

1. 一种构建体,其是式1的肿瘤坏死因子受体1 (TNFR1) 拮抗剂构建体:
(TNFR1抑制剂)_n-接头_p-(活性调节剂)_q,其中:
n和q各自为整数,且各自独立地为1、2或3;
p是0、1、2或3;
TNFR1抑制剂是结合TNFR1以抑制(拮抗)TNFR1活性的分子;
活性调节剂是与不存在所述活性调节剂的构建体相比,调节或改变构建体的活性或药理学性质的部分;和
接头增加所述构建体的柔性,和/或缓和或减少所述构建体的空间效应或其与受体的相互作用,和/或增加所述构建体在水性介质中的溶解度。
2. 根据权利要求1的构建体,其中所述接头选自化学接头、多肽接头及其组合。
3. 根据权利要求1或权利要求2的构建体,其是融合蛋白。
4. 根据权利要求1至3任一项的构建体,其中所述接头含有多个接头组分。
5. 根据权利要求1至4任一项的构建体,其中所述TNFR1抑制剂包含域抗体(dAb)。
6. 根据权利要求1至5任一项的构建体,其中,如果所述TNFR1抑制剂是域抗体(dAb),则所述活性调节剂不是未修饰的单个Fc区且不是人血清白蛋白抗体。
7. 根据权利要求1至6任一项的构建体,其中所述TNFR1抑制剂抑制TNFR1信号传导。
8. 根据权利要求1至7任一项的构建体,其中所述活性调节剂增加所述构建体的血清半衰期。
9. 根据权利要求1至8任一项的构建体,其中所述活性调节剂是白蛋白或修饰为具有降低的或没有ADCC活性和/或降低的或没有CDC活性的Fc。
10. 根据权利要求1至9任一项的构建体,其中所述TNFR1抑制剂抑制TNFR1活性,但不拮抗肿瘤坏死因子受体2(TNFR2)活性。
11. 根据权利要求10的构建体,其中所述TNFR1抑制剂抑制TNFR1信号传导。
12. 一种构建体,其是多特异性构建体,其包含TNFR1抑制剂和Treg扩增物,其中双特异性构建体与两种不同的靶受体或受体上的抗原或表位相互作用。
13. 根据权利要求12的构建体,其对TNFR1和Treg扩增物是双特异性的。
14. 根据权利要求12或权利要求13的构建体,其中所述Treg扩增物是TNFR2激动剂。
15. 根据权利要求12至14任一项的构建体,其包含接头以提供柔性、增加溶解度或减轻或减少空间位阻或范德华相互作用。
16. 根据权利要求12至15任一项的构建体,进一步包含活性调节剂以改变所述构建体的活性。
17. 根据权利要求12至16任一项的构建体,其具有式2:
(TNFR1抑制剂)_n-(活性调节剂)_{r1}-(接头(L))_p-(活性调节剂)_{r2}-(TNFR2激动剂)_q,或
(TNFR1抑制剂)_n-(活性调节剂)_{r1}-(接头(L))_p-(活性调节剂)_{r2}-(Treg扩增物)_q,
其中:
n=1、2或3,p=1、2或3,q=0、1或2,r1和r2各自独立地为0、1或2;和
组分可以是所指定的顺序或任何其它顺序,只要所述构建体与TNFR1和TNFR2相互作用以拮抗TNFR1和激动TNFR2,或具有Treg扩增物活性。
18. 根据权利要求1至17任一项的构建体,其中所述TNFR1抑制剂部分抑制TNFα与TNFR1

的结合和/或抑制信号传导。

19. 式3a或3b的构建体:

(TNFR2激动剂或Treg扩增物)_n-接头_p-(活性调节剂)_q, 式3a, 或
(活性调节剂)_q-接头_p-(TNFR2激动剂或Treg扩增物)_n, 式3b, 其中:

n和q各自为整数, 且各自独立地为1、2或3; p是0、1、2或3;

活性调节剂是改变所述构建体的药理学性质的部分;

TNFR2激动剂与TNFR2相互作用, 导致TNFR2活性;

Treg扩增物, 包括TNFR2激动剂, 并且是导致Treg细胞增加的分子; 和

接头增加所述构建体的柔性和/或缓和或减少所述构建体的空间效应或其与受体的相互作用; 和/或改变构建体的溶解度。

20. 根据权利要求1至19任一项的构建体, 其中所述活性调节剂是Fc区或修饰的Fc区或短FcRnBP; 和

所述接头包含铰链区, 或者是包含G和S残基的接头。

21. 根据权利要求1至20任一项的构建体, 其中所述接头具有SEQ ID NO:812-834任一项所示序列或者是PEG部分接头。

22. 根据权利要求1至21任一项的构建体, 其包含活性调节剂, 所述活性调节剂是增加所述构建体的血清半衰期的修饰的Fc区或肽。

23. 根据权利要求1至22任一项的构建体, 其包含Fc区或Fc二聚体。

24. 根据权利要求1至23任一项的构建体, 其包含被修饰以具有降低的ADCC和/或CDC活性的Fc区。

25. 根据权利要求24的构建体, 其中所述Fc被修饰为具有降低的ADCC活性或没有ADCC活性。

26. 根据权利要求1至25任一项的构建体, 其中:

所述TNFR1抑制剂是序列表中定义的、下文列出的或本领域已知的任何抑制剂;

所述Treg扩增物是本领域已知的任何一种, 是TNFR2激动剂, 或序列表中所示、下文所列或本领域已知的任何Treg扩增物;

所述接头是序列表或下文中所列的或本领域已知的任何接头; 和

所述活性调节剂是序列表中列出的、本领域已知的和/或下文列出的任何活性调节剂。

27. 一种构建体, 其是TNFR1拮抗剂构建体, 其包含TNFR1抑制剂, 所述TNFR1抑制剂是特异性靶向并抑制TNFR1、但不拮抗TNFR2, 从而阻止TNFR1通过受体簇集的瞬时激活的单链抗体或其抗原结合部分。

28. 根据权利要求27的构建体, 其中所述抗体或其抗原结合部分包含改善所述构建体的药理学性质和/或结构的修饰。

29. 根据权利要求1至28任一项的构建体, 其激动TNFR2信号传导从而增加调节性T细胞(Treg)的表达。

30. 根据权利要求27至29任一项的构建体, 其中所述单链抗体通过抑制TNFR1信号传导来抑制TNFR1。

31. 根据权利要求27至30任一项的TNFR1拮抗剂构建体, 其中所述构建体的抗体部分或抗原结合部分抑制TNF α 与TNFR1的结合。

32. 根据权利要求27至30任一项的构建体,其中所述构建体的抗体或抗原结合部分不抑制TNF α 与TNFR1的结合,但抑制TNFR1信号传导。

33. 根据权利要求28至32任一项的构建体,其中所述药理学性质是增加的血清半衰期。

34. 根据权利要求27至33任一项的构建体,其中所述TNFR1构建体包含被修饰以消除ADCC和/或CDC活性的Fc。

35. 根据权利要求27至34任一项的构建体,其中所述TNFR1构建体包含Fc二聚体。

36. 根据权利要求35的构建体,其中一个Fc单体包含凹陷,而另一个Fc单体包含凸出,以形成异二聚体。

37. 根据权利要求35的构建体,其中:

凸出突变选自EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W;和

凹陷突变选自EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V,由此Fc单体形成异二聚体。

38. 根据权利要求1至37任一项的构建体,其包含Fc,其中所述Fc来自曲妥珠单抗。

39. 根据权利要求38的构建体,其包含接头,所述接头是来自Fc区的铰链区。

40. 根据权利要求39的构建体,其中所述铰链区来自曲妥珠单抗,并与Fc区连接。

41. 根据权利要求27至40任一项的构建体,其包含与抗-TNFR1拮抗剂抗体或其抗原结合部分连接的接头。

42. 根据权利要求27至41的构建体,其包含与抗-TNFR1拮抗剂抗体或其抗原结合部分连接、直接或通过铰链区与Fc区连接的接头。

43. 根据权利要求1至42任一项的构建体,其包含Fc区或修饰的Fc区,其包含SEQ ID NO:10、12、14、16、27、30、1469和1470任一项所示的氨基酸序列。

44. 根据权利要求1至43任一项的构建体,其中所述构建体包含与Fc部分连接的铰链区。

45. 根据权利要求1至44任一项的构建体,其中所述构建体结合新生儿Fc受体(FcRn)。

46. 根据权利要求45的构建体,其中:

所述TNFR1构建体包含短FcRn结合肽(FcRnBP);和

短FcRn结合肽(FcRnBP)提供所述构建体与FcRn的相互作用,并含有6-25个或10-20个氨基酸残基。

47. 根据权利要求46的TNFR1拮抗剂构建体,其中所述FcRnBP含有12-20个残基或15个残基或16个残基。

48. 根据权利要求46或权利要求47的TNFR1拮抗剂构建体,其中所述FcRn结合肽(FcRnBP)包含SEQ ID NO:48-51任一所示的肽。

49. 根据权利要求46至48任一项的TNFR1拮抗剂构建体,其中所述FcRn结合肽(FcRnBP)由SEQ ID NO:48-51任一所示的肽组成。

50. 根据权利要求1至49任一项的构建体,其中所述TNFR1构建体包含Fc异二聚体,其中一个Fc单体包含凹陷,而另一个包含凸出,由此产生的Fc二聚体是异二聚体。

51. 根据权利要求1至50任一项的构建体,其是TNFR1拮抗剂构建体,包含:

TNFR1抑制剂;

Fc二聚体;和

Treg扩增物,其中:

所述Fc二聚体包含两个互补Fc单体;

所述TNFR1抑制剂与所述Fc单体之一连接,并且所述Treg扩增物与另一Fc单体连接。

52. 根据权利要求51的构建体,其中所述Treg扩增物是TNFR2激动剂。

53. 根据权利要求51或权利要求52的构建体,其进一步包含连接至与所述TNFR1抑制剂相同的Fc单体的第二Treg扩增物,其中所述第一和第二Treg扩增物是相同的或不同的。

54. 根据权利要求53的构建体,其中所述第二Treg扩增物是TNFR2激动剂。

55. 根据权利要求53的构建体,其中所述Treg扩增物是相同的。

56. 根据权利要求51至55任一项的构建体,其中所述TNFR1抑制剂抑制或阻断TNFR1信号传导。

57. 根据权利要求51至56任一项的构建体,其中所述TNFR1抑制剂结合TNFR1并阻断或抑制TNF α 结合和TNFR1信号传导。

58. 根据权利要求51至56任一项的构建体,其中所述TNFR1抑制剂结合TNFR1,不干扰TNF α 结合,并且阻断或抑制TNFR1信号传导。

59. 根据权利要求51至58任一项的构建体,其中所述Treg扩增物是TNFR2激动剂。

60. 根据权利要求59的构建体,其中所述TNFR2激动剂刺激或诱导TNFR2信号传导。

61. 根据权利要求51至60任一项的构建体,其中所述Treg扩增物是TNFR2激动剂,其是scFv、VHH单域抗体或TNFR2激动剂单克隆抗体的Fab。

62. 根据权利要求1至61任一项的构建体,其包含曲妥珠单抗的全部或一部分,并且通过N-末端与曲妥珠单抗的C-末端的融合而二聚化。

63. 根据权利要求7至16任一项的构建体,其中所述Treg扩增物是TNFR2激动剂,其是小分子、或核酸适体,或肽适体。

64. 根据权利要求1至63任一项的构建体,其是式3的TNFR2激动剂构建体:

(Treg扩增物)_n-接头_p-(活性调节剂)_q,式3a,或

(活性调节剂)_q-接头_p-(Treg扩增物)_n,式3b,其中:

n和q各自为整数,且各自独立地为1、2或3;

p是0、1、2或3;

活性调节剂是与不存在所述活性调节剂的构建体相比,调节或改变所述构建体的活性或药理学性质的部分;和

所述接头增加所述构建体的柔性,和/或缓和或减少所述构建体的空间效应或其与受体的相互作用,和/或增加所述构建体在水性介质中的溶解度。

65. 根据权利要求51至64任一项的构建体,其中所述Treg扩增物是TNFR2激动剂。

66. 根据权利要求65的构建体,其中所述TNFR2激动剂刺激或诱导TNFR2信号传导。

67. 根据权利要求51至66任一项的构建体,其中所述Treg扩增物是TNFR2激动剂,其是scFv、VHH单域抗体或TNFR2激动剂单克隆抗体的Fab。

68. 根据权利要求67的构建体,其通过N-末端与曲妥珠单抗的C-末端融合而二聚化。

69. 根据权利要求51至68任一项的TNFR1拮抗剂构建体,其中所述Treg扩增物是TNFR2激动剂,其是小分子、或核酸、或肽适体。

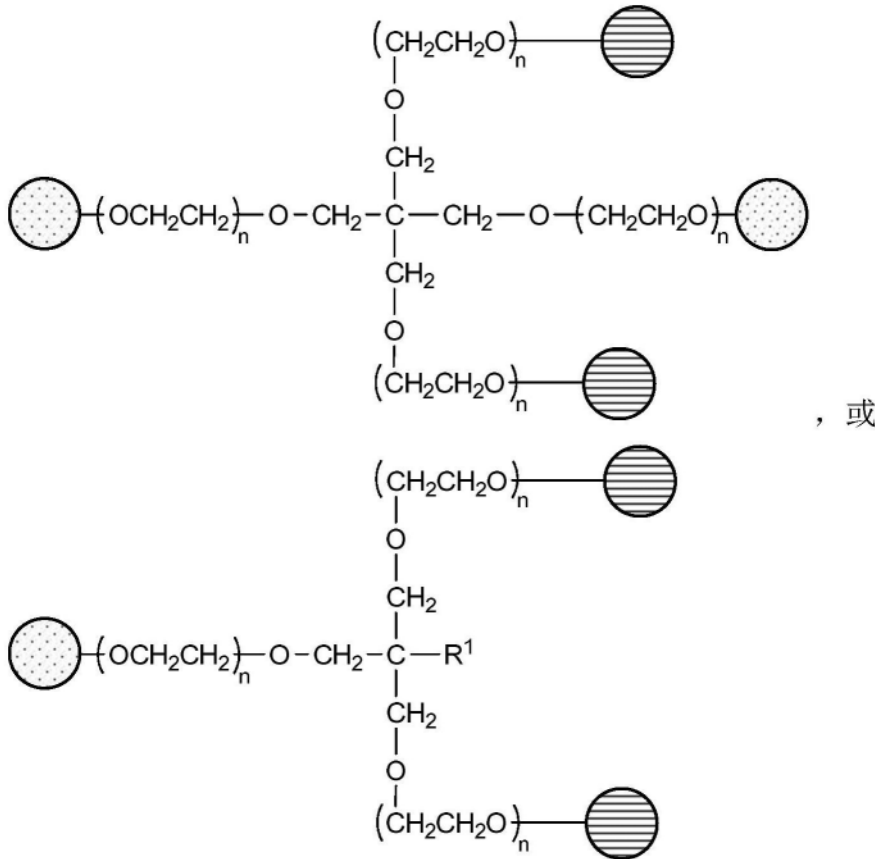
70. 一种构建体,其包含通过中央PEG接头连接至一个或多个Treg扩增物的TNFR1抑制

剂部分,或包含至少两个相同或不同的TNFR1抑制剂,或包含两个相同或不同的Treg扩增物。

71. 根据权利要求70的构建体,其包含连接所述TNFR1抑制剂和一个或多个Treg扩增物的支链PEG部分。

72. 根据权利要求70或权利要求71的构建体,其具有选自式4A至4D的结构:

式4A:



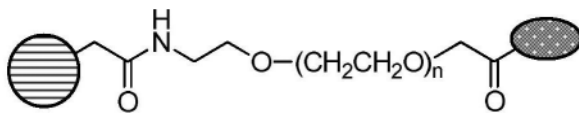
n是1至5;

R¹是H或CH₃、或CH₂CH₃或其它C1-C5烷基;

是TNFR1抑制剂 (TNFR1拮抗剂);

是Treg扩增物;或

式4B:

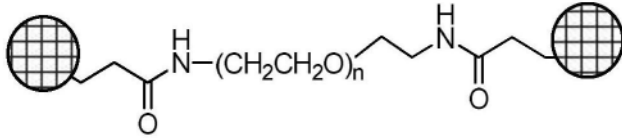


是TNFR1抑制剂 (TNFR1拮抗剂);

是Treg扩增物;

n是1至5;或

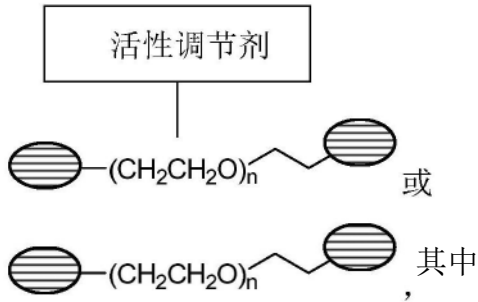
式4C:




是TNFR1抑制剂(TNFR1拮抗剂),或是Treg扩增物;及

n是1至5;或

式4D:



每个是相同或不同的,且各自独立地选自TNFR1抑制剂(TNFR1拮抗剂)和TNFR2激动剂;

所述活性调节剂是任选存在的,并且可以连接于所述分子中的任何合适的位点;及
n是1至5。

73. 根据权利要求70至72任一项的构建体,其中所述Treg扩增物是TNFR2激动剂。

74. 根据权利要求1至73任一项的构建体,其包含活性调节剂,其中:

所述活性调节剂是Fc区,或者是包括铰链区或其它接头的Fc区;和

所述Fc区或具有铰链区的Fc区是经修饰以降低或消除ADCC和/或CDC活性的Fc。

75. 根据权利要求74的构建体,其中所述Fc或经修饰的Fc是IgG Fc或者是IgG1或IgG4 Fc。

76. 根据权利要求1至75任一项的构建体,其结合新生儿Fc受体(FcRn)。

77. 根据权利要求76的构建体,其中:

所述构建体包含短FcRn结合肽(FcRnBP);和

所述短FcRn结合肽(FcRnBP)提供所述构建体与FcRn的相互作用,并含有6-25个例如10-20个氨基酸残基。

78. 根据权利要求77的构建体,其中所述FcRnBP含有12-20个残基或15个残基或16个残基。

79. 根据权利要求78的TNFR1拮抗剂构建体,其中所述FcRn结合肽(FcRnBP)包含SEQ ID NO: 48-51任一所示的肽。

80. 根据权利要求78的TNFR1拮抗剂构建体,其中所述FcRn结合肽(FcRnBP)由SEQ ID NO: 48-51任一所示的肽组成。

81. 根据权利要求1至80任一项的构建体,其是TNFR1拮抗剂构建体,包含:

a) TNFR1选择性的TNFR1抑制剂部分;

- b) 任选存在的一个或多个接头;和
- c) 任选存在的半衰期延长部分,其中所述拮抗剂构建体包含b)和c)至少之一。

82. 根据权利要求81的构建体,其中所述TNFR1选择性拮抗剂选择性结合并抑制TNFR1信号传导,而不结合和不抑制TNFR2信号传导。

83. 根据权利要求81或权利要求82的构建体,其中所述TNFR1抑制剂是选择性拮抗剂,包含选择性结合并抑制TNFR1信号传导而不结合和不抑制TNFR2信号传导的抗原结合片段。

84. 根据权利要求83的构建体,其中所述选择性结合并抑制TNFR1信号传导而不结合和不抑制TNFR2信号传导的抗原结合片段包含域抗体(dAb)、scFv或Fab片段。

85. 根据权利要求1至84任一项的构建体,其中所述TNFR1抑制剂包含人抗TNFR1拮抗剂单克隆抗体的抗原结合片段。

86. 根据权利要求85的构建体,其中所述人抗TNFR1拮抗剂单克隆抗体是包含SEQ ID NO:678的H398,或者是ATROSAB,或者是其抗原结合部分,或者具有与SEQ ID NO:31或32或673或678具有至少95%序列相同性的序列,或是其结合TNFR1的抗原结合部分。

87. 根据权利要求1至86任一项的构建体,其中所述TNFR1抑制剂包含域抗体(dAb),或其抗原结合部分或包含SEQ ID NO:52-672任一所示的氨基酸序列,或保留TNFR1抑制剂活性的与其具有至少95%序列相同性的序列。

88. 根据权利要求1至87任一项的构建体,其中所述TNFR1抑制剂包含SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或保留TNFR1抑制剂活性的与其具有至少90%或95%序列相同性的这些多肽的变体。

89. 根据权利要求1至88任一项的构建体,其中所述TNFR1抑制剂包含SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab或保留TNFR1抑制剂活性或结合活性的与其具有至少90%或95%序列相同性的序列。

90. 根据权利要求1至89任一项的构建体,其中所述TNFR1抑制剂包含其序列如SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体或保留TNFR1抑制剂活性或结合活性的与其具有至少90%或95%序列相同性的序列。

91. 根据权利要求1至90任一项的构建体,其中所述TNFR1抑制剂包含显性阴性肿瘤坏死因子(DN-TNF)或TNF突变蛋白。

92. 根据权利要求91的构建体,其中所述DN-TNF或TNF突变蛋白是可溶的TNF分子,包含一个或多个氨基酸置换,所述一或多个氨基酸置换赋予选择性抑制TNFR1并且选自:

V1M,L29S,L29G,L29Y,R31C,R31E,R31N,R32Y,R32W,C69V,A84S,V85T,S86T,Y87H,Q88N,T89Q,I97T,C101A,A145R,E146R,L29S/R32W,L29S/S86T,R32W/S86T,L29S/R32W/S86T,R31N/R32T,R31E/S86T,R31N/R32T/S86T,I97T/A145R,V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R,及A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q,参考SEQ ID NO:2所示的可溶的TNF序列。

93. 根据权利要求91或权利要求92的构建体,其中所述TNFR1抑制剂TNF突变蛋白包含SEQ ID NO:701-703任一所示的残基序列,或与SEQ ID NO:701-703任一所示的残基序列具有至少90%或95%或至少约90%或95%序列相同性的序列或其保留TNFR1抑制剂活性的片段。

94. 根据权利要求1至93任一项的构建体,其包含接头,其中所述接头包含曲妥珠单抗

的全部或部分铰链序列、对应于SEQ ID NO:26的残基222-227的SCDKTH或直到曲妥珠单抗铰链区的全部序列,其含有或具有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233),或其至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基,或SEQ ID NO:29的残基212-223残基ESKYGPPCPPCP,或是接头的与其具有至少98%或99%序列相同性的序列。

95. 根据权利要求1至94任一项的构建体,其包含接头,其中所述接头包含序列SCDKTH,对应于SEQ ID NO:26的残基222-227。

96. 根据权利要求1至95任一项的构建体,其包含接头,其中所述接头包含甘氨酸-丝氨酸(GS)接头。

97. 根据权利要求96的构建体,其中GS接头选自 $(\text{GlySer})_n$, 其中 $n=1-10$; (GlySer_2) ; $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$; 其中 $n=1-10$; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$, 其中 $n=1-5$; $(\text{SerGly}_4)_n$, 其中 $n=1-5$; $(\text{GlySerSerGly})_n$, 其中 $n=1-5$; GSGGSSGG; GSSSGSGSGSSG; GSSSGSGSGSSGG; GGSSGG; GGSSGGSGSSSG; GSSSGSGSGSSSGSGSG; GGSSGGSSGGSSSGSSG; 和GSSSGS。

98. 根据权利要求1至97任一项的构建体,其包含接头,其中所述接头包含GS接头和曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列,对应于残基EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:26的219-233)。

99. 根据权利要求1至98任一项的构建体,其中所述接头包含GS接头并且包含序列SCDKTH,对应于SEQ ID NO:31的残基217-222。

100. 根据权利要求1至99任一项的构建体,其中所述接头包含GS接头和纳武单抗的全部或部分铰链序列,对应于SEQ ID NO:29的残基212-223。

101. 根据权利要求1至100任一项的构建体,其包含活性调节剂,其中所述活性调节剂是半衰期延长部分,其是IgG Fc、聚乙二醇(PEG)分子或人血清白蛋白(HSA)。

102. 根据权利要求101的构建体,其中所述IgG Fc是IgG1或IgG4 Fc。

103. 根据权利要求101或权利要求102的构建体,其中所述IgG1 Fc是SEQ ID NO:27所示的曲妥珠单抗的Fc,或与其具有至少95%序列相同性的氨基酸序列。

104. 根据权利要求101或权利要求102的构建体,其中所述IgG4 Fc是SEQ ID NO:30所示的纳武单抗的Fc,或与其具有至少95%序列相同性的氨基酸序列。

105. 根据权利要求101-104任一项的构建体,其中所述IgG1 Fc是SEQ ID NO:10所示的人IgG1的Fc。

106. 根据权利要求101至104任一项的构建体,其中所述IgG4 Fc是SEQ ID NO:16所示的人IgG4的Fc。

107. 根据权利要求1至106任一项的构建体,其包含TNFR1抑制剂,其中所述TNFR1抑制剂是单价的。

108. 根据权利要求81至107任一项的构建体,其包含接头,其中所述接头包含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 。

109. 根据权利要求81至107任一项的构建体,其包含接头,其中所述接头包含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 和SCDKTH (SEQ ID NO:31的残基217-222)。

110. 根据权利要求1至109任一项的构建体,其包含接头,其中所述接头包含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 和曲妥珠单抗的铰链序列,对应于SEQ ID NO:26的残基219-233。

111. 根据权利要求1至109任一项的构建体,其包含接头,其中所述接头包含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$

和纳武单抗的铰链序列,对应于SEQ ID NO:29的残基212-223。

112. 根据权利要求1至111任一项的构建体,其包含SEQ ID NO:704-764任一所示的残基序列,或抑制TNFR1并且具有与SEQ ID NO:704-764任一所示残基序列具有至少或至少约95%序列相同性的序列的构建体。

113. 根据权利要求1至112任一项的构建体,其是TNFR1拮抗剂构建体,其中:

所述TNFR1构建体包含短FcRn结合肽(FcRnBP);和

短FcRn结合肽(FcRnBP)提供所述构建体与FcRn的相互作用,并含有6-25个如10-20个氨基酸残基。

114. 根据权利要求113的构建体,其中所述FcRnBP含有12-20个残基或15个残基或16个残基。

115. 根据权利要求113的构建体,其中所述FcRn结合肽(FcRnBP)包含SEQ ID NO:48-51任一所示的肽。

116. 根据权利要求113的TNFR1拮抗剂构建体,其中所述FcRn结合肽(FcRnBP)由SEQ ID NO:48-51任一所示的肽组成。

117. 根据权利要求1至116任一项的构建体,包含:

a) 抑制TNFR1的域抗体;

b) 增加柔性、减少空间效应、或增加溶解度的接头;和

c) 半衰期延长部分。

118. 根据权利要求117的构建体,其中所述半衰期延长部分不是人血清白蛋白抗体和不是未修饰的Fc。

119. 根据权利要求117或权利要求118任一项的构建体,其是TNFR1拮抗剂,包含:

a) SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb),或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab,或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体,或SEQ ID NO:685-703任一所示的TNF突变蛋白;

b) GS接头,其选自 $(\text{GlySer})_n$,其中 $n=1-10$; (GlySer_2) ; $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$,其中 $n=1-10$; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{SerGly}_4)_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{GlySerSerGly})_n$,其中 $n=1-5$; GSGGSSGG; GSSSGSGSGSSG; GSSSGSGSGSSGG; GGSSGG; GGSSGGSGGSSSG; GSSSGSGSGGSSSGSGSG; GGSSGGSSGGGSSSGSSG; 和GSSSGS; 及

c) 半衰期延长部分,其是IgG Fc。

120. 根据权利要求117至119任一项的TNFR1拮抗剂构建体,其中:

所述GS接头是 $(\text{GGGS})_3$;和

所述IgG Fc是曲妥珠单抗的Fc或纳武单抗的Fc。

121. 根据权利要求1至120任一项的构建体,其是TNFR1拮抗剂构建体,包含:

a) SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb),或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab,或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体,或SEQ ID NO:685-703任一所示的TNF突变蛋白;

b) 选自曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列和纳武单抗的全部或部分铰链序列的接头;和

c) 半衰期延长部分,其是IgG Fc。

122. 根据权利要求121的构建体,其中:

所述接头包含曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列;和

所述IgG Fc是曲妥珠单抗的Fc。

123. 根据权利要求121的构建体,其中:

所述接头包含纳武单抗的全部或部分铰链序列;和

所述IgG Fc是纳武单抗的Fc。

124. 根据权利要求1至123任一项的构建体,其是TNFR1拮抗剂构建体,包含:

a) SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb),或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab,或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体,或SEQ ID NO:685-703任一所示的TNF突变蛋白;

b) GS接头,选自 $(\text{GlySer})_n$,其中 $n=1-10$; (GlySer_2) ; $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$,其中 $n=1-10$; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{SerGly}_4)_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{GlySerSerGly})_n$,其中 $n=1-5$; GSGSSGG; GSSSGSGSGSSG; GSSSGSGSGSSG; GGSSGG; GGSSGGSGSSSG; GSSSGSGSGSSSGSGSG; GGSSGGSSGGSSGGSSG; 和GSSSGS;

c) 选自曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列和纳武单抗的全部或部分铰链序列的第二接头;和

d) 半衰期延长部分,其是IgG Fc。

125. 根据权利要求124的构建体,其中:

所述GS接头是 $(\text{GGGS})_3$;

所述第二接头包含序列SCDKTH(SEQ ID NO:31的残基217-222);和

所述IgG Fc是曲妥珠单抗的Fc。

126. 根据权利要求124的构建体,其中:

所述GS接头是 $(\text{GGGS})_3$;

所述第二接头包含纳武单抗的全部或部分铰链序列;和

所述IgG Fc是纳武单抗的Fc。

127. 一种构建体,其是TNFR1激动剂,包含:

a) SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb),或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab,或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体,或SEQ ID NO:685-703任一所示的TNF突变蛋白;

b) GS接头,选自 $(\text{GlySer})_n$,其中 $n=1-10$; (GlySer_2) ; $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$,其中 $n=1-10$; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{SerGly}_4)_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{GlySerSerGly})_n$,其中 $n=1-5$; GSGSSGG; GSSSGSGSGSSG; GSSSGSGSGSSG; GGSSGG; GGSSGGSGSSSG; GSSSGSGSGSSSGSGSG; GGSSGGSSGGSSGGSSG; 和GSSSGS; 及

c) 半衰期延长部分,其是PEG分子。

128. 根据权利要求127的构建体,其中所述GS接头是 $(\text{GGGS})_3$ 。

129. 根据权利要求127或权利要求128的构建体,其中所述PEG分子具有30kDa或更大的分子量。

130. 根据权利要求1至129任一项的构建体,其是TNFR1激动剂构建体,包含:

a) SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb),或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv

或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab,或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体,或SEQ ID NO:685-703任一所示的TNF突变蛋白;

b) GS接头,选自 $(\text{GlySer})_n$,其中 $n=1-10$; $(\text{GlySer}_2)_n$; $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$,其中 $n=1-10$; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{SerGly}_4)_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{GlySerSerGly})_n$,其中 $n=1-5$; GSGSSGG;GSSSGSGSGSSG;GSSSGSGSGSSGG;GGSSGG;GGSSGGSGSSSG;GSSSGSGSGSSSGSGSG;GGSSGGSSGGSSGGSSG;和GSSSGS;及

c) 半衰期延长部分,其是人血清白蛋白。

131. 根据权利要求130的构建体,其中所述GS接头是 $(\text{GGGS})_3$ 。

132. 根据权利要求1至131任一项的构建体,其是TNFR1拮抗剂,其中所述构建体被优化以消除免疫原性序列或免疫原性表位。

133. 根据权利要求1至132任一项的构建体,其中所述IgG Fc包含以下修饰中的一个或多个:

a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰;

b) 增加或增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的一或多个修饰;和

c) 减少或消除免疫效应子功能的一或多个修饰。

134. 根据权利要求133的TNFR1拮抗剂构建体,其中:

所述凸出突变选自根据EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W;和

所述凹陷突变选自根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V。

135. 根据权利要求133或权利要求134的TNFR1拮抗剂构建体,其中增加或增强FcRn再循环的一或多个修饰选自以下的一种或多种:

根据EU编号的T250Q,T250R,M252F,M252W,M252Y,S254T,T256D,T256E,T256Q,V259I,V308F,E380A,M428L,H433K,N434F,N434A,N434W,N434S,N434Y,Y436H,M252Y/T256Q,M252F/T256D,M252Y/S254T/T256E,H433K/N434F/Y436H,N434F/Y436H,T250Q/M428L,T250R/M428L,M428L/N434S,V259I/V308F,V259I/V308F/M428L,E294del/T307P/N434Y,和T256N/A378V/S383N/N434Y。

136. 根据权利要求133至135任一项的TNFR1拮抗剂构建体,其中所述免疫效应子功能选自以下的一种或多种:补体依赖性细胞毒性(CDC),抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)。

137. 根据权利要求136的TNFR1拮抗剂构建体,其中用于降低或消除免疫效应子功能的一或多个修饰选自以下的一种或多种:

在IgG1中:根据EU编号的L235E,L234A/L235A,L234E/L235F/P331S,L234F/L235E/P331S,L234A/L235A/P329G,L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S,G236R/L328R,G237A,E318A,D265A,E233P,N297A,N297Q,N297D,N297G,N297G/D265A,A330L,D270A,P329A,P331A,K322A,V264A,和F241A;及

在IgG4中,根据EU编号的L235E,F234A/L235A,S228P/L235E,和S228P/F234A/L235A。

138. 根据权利要求1至137任一项的构建体,其是TNFR1拮抗剂或多特异性的或包含中心PEG接头部分,并且所述构建体包含经修饰的Fc区。

139. 根据权利要求138的构建体,其中所述Fc区是经修饰的IgG Fc并且所述经修饰的IgG Fc包含以下修饰中的一或多种:

a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰,其中:

所述凸出突变选自根据EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W;和

所述凹陷突变选自根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V;

b) 增加或增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的一或多个修饰,其中所述修饰选自以下的一种或多种:

根据EU编号的T250Q, T250R, M252F, M252W, M252Y, S254T, T256D, T256E, T256Q, V259I, V308F, E380A, M428L, H433K, N434F, N434A, N434W, N434S, N434Y, Y436H, M252Y/T256Q, M252F/T256D, M252Y/S254T/T256E, H433K/N434F/Y436H, N434F/Y436H, T250Q/M428L, T250R/M428L, M428L/N434S, V259I/V308F, V259I/V308F/M428L, E294del/T307P/N434Y, 和 T256N/A378V/S383N/N434Y; 及

c) 增加或增强一种或多种免疫效应子功能的一或多个修饰,其中:

所述一种或多种免疫效应子功能选自CDC、ADCC和ADCP中的一种或多种;和

增加或增强免疫效应子功能的一或多个修饰选自以下的一或多个:

在IgG1中:根据EU编号, S239D, I332E, S239D/I332E, S239D/A330L/I332E, S298A/E333A/K334A; F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L; L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L; F243L/R292P/Y300L; 在第一重链中的L234Y/G236W/S298A及在第二重链中的S239D/A330L/I332E; 第一重链中的L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A和第二重链中的D270E/K326D/A330M/K334E; A327Q/P329A; D265A/S267A/H268A/D270A/K326A/S337A; T256A/K290A/S298A/E333A/K334A; G236A; G236A/I332E; G236A/S239D/I332E; G236A/S239D/A330L/I332E; 在残基N297引入双触角聚糖; 在残基N297引入去岩藻糖基化聚糖; K326W; K326A; E333A; K326A/E333A; K326W/E333S; K326M/E333S; K222W/T223W; K222W/T223W/H224W; D221W/K222W; C220D/D221C; C220D/D221C/K222W/T223W; H268F/S324T; S267E; H268F; S324T; S267E/H268F/S324T; G236A/I332E/S267E/H268F/S324T; E345R; 和 E345R/E430G/S440Y。

140. 根据权利要求1至139任一项的构建体,其包含Fc区,其包含IgG1 Fc,其包含一个或多个修饰以增加与抑制性Fc γ 受体(Fc γ R)Fc γ RIIb的结合。

141. 根据权利要求140的TNFR1拮抗剂构建体,其中增加与Fc γ RIIb结合的所述修饰选自以下的一或多个:根据EU编号的S267E、N297A、L328F、L351S、T366R、L368H、P395K、S267E/L328F和L351S/T366R/L368H/P395K。

142. 一种构建体,其是Treg扩增物构建体,包含:

a) Treg扩增物;

b) 接头,其中接头增加所述构建体的柔性,和/或缓和或降低所述构建体的空间效应或其与受体的相互作用,和/或增加所述构建体在水性介质中的溶解度;和

c) 活性调节剂,其中活性调节剂是与不存在所述活性调节剂的构建体相比,调节或改变所述构建体的活性或药理学性质的部分。

143. 根据权利要求142或权利要求1至141任一项的构建体,其包含Treg扩增物,其中所述Treg扩增物是TNFR2激动剂。

144. 根据权利要求142或权利要求143的构建体,其进一步包含TNFR1-抑制剂。

145. 根据权利要求143或权利要求144的构建体,其中所述TNFR2激动剂是TNFR2选择性

激动剂。

146. 根据权利要求1至145任一项的构建体,其是TNFR2激动剂构建体,包含:

a) TNFR2激动剂;

b) 接头,其中接头增加所述构建体的柔性,和/或缓和或降低所述构建体的空间效应或其与受体的相互作用,和/或增加所述构建体在水性介质中的溶解度;和

c) 活性调节剂,其中活性调节剂是与不存在所述活性调节剂的构建体相比,调节或改变所述构建体的活性或药理学性质的部分。

147. 根据权利要求146的构建体,其中所述TNFR2激动剂是TNFR2选择性激动剂。

148. 根据权利要求142至147任一项的构建体,其包含活性调节剂,其中所述活性调节剂是半衰期延长部分。

149. 根据权利要求142至148任一项的构建体,其中所述TNFR2激动剂选择性激活或拮抗TNFR2,而不激活或拮抗TNFR1。

150. 根据权利要求1至149任一项的构建体,其包含TNFR2激动剂,其中所述TNFR2激动剂结合TNFR2内的一个或多个表位。

151. 根据权利要求150的构建体,其中所述TNFR2是人TNFR2。

152. 根据权利要求151的构建体,其中所述表位选自包含SEQ ID NO:839-865、1202和1204所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:839-865、1202和1204所示的氨基酸序列组成的表位的一个或多个。

153. 根据权利要求149至152任一项的构建体,其中所述TNFR2激动剂包含激动剂人抗TNFR2抗体或人源化抗TNFR2抗体的抗原结合片段,或其抗原结合部分,或其单链形式。

154. 根据权利要求153的构建体,其中所述激动剂抗-TNFR2抗体选自MR2-1(也称为ab8161;美国专利号9,821,010)或MAB2261(美国专利号9,821,010)。

155. 根据权利要求149至154任一项的构建体,其中所述TNFR2激动剂是选自dAb、scFv或Fab片段的抗原结合片段。

156. 根据权利要求149至155任一项的构建体,其中所述TNFR2激动剂是TNFR2选择性激动剂。

157. 根据权利要求1至156任一项的构建体,其包含TNFR2激动剂,其中所述TNFR2激动剂包含TNFR2激动剂TNF突变蛋白。

158. 根据权利要求157的构建体,其中所述TNFR2突变蛋白是可溶的TNF变体,其包含一个或多个选自以下的TNFR2选择性突变:K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V,A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D,Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D,L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D,A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D,A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D,D143V/F144L/A145S,S95C/G148C,和D143V/A145S,及前述任何突变的组合,均参考SEQ ID NO:2。

159. 根据权利要求157的构建体,其中所述TNFR2激动剂是包含突变D143N/A145R的TNF突变蛋白。

160. 根据权利要求142至159任一项的构建体,其中所述接头包含对应于SEQ ID NO:26

的残基219-233的曲妥珠单抗的铰链序列的全部或部分,或包含对应于SEQ ID NO:29的残基212-223的纳武单抗的铰链序列的全部或部分。

161. 根据权利要求1至160任一项的构建体,其包含接头,其中所述接头包含序列SCDKTH,对应于SEQ ID NO:31的残基217-222。

162. 根据权利要求161任一项的构建体,其包含接头,其中所述接头包含甘氨酸-丝氨酸(GS)接头。

163. 根据权利要求162的构建体,其中所述GS接头选自 $(\text{GlySer})_n$,其中 $n=1-10$; (GlySer_2) ; $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$,其中 $n=1-10$; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{SerGly}_4)_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{GlySerSerGly})_n$,其中 $n=1-5$; GSGGSSGG; GSSSGSGSGSSG; GSSSGSGSGSSGG; GGSSGG; GGSSGGSGSSSG; GSSSGSGSGSSSGSGSG; GGSSGGSSGGSSSGSSG; 和GSSSGS。

164. 根据权利要求146至163任一项的构建体,其中所述接头包含GS接头和对应于SEQ ID NO:26的残基219-233的曲妥珠单抗的铰链序列的全部或部分。

165. 根据权利要求146至163任一项的构建体,其中所述接头包含GS接头和序列SCDKTH,对应于SEQ ID NO:31的残基217-222。

166. 根据权利要求146至163任一项的构建体,其中所述接头包含GS接头和对应于SEQ ID NO:29的残基212-223的纳武单抗的铰链序列的全部或部分。

167. 根据权利要求1至166任一项的构建体,其包含半衰期延长部分,其中所述半衰期延长部分是IgG Fc、聚乙二醇(PEG)分子或人血清白蛋白(HSA)。

168. 根据权利要求167的构建体,其中所述IgG Fc是IgG1或IgG4 Fc。

169. 根据权利要求168的构建体,其中所述IgG1 Fc是SEQ ID NO:27所示的曲妥珠单抗的Fc。

170. 根据权利要求168的构建体,其中所述IgG4 Fc是SEQ ID NO:30所示的纳武单抗的Fc。

171. 根据权利要求168的构建体,其中所述IgG1 Fc是SEQ ID NO:10所示的人IgG1的Fc。

172. 根据权利要求168的构建体,其中所述IgG4 Fc是SEQ ID NO:16所示的人IgG4的Fc。

173. 根据权利要求146至172任一项的构建体,其中所述TNFR2激动剂是单价的。

174. 根据权利要求1至173任一项的构建体,其是TNFR2激动剂构建体,其中所述TNFR2激动剂是二价的。

175. 根据权利要求1至173任一项的构建体,其是TNFR2激动剂构建体,其中所述TNFR2是三价的。

176. 根据权利要求1至175任一项的构建体,其是TNFR2激动剂构建体,其中所述接头包含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 。

177. 根据权利要求1至176任一项的构建体,其是TNFR2激动剂构建体TNFR2,其中所述接头包含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 和SCDKTH(SEQ ID NO:31的残基217-222)。

178. 根据权利要求1至177任一项的构建体,其是TNFR2激动剂构建体,其中所述接头包含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 和对应于SEQ ID NO:26的残基219-233的曲妥珠单抗的铰链序列。

179. 根据权利要求1至177任一项的构建体,其是TNFR2激动剂构建体,其中所述接头包

含(Gly₄Ser)₃和对应于SEQ ID NO:29的残基212-223的纳武单抗的铰链序列。

180. 根据权利要求1至179任一项的构建体,其包含是半衰期延长部分的活性调节剂。

181. 根据权利要求180的构建体,其中所述半衰期延长部分是PEG。

182. 根据权利要求180的构建体,其中所述PEG具有至少或至少约30kDa的分子量。

183. 根据权利要求180的构建体,其中所述半衰期延长部分是人血清白蛋白(HSA)。

184. 根据权利要求1至183任一项的构建体,其是TNFR2激动剂构建体,包含:

a) 结合人TNFR2内的一或多个表位的TNFR2激动剂,所述表位选自SEQ ID NO:839-865、1202和1204所示的表位;

b) GS接头,选自(GlySer)_n,其中n=1-10;(GlySer₂);(Gly₄Ser)_n,其中n=1-10;(Gly₃Ser)_n,其中n=1-5;(SerGly₄)_n,其中n=1-5;(GlySerSerGly)_n,其中n=1-5;GSGSSGG;GSSSGSGSGSSG;GSSSGSGSGSSG;GGSSGG;GGSSGGSGSSSG;GSSSGSGSGSSSGSGSG;GGSSGGSSGGSSGGSSG;和GSSSGS;及

c) 活性调节剂,其是半衰期延长部分,是IgG Fc。

185. 根据权利要求184的构建体,其中:

所述GS接头是(GGGGS)₃;和

所述IgG Fc是曲妥珠单抗的Fc或纳武单抗的Fc。

186. 根据权利要求1至185任一项的构建体,其是TNFR2激动剂构建体,包含:

a) 结合人TNFR2内的一或多个表位的TNFR2激动剂,所述表位选自SEQ ID NO:839-865、1202和1204所示的表位;

b) 接头,其选自曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列和纳武单抗的全部或部分铰链序列;和

c) 活性调节剂,其是半衰期延长部分,是IgG Fc。

187. 根据权利要求186的构建体,其中:

所述接头包含曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列;和

所述IgG Fc是曲妥珠单抗的Fc。

188. 根据权利要求187的构建体,其中:

所述接头包含纳武单抗的全部或部分铰链序列;和

所述IgG Fc是纳武单抗的Fc。

189. 根据权利要求1至183任一项的构建体,其是TNFR2构建体,包含:

a) 结合人TNFR2内的一或多个表位的TNFR2激动剂,所述表位选自SEQ ID NO:839-865、1202和1204所示的表位;

b) GS接头,选自(GlySer)_n,其中n=1-10;(GlySer₂);(Gly₄Ser)_n,其中n=1-10;(Gly₃Ser)_n,其中n=1-5;(SerGly₄)_n,其中n=1-5;(GlySerSerGly)_n,其中n=1-5;GSGSSGG;GSSSGSGSGSSG;GSSSGSGSGSSG;GGSSGG;GGSSGGSGSSSG;GSSSGSGSGSSSGSGSG;GGSSGGSSGGSSGGSSG;和GSSSGS;

c) 第二接头,选自曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列和纳武单抗的全部或部分铰链序列;以及

d) 活性调节剂,其是半衰期延长部分,是IgG Fc。

190. 根据权利要求189的构建体,其中:

所述GS接头是(GGGGS)₃;

所述第二接头包含序列SCDKTH(SEQ ID NO:31的残基217-222);和

所述IgG Fc是曲妥珠单抗的Fc。

191. 根据权利要求189的构建体,其中:

所述GS接头是(GGGGS)₃;

所述第二接头包含纳武单抗的全部或部分铰链序列;和

所述IgG Fc是纳武单抗的Fc。

192. 根据权利要求1至191任一项的构建体,其是TNFR2激动剂构建体,包含:

a) TNFR2激动剂,其包含选自MR2-1或MAB2261的激动剂人抗TNFR2抗体的抗原结合片段;

b) 接头,其包含:

i) GS接头,选自(GlySer)_n,其中n=1-10;(GlySer₂);(Gly₄Ser)_n,其中n=1-10;

(Gly₃Ser)_n,其中n=1-5;(SerGly₄)_n,其中n=1-5;(GlySerSerGly)_n,其中n=1-5;

GSGGSSGG;GSSSGSGSGSSG;GSSSGSGSGSSG;GGSSGG;GGSSGGSGGSSSG;

GSSSGSGSGGSSSGSGSG;GGSSGGSSGGSSGGSSG;及GSSSGS;和/或

ii) 曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列或纳武单抗的全部或部分铰链序列;和

c) 活性调节剂,其是选自IgG1或IgG4 Fc、PEG分子和人血清白蛋白(HSA)的半衰期延长部分,其中:

所述IgG1 Fc是SEQ ID NO:10所示的人IgG1的Fc,或者是SEQ ID NO:27所示的曲妥珠单抗的Fc;和

所述PEG分子具有至少或至少约30kDa的分子量。

193. 根据权利要求1至192任一项的构建体,其是或包含TNFR2激动剂构建体,包含:

a) TNFR2-选择性TNF突变蛋白,其是可溶的TNF变体,包含选自以下的一或多个TNFR2-选择性突变:K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V,A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D,Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D,L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D,A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D,A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D,D143V/F144L/A145S,S95C/G148C,和D143V/A145S,参考SEQ ID NO:2;

b) 接头,其包含:

i) GS接头,选自(GlySer)_n,其中n=1-10;(GlySer₂);(Gly₄Ser)_n,其中n=1-10;

(Gly₃Ser)_n,其中n=1-5;(SerGly₄)_n,其中n=1-5;(GlySerSerGly)_n,其中n=1-5;

GSGGSSGG;GSSSGSGSGSSG;GSSSGSGSGSSG;GGSSGG;GGSSGGSGGSSSG;

GSSSGSGSGGSSSGSGSG;GGSSGGSSGGSSGGSSG;和GSSSGS;和/或

ii) 曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列或纳武单抗的全部或部分铰链序列;和

c) 活性调节剂,其是选自IgG1或IgG4 Fc、PEG分子和人血清白蛋白(HSA)的半衰期延长部分,其中:

所述IgG1 Fc是SEQ ID NO:10所示的人IgG1的Fc,或者是SEQ ID NO:27所示的曲妥珠

单抗的Fc;和

所述PEG分子具有至少或至少约30kDa的分子量。

194. 根据权利要求1至193任一项的构建体,其是或包含TNFR2激动剂构建体,包含:

a) 包含突变D143N/A145R的TNFR2 TNF突变蛋白;

b) (GGGGS)₃接头;和

c) 活性调节剂,其是半衰期延长部分,是曲妥珠单抗的Fc或纳武单抗的Fc。

195. 根据权利要求1至194任一项的构建体,其是TNFR2激动剂构建体,包含:

a) 包含突变D143N/A145R的TNFR2选择性TNF突变蛋白;

b) (GGGGS)₃接头和包含序列SCDKTH(SEQ ID NO:31的残基217-222)的第二接头;和

c) 活性调节剂,其是半衰期延长部分,是曲妥珠单抗的Fc。

196. 一种构建体,其是TNFR2激动剂构建体,包含:

a) 包含突变D143N/A145R的TNFR2选择性TNF突变蛋白;

b) (GGGGS)₃接头和包含纳武单抗的全部或部分铰链序列的第二接头;和

c) 活性调节剂,其是半衰期延长部分,是纳武单抗的Fc。

197. 根据权利要求1至196任一项的构建体,其是TNFR2激动剂构建体,包含:

a) 包含突变D143N/A145R的TNFR2选择性TNF突变蛋白;

b) 接头,包含对应于SEQ ID NO:26的残基219-233的曲妥珠单抗的铰链序列的全部或部分;和

c) 半衰期延长部分,其是曲妥珠单抗的Fc。

198. 根据权利要求1至197任一项的构建体,其是或包含TNFR2激动剂构建体,包含:

a) 包含突变D143N/A145R的TNFR2选择性TNF突变蛋白;

b) 接头,包含对应于SEQ ID NO:29的残基212-223的纳武单抗的铰链序列的全部或部分;和

c) 活性调节剂,其是半衰期延长部分,是纳武单抗的Fc。

199. 根据权利要求1至198任一项的构建体,其是TNFR1拮抗剂构建体或TNFR2激动剂构建体或两者,其中IgG Fc是单体或二聚体。

200. 根据权利要求1至199任一项的构建体,其包含dAb。

201. 根据权利要求200的构建体,其包含含有dAb的Vhh单链或双链(纳米抗体)。

202. 根据权利要求201的构建体,其包含直接或经由接头连接至所述dAb的HSA。

203. 根据权利要求202的构建体,其中所述接头是Gly-Ser(GS)接头和/或所述HSA通过接头或直接连接至所述dAb的C-末端。

204. 根据权利要求1至203任一项的构建体,包含SEQ ID NO:1475所示的残基20-732,其是SEQ ID NO:59的dAb Dom1h-131-206,通过接头连接至HSA,或与SEQ ID NO:1475的构建体具有至少95%、96%、97%、98%、99%序列相同性并具有TNFR1拮抗剂活性的构建体。

205. 根据权利要求200或203的构建体,其包含SEQ ID NO:52-83、503-672、1478和1479任一所示的dAb,及与其具有至少95%、96%、97%、98%、99%序列相同性的其变体,由此所述构建体具有TNFR1拮抗剂活性。

206. 根据权利要求205的构建体,其中所述dAb具有SEQ ID NO:57-59任一所示的序列以及与其具有至少95%序列相同性的其变体,由此所述构建体具有TNFR1拮抗剂活性。

207. 根据权利要求206的构建体,其中所述dAb指定为SEQ ID NO:59的DOM1h-131-206及其具有TNFR1拮抗剂活性的变体。

208. 根据权利要求200至207任一项的构建体,其中所述dAb的序列或用于施用于人的构建体的必要部分是人源化的。

209. 根据权利要求1至208任一项的构建体,其包含TNFR2激动剂或者是TNFR2激动剂构建体。

210. 根据权利要求1至208任一项的构建体,其是或也是或包含TNFR2激动剂构建体,其中所述TNFR2激动剂被修饰为消除在待治疗的受试者中具有免疫原性的氨基酸序列或表位。

211. 根据权利要求200的构建体,其中所述受试者是人。

212. 根据权利要求189至211任一项的构建体,其中所述TNFR2激动剂是TNFR2选择性激动剂。

213. 根据权利要求1至212任一项的构建体,其是TNFR2激动剂构建体并且包含经修饰的IgG Fc,其中所述IgG Fc包含以下修饰的一个或多个:

a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰;

b) 增加或增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的一或多个修饰;和

c) 减少或消除免疫效应子功能的一或多个修饰,所述免疫效应子功能选自补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)中的一种或多种。

214. 根据权利要求213的构建体,其中:

a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰选自:

选自以下的一或多个凸出突变:根据EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W;和

选自以下的一或多个凹陷突变:根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V,由此Fc形成二聚体;

b) 增加或增强FcRn再循环的一或多个修饰选自以下的一或多个:根据EU编号的T250Q, T250R, M252F, M252W, M252Y, S254T, T256D, T256E, T256Q, V259I, V308F, E380A, M428L, H433K, N434F, N434A, N434W, N434S, N434Y, Y436H, M252Y/T256Q, M252F/T256D, M252Y/S254T/T256E, H433K/N434F/Y436H, N434F/Y436H, T250Q/M428L, T250R/M428L, M428L/N434S, V259I/V308F, V259I/V308F/M428L, E294del/T307P/N434Y, 和T256N/A378V/S383N/N434Y;及

c) 降低或消除免疫效应子功能的一或多个修饰选自以下的一或多个:

在IgG1中:根据EU编号的L235E, L234A/L235A, L234E/L235F/P331S, L234F/L235E/P331S, L234A/L235A/P329G, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, G236R/L328R, G237A, E318A, D265A, E233P, N297A, N297Q, N297D, N297G, N297G/D265A, A330L, D270A, P329A, P331A, K322A, V264A, 和F241A;及

在IgG4中:根据EU编号的L235E, F234A/L235A, S228P/L235E, 和S228P/F234A/L235A。

215. 根据权利要求1至213任一项的构建体,其是含有经修饰的IgG Fc的TNFR2激动剂构建体,其中所述IgG Fc包含以下修饰的一个或多个:

a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰,其中:

所述凸出突变选自根据EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W；和

所述凹陷突变选自根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V；

b) 增加或增强新生儿Fc受体 (FcRn) 再循环的一或多个修饰, 其中所述修饰选自以下的一或多个:

根据EU编号的T250Q, T250R, M252F, M252W, M252Y, S254T, T256D, T256E, T256Q, V259I, V308F, E380A, M428L, H433K, N434F, N434A, N434W, N434S, N434Y, Y436H, M252Y/T256Q, M252F/T256D, M252Y/S254T/T256E, H433K/N434F/Y436H, N434F/Y436H, T250Q/M428L, T250R/M428L, M428L/N434S, V259I/V308F, V259I/V308F/M428L, E294del/T307P/N434Y, 和 T256N/A378V/S383N/N434Y;

c) 增加或增强免疫效应子功能的一或多个修饰, 其中:

所述免疫效应子功能选自CDC、ADCC和ADCP中的一种或多种; 和

所述增加或增强免疫效应子功能的一或多个修饰选自以下的一或多个:

在IgG1中: 根据EU编号, S239D, I332E, S239D/I332E, S239D/A330L/I332E, S298A/E333A/K334A; F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L; L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L; F243L/R292P/Y300L; 第一重链中的L234Y/G236W/S298A和第二重链中的S239D/A330L/I332E; 第一重链中的L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A和第二重链中的D270E/K326D/A330M/K334E; A327Q/P329A; D265A/S267A/H268A/D270A/K326A/S337A; T256A/K290A/S298A/E333A/K334A; G236A; G236A/I332E; G236A/S239D/I332E; G236A/S239D/A330L/I332E; 在残基N297引入双触角聚糖; 在残基N297引入去岩藻糖基化聚糖; K326W; K326A; E333A; K326A/E333A; K326W/E333S; K326M/E333S; K222W/T223W; K222W/T223W/H224W; D221W/K222W; C220D/D221C; C220D/D221C/K222W/T223W; H268F/S324T; S267E; H268F; S324T; S267E/H268F/S324T; G236A/I332E/S267E/H268F/S324T; E345R; 和 E345R/E430G/S440Y。

216. 根据权利要求1至215任一项的构建体, 其是或包含TNFR2激动剂构建体, 其包含经修饰的IgG1 Fc, 其中所述Fc被修饰以增加与抑制性Fc γ 受体 (Fc γ R) Fc γ RIIb的结合。

217. 根据权利要求216的构建体, 其中增加与Fc γ RIIb结合的修饰选自以下的一或多个: 根据EU编号S267E、N297A、L328F、L351S、T366R、L368H、P395K、S267E/L328F和L351S/T366R/L368H/P395K。

218. 根据权利要求1至217任一项的构建体, 其是或包含TNFR2激动剂构建体并且选择性激活或激动TNFR2而不激活和不拮抗TNFR1, 其包含:

a) TNFR2激动剂;

b) 一个或多个接头; 及

c) 活性调节剂, 其是半衰期延长部分, 其中:

所述TNFR2激动剂构建体是包含与多聚化结构域融合的单链TNFR2-选择性TNF突变蛋白三聚体的融合蛋白, 并且包含下式:

MD-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-TNFmut (式II); 或

TNFmut-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-MD (式III),

其中MD是相同或不同的多聚化结构域; TNFmut是TNFR2选择性TNF突变蛋白; 以及L1、L2和L3是可以相同或不同的接头。

219. 根据权利要求218的构建体,其中所述TNF突变蛋白包含选自以下的一或多个TNFR2-选择性突变:K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V,A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D,Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D,L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D,A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D,A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D,D143V/F144L/A145S,S95C/G148C,和D143V/A145S,参考SEQ ID NO:2。

220. 根据权利要求218的构建体,其中所述TNF突变蛋白包含TNFR2选择性突变D143N/A145R。

221. 根据权利要求218至220任一项的构建体,其中所述多聚化结构域选自EHD2 (SEQ ID NO:808)、MHD2 (SEQ ID NO:811)、鸡生腱蛋白C (TNC) 的三聚化结构域 (SEQ ID NO:804的残基110-139;SEQ ID NO:805),或人TNC的三聚化结构域 (SEQ ID NO:806的残基110-139,SEQ ID NO:807)。

222. 根据权利要求218至221任一项的TNFR2激动剂构建体,其中所述多聚化结构域是IgG1 Fc或IgG4 Fc并且其中所述IgG1 Fc或IgG4 Fc也是半衰期延长部分。

223. 根据权利要求218至222任一项的TNFR2激动剂构建体,其中所述L1、L2和/或L3接头独立地选自 $(GGGS)_n$,其中 $n=1-5$,或全部或部分TNF茎区 (SEQ ID NO:812)。

224. 根据权利要求218至223任一项的TNFR2激动剂构建体,其中所述TNFR2激动剂和所述半衰期延长部分之间的接头是:

GS接头,选自 $(GlySer)_n$,其中 $n=1-10$; $(GlySer_2)$; $(Gly_4Ser)_n$,其中 $n=1-10$; $(Gly_3Ser)_n$,其中 $n=1-5$; $(SerGly_4)_n$,其中 $n=1-5$; $(GlySerSerGly)_n$,其中 $n=1-5$; GSGSSGG;GSSSGSGSSGG;GSSSGSGSSGG;GGSSGG;GGSSGGSSSSG;GSSSGSGSSSSGSSG;GGSSGGSSGGSSSSGSSG;和GSSSGS;或

选自曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列和纳武单抗的全部或部分铰链序列的接头;或者

其组合。

225. 根据权利要求218至224任一项的TNFR2激动剂构建体,其中所述半衰期延长部分选自:

IgG1 Fc,其是SEQ ID NO:10所示的人IgG1的Fc,或SEQ ID NO:27所示的曲妥珠单抗的Fc;

IgG4 Fc,其是SEQ ID NO:16所示的人IgG4的Fc,或SEQ ID NO:30所示的纳武单抗的Fc;

PEG分子,其大小为至少或至少约30kDa;和

人血清白蛋白 (HSA)。

226. 根据权利要求1至217任一项的构建体,其是或包含TNFR2激动剂构建体,包含:

a) 所述构建体具有下式:

MD-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-TNFmut (式II);或者

TNFmut-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-MD (式III),

其中MD是多聚化结构域;TNFmut是TNFR2选择性TNF突变蛋白;以及L1、L2和L3是可以相同或不同的接头,其中:

i) 所述MD选自EHD2(SEQ ID NO:808)、MHD2(SEQ ID NO:811)、鸡生腱蛋白C(TNC)的三聚化结构域(SEQ ID NO:804的残基110-139;SEQ ID NO:805),或人TNC的三聚化结构域(SEQ ID NO:806的残基110-139,SEQ ID NO:807);

ii) L1、L2和L3各自为(GGGGS)_n,其中n=1-5,或全部或部分TNF茎区(SEQ ID NO:812),或其混合物;和

iii) 所述TNF突变蛋白包含TNFR2选择性突变D143N/A145R;

b) 半衰期延长部分,选自:

IgG1 Fc,其是SEQ ID NO:10所示的人IgG1的Fc,或SEQ ID NO:27所示的曲妥珠单抗的Fc;

IgG4 Fc,其是SEQ ID NO:16所示的人IgG4的Fc,或SEQ ID NO:30所示的纳武单抗的Fc;

PEG分子,其大小为至少或至少约30kDa;和

人血清白蛋白(HSA);和

c) TNFR2-选择性激动剂和半衰期延长部分之间的接头,其中所述接头包含:

GS接头,选自(GlySer)_n,其中n=1-10;(GlySer₂);(Gly₄Ser)_n,其中n=1-10;(Gly₃Ser)_n,其中n=1-5;(SerGly₄)_n,其中n=1-5;(GlySerSerGly)_n,其中n=1-5;GSGSSGG;GSSSGSGSGSSG;GSSSGSGSGSSG;GGSSGG;GGSSGGSGSSSG;GSSSGSGSGSSSGSGSG;GGSSGGSSGGSSGGSSG;和GSSSGS;或

接头,选自曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列和纳武单抗的全部或部分铰链序列;或者

其组合。

227. 根据权利要求1至217任一项的构建体,其是TNFR2激动剂构建体,包含下式:

MD-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-TNFmut(式II);或者

TNFmut-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-MD(式III),

其中MD是多聚化结构域;TNFmut是TNFR2选择性TNF突变蛋白;以及L1、L2和L3是可以相同或不同的接头,其中:

i) MD选自IgG1 Fc或IgG4 Fc;

ii) 式II中的L2和L3以及式III中的L1和L2各自独立地为(GGGGS)_n,其中n=1-5,或全部或部分TNF茎区(SEQ ID NO:812),或其组合;

iii) 式II中的L1和式III中的L3各自独立地选自:

GS接头,选自(GlySer)_n,其中n=1-10;(GlySer₂);(Gly₄Ser)_n,其中n=1-10;(Gly₃Ser)_n,其中n=1-5;(SerGly₄)_n,其中n=1-5;(GlySerSerGly)_n,其中n=1-5;GSGSSGG;GSSSGSGSGSSG;GSSSGSGSGSSG;GGSSGG;GGSSGGSGSSSG;GSSSGSGSGSSSGSGSG;GGSSGGSSGGSSGGSSG;和GSSSGS;或

接头,选自曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列和纳武单抗的全部或部分铰链序列;或者

其组合;以及

iv) 所述TNF突变蛋白包含TNFR2选择性突变D143N/A145R。

228. 根据权利要求227的构建体, 其中所述MD选自:

IgG1 Fc, 其是SEQ ID NO:10所示的人IgG1的Fc, 或SEQ ID NO:27所示的曲妥珠单抗的Fc; 或者

IgG4 Fc, 其是SEQ ID NO:16所示的人IgG4的Fc, 或SEQ ID NO:30所示的纳武单抗的Fc。

229. 根据权利要求227或权利要求228的构建体, 其中所述MD是曲妥珠单抗的IgG1 Fc, 并且所述MD和相邻TNF突变蛋白之间的接头是对应于SEQ ID NO:26的残基219-233的曲妥珠单抗的铰链序列的全部或部分。

230. 根据权利要求227或权利要求228的构建体, 其中所述MD是曲妥珠单抗的IgG1 Fc, 并且所述MD和相邻TNF突变蛋白之间的接头包含序列SCDKTH (SEQ ID NO:31的残基217-222)。

231. 根据权利要求227至230任一项的构建体, 其中所述MD是曲妥珠单抗的IgG1Fc, 并且所述MD和相邻TNF突变蛋白之间的接头包含(Gly₄Ser)₃和对应于SEQ ID NO:26的残基219-233的曲妥珠单抗的铰链序列。

232. 根据权利要求227或权利要求228的构建体, 其中所述MD是曲妥珠单抗的IgG1 Fc, 并且所述MD和相邻TNF突变蛋白之间的接头包含(Gly₄Ser)₃和SCDKTH (SEQ ID NO:31的残基222-227)。

233. 根据权利要求227或权利要求228的构建体, 其中所述MD是纳武单抗的IgG4Fc, 并且所述MD和相邻TNF突变蛋白之间的接头包含对应于SEQ ID NO:29的残基212-223的纳武单抗的铰链序列的全部或部分。

234. 根据权利要求227或权利要求228的构建体, 其中所述MD是纳武单抗的IgG4Fc, 并且所述MD和相邻TNF突变蛋白之间的接头包含(Gly₄Ser)₃和对应于SEQ ID NO:29的残基212-223的纳武单抗的铰链序列的全部或部分。

235. 根据权利要求1至234任一项的构建体, 其是激动剂构建体, 其中所述TNFR2激动剂被修饰以消除在受试者中具有免疫原性的免疫原性序列或表位。

236. 根据权利要求235的构建体, 其中所述受试者是人。

237. 根据权利要求1至236任一项的构建体, 其是TNFR2激动剂构建体并且包含经修饰的IgG Fc, 其中所述IgG Fc包含以下修饰中的一个或多个:

a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰, 其中:

所述凸出突变选自根据EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W中的一或多个; 和

所述凹陷突变选自根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V中的一或多个;

b) 增加或增强新生儿Fc受体 (FcRn) 再循环的一或多个修饰, 其中所述修饰选自以下的一或多个:

根据EU编号的T250Q, T250R, M252F, M252W, M252Y, S254T, T256D, T256E, T256Q, V259I, V308F, E380A, M428L, H433K, N434F, N434A, N434W, N434S, N434Y, Y436H, M252Y/T256Q, M252F/T256D, M252Y/S254T/T256E, H433K/N434F/Y436H, N434F/Y436H, T250Q/M428L, T250R/M428L, M428L/N434S, V259I/V308F, V259I/V308F/M428L, E294del/T307P/N434Y, 和

T256N/A378V/S383N/N434Y;及

c)减少或消除免疫效应子功能的一或多个修饰,其中:

所述免疫效应子功能选自CDC、ADCC和ADCP中的一种或多种;和

所述减少或消除免疫效应子功能的一或多个修饰选自以下的一或多个:

在IgG1中:根据EU编号,L235E,L234A/L235A,L234E/L235F/P331S,L234F/L235E/P331S,L234A/L235A/P329G,L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S,G236R/L328R,G237A,E318A,D265A,E233P,N297A,N297Q,N297D,N297G,N297G/D265A,A330L,D270A,P329A,P331A,K322A,V264A,和F241A;及

在IgG4中:根据EU编号,L235E,F234A/L235A,S228P/L235E,和S228P/F234A/L235A。

238.根据权利要求1至237任一项的构建体,其是包含经修饰的IgG Fc的TNFR2激动剂构建体,其中所述IgG Fc包含以下修饰中的一个或多个:

a)引入凸出凹陷的一或多个修饰,其中:

所述凸出突变选自根据EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W中的一或多个;和

所述凹陷突变选自根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V中的一或多个;

b)增加或增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的一或多个修饰,其中所述修饰选自以下的一或多个:

根据EU编号,T250Q,T250R,M252F,M252W,M252Y,S254T,T256D,T256E,T256Q,V259I,V308F,E380A,M428L,H433K,N434F,N434A,N434W,N434S,N434Y,Y436H,M252Y/T256Q,M252F/T256D,M252Y/S254T/T256E,H433K/N434F/Y436H,N434F/Y436H,T250Q/M428L,T250R/M428L,M428L/N434S,V259I/V308F,V259I/V308F/M428L,E294de1/T307P/N434Y,和T256N/A378V/S383N/N434Y;及

c)增加或增强免疫效应子功能的一或多个修饰,其中:

所述免疫效应子功能选自CDC、ADCC和ADCP中的一种或多种;和

所述增加或增强免疫效应子功能的一或多个修饰选自以下的一或多个:

在IgG1中:根据EU编号,S239D,I332E,S239D/I332E,S239D/A330L/I332E,S298A/E333A/K334A;F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L;L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L;F243L/R292P/Y300L;第一重链中的L234Y/G236W/S298A和第二重链中的S239D/A330L/I332E;第一重链中的L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A和第二重链中的D270E/K326D/A330M/K334E;A327Q/P329A;D265A/S267A/H268A/D270A/K326A/S337A;T256A/K290A/S298A/E333A/K334A;G236A;G236A/I332E;G236A/S239D/I332E;G236A/S239D/A330L/I332E;在残基N297引入双触角聚糖;在残基N297引入去岩藻糖基化聚糖;K326W;K326A;E333A;K326A/E333A;K326W/E333S;K326M/E333S;K222W/T223W;K222W/T223W/H224W;D221W/K222W;C220D/D221C;C220D/D221C/K222W/T223W;H268F/S324T;S267E;H268F;S324T;S267E/H268F/S324T;G236A/I332E/S267E/H268F/S324T;E345R;和E345R/E430G/S440Y。

239.根据权利要求1至238任一项的TNFR2激动剂构建体,其是包含IgG1 Fc的TNFR2激动剂构建体,所述IgG1 Fc被修饰以增加与抑制性Fc γ 受体(Fc γ R)Fc γ RIIb的结合。

240.根据权利要求239的TNFR2激动剂构建体,其中增加与Fc γ RIIb结合的修饰选自根

据EU编号的S267E、N297A、L328F、L351S、T366R、L368H、P395K、S267E/L328F和L351S/T366R/L368H/P395K中的一或多个。

241. 根据权利要求1至240任一项的构建体,其是多特异性TNFR1抑制剂/TNFR2激动剂构建体,并且具有下式:

(TNFR1抑制剂)_n-接头(L)_p-(TNFR2激动剂)_q(式I),或

(TNFR1抑制剂)_n-接头(L)_p-(TNFR2激动剂)_q,或

(TNFR1抑制剂)_n-(TNFR2激动剂)_q-接头(L)_p,或

(TNFR2激动剂)_q-(TNFR1抑制剂)_n-接头(L)_p,或

包含任选存在的活性调节剂的上述任一项,其中:

n=1或2,p=1、2或3,且q=1或2;

所述TNFR1抑制剂与TNFR1相互作用以抑制其活性;

活性调节剂是与不存在所述活性调节剂的构建体相比,调节或改变所述构建体的活性或药理学性质的部分;和

所述接头增加所述构建体的溶解度,或增加所述构建体的柔性,或改变所述构建体的空间效应。

242. 根据权利要求1至241任一项的构建体,其是多特异性TNFR1抑制剂/TNFR2激动剂构建体,其中:

所述TNFR1抑制剂选择性抑制或拮抗TNFR1信号传导而不抑制或不拮抗TNFR2信号传导;

所述TNFR1抑制剂不干扰TNFR2的激活或激动作用;

所述TNFR2激动剂选择性激活或激动TNFR2信号传导而不激活或不激动TNFR1信号传导;和

所述TNFR2激动剂不干扰TNFR1的抑制或拮抗作用。

243. 根据权利要求241或权利要求242的构建体,其中:

a) 所述TNFR1抑制剂选自:

i) 人抗TNFR1拮抗剂单克隆抗体的抗原结合片段,选自H398或ATROSAB或具有与其具有至少95%序列相同性的序列的多肽;或者

ii) SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb),或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab,或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体,或SEQ ID NO:701-703任一所示的TNF突变蛋白,或具有与任何前述多肽具有至少95%序列相同性的序列且是TNFR1抑制剂的多肽;或者

iii) 显性阴性肿瘤坏死因子(DN-TNF)或TNF突变蛋白,包含可溶的TNF分子,具有一个或多个氨基酸置换,所述一或多个氨基酸置换赋予选择性抑制TNFR1,并且选自:

V1M,L29S,L29G,L29Y,R31C,R31E,R31N,R32Y,R32W,C69V,A84S,V85T,S86T,Y87H,Q88N,T89Q,I97T,C101A,A145R,E146R,L29S/R32W,L29S/S86T,R32W/S86T,L29S/R32W/S86T,R31N/R32T,R31E/S86T,R31N/R32T/S86T,I97T/A145R,V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R,和A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q,参考SEQ ID NO:2所示的可溶TNF的序列;

b) 所述接头选自:

i) GS接头,选自(GlySer)_n,其中n=1-10;(GlySer₂);(Gly₄Ser)_n,其中n=1-10;

(Gly₃Ser)_n,其中n=1-5;(SerGly₄)_n,其中n=1-5;(GlySerSerGly)_n,其中n=1-5;
GSGGSSGG;GSSSGSGSGSSG;GSSSGSGSGSSG;GGSSGG;GGSSGGSGSSSG;
GSSSGSGSGSSSGSGSG;GGSSGGSSGGSSSGSSG;和GSSSGS;和/或

ii)对应于SEQ ID NO:26的残基219-233的曲妥珠单抗的铰链序列的全部或部分,或对应于SEQ ID NO:29的残基212-223的纳武单抗的铰链序列的全部或部分;和

iii)IgG1或IgG4 Fc,其中:

IgG1 Fc选自SEQ ID NO:10所示的人IgG1的IgG1 Fc,或SEQ ID NO:27所示的曲妥珠单抗的IgG1 Fc;

IgG4 Fc选自SEQ ID NO:16所示的人IgG4的IgG4 Fc,或SEQ ID NO:30所示的纳武单抗的IgG4 Fc;和

任选地,所述Fc包括一或多个修饰以引入凸出凹陷,和/或增加或增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环,和/或减少或消除免疫效应子功能;及

c)所述TNFR2激动剂选自:

i)结合人TNFR2内一或多个表位的抗原结合片段,所述表位选自SEQ ID NO:

839-865、1202和1204所示的表位;或者

ii)选自MR2-1或MAB2261的激动性人抗TNFR2抗体的抗原结合片段;或者

iii)TNFR2-选择性TNF突变蛋白,其是可溶的TNF变体,包含选自以下的一或多个TNFR2-选择性突变:K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V,

A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,

D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D,

Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D,

L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D,

A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D,

A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D,

D143V/F144L/A145S,S95C/G148C,和D143V/A145S,参考SEQ ID NO:2;或

iv)包含突变D143N/A145R的单链TNFR2选择性TNF突变蛋白三聚体,其中

所述TNF突变蛋白由(GGGGS)_n或全部或部分TNF茎区(SEQ ID NO:812)连接,其中n=1-5;或者

v)TNFR2-选择性激动剂,包含下式:

MD-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-TNFmut(式II);或者

TNFmut-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-MD(式III);

其中MD是多聚化结构域;TNFmut是TNFR2选择性TNF突变蛋白;以及L1、L2和L3是可以相同或不同的接头,并且其中:

所述MD选自EHD2(SEQ ID NO:808)、MHD2(SEQ ID NO:811)、鸡生腱蛋白C(TNC)的三聚化结构域(SEQ ID NO:804的残基110-139;SEQ ID NO:805),或人TNC的三聚化结构域(SEQ ID NO:806的残基110-139,SEQ ID NO:807);

L1、L2和L3各自为(GGGGS)_n,其中n=1-5,或TNF的全部或部分茎区(SEQ ID NO:812),或其混合物;及

TNF突变蛋白包含TNFR2选择性突变D143N/A145R。

244. 根据权利要求241或权利要求242的构建体,其是多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体,其中:

a) 所述TNFR1抑制剂包含SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb),或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab,或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体,或SEQ ID NO:701-703任一所示的TNF突变蛋白,或与其具有至少或至少约95%序列相同性的序列;

b) 所述接头包含(GGGGS)₃、包含序列SCDKTH(SEQ ID NO:26的残基222-227)的多肽和曲妥珠单抗的Fc;和

c) TNFR2激动剂包含TNFR2选择性TNF突变蛋白,其是可溶的TNF变体,包含选自以下的一个或多个TNFR2选择性突变:K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V,A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D,Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D,L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D,A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D,A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D,D143V/F144L/A145S,S95C/G148C,和D143V/A145S,参考SEQ ID NO:2。

245. 根据权利要求241或权利要求242的构建体,其中:

a) 所述TNFR1抑制剂包含SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb),或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab,或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体,或SEQ ID NO:701-703任一所示的TNF突变蛋白,或与其具有至少或至少约95%序列相同性的序列;

b) 所述接头包含(GGGGS)₃、纳武单抗的全部或部分铰链序列以及纳武单抗的Fc;和

c) 所述TNFR2激动剂包含TNFR2选择性TNF突变蛋白,其是可溶TNF变体,包含选自以下的一个或多个TNFR2选择性突变:K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V,A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D,Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D,L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D,A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D,A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D,D143V/F144L/A145S,S95C/G148C,和D143V/A145S,参考SEQ ID NO:2。

246. 根据权利要求241或权利要求242的构建体,其中:

a) 所述TNFR1抑制剂包含SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb),或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab,或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体,或SEQ ID NO:701-703任一所示的TNF突变蛋白,或与其具有至少或至少约95%序列相同性的序列;

b) 所述接头包含(GGGGS)₃和曲妥珠单抗的Fc;和

c) 所述TNFR2激动剂包含TNFR2选择性TNF突变蛋白,其是可溶TNF变体,包含选自以下的一个或多个TNFR2选择性突变:K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V,A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/

T89S/A145S/E146A/S147D, Q88N/A145I/E146G/S147D, A145H/E146S/S147D, A145H/S147D, L29V/A145D/E146D/S147D, A145N/E146D/S147D, A145T/E146S/S147D, A145Q/E146D/S147D, A145T/E146D/S147D, A145D/E146G/S147D, A145D/S147D, A145K/E146D/S147T, A145R/E146T/S147D, A145R/S147T, E146D/S147D, D143V/F144L/A145S, S95C/G148C, 和D143V/A145S, 参考SEQ ID NO:2。

247. 根据权利要求241或权利要求242的构建体, 其中:

a) 所述TNFR1抑制剂包含SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb), 或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab, 或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体, 或SEQ ID NO:701-703任一所示的TNF突变蛋白, 或与其具有至少或至少约95%序列相同性的序列;

b) 所述接头包含(GGGGS)₃和纳武单抗的Fc; 和

c) 所述TNFR2激动剂包含TNFR2选择性TNF突变蛋白, 其是可溶TNF变体, 包含选自以下的一个或多个TNFR2选择性突变: K65W, D143Y, D143F, D143N, D143E, D143W, D143V, A145R, A145H, A145K, A145F, A145W, E146Q, E146H, E146K, E146N, D143N/A145R, A145R/S147T, Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D, Q88N/A145I/E146G/S147D, A145H/E146S/S147D, A145H/S147D, L29V/A145D/E146D/S147D, A145N/E146D/S147D, A145T/E146S/S147D, A145Q/E146D/S147D, A145T/E146D/S147D, A145D/E146G/S147D, A145D/S147D, A145K/E146D/S147T, A145R/E146T/S147D, A145R/S147T, E146D/S147D, D143V/F144L/A145S, S95C/G148C, 和D143V/A145S, 及前述突变的任何组合, 参考SEQ ID NO:2。

248. 根据权利要求241-247任一项的构建体, 其包含经修饰的Fc, 其中所述IgG Fc包含以下修饰中的一个或多个:

a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰;

b) 增加或增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的一或多个修饰; 和

c) 减少或消除免疫效应子功能的一或多个修饰。

249. 根据权利要求248的构建体, 其中所述Fc包含引入凸出凹陷的修饰:

所述凸出突变选自EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W中的一或多个; 和

所述凹陷突变选自EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V中的一或多个。

250. 根据权利要求248的构建体, 其中所述Fc包含增加或增强FcRn再循环的修饰选自以下的一或多个:

根据EU编号的T250Q, T250R, M252F, M252W, M252Y, S254T, T256D, T256E, T256Q, V259I, V308F, E380A, M428L, H433K, N434F, N434A, N434W, N434S, N434Y, Y436H, M252Y/T256Q, M252F/T256D, M252Y/S254T/T256E, H433K/N434F/Y436H, N434F/Y436H, T250Q/M428L, T250R/M428L, M428L/N434S, V259I/V308F, V259I/V308F/M428L, E294del/T307P/N434Y, 和T256N/A378V/S383N/N434Y。

251. 根据权利要求248的构建体, 其中所述Fc包含对免疫效应子功能的修饰, 所述免疫效应子功能选自补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)中的一种或多种。

252. 根据权利要求248的构建体, 其包含减少或消除免疫效应子功能的一或多个修饰,

选自以下的一或多个：

在IgG1中：根据EU编号的L235E, L234A/L235A, L234E/L235F/P331S, L234F/L235E/P331S, L234A/L235A/P329G, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, G236R/L328R, G237A, E318A, D265A, E233P, N297A, N297Q, N297D, N297G, N297G/D265A, A330L, D270A, P329A, P331A, K322A, V264A, 和F241A；及

在IgG4中：根据EU编号的L235E, F234A/L235A, S228P/L235E, 和S228P/F234A/L235A。

253. 根据权利要求241至247任一项的构建体，其中所述IgG Fc包含以下修饰中的一个或多个：

a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰，其中：

所述凸出突变选自根据EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W中的一或多个；和

所述凹陷突变选自根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V中的一或多个；

b) 增加或增强新生儿Fc受体 (FcRn) 再循环的一或多个修饰，其中所述修饰选自以下的一或多个：

根据EU编号的T250Q, T250R, M252F, M252W, M252Y, S254T, T256D, T256E, T256Q, V259I, V308F, E380A, M428L, H433K, N434F, N434A, N434W, N434S, N434Y, Y436H, M252Y/T256Q, M252F/T256D, M252Y/S254T/T256E, H433K/N434F/Y436H, N434F/Y436H, T250Q/M428L, T250R/M428L, M428L/N434S, V259I/V308F, V259I/V308F/M428L, E294del/T307P/N434Y, 和T256N/A378V/S383N/N434Y；及

c) 增加或增强免疫效应子功能的一或多个修饰，其中：

所述免疫效应子功能选自CDC、ADCC和ADCP中的一种或多种；和

增加或增强免疫效应子功能的一或多个修饰选自以下的一或多个：

在IgG1中：根据EU编号的S239D, I332E, S239D/I332E, S239D/A330L/I332E, S298A/E333A/K334A; F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L; L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L; F243L/R292P/Y300L; 第一重链中的L234Y/G236W/S298A和第二重链中的S239D/A330L/I332E; 第一重链中的L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A和第二重链中的D270E/K326D/A330M/K334E; A327Q/P329A; D265A/S267A/H268A/D270A/K326A/S337A; T256A/K290A/S298A/E333A/K334A; G236A; G236A/I332E; G236A/S239D/I332E; G236A/S239D/A330L/I332E; 在残基N297引入双触角聚糖；在残基N297引入去岩藻糖基化聚糖；K326W; K326A; E333A; K326A/E333A; K326W/E333S; K326M/E333S; K222W/T223W; K222W/T223W/H224W; D221W/K222W; C220D/D221C; C220D/D221C/K222W/T223W; H268F/S324T; S267E; H268F; S324T; S267E/H268F/S324T; G236A/I332E/S267E/H268F/S324T; E345R; 和E345R/E430G/S440Y。

254. 根据权利要求241至253任一项的构建体，其中所述构建体包含经修饰以增加与抑制性Fc γ 受体 (Fc γ R) Fc γ RIIb的结合的IgG1 Fc。

255. 根据权利要求254的构建体，其中增加与Fc γ RIIb结合的修饰选自根据EU编号的S267E、N297A、L328F、L351S、T366R、L368H、P395K、S267E/L328F和L351S/T366R/L368H/P395K中的一种或多种。

256. 根据权利要求1至255任一项的构建体，其是多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂，

其中：

所述TNFR1拮抗剂是单价的；和
所述TNFR2激动剂是单价的。

257. 根据权利要求1至255任一项的构建体，其是多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂，其中：

所述TNFR1拮抗剂是单价的；和
所述TNFR2激动剂是二价的。

258. 根据权利要求241至257任一项的构建体，其是多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂，其中：

a) 所述TNFR1拮抗剂选自：

i) 选自H398或ATROSAB的人抗TNFR1拮抗剂单克隆抗体的抗原结合片段；或者
ii) SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb)，或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab，或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体，或SEQ ID NO:701-703任一所示的TNF突变蛋白，或与其具有至少或至少约95%序列相同性的序列；或者

iii) 显性阴性肿瘤坏死因子(DN-TNF)或TNF突变蛋白，包含可溶TNF分子，具有一个或多个氨基酸置换，所述一个或多个氨基酸置换赋予选择性抑制TNFR1，并且选自：

V1M,L29S,L29G,L29Y,R31C,R31E,R31N,R32Y,R32W,C69V,A84S,V85T,S86T,Y87H,Q88N,T89Q,I97T,C101A,A145R,E146R,L29S/R32W,L29S/S86T,R32W/S86T,L29S/R32W/S86T,R31N/R32T,R31E/S86T,R31N/R32T/S86T,I97T/A145R,V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R,和A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q,参考SEQ ID NO:2所示的可溶TNF的序列；

b) 所述接头是支链PEG分子，其大小是至少或至少约30kDa；和

c) 所述TNFR2激动剂选自：

i) 结合人TNFR2内一或多个表位的抗原结合片段，所述表位选自SEQ ID NO:839-865、1202和1204所示的表位；或者
ii) 选自MR2-1或MAB2261的激动性人抗TNFR2抗体的抗原结合片段；或者
iii) TNFR2选择性TNF突变蛋白，其是可溶TNF变体，包含选自以下的一个或多个TNFR2选择性突变：K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V，

A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N，

D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D，

Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D，

L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D，

A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D，

A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D，

D143V/F144L/A145S,S95C/G148C,和D143V/A145S,参考SEQ ID NO:2；或

iv) 单链TNFR2选择性TNF突变蛋白三聚体，包含突变D143N/A145R，其中所述TNF突变蛋白由(GGGGS)_n或全部或部分TNF茎区(SEQ ID NO:812)连接，其中

n=1-5；或者

v) TNFR2-选择性激动剂，包含下式：

MD-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-TNFmut(式II);或者

TNFmut-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-MD(式III);

其中MD是多聚化结构域;TNFmut是TNFR2选择性TNF突变蛋白;以及L1、L2和L3是可以相同或不同的接头,并且其中:

所述MD选自EHD2(SEQ ID NO:808)、MHD2(SEQ ID NO:811)、鸡生腱蛋白C(TNC)的三聚化结构域(SEQ ID NO:804的残基110-139;SEQ ID NO:805),或人TNC的三聚化结构域(SEQ ID NO:806的残基110-139,SEQ ID NO:807);

L1、L2和L3各自为(GGGGS)_n,其中n=1-5,或全部或部分TNF茎区(SEQ ID NO:812),或其混合物;及

所述TNF突变蛋白包含TNFR2选择性突变D143N/A145R。

259. 根据权利要求258的构建体,其中所述TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂各自是单价的。

260. 根据权利要求258的构建体,其中所述TNFR1拮抗剂是单价的,并且所述TNFR2激动剂是二价的。

261. 根据权利要求1至260任一项的构建体,其是多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂,用于治疗慢性炎症性、自身免疫、神经退行性、脱髓鞘或呼吸系统疾病或病症,或其病因学特征在于TNF过表达或TNFR1信号传导失调的疾病、病况或病症。

262. 根据权利要求1至260任一项的构建体用于治疗慢性炎症性、自身免疫、神经退行性、脱髓鞘或呼吸系统疾病或病症、或其病因学特征在于TNF过表达或TNFR1信号传导失调的疾病、病况或病症的用途,所述构建体是多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂。

263. 一种组合物,其包含在药学上可接受的载体或运载体中的权利要求1至260任一项的构建体。

264. 根据权利要求263的组合物,用于治疗慢性炎症性、自身免疫、神经退行性、脱髓鞘或呼吸系统疾病或病症、或其病因学特征在于TNF过表达或TNFR1信号传导失调的疾病、病况或病症。

265. 根据权利要求1至261任一项的构建体或权利要求262的用途,或权利要求263或权利要求264的组合物,其中所述慢性炎症性、自身免疫、神经退行性、脱髓鞘或呼吸系统疾病或病症、或其病因学特征在于TNF过表达或TNFR1信号传导失调的疾病、病况或病症选自:

类风湿性关节炎(RA),银屑病,银屑病关节炎,幼年特发性关节炎(JIA),脊柱关节炎,强直性脊柱炎,克罗恩病,溃疡性结肠炎,炎症性肠病(IBD),葡萄膜炎,纤维化疾病,子宫内膜异位症,狼疮,多发性硬化症(MS),充血性心力衰竭,心血管疾病,心肌梗塞(MI),动脉粥样硬化,代谢性疾病,细胞因子释放综合征,败血症休克,败血症,急性呼吸窘迫综合征(ARDS),严重急性呼吸综合征(SARS),SARS-CoV-2,流感,急性和慢性神经退行性疾病,脱髓鞘疾病和病症,卒中,阿尔茨海默病,帕金森病,白塞氏病,Dupuytren's病,肿瘤坏死因子受体相关周期性综合征(TRAPS),胰腺炎,I型糖尿病,慢性阻塞性肺病(COPD),慢性支气管炎,肺气肿,移植物排斥,移植物抗宿主病(GvHD),肺部炎症,肺部疾病和病况,哮喘,囊性纤维化,特发性肺纤维化,急性暴发性病毒或细菌感染,肺炎,以TNF/TNFR1为致病病理介质的遗传性疾病,周期性发热综合征或癌症。

266. 根据权利要求1至261任一项的构建体或权利要求262的用途,或权利要求263或权利要求264的组合物,用于治疗类风湿性关节炎。

267. 根据权利要求1至261任一项的构建体或权利要求262的用途或权利要求263或权利要求264的组合物用于治疗类风湿性关节炎的用途。

268. 一种构建体, 其是TNFR2拮抗剂构建体, 包含TNFR2拮抗剂和任选包含接头和任选包含活性调节剂。

269. 根据权利要求268的构建体, 其包含式5:

$(\text{TNFR2拮抗剂})_n$ -接头 $_p$ -(活性调节剂) $_q$, 或
接头 $_p$ -(活性调节剂) $_q$ -(TNFR2拮抗剂) $_n$, 其中:
n和q各自为整数, 且各自独立地为1、2或3;
p是0、1、2或3;

TNFR2拮抗剂是与TNFR2相互作用以抑制(拮抗)其TNFR2活性从而抑制Treg增殖和/或诱导其死亡的分子, 并且还可以抑制表达TNFR2的肿瘤细胞的增殖并诱导其死亡;

活性调节剂是与不存在所述活性调节剂的构建体相比, 调节或改变所述构建体的活性或药理学性质的部分; 和

接头增加所述构建体的柔性, 和/或缓和或减少所述构建体的空间效应或其与受体的相互作用, 和/或增加所述构建体在水性介质中的溶解度。

270. 根据权利要求268或权利要求269的构建体, 其中所述活性调节剂和接头各自如权利要求1至250任一项的构建体所定义和描述。

271. 根据权利要求268至270任一项的构建体, 其中TNFR2拮抗剂:

减少和/或抑制骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的增殖; 和/或

通过结合存在于肿瘤微环境中的MDSC表面上表达的TNFR2, 诱导MDSC内的凋亡; 和/或
通过抑制Treg扩增和活性, 诱导T效应细胞包括细胞毒性CD8+T细胞的扩增。

272. 根据权利要求268至271任一项的构建体, 其中所述TNFR2拮抗剂是抗体、其抗原结合片段或单链抗体, 其结合人TNFR2内含有残基KCRPG(对应于SEQ ID NO:4的残基142-146)的一个或多个的表位或例如含有残基130-149、137-144或142-149或这些表位内的至少5个连续或不连续残基的更大表位, 并且不结合含有残基KCSPG(对应于SEQ ID NO:4的残基56-60)的表位; 或结合TNFR2表位PECLSCGS(对应于SEQ ID NO:4的残基91-98)、RICTCRPG(对应于SEQ ID NO:4的残基116-123)、CAPLRKCR(对应于SEQ ID NO:4的残基137-144)、LRKCRPGFGVA(对应于SEQ ID NO:4的残基140-150)和/或VVCKPCAPGTFSN(对应于SEQ ID NO:4的残基159-171), 和/或含有SEQ ID NO:4的残基75-128、86-103、111-128或150-190内的至少5个连续或不连续残基的表位。

273. 根据权利要求268至272任一项的构建体, 其中所述抗体、其片段或其单链形式结合含有KCRPG序列(SEQ ID NO:840)的一个或多个残基的表位, 其亲和力为比相同抗体或抗原结合片段对含有人TNFR2的KCSPG序列(SEQ ID NO:839)的肽的亲力的至少10倍高。

274. 根据权利要求268至273任一项的构建体, 其中所述TNFR2拮抗剂是选自以下的抗体或抗体的片段或单链形式:

TNFRAB1(参见SEQ ID NO:1212和1213, 分别表示TNFRAB1的重链和轻链序列)、TNFRAB2和TNFR2A3(见例如美国专利公开号2019/0144556关于这些抗体的描述);

抗体和抗体片段及其单链形式, 其含有TNFRAB1的CDR-H3序列(QRVDGYSSYWFYDFV; 对应于SEQ ID NO:1212的残基99-112)、TNFRAB2的CDR-H3序列(ARDDGYSYSPFDYWG; SEQ ID NO:

1217)或TNFR2A3的CDR-H3序列(ARDDGSYSPFDYFG;SEQ ID NO:1223),或与其具有至少约85%序列相同性的CDR-H3序列,例如,TNFRAB1特异性结合含有TNFR2的残基KCRPG的残基130-149,其亲和力是结合含有TNFR2的残基KCSPG的残基48-67的40倍高。

275.根据权利要求268至274任一项的构建体,其中所述TNFR2拮抗剂结合TNFR2中选自以下的一个或多个表位:

含有残基137-144的表位(CAPLRKCR;SEQ ID NO:851)

包括人TNFR2的位置80-86(DSTYTQL;SEQ ID NO:1247)、91-98(PECLSCGS;SEQ ID NO:1248)和/或116-123(RICTCRPG;SEQ ID NO:1249)内的一个或多个残基的表位;和

TNFR2A3表位,选自包括人TNFR2的残基140-150(LRKCRPGFGVA;SEQ ID NO:1463)并含有KCRPG基序的第一表位,和/或含有人TNFR2的残基159-171(VVCKPCAPGTFSN;SEQ ID NO:1464)的第二表位。

276.根据权利要求268至275任一项的构建体,其中所述TNFR2拮抗剂是抗体、其片段或其单链形式,含有以下的一或多种序列:具有SEQ ID NO:1214、1215和1231-1233任一所示的序列的一个或多个CDR-H1氨基酸,SEQ ID NO:1216、1224和1230任一所示的CDR-H2序列,SEQ ID NO:1217、1223和1225-1229任一所示的CDR-H3序列,和/或对应于SEQ ID NO:1212的残基99-112的TNFRAB1的CDR-H3;SEQ ID NO:1218和1234-1236任一所示的CDR-L1序列,和/或对应于SEQ ID NO:1213的残基24-33的TNFRAB1的CDR-L1序列;SEQ ID NO:1219、1220、1237和1238任一所示的CDR-L2序列,或对应于SEQ ID NO:1213的残基49-55的TNFRAB1的CDR-L2序列;和/或SEQ ID NO:1221、1222和1241-1244任一所示的CDR-L3序列,或对应于SEQ ID NO:1213的残基88-96的TNFRAB1的CDR-L3序列;和/或以表型中性、TNFR2特异性抗体的相应CDR序列置换SEQ ID NO:1245的人抗体重链可变结构域共有序列的CDR-H1和CDR-H2序列,和/或以表型中性、TNFR2特异性抗体的相应CDR序列置换SEQ ID NO:1246的人抗体轻链可变结构域序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列,以产生人源化拮抗性TNFR2抗体。

277.根据权利要求268至275任一项的构建体,其中所述TNFR2拮抗剂特异性结合SEQ ID NO:1247-1464任一所示的TNFR2内的表位。

278.根据权利要求268至277任一项的构建体,其中TNFR2拮抗剂特异性结合选自以下的一或多个表位:

(a)人TNFR2内的一个或多个表位,其含有对应于SEQ ID NO:4的残基142-146的残基KCRPG的一个或多个,或含有残基130-149、137-144或142-149或这些表位内的至少5个连续或不连续的残基的更大表位,并且不结合含有对应于SEQ ID NO:4的残基56-60的残基KCSPG的表位;和/或

(b)一个或多个包含氨基酸序列的TNFR2表位,所述氨基酸序列包含:

对应于SEQ ID NO:4的残基91-98的PECLSCGS,和/或对应于SEQ ID NO:4的残基116-123的RICTCRPG,和/或

对应于SEQ ID NO:4残基137-144的CAPLRKCR,和/或对应于SEQ ID NO:4残基140-150的LRKCRPGFGVA),和/或VVCKPCAPGTFSN(对应于SEQ ID NO:4残基159-171),和/或

含有在SEQ ID NO:4的残基75-128、86-103、111-128或150-190内的至少5个连续或不连续残基的表位。

279. 根据权利要求268至278任一项的构建体,其包含是小分子的TNFR2拮抗剂。
280. 根据权利要求279的构建体,其中所述TNFR2拮抗剂是沙利度胺或其类似物。
281. 根据权利要求280的构建体,其中所述沙利度胺类似物是来那度胺和泊马度胺。
282. 根据权利要求268至281任一项的构建体,其包含降低FoxP3表达并抑制Treg的抑制活性的TNFR2拮抗剂。
283. 根据权利要求282的构建体,其中所述TNFR2拮抗剂是组蛋白脱乙酰酶抑制剂,其可以降低FoxP3表达并抑制Treg的抑制活性。
284. 根据权利要求282或权利要求283的构建体,其中所述抑制剂是帕比司他或环磷酰胺或雷公藤内酯。
285. 根据权利要求268至282任一项的构建体,其用于治疗感染性疾病和表达TNFR2的癌症。
286. 根据权利要求285的构建体,其中所述癌症是选自如下的癌症:T细胞淋巴瘤如霍奇金淋巴瘤和皮肤非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、结肠癌、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、头颈癌、肝癌和肺癌。

治疗自身免疫性疾病和癌症的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 要求发明人H.Michael Shepard和申请人Enosi Life Sciences Corp于2020年8月27日提交的题为“METHODS AND COMPOSITIONS TO TREAT AUTOIMMUNE DISEASES AND CANCER”的美国临时申请序列号63/071,313的优先权。

[0003] 这个申请与于2020年2月19日提交、于2020年8月27日公布为国际PCT公开号WO 2020/172218、发明人为H.Michael Shepard和申请人为Enosi Life Sciences Corp.、题为“ANTIBODIES AND ENOMERS”的国际PCT申请号PCT/US2020/018739相关。这个申请也与于2021年8月20日提交的美国申请序列号17/432,720(于2020年2月19日提交的要求于2019年2月21日提交的临时申请序列号62/808,635的权益的PCT/US2020/018739的美国国家阶段申请)相关。

[0004] 在允许的情况下,这些申请中每一个的主题均通过引用整体并入。

[0005] 通过引用电子方式提供的序列列表而并入

[0006] 序列列表的电子版本随此提交,其内容通过引用整体并入。电子文件创建于2021年8月26日,大小为1.629兆字节,标题为5301SEQPC1.txt。

发明领域

[0007] 本申请涉及用作抗TNF治疗剂的核酸构建体和编码的产物。所治疗的疾病是其中涉及TNF受体和/或TNF或TNF/TNF受体途径或TNF受体和/或TNF或TNF/TNF受体途径在其病因学中起作用的疾病。

背景技术

[0008] 抗TNF治疗剂/TNF阻滞剂(一种生物学改善病情抗风湿药;DMARD)通常在常规DMARD失败后处方用药。这些治疗剂包括单克隆抗体(mAb),例如嵌合mAb英夫利昔单抗(Remicade®);含有鼠可变区和人IgG1恒定区,以及完全人源化的mAb(IgG1)阿达木单抗(例如以商标Humira®销售)和戈利木单抗(Simponi®抗体);靶向TNF的mAb赛妥珠单抗(Cimzia®抗体)的PEG化人源化Fab'片段;和TNFR2融合蛋白,例如TNFR2-Fc融合蛋白依那西普(以商标Enbrel®销售),其含有胞外受体区域,该区域含有与人IgG1的Fc融合的人TNFR2的结合位点。以 Remsima®和 Inflectra® 商标销售的药物是英夫利昔单抗的生物仿制药,已获准在欧盟用于治疗各种自身免疫和慢性炎症性疾病和病症。这些螯合TNF的TNF抑制剂用于治疗各种疾病和病症,包括例如RA、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、幼年特发性关节炎(JIA)和/或炎症性肠病(IBD;例如克罗恩病和溃疡性结肠炎)。

[0009] 然而,此类治疗剂与严重副作用有关,包括例如增加败血症和严重感染的风险,例如李斯特菌病、结核病再激活、乙型/丙型肝炎再激活、带状疱疹再激活以及侵袭性真菌和其它机会性感染,包括结核分枝杆菌(M. tuberculosis)感染的再激活。这些治疗剂已被证明可诱导类风湿性滑膜中的巨噬细胞凋亡。英夫利昔单抗(Infliximab)与克罗恩病患者肠道中炎症细胞浸润的细胞凋亡增加有关。其它抗风湿药,如甲氨蝶呤和糖皮质激素,也可诱

导免疫细胞凋亡(见例如Vigna-Pérez et al. (2005) Clin. Exp. Immunol. 141 (2) :372-380)。这些治疗剂还可以导致严重充血性心力衰竭、药物性狼疮和脱髓鞘中枢神经系统(CNS)疾病以及淋巴瘤和非黑色素瘤皮肤癌的恶化(见例如Benjamin et al. Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs (DMARDs) [Updated 2020Feb 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020Jan. 可得自: (ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507863/)。其它不良副作用包括肝损伤、脱髓鞘疾病/CNS病症、狼疮、银屑病、结节病和发生其它自身免疫性疾病以及癌症(包括淋巴瘤和实体恶性肿瘤)的易感性增加(见例如Dong et al. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 113 (43) : 12304-12309; Zalevsky et al. (2007) J. Immunol. 179:1872-1883; Zoran et al. (2019) Sci. Rep. 9:17231)。因此,这些治疗剂的用途,特别是对于需要长期施用的慢性疾病/病况如关节炎和炎症性肠病(IBD)是有限的。大约30%的RA患者在使用抗TNF治疗剂时无反应,或者治疗益处不持续(见例如McCann et al. (2014) Arthritis & Rheumatology 66 (10) : 2728-2738)。无反应性也发生在接受抗TNF治疗剂的非RA患者中。取决于抗TNF治疗剂,13-33%的接受治疗的患者对治疗无反应,高达46%的患者停止应答,导致停药或剂量增加(见例如Richter et al. (2019) MABS 11 (4) :653-665)。因此,需要具有改善的疗效和安全性的疗法。

[0010] 发明概述

[0011] 提供靶向肿瘤坏死因子受体1 (TNFR1) 和/或肿瘤坏死因子受体2 (TNFR2) 的分子构建体和编码其的核酸。所述构建体用于治疗其中这些受体和/或TNF参与病因学或其中其抑制或激活可以改善疾病、病症和/或病况或其症状的疾病、病症和病况。本文提供的构建体包括TNFR1和TNFR2的激动剂和拮抗剂。TNFR1拮抗剂构建体被工程化为抑制TNFR1功能,并避免TNFR1激动剂活性。还包括TNFR2的激动剂和拮抗剂。TNFR2的激动剂增加调节性T细胞功能以控制急性或慢性炎症。TNFR2的拮抗剂降低调节性T细胞功能,从而增强免疫力,用于治疗癌症和某些免疫缺陷疾病。

[0012] 细胞有两种TNF受体:TNFR1和TNFR2。这些途径在正常生理学中相互平衡。TNF/TNFR1驱动炎症,而TNF/TNFR2具有抗炎作用。TNFR2通常比TNFR1更晚被激活,因此不会立即影响有用的TNF诱导的炎症,而是稍后激活以抑制炎症通路的过度激活。同时抑制这两种途径去除了TNFR2的炎症抑制作用。现有的TNF阻滞剂限制了其自身的功效,因为抗炎的Treg生成子(TNFR2)被关低/关闭。

[0013] 本文提供的构建体,除了不同于靶向TNF/TNFR的现有治疗剂的性质外,还抑制TNFR1信号传导或活性,而不损害治疗对象抵抗机会性感染的能力。在本文提供的构建体中,有一种类型是修饰的单链抗体,其特异性靶向并抑制TNFR1,但不拮抗TNFR2,从而防止TNFR1通过受体簇集的瞬时激活。本文提供的构建体沉默由TNFR1介导的TNF炎症通路,但保留并在一些实施方案中增强TNFR2的愈合通路。可以施用这些构建体来治疗TNF阻滞剂失败的适应症。本文提供的构建体是特异性抑制1型肿瘤坏死因子受体的构建体;提供了所述构建体用于治疗其中TNF或其受体在病因学或症状中起作用的疾病、病症和病况的方法和用途。

[0014] 现有抗TNF药物阻断发生在自身免疫性疾病包括类风湿性关节炎、多关节幼年特发性关节炎、中轴型脊柱关节炎、强直性脊柱炎、银屑病关节炎、银屑病、克罗恩病、小儿克

罗恩病和溃疡性结肠炎中的过度炎症。本文的构建体可用于治疗相同的疾病,但避免有害或不利的副作用。本文提供的构建体在抑制体内炎性细胞因子方面比现有治疗剂如TNFR2-Fc融合蛋白依那西普(以商标Enbrel®销售)更有效,并保持调节性T细胞功能。所述构建体可以包括活性调节剂或性质调节剂以增加血清半衰期,已证明在阻断TNFR1信号传导方面具有活性,例如在与阿达木单抗和/或依那西普比较活性的TNF测定中。

[0015] 正如在小鼠模型中建立的那样,所述构建体比阿达木单抗更好地保持巨噬细胞功能,表明它们不会导致机会性感染;它们还比阿达木单抗或依那西普更好地保留Treg功能,并且在治疗疾病、病症和病症例如类风湿性关节炎方面同样有效。在一些实施方案中, $K_d \leq 1\text{nM}$,体内 $t_{1/2}$ 约为10-12天。所述构建体可以通过任何适合特定适应症的途径施用。所述途径包括但不限于皮下、静脉内、肿瘤内、肝内、局部、粘膜、皮内和任何其它合适的途径。

[0016] 本文提供的构建体如下所示。提供的构建体是式1的肿瘤坏死因子受体1 (TNFR1) 拮抗剂构建体: $(\text{TNFR1抑制剂})_n\text{-接头}_p\text{-}(\text{活性调节剂})_q$, 其中: n 和 q 均是整数,并且各自独立地是1、2或3; p 是0、1、2或3; TNFR1抑制剂是结合TNFR1以抑制(拮抗)TNFR1活性的分子; 活性调节剂是与不存在所述活性调节剂的构建体相比,调节或改变所述构建体的活性或药理学性质的部分; 并且接头增加所述构建体的柔性,和/或缓和或减少所述构建体的空间效应或其与受体的相互作用,和/或增加所述构建体在水性介质中的溶解度。接头可含有多个组分。接头包括化学接头、多肽接头及其组合。所述构建体可以通过化学和/或物理键连接。所述构建体可以是融合蛋白。

[0017] TNFR1抑制剂可包含域抗体(dAb)或单链抗体。所述构建体包括其中TNFR1抑制剂是域抗体(dAb)、活性调节剂不是未修饰的单个Fc区或人血清白蛋白抗体的那些构建体。例如,所述活性调节剂(或性质调节剂)是经修饰的Fc区或是人血清白蛋白。在所述构建体中,所述TNFR1抑制剂可以是抑制TNFR1信号传导的抑制剂,和/或所述活性调节剂增加所述构建体的血清半衰期。例如,所述构建体包括其中所述活性调节剂是白蛋白或被修饰成具有降低的或没有ADCC(抗体依赖性细胞毒性)活性和/或降低的或没有CDC(补体依赖性细胞毒性)活性的Fc的那些构建体。所述TNFR1抑制剂可以是抑制TNFR1活性但不拮抗肿瘤坏死因子受体2(TNFR2)活性的抑制剂。TNFR1抑制剂可以是抑制TNFR1信号传导的抑制剂。

[0018] 还提供了多特异性构建体。例如,提供了多特异性构建体,其包含TNFR1抑制剂和Treg扩增物,其中双特异性构建体与两种不同的靶受体或抗原或受体上的表位相互作用。所述多特异性构建体是那些双特异于TNFR1和Treg扩增物的构建体。Treg扩增物可以是TNFR2激动剂。

[0019] 所述构建体可包含接头以提供柔性、增加溶解度和/或减轻和/或减少空间位阻和/或范德华力相互作用。所述构建体任选但通常包含活性调节剂以改变或调节所述构建体的活性或性质。提供了具有式2的构建体: $(\text{TNFR1抑制剂})_n\text{-}(\text{活性调节剂})_{r1}\text{-}(\text{接头(L)})_p\text{-}(\text{活性调节剂})_{r2}\text{-}(\text{TNFR2激动剂})_q$, 或 $(\text{TNFR1抑制剂})_n\text{-}(\text{活性调节剂})_{r1}\text{-}(\text{接头(L)})_p\text{-}(\text{活性调节剂})_{r2}\text{-}(\text{Treg扩增物})_q$, 其中: $n=1,2$ 或3, $p=1,2$ 或3, $q=0,1$ 或2, 并且 $r1$ 和 $r2$ 均独立地是0、1或2; 并且所述组分可以是指定的顺序或任何其它顺序,只要该构建体与TNFR1和TNFR2相互作用以拮抗TNFR1并激动TNFR2,或具有Treg扩增物活性即可。例如,在本文提供的任何那些构建体中,包括其中TNFR1抑制剂部分抑制TNF α 与TNFR1的结合和/或抑制信号传导的构建体。

[0020] 还提供了式3a或3b的构建体：(TNFR2激动剂或Treg扩增物)_n-接头_p-(活性调节剂)_q，式3a，或者(活性调节剂)_q-接头_p-(TNFR2激动剂或Treg扩增物)_n，式3b，其中：n和q均为整数，且各自独立为1、2或3；p是0、1、2或3；活性调节剂是改变构建体的药理学性质或活性的部分；TNFR2激动剂与TNFR2相互作用，导致TNFR2活性；Treg扩增物，包括TNFR2激动剂，是导致Treg细胞增加的分子；以及接头增加柔性和/或缓和或减少构建体的空间效应或其与受体的相互作用；和/或改变所述构建体的溶解度。在一些实施方案中，活性调节剂是Fc区或经修饰的Fc区或短FcRnBP；所述接头包含铰链区，或者是包含G和S残基的接头。接头的示例是那些增加构建体的血清半衰期的接头。例如，接头可具有SEQ ID NO:812-834任一所示的序列或者是PEG部分接头。在一些实施方案中，构建体包含活性调节剂，其是修饰的Fc区或增加构建体的血清半衰期的肽。Fc区可以是Fc二聚体；Fc区可以被修饰以具有降低的ADCC和/或CDC活性，例如被修饰以具有降低的或没有ADCC活性的Fc。

[0021] 本文提供的构建体中包括其中TNFR1抑制剂是序列表中定义的、下面列出的或本领域已知的任何构建体；Treg扩增物是本领域已知的任何扩增物、TNFR2激动剂或序列表中列出的或本领域已知的任何Treg扩增物；接头是序列表或下文中所列的或本领域已知的任何接头；活性调节剂是序列表中列出的、本领域已知的和/或下文所列的任何活性调节剂。

[0022] 提供了作为TNFR1拮抗剂构建体的构建体，其包含是单链抗体或其抗原结合部分的TNFR1抑制剂，其特异性靶向和抑制TNFR1，但不拮抗TNFR2，从而防止TNFR1通过受体簇集的瞬时激活。在此类构建体中，抗体或其抗原结合部分包含改进构建体的药理学性质和/或结构的修饰。

[0023] 在本文提供的任何构建体中，构建体包括激动TNFR2信号转导从而增加调节性T细胞(Treg)表达的组分，从而提供TNFR1拮抗作用和伴随(或基本上伴随)的Treg表达的增加。在本文提供的构建体中，TNFR1抑制剂可以通过抑制TNFR1信号传导来抑制TNFR1的单链抗体，例如，构建体的抗体部分或抗原结合部分抑制TNF α 与TNFR1的结合。在这些构建体中，TNFR1抑制剂是不抑制TNF α 与TNFR1结合但抑制TNFR1信号传导的抗体或抗原结合部分。可以调节/改变的性质或活性可以是血清半衰期。

[0024] 所述构建体可包含经修饰以消除ADCC和/或CDC活性的Fc。所述构建体可以包含Fc二聚体，例如其中一个Fc单体包含凹陷(holes)，另一个包含凸出(knobs)，以形成异二聚体。例如，凸出突变选自EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W；并且凹陷突变选自EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V，由此Fc单体形成异二聚体。在构建体包含Fc的一些实施方案中，所述Fc来自曲妥珠单抗(trastuzumab)。所述构建体可通过曲妥珠单抗的N末端与C末端融合而二聚化。

[0025] 在构建体包含接头的一些实施方案中，所述接头是或包含来自Fc区的铰链区。例如，铰链区来自曲妥珠单抗，它连接于Fc区。构建体包括包含与抗-TNFR1拮抗剂抗体或其抗原结合部分连接的接头的那些构建体。接头可连接于抗-TNFR1拮抗剂抗体或其抗原结合部分，并直接或通过铰链区连接于Fc区。Fc区或经修饰的Fc区例如包含SEQ ID NO:10、12、14、16、27、30、1469和1470任一所示的氨基酸序列。

[0026] 还提供了结合新生儿Fc受体(FcRn)的构建体。例如，提供的是包含短FcRn结合肽(FcRnBP)的TNFR1构建体，其中短FcRn结合肽(FcRnBP)提供构建体与FcRn的相互作用，并含有6-25个或10-20个氨基酸残基。例如，FcRnBP含有12-20个残基或15个残基或16个残基。这

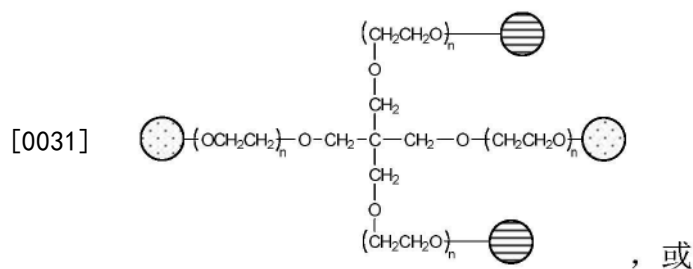
些的示例是TNFR1拮抗剂构建体,其中FcRn结合肽(FcRnBP)包含SEQ ID NO:48-51任一所示的肽或由其组成。所述构建体包括包含Fc异二聚体的TNFR1构建体,其中一个Fc单体包含凹陷,另一个包含凸出,由此产生的Fc二聚体是异二聚体。

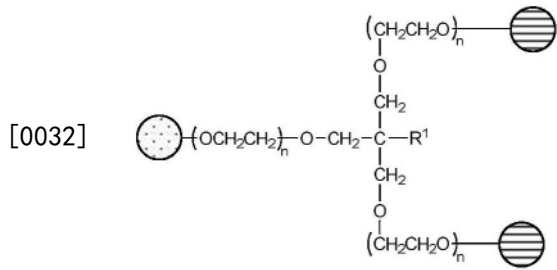
[0027] 提供的构建体是TNFR1拮抗剂构建体,其包含:TNFR1抑制剂;Fc二聚体;和Treg扩增物,其中:Fc二聚体包含两个互补的Fc单体;TNFR1抑制剂连接于一个Fc单体,Treg扩增物连接于另一个Fc单体。在此类构建体中,Treg扩增物可以是TNFR2激动剂。其还可以包含连接于与TNFR1抑制剂相同的Fc单体的第二Treg扩增物,其中第一和第二Treg扩增物是相同或不同的。第二Treg扩增物可以是TNFR2激动剂。在一些实施方案中,Treg扩增物是相同的。TNFR1抑制剂可以是抑制或阻断TNFR1信号传导的抑制剂。在一些实施方案中,TNFR1抑制剂结合TNFR1并阻断或抑制TNF α 结合和TNFR1信号传导。在一些实施方案中,TNFR1抑制剂结合TNFR1,不结合TNF α 和干扰TNF α 结合,并且阻断或抑制TNFR1信号传导。在这些构建体的一些实施方案中,其中Treg扩增物是TNFR2激动剂。TNFR2激动剂可以是刺激或诱导TNFR2信号传导的激动剂。示例的Treg扩增物是TNFR2激动剂,其是scFv、VHH单域抗体或TNFR2激动剂单克隆抗体的Fab。在这些构建体中,Treg扩增物可以是作为小分子的TNFR2激动剂,或核酸适体,或肽适体。

[0028] 还提供了是或也是TNFR2激动剂的任何这些构建体。TNFR2激动剂是式3a或3b的构建体,其中:式3a是(Treg扩增物)_n-接头_p-(活性调节剂)_q,式3b是(活性调节剂)_q-接头_p-(Treg扩增物)_n。在这些式中,n和q均为整数,并且均独立地为1、2或3;p是0、1、2或3;活性调节剂是与不存在所述活性调节剂的构建体相比,调节或改变所述构建体的活性或药理学性质的部分;并且所述接头增加所述构建体的柔性,和/或缓和或减少所述构建体的空间效应或其与受体的相互作用,和/或增加所述构建体在水性介质中的溶解度。在任何这些构建体中,构建体中的Treg扩增物是TNFR2激动剂。例如,TNFR2激动剂刺激或诱导TNFR2信号传导。在其它实例中,Treg扩增物是TNFR2激动剂,其是scFv、VHH单域抗体或TNFR2激动剂单克隆抗体的Fab。Treg扩增物可以是TNFR2激动剂,其是小分子或核酸或肽适体。在包含全部或部分曲妥珠单抗的构建体中,例如包含Fc部分和/或Fc和铰链区或其修饰形式,所述构建体可以通过与曲妥珠单抗的C末端的N末端融合而二聚化。

[0029] 提供的构建体包含通过中心PEG接头与一个或多个Treg扩增物连接的TNFR1抑制剂部分,或包含至少两个相同或不同的TNFR1抑制剂,或包含两个相同或不同的Treg扩增物。包含PEG部分例如中心PEG接头的构建体可包含连接TNFR1抑制剂和一或多个Treg扩增物的支链PEG部分。示例的是具有选自式4A至4D的结构的那些构建体:

[0030] 式4A:





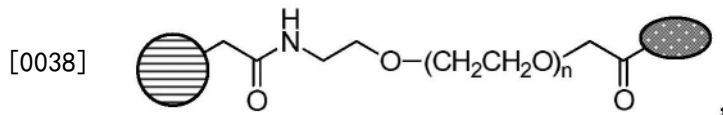
[0033] n是1-5;

[0034] R¹是H或CH₃,或CH₂CH₃或其它C₁-C₅烷基,

[0035] 是TNFR1抑制剂 (TNFR1拮抗剂);

[0036] 是Treg扩增物;或

[0037] 式4B:

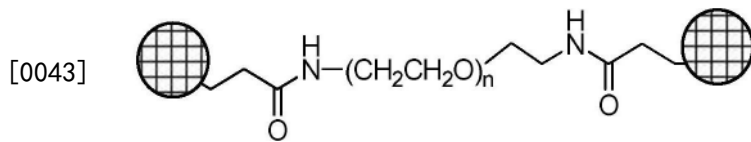


[0039] 是TNFR1抑制剂 (TNFR1拮抗剂)

[0040] 是Treg扩增物;

[0041] n是1-5;或

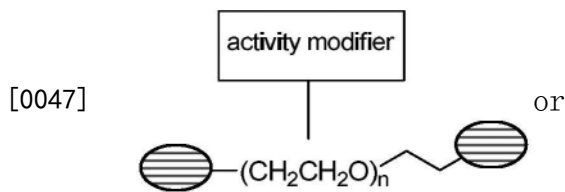
[0042] 式4C:



[0044] 是TNFR1抑制剂 (TNFR1拮抗剂),或Treg扩增物;及

[0045] n是1-5;或

[0046] 式4D:



[0048] -(CH₂CH₂O)_n 其中

[0049] 每个 相同或不同,且均独立地选自TNFR1抑制剂 (TNFR1拮抗剂) 和TNFR2激动剂;

[0050] 所述活性调节剂是任选的,可以连接于所述分子中任何合适的位点;并且n是1-5。

[0051] 在本文提供的TNFR1拮抗剂构建体和其它构建体中,Treg扩增物可以是TNFR2激动

剂。这些构建体可以包括活性调节剂,例如,其中活性调节剂是Fc区,或者是包括铰链区或其它接头的Fc区;并且Fc区或具有铰链区的Fc区是被修饰以降低或消除ADCC和/或CDC活性的Fc。其示例是这样的构建体,其中Fc或经修饰的Fc是IgG Fc或者是IgG1 Fc或IgG4 Fc,和/或是结合新生儿Fc受体(FcRn)的构建体。示例的这些构建体是这样的构建体,其中:构建体包含短FcRn结合肽(FcRnBP),其中短FcRn结合肽(FcRnBP)提供构建体与FcRn的相互作用,并且含有6-25个如10-20个氨基酸残基;其中FcRnBP含有12-20个残基或15个残基或16个残基,例如其中FcRn结合肽(FcRnBP)包含或由任何SEQ ID NO:48-51任一所示的肽组成。

[0052] 还提供了上文和本申请中任何式的TNFR1拮抗剂构建体,其包含:a)是TNFR1选择性的TNFR1抑制剂部分;b)任选存在的一个或多个接头;c)任选存在的半衰期延长部分,其中所述拮抗剂构建体包含b)和c)中的至少一个。在此类构建体中,TNFR1选择性拮抗剂选择性结合并抑制TNFR1信号传导,但不结合和不抑制TNFR2信号传导。如以上构建体所述,TNFR1抑制剂、接头和其它组分可以是如上所述的那些。这些包括这样的构建体,其中作为选择性拮抗剂的TNFR1抑制剂包含抗原结合片段,该片段选择性结合和抑制TNFR1信号传导但不结合和不抑制TNFR2信号传导。例如,选择性结合并抑制TNFR1信号传导而不结合和不抑制TNFR2信号传导的抗原结合片段可包含域抗体(dAb)、scFv或Fab片段。在本文所述的任何构建体中,TNFR1抑制剂包含人抗TNFR1拮抗剂单克隆抗体的抗原结合片段。例如,人抗-TNFR1拮抗剂单克隆抗体是包含SEQ ID NO:678的H398,或ATROSAB,或其抗原结合部分或与SEQ ID NO:31或32或673或678具有至少95%序列相同性的序列或其结合TNFR1的抗原结合部分。示例的TNFR1抑制剂是以下那些抑制剂:包含域抗体(dAb)或其抗原结合部分或包含SEQ ID NO:52-672任一所示的氨基酸序列或与其具有至少95%序列相同性及保留TNFR1抑制剂活性的序列;和/或包含SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或与其具有至少90%或95%序列相同性并保留TNFR1抑制剂活性的这些多肽的变体;和/或包含SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab或与其具有至少90%或95%序列相同性且保留TNFR1抑制剂或结合活性的序列;和/或包含SEQ ID NO:683或684所示序列的纳米抗体或与其具有至少90%或95%序列相同性且保留TNFR1抑制剂或结合活性的序列。所述TNFR1抑制剂是例如那些包含显性阴性肿瘤坏死因子(DN-TNF)或TNF突变蛋白,例如DN-TNF或TNF突变蛋白是一种可溶TNF分子,包含一个或更多赋予选择性抑制TNFR1的氨基酸置换,并且选自:

[0053] V1M,L29S,L29G,L29Y,R31C,R31E,R31N,R32Y,R32W,C69V,A84S,V85T,S86T,Y87H,Q88N,T89Q,I97T,C101A,A145R,E146R,L29S/R32W,L29S/S86T,R32W/S86T,L29S/R32W/S86T,R31N/R32T,R31E/S86T,R31N/R32T/S86T,I97T/A145R,V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R,及A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q,参考SEQ ID NO:2所示的可溶TNF的序列。例如,TNFR1抑制剂是TNF突变蛋白,其包含SEQ ID NO:701-703任一所示的残基序列,或与SEQ ID NO:701-703任一所示的残基序列具有至少或至少约90%或95%序列相同性的序列或其保留TNFR1抑制剂活性的片段。

[0054] 本文提供的任何前述构建体可包括接头,其中所述接头包含曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列,对应于SEQ ID NO:26的残基222-227的SCDKTH或直至曲妥珠单抗铰链区的完整序列,其含有或具有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233),或其至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基,或SEQ ID NO:29的残基212-223的ESKYGPPCPPCP残基,或与其具有至少98%或99%序列相同性的是接头的序列。例如,所述构建体可以包含接

头,其中所述接头包含对应于SEQ ID NO:26的残基222-227的序列SCDKTH。代替或除了另一个接头之外,所述构建体可以包含GS接头,即包含甘氨酸和丝氨酸(GS)残基的接头。本文提供的任何构建体的示例GS接头包括选自以下的那些接头: $(\text{GlySer})_n$,其中 $n=1-10$; (GlySer_2) ; $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$,其中 $n=1-10$; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{SerGly}_4)_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{GlySerSerGly})_n$,其中 $n=1-5$; GSGGSSGG; GSSSGSGSGSSG; GSSSGSGSGSSGG; GGSSGG; GGSSGGSGGSSSG; GSSSGSGSGSSSGSGSG; GGSSGGSSGGSSSGSSG; 及GSSSGS。还包括这样的接头,其包含GS接头和对应于残基EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:26的残基219-233)的曲妥珠单抗的铰链序列的全部或部分,例如所述接头可以包含GS接头并且仅包含或含有来自对应于SEQ ID NO:31的残基217-222的铰链序列的序列SCDKTH。此类接头包括例如包含GS接头和纳武单抗(Nivolumab)的铰链序列的全部或部分的那些接头,所述铰链序列对应于SEQ ID NO:29的残基212-223。

[0055] 本文的构建体可以含有活性调节剂。所述活性调节剂包括本文所述的任何调节剂,包括上文和下文所述的那些,以及本领域技术人员已知的其它调节剂;所述活性调节剂改变了构建体的活性或性质。所述活性调节剂可以是半衰期延长部分,其是IgG Fc、聚乙二醇(PEG)分子或人血清白蛋白(HSA)。示例的IgG Fc是IgG1 Fc或IgG4 Fc。IgG1 Fc可以是曲妥珠单抗的Fc,如SEQ ID NO:27所示,或与其具有至少95%序列相同性的氨基酸序列;IgG4 Fc可以是纳武单抗的Fc,如SEQ ID NO:30所示,或与其具有至少95%序列相同性的氨基酸序列。例如,IgG1 Fc是人IgG1的Fc,如SEQ ID NO:10所示,并且IgG4 Fc是人IgG4的Fc,如SEQ ID NO:16所示。

[0056] 本文所述的构建体包括那些是TNFR1抑制剂或包含TNFR1抑制剂的构建体。这些包括其中TNFR1抑制剂是单价的构建体。这些可包括接头,例如其中接头包含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$,和/或包含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 和SCDKTH (SEQ ID NO:31的残基217-222)的接头;和/或包含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 和曲妥珠单抗的铰链序列的接头,所述铰链序列对应于SEQ ID NO:26的残基219-233;和/或那些包含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 和对应于SEQ ID NO:29的残基212-223的纳武单抗铰链序列的接头。本文提供的示例的抑制TNFR1的构建体是包含SEQ ID NO:704-764任一所示的残基序列的那些构建体,或抑制TNFR1且具有与SEQ ID NO:704-764任一所示的残基序列具有至少或至少约95%序列相同性的序列的构建体。

[0057] 本文提供了TNFR1拮抗剂构建体。这些包括其中TNFR1构建体包含短FcRn结合肽(FcRnBP)的那些构建体;并且所述短FcRn-结合肽(FcRnBP)提供构建体与FcRn的相互作用,并且含有6-25个例如10-20个氨基酸残基,例如其中FcRnBP含有12-20个残基或15个残基或16个残基,例如其中FcRn结合肽(FcRnBP)包含SEQ ID NO:48-51任一所示的肽或与其具有至少约95%序列相同性的肽,或由SEQ ID NO:48-51任一所示的肽组成的FcRn-结合肽(FcRnBP)。

[0058] 本文提供的其它示例TNFR1抑制构建体包括包含以下的构建体:a)抑制TNFR1的域抗体;b)增加柔性、减少空间效应或增加溶解度的接头;和c)半衰期延长部分。包括这样的构建体,其中半衰期延长部分不是人血清白蛋白抗体或未修饰的Fc。这些构建体包括那些作为TNFR1拮抗剂的构建体,其包含:a) SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb),或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab,或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体,或SEQ ID NO:685-703任一所示的TNF突变蛋白;b) GS接头,选自

(GlySer)_n, 其中n=1-10; (GlySer)₂; (Gly₄Ser)_n, 其中n=1-10; (Gly₃Ser)_n, 其中n=1-5; (SerGly₄)_n, 其中n=1-5; (GlySerSerGly)_n, 其中n=1-5; GSGGSSGG; GSSSGSGSGSSG; GSSSGSGSGSSG; GGSSGG; GGSSGGSGSSSG; GSSSGSGSGSSSGSGSG; GGSSGGSSGGSSSGSSG; 和 GSSSGS; 及c) 半衰期延长部分, 其是IgG Fc。在包括一个或多个这些组分的这些构建体或本文提供的任何构建体中, GS接头可以是 (GGGS)₃; 并且IgG Fc可以是曲妥珠单的Fc或纳武单抗的Fc。

[0059] 本文提供的其它构建体是TNFR1拮抗剂构建体, 包括包含以下的构建体: a) SEQ ID NO: 52-672任一所示的域抗体 (dAb), 或SEQ ID NO: 673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO: 679-682任一所示的Fab, 或SEQ ID NO: 683或684所示的纳米抗体, 或SEQ ID NO: 685-703任一所示的TNF突变蛋白; b) 接头, 其选自曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列和纳武单抗的全部或部分铰链序列; 和c) 半衰期延长部分, 其是IgG Fc。在此类构建体中, 所述接头可包含曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列, 其中IgG Fc是曲妥珠单抗的Fc。在其它实施方案中, 所述接头可包含纳武单抗的全部或部分铰链序列, 其中IgG Fc是纳武单抗的Fc。

[0060] 提供了如本文提供的任何构建体, 其是TNFR1拮抗剂构建体, 包含:

[0061] a) SEQ ID NO: 52-672任一所示的域抗体 (dAb), 或SEQ ID NO: 673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO: 679-682任一所示的Fab, 或SEQ ID NO: 683或684所示的纳米抗体, 或SEQ ID NO: 685-703任一所示的TNF突变蛋白;

[0062] b) 第一接头, 其是GS接头, 选自 (GlySer)_n, 其中n=1-10; (GlySer)₂; (Gly₄Ser)_n, 其中n=1-10; (Gly₃Ser)_n, 其中n=1-5; (SerGly₄)_n, 其中n=1-5; (GlySerSerGly)_n, 其中n=1-5; GSGGSSGG; GSSSGSGSGSSG; GSSSGSGSGSSG; GGSSGG; GGSSGGSGSSSG; GSSSGSGSGSSSGSGSG; GGSSGGSSGGSSSGSSG; 和GSSSGS;

[0063] c) 第二接头, 其选自曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列和纳武单抗的全部或部分铰链序列; 和

[0064] d) 半衰期延长部分, 其是IgG Fc。

[0065] 在一些实施方案中, 这些构建体可以含有第一接头, 其是GS接头是 (GGGS)₃; 及第二接头, 其包含序列SCDKTH (SEQ ID NO: 31的残基217-222); 以及IgG Fc是曲妥珠单抗的Fc。在其它实施方案中, 第一接头是GS接头是 (GGGS)₃; 第二接头包含纳武单抗的全部或部分铰链序列; 及IgG Fc是纳武单抗的Fc。

[0066] 提供的构建体是TNFR1激动剂, 其包含:

[0067] a) SEQ ID NO: 52-672任一所示的域抗体 (dAb), 或SEQ ID NO: 673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO: 679-682任一所示的Fab, 或SEQ ID NO: 683或684所示的纳米抗体, 或SEQ ID NO: 685-703任一所示的TNF突变蛋白;

[0068] b) GS接头, 其选自 (GlySer)_n, 其中n=1-10; (GlySer)₂; (Gly₄Ser)_n, 其中n=1-10; (Gly₃Ser)_n, 其中n=1-5; (SerGly₄)_n, 其中n=1-5; (GlySerSerGly)_n, 其中n=1-5; GSGGSSGG; GSSSGSGSGSSG; GSSSGSGSGSSG; GGSSGG; GGSSGGSGSSSG; GSSSGSGSGSSSGSGSG; GGSSGGSSGGSSSGSSG; 和GSSSGS; 及

[0069] c) 半衰期延长部分, 其是PEG分子。GS接头可以是本文描述的或本领域技术人员已知的任何接头, 例如 (GGGS)₃。PEG分子可以是具有至少25kDa、通常至少30kDa或更大、例如至少40kDa或50kDa、或60kDa、或80kDa或更大分子量的分子。

[0070] 提供的构建体是TNFR1激动剂构建体,其包含:

[0071] a) SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb),或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab,或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体,或SEQ ID NO:685-703任一所示的TNF突变蛋白;

[0072] b) GS接头,其选自 $(\text{GlySer})_n$,其中 $n=1-10$; (GlySer_2) ; $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$,其中 $n=1-10$; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{SerGly}_4)_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{GlySerSerGly})_n$,其中 $n=1-5$; GSGGSSGG;GSSSGSGSGSSG;GSSSGSGSGSSGG;GGSSGG;GGSSGGSGGSSSG;GSSSGSGSGSSSGSGSG;GGSSGGSSGGSSGGSSG;和GSSSGS;及

[0073] c) 半衰期延长部分,其是人血清白蛋白。接头的示例是本文描述的任何接头,例如其中GS接头是 $(\text{GGGS})_3$ 。

[0074] 可以优化或修饰本文提供的任何构建体(上文和下文所述)的一级氨基酸序列以消除免疫原性序列或免疫原性表位。例如,在含有IgG Fc的构建体中,IgG Fc可以被修饰以包含以下修饰中的一种或多种:a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰;b) 增加或增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的一或多个修饰;及c) 减少或消除免疫效应子功能的一或多个修饰。在这样的构建体中以及在任何含有IgG Fc的构建体中,凸出突变可以选自根据EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W;并且凹陷突变选自根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A、Y407V。这些TNFR1拮抗剂构建体可以是这样的构建体,其中增加或增强FcRn再循环的一或多个修饰选自以下一种或多种:根据EU编号的T250Q,T250R,M252F,M252W,M252Y,S254T,T256D,T256E,T256Q,V259I,V308F,E380A,M428L,H433K,N434F,N434A,N434W,N434S,N434Y,Y436H,M252Y/T256Q,M252F/T256D,M252Y/S254T/T256E,H433K/N434F/Y436H,N434F/Y436H,T250Q/M428L,T250R/M428L,M428L/N434S,V259I/V308F,V259I/V308F/M428L,E294del/T307P/N434Y,和T256N/A378V/S383N/N434Y。TNFR1拮抗剂构建体可以被修饰以减少或消除免疫效应子功能,例如选自补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)中的一种或多种免疫效应子功能。例如,在这些TNFR1拮抗剂构建体中,减少或消除免疫效应子功能的一或多个修饰选自以下的一种或多种:

[0075] 在IgG1中:根据EU编号的L235E,L234A/L235A,L234E/L235F/P331S,L234F/L235E/P331S,L234A/L235A/P329G,L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S,G236R/L328R,G237A,E318A,D265A,E233P,N297A,N297Q,N297D,N297G,N297G/D265A,A330L,D270A,P329A,P331A,K322A,V264A,和F241A;及

[0076] 在IgG4中:根据EU编号的L235E,F234A/L235A,S228P/L235E和S228P/F234A/L235A。

[0077] TNFR1拮抗剂或多特异性构建体可包含中央PEG接头部分;并且所述构建体可以包含经修饰的Fc区,例如上文描述的那些,其中Fc区是经修饰的IgG Fc并且经修饰的IgG Fc包含以下修饰中的一种或多种:

[0078] a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰,其中:

[0079] 凸出突变选自根据EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W;和

[0080] 凹陷突变选自根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V;

[0081] b) 增加或增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的一或多个修饰,其中所述修饰选自以

下的一种或多种:

[0082] 根据EU编号的T250Q, T250R, M252F, M252W, M252Y, S254T, T256D, T256E, T256Q, V259I, V308F, E380A, M428L, H433K, N434F, N434A, N434W, N434S, N434Y, Y436H, M252Y/T256Q, M252F/T256D, M252Y/S254T/T256E, H433K/N434F/Y436H, N434F/Y436H, T250Q/M428L, T250R/M428L, M428L/N434S, V259I/V308F, V259I/V308F/M428L, E294del/T307P/N434Y, 和T256N/A378V/S383N/N434Y; 及

[0083] c) 增加或增强一种或多种免疫效应子功能的一或多个修饰, 其中:

[0084] 所述免疫效应子功能选自CDC、ADCC和ADCP中的一种或多种; 和

[0085] 所述增加或增强免疫效应子功能的一或多个修饰选自以下的一种或多种:

[0086] 在IgG1中: 根据EU编号的S239D, I332E, S239D/I332E, S239D/A330L/I332E, S298A/E333A/K334A; F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L; L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L; F243L/R292P/Y300L; 在第一重链中的L234Y/G236W/S298A, 及在第二重链中的S239D/A330L/I332E; 在第一重链中的L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A, 和在第二重链中的D270E/K326D/A330M/K334E; A327Q/P329A; D265A/S267A/H268A/D270A/K326A/S337A; T256A/K290A/S298A/E333A/K334A; G236A; G236A/I332E; G236A/S239D/I332E; G236A/S239D/A330L/I332E; 在残基N297引入双触角聚糖; 在残基N297引入去岩藻糖基化聚糖; K326W; K326A; E333A; K326A/E333A; K326W/E333S; K326M/E333S; K222W/T223W; K222W/T223W/H224W; D221W/K222W; C220D/D221C; C220D/D221C/K222W/T223W; H268F/S324T; S267E; H268F; S324T; S267E/H268F/S324T; G236A/I332E/S267E/H268F/S324T; E345R; 和 E345R/E430G/S440Y。

[0087] 在包含Fc区的任何构建体的一些实施方案中, 所述构建体可包含IgG1 Fc, 其包含一个或多个修饰以增加与抑制性Fc γ 受体(Fc γ R)Fc γ RIIb的结合。例如, 增加与Fc γ RIIb结合的一或多个修饰选自根据EU编号的S267E、N297A、L328F、L351S、T366R、L368H、P395K、S267E/L328F和L351S/T366R/L368H/P395K中的一或多个。

[0088] 还提供了是Treg扩增物构建体的构建体。此类构建体中包括那些包含以下的构建体: a) Treg扩增物; b) 接头, 其中接头增加所述构建体的柔性, 和/或缓和或降低所述构建体的空间效应或其与受体的相互作用, 和/或增加所述构建体在水性介质中的溶解度; 和c) 活性调节剂, 其中活性调节剂是与不存在所述活性调节剂的构建体相比, 调节或改变所述构建体的活性或药理学性质的部分。Treg扩增物可以是TNFR2激动剂。这些构建体还可包含TNFR1抑制剂。在一些实施方案中, TNFR2激动剂是TNFR2选择性激动剂。

[0089] 提供了本文所述的构建体, 其是TNFR2激动剂构建体, 包含: a) TNFR2激动剂; b) 接头, 其中接头增加所述构建体的柔性, 和/或缓和或降低所述构建体的空间效应或其与受体的相互作用, 和/或增加所述构建体在水性介质中的溶解度; 和c) 活性调节剂, 其中活性调节剂是与不存在所述活性调节剂的构建体相比, 调节或改变所述构建体的活性或药理学性质的部分。在TNFR2激动剂构建体中, TNFR2激动剂可以是TNFR2选择性激动剂。所述构建体可以包含活性调节剂, 例如是半衰期延长部分的活性调节剂。所述构建体可以是选择性激活或拮抗TNFR2而不激活和不拮抗TNFR1的TNFR2激动剂构建体。包括TNFR2激动剂构建体, 其中TNFR2激动剂结合TNFR2内的一个或多个表位。这些包括人TNFR2。此类表位包括例如选自包含SEQ ID NO: 839-865、1202和1204所示氨基酸序列或由SEQ ID NO: 839-865、1202和

1204所示氨基酸序列组成的表位中一个或多个的表位。

[0090] 提供了TNFR2激动剂构建体,其中TNFR2激动剂包含激动剂人抗TNFR2抗体或人源化抗TNFR2抗体的抗原结合片段,或其抗原结合部分,或其单链形式。此类抗体的示例是激动剂抗TNFR2抗体,选自MR2-1(也称为ab8161;美国专利号9,821,010)或MAB2261(美国专利号9,821,010)。TNFR2激动剂可以是选自dAb、scFv或Fab片段的抗原结合片段。在一些实施方案中,TNFR2激动剂是TNFR2选择性激动剂。所述选择性激动剂可包含TNFR2激动剂TNF突变蛋白。示例的TNFR2选择性激动剂突变蛋白包括但不限于包含一个或多个选自以下的TNFR2选择性突变的可溶TNF变体:K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V,A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D,Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D,L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D,A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D,A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D,D143V/F144L/A145S,S95C/G148C,和D143V/A145S,以及任何前述的组合,均参考SEQ ID NO:2。例如,TNFR2激动剂是包含突变D143N/A145R的TNF突变蛋白。

[0091] 在TNFR2激动剂构建体中,接头包括本文所述的或本领域技术人员已知用作接头的任何接头。示例接头包含对应于SEQ ID NO:26的残基219-233的曲妥珠单抗的铰链序列的全部或部分,或包含对应于SEQ ID NO:29的残基212-223的纳武单抗的铰链序列的全部或部分,或与其具有至少95%序列相同性的序列。其它示例接头包含或由序列SCDKTH组成,对应于SEQ ID NO:31的残基217-222。接头可以是甘氨酸-丝氨酸(GS)接头,例如但不限于:GS接头,选自 $(\text{GlySer})_n$ 的,其中 $n=1-10$; (GlySer_2) ; $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$,其中 $n=1-10$; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{SerGly}_4)_n$,其中 $n=1-5$; $(\text{GlySerSerGly})_n$,其中 $n=1-5$; GSGGSSGG; GSSSGSGSGSSG; GSSSGSGSGSSGG; GGSSGG; GGSSGGSGGSSSG; GSSSGSGSGGSSSGSGSG; GGSSGGSSGGGSSSGSSG; 和GSSSGS。接头可以包含接头的组合,例如包含GS接头和对应于SEQ ID NO:26的残基219-233的曲妥珠单抗的铰链序列的全部或部分的接头,或GS接头和对应于SEQ ID NO:31的残基217-222的序列SCDKTH,或GS接头和对应于SEQ ID NO:29的残基212-223的纳武单抗的铰链序列的全部或部分。

[0092] 本文提供的所有构建体均可包括改变或调节构建体的性质或活性的活性调节剂。例如,半衰期延长部分是活性或性质调节剂。如上文和下文所讨论的示例是IgG Fc、聚乙二醇(PEG)分子和人血清白蛋白(HSA),或其变体的部分或衍生物。例如,在一些实施方案中,IgG Fc是IgG1 Fc或IgG4 Fc。IgG1 Fc的实例是曲妥珠单抗的Fc,如SEQ ID NO:27所示; IgG4 Fc的实例是纳武单抗的Fc,如SEQ ID NO:30所示,人版本,其中IgG1 Fc是人IgG1的Fc,如SEQ ID NO:10所示,并且IgG4 Fc是人IgG4的Fc,如SEQ ID NO:16所示。

[0093] 在TNFR2激动剂构建体的一些实施方案中,TNFR2激动剂是单价的;在其它情况下,它是多价的,例如二价或三价。TNFR2构建体可以含有本文所述的接头。例如,接头可包含Gly-Ser,例如 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$,或 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 和SCDKTH(SEQ ID NO:31的残基217-222),或 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 和曲妥珠单抗的铰链序列,对应于SEQ ID NO:26的残基219-233,或 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 和纳武单抗的铰链序列,对应于SEQ ID NO:29的残基212-223,或与其具有至少95%序列相同性的任何前述接头的变体。这些构建体还可以包括活性调节剂,例如是半衰期延长部分

的调节剂,例如如上所述的PEG或HSA。PEG部分的大小至少为20kDa,通常至少为30kDa或更大,如上文和下文所述。

[0094] 还提供了TNFR2激动剂构建体,其包含:

[0095] a) 结合人TNFR2内一个或多个表位的TNFR2激动剂,该表位选自SEQ ID NO:839-865、1202和1204中所示的表位;

[0096] b) GS接头,其选自 $(\text{GlySer})_n$, 其中 $n=1-10$; $(\text{GlySer}_2)_n$; $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, 其中 $n=1-10$; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$, 其中 $n=1-5$; $(\text{SerGly}_4)_n$, 其中 $n=1-5$; $(\text{GlySerSerGly})_n$, 其中 $n=1-5$; GSGGSSGG; GSSSGSGSGSSG; GSSSGSGSGSSG; GGSSGG; GGSSGGSGGSSG; GSSSGSGSGSSSGSGSG; GGSSGGSSGGSSSGSSG; 和GSSSGS; 和

[0097] c) 活性调节剂,其是半衰期延长部分,是IgG Fc。

[0098] 如上所述,在示例的实施方案中,GS接头可以是 $(\text{GGGS})_3$; IgG Fc是为曲妥珠单抗的Fc或纳武单抗的Fc的Fc。

[0099] 其它TNFR2激动剂构建体包含:

[0100] a) 结合人TNFR2内一个或多个表位的TNFR2激动剂,该表位选自SEQ ID NO:839-865、1202和1204中所示的表位;

[0101] b) 选自曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列和纳武单抗的全部或部分铰链序列的接头;和

[0102] c) 活性调节剂,其是半衰期延长部分,是IgG Fc。接头和活性调节剂的实例是曲妥珠单抗的铰链序列; IgG Fc是曲妥珠单抗的Fc,或纳武单抗的全部或部分铰链序列; IgG Fc是纳武单抗的Fc。

[0103] 在其它实施方案中, TNFR2构建体包含:

[0104] a) 结合人TNFR2内一个或多个表位的TNFR2激动剂,该表位选自SEQ ID NO:839-865、1202和1204中所示的表位;

[0105] b) 第一接头,其是GS接头,选自 $(\text{GlySer})_n$, 其中 $n=1-10$; $(\text{GlySer}_2)_n$; $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, 其中 $n=1-10$; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$, 其中 $n=1-5$; $(\text{SerGly}_4)_n$, 其中 $n=1-5$; $(\text{GlySerSerGly})_n$, 其中 $n=1-5$; GSGGSSGG; GSSSGSGSGSSG; GSSSGSGSGSSG; GGSSGG; GGSSGGSGGSSG; GSSSGSGSGSSSGSGSG; GGSSGGSSGGSSSGSSG; 和GSSSGS;

[0106] c) 第二接头,选自曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列和纳武单抗的全部或部分铰链序列;和

[0107] d) 活性调节剂,其是半衰期延长部分,是IgG Fc。此类构建体的示例是其中第一GS接头是 $(\text{GGGS})_3$, 第二接头包含序列SCDKTH (SEQ ID NO:31的残基217-222) 的那些构建体以及IgG Fc为曲妥珠单抗的Fc的构建体。在其它实施方案中,第一接头是 $(\text{GGGS})_3$, 第二接头包含纳武单抗的全部或部分铰链序列以及IgG Fc是纳武单抗的Fc。

[0108] 在一些实施方案中,构建体是TNFR2激动剂构建体,包含:

[0109] a) TNFR2激动剂,其包含选自MR2-1或MAB2261的激动剂人抗TNFR2抗体的抗原结合片段;

[0110] b) 接头,其包含:

[0111] i) GS接头,选自 $(\text{GlySer})_n$, 其中 $n=1-10$; $(\text{GlySer}_2)_n$; $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, 其中 $n=1-10$; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$, 其中 $n=1-5$; $(\text{SerGly}_4)_n$, 其中 $n=1-5$; $(\text{GlySerSerGly})_n$, 其中 $n=1-5$;

GSGGSSGG;GSSSGSGSGSSG;GSSSGSGSGSSGG;GGSSGG;GGSSGGSGGSSSG;GSSSGSGSGSSSGSGSG;
GGSSGGSSGGSSGGSSG;和GSSSGS;和/或

[0112] ii) 曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列或纳武单抗的全部或部分铰链序列;和

[0113] c) 活性调节剂,其是选自IgG1 Fc或IgG4 Fc、PEG分子和人血清白蛋白(HSA)的半衰期延长部分,其中:

[0114] IgG1 Fc是人IgG1的Fc,如SEQ ID NO:10所示,或者是曲妥珠单抗的Fc,如SEQ ID NO:27所示;和

[0115] PEG分子具有至少或至少约30kDa的分子量。

[0116] 在一些实施方案中,构建体是TNFR2激动剂构建体,包含:

[0117] a) TNFR2选择性TNF突变蛋白,其是可溶TNF变体,包含一个或多个选自以下的TNFR2选择性突变:参考SEQ ID NO:2的K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V,A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D,Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D,L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D,A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D,A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D,D143V/F144L/A145S,S95C/G148C,和D143V/A145S;

[0118] b) 接头,其包含:

[0119] i) GS接头,选自:(GlySer)_n,其中n=1-10;(GlySer₂);(Gly₄Ser)_n,其中n=1-10;(Gly₃Ser)_n,其中n=1-5;(SerGly₄)_n,其中n=1-5;(GlySerSerGly)_n,其中n=1-5;GSGGSSGG;GSSSGSGSGSSG;GSSSGSGSGSSGG;GGSSGG;GGSSGGSGGSSSG;GSSSGSGSGSSSGSGSG;GGSSGGSSGGSSGGSSG;和GSSSGS;和/或

[0120] ii) 曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列或纳武单抗的全部或部分铰链序列;和

[0121] c) 活性调节剂,其是选自IgG1 Fc或IgG4 Fc、PEG分子和人血清白蛋白(HSA)的半衰期延长部分,其中:

[0122] IgG1 Fc是人IgG1的Fc,如SEQ ID NO:10所示,或者是曲妥珠单抗的Fc,如SEQ ID NO:27所示;和

[0123] PEG分子具有至少或至少约30kDa的分子量。

[0124] 在一些实施方案中,构建体是TNFR2激动剂构建体,包含:

[0125] a) 包含突变D143N/A145R的TNFR2 TNF突变蛋白;

[0126] b) (GGGS)₃接头;和

[0127] c) 活性调节剂,其是半衰期延长部分,是曲妥珠单抗的Fc或纳武单抗的Fc。

[0128] 在一些实施方案中,构建体是TNFR2激动剂构建体,其包含

[0129] a) 包含突变D143N/A145R的TNFR2选择性TNF突变蛋白;

[0130] b) (GGGS)₃接头和包含序列SCDKTH(SEQ ID NO:31的残基217-222)的第二接头;和

[0131] c) 活性调节剂,其是半衰期延长部分,是曲妥珠单抗的Fc。

[0132] 在一些实施方案中,构建体是TNFR2激动剂构建体,包含:

[0133] a) 包含突变D143N/A145R的TNFR2选择性TNF突变蛋白;

- [0134] b) (GGGGS)₃接头和包含纳武单抗的全部或部分铰链序列的第二接头;和
- [0135] c) 活性调节剂,其是半衰期延长部分,是纳武单抗的Fc。
- [0136] 在一些实施方案中,构建体是TNFR2激动剂构建体,包含:
- [0137] a) 包含突变D143N/A145R的TNFR2选择性TNF突变蛋白;
- [0138] b) 包含曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列的接头,对应于SEQ ID NO:26的残基219-233;和
- [0139] c) 半衰期延长部分,其是曲妥珠单抗的Fc。
- [0140] 在一些实施方案中,构建体是TNFR2激动剂构建体,包含:
- [0141] a) 包含突变D143N/A145R的TNFR2选择性TNF突变蛋白;
- [0142] b) 包含对应于SEQ ID NO:29的残基212-223的纳武单抗的铰链序列的全部或部分的接头;和
- [0143] c) 活性调节剂,其是半衰期延长部分,是纳武单抗的Fc。
- [0144] 提供了TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体以及这两者,其中IgG Fc是单体或二聚体。本文提供的构建体可包含dAb(或Vhh)。构建体可包含含有dAb的Vhh单链或双链。这些构建体可以含有直接或通过接头连接于dAb的HSA。HSA和dAb可以以任何顺序连接,例如dAb的C末端直接或通过例如上述任何一种接头连接于HSA的N末端。此类构建体的示例是包含以下的那些:
- [0145] a) 残基20-732,其是SEQ ID NO:59的dAb Dom1h-131-206,通过接头连接于HSA,如SEQ ID NO:1475所示,或与SEQ ID NO:1475的构建体或与SEQ ID NO:1475的残基20-732具有至少95%、96%、97%、98%、99%序列相同性并具有TNFR1拮抗剂活性的构建体;或者
- [0146] b) SEQ ID NO:53-83和503-671任一所示的dAb,及与其具有至少95%、96%、97%、98%、99%序列相同性的变体,由此所述构建体具有TNFR1拮抗剂活性;或者
- [0147] c) 具有SEQ ID NO:57-59任一所示序列的dAb及与其具有至少95%序列相同性的变体,由此该构建体具有TNFR1拮抗剂活性;或者
- [0148] d) 称作SEQ ID NO:59所示DOM1h-131-206的dAb及与其具有至少95%、96%、97%、98%、99%序列相同性并具有TNFR1拮抗剂活性的变体;或者
- [0149] e) 上述a)至d)任一项的组合;或者
- [0150] f) 上述a)至f)任一项的人源化序列,或者其中施用于人的构建体的足够部分是人源化的,其中足够部分足以在施用于人时消除或减少对该构建体的任何免疫反应。
- [0151] 作为TNFR1构建体的本文提供的构建体可以进一步包含TNFR2激动剂或者所述构建体可以是TNFR2激动剂构建体。在包含TNFR2激动剂的构建体中,可以修饰TNFR2激动剂以消除在待治疗的受试者中具有免疫原性的氨基酸序列或表位,例如用于施用于人受试者。在含有TNFR2激动剂的构建体中,其可以是TNFR2选择性激动剂。这些构建体可以包含经修饰的IgG Fc。例如,IgG Fc可以包含以下修饰中的一种或多种:
- [0152] a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰;
- [0153] b) 增加或增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的一或多个修饰;和
- [0154] c) 减少或消除免疫效应子功能的一或多个修饰,所述免疫效应子功能选自补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)中的一种或多种。示例的此类修饰是:

[0155] a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰选自：

[0156] 一种或多种凸出突变,选自根据EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W;和

[0157] 一种或多种凹陷突变,选自根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V,由此Fc形成二聚体;

[0158] b) 增加或增强FcRn再循环的一或多个修饰选自以下的一或多个:根据EU编号的T250Q, T250R, M252F, M252W, M252Y, S254T, T256D, T256E, T256Q, V259I, V308F, E380A, M428L, H433K, N434F, N434A, N434W, N434S, N434Y, Y436H, M252Y/T256Q, M252F/T256D, M252Y/S254T/T256E, H433K/N434F/Y436H, N434F/Y436H, T250Q/M428L, T250R/M428L, M428L/N434S, V259I/V308F, V259I/V308F/M428L, E294del/T307P/N434Y, 和T256N/A378V/S383N/N434Y;及

[0159] c) 减少或消除免疫效应子功能的一或多个修饰选自以下的一或多个:

[0160] 在IgG1中:根据EU编号的L235E, L234A/L235A, L234E/L235F/P331S, L234F/L235E/P331S, L234A/L235A/P329G, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, G236R/L328R, G237A, E318A, D265A, E233P, N297A, N297Q, N297D, N297G, N297G/D265A, A330L, D270A, P329A, P331A, K322A, V264A, 和F241A;及

[0161] 在IgG4中:根据EU编号的L235E, F234A/L235A, S228P/L235E, 和S228P/F234A/L235A。

[0162] 本文提供的构建体包括含有经修饰的IgG Fc的TNFR2激动剂构建体,其中IgG Fc包含以下修饰中的一或多个:

[0163] a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰,其中:

[0164] 凸出突变选自根据EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W;和

[0165] 凹陷突变选自根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V;

[0166] b) 增加或增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的一或多个修饰,其中修饰选自以下的一或多个:

[0167] 根据EU编号的T250Q, T250R, M252F, M252W, M252Y, S254T, T256D, T256E, T256Q, V259I, V308F, E380A, M428L, H433K, N434F, N434A, N434W, N434S, N434Y, Y436H, M252Y/T256Q, M252F/T256D, M252Y/S254T/T256E, H433K/N434F/Y436H, N434F/Y436H, T250Q/M428L, T250R/M428L, M428L/N434S, V259I/V308F, V259I/V308F/M428L, E294del/T307P/N434Y, 和T256N/A378V/S383N/N434Y;及

[0168] c) 增加或增强免疫效应子功能的一或多个修饰,其中:

[0169] 免疫效应子功能选自CDC、ADCC和ADCP中的一种或多种;和

[0170] 增加或增强免疫效应子功能的一或多个修饰选自以下的一或多个:

[0171] 在IgG1中:根据EU编号的S239D, I332E, S239D/I332E, S239D/A330L/I332E, S298A/E333A/K334A; F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L; L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L; F243L/R292P/Y300L; 第一重链中L234Y/G236W/S298A和第二重链中S239D/A330L/I332E; 第一重链中L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A和第二重链中D270E/K326D/A330M/K334E; A327Q/P329A; D265A/S267A/H268A/D270A/K326A/S337A; T256A/K290A/S298A/E333A/K334A; G236A; G236A/I332E; G236A/S239D/I332E; G236A/S239D/A330L/I332E; 在残基N297引入双触角聚糖; 在残基N297引入去岩藻糖基化聚糖; K326W; K326A;

E333A;K326A/E333A;K326W/E333S;K326M/E333S;K222W/T223W;K222W/T223W/H224W;D221W/K222W;C220D/D221C;C220D/D221C/K222W/T223W;H268F/S324T;S267E;H268F;S324T;S267E/H268F/S324T;G236A/I332E/S267E/H268F/S324T;E345R;和E345R/E430G/S440Y。

[0172] 作为TNFR2激动剂构建体的本文提供的构建体可以包含经修饰的IgG1 Fc,例如其中Fc被修饰以增加与抑制性Fc γ 受体(Fc γ R)Fc γ R1Ib的结合,其可以包括增加与Fc γ R1Ib结合的修饰。此类修饰的示例是选自根据EU编号的S267E、N297A、L328F、L351S、T366R、L368H、P395K、S267E/L328F和L351S/T366R/L368H/P395K中一种或多种的那些修饰。

[0173] 提供的构建体是或包含TNFR2激动剂构建体,其选择性激活或激动TNFR2而不激活和不拮抗TNFR1。这些构建体包括那些包含以下的构建体:a) TNFR2激动剂;b) 一个或多个接头;和c) 活性调节剂,其是半衰期延长部分,其中:

[0174] TNFR2激动剂构建体是包含与多聚化结构域融合的单链TNFR2-选择性TNF突变蛋白三聚体的融合蛋白,并且包含下式:

[0175] MD-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-TNFmut(式II);或

[0176] TNFmut-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-MD(式III),

[0177] MD是多聚化结构域,并且每个结构域是相同或不同的;TNFmut是TNFR2选择性TNF突变蛋白;并且L1、L2和L3是可以相同或不同的接头。TNF突变蛋白可包含一或多个选自以下的TNFR2选择性突变:参考SEQ ID NO:2的K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V,A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D,Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D,L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D,A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D,A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D,D143V/F144L/A145S,S95C/G148C,和D143V/A145S,例如TNFR2-选择性突变D143N/A145R。在这些构建体中,多聚化结构域可以选自EHD2(SEQ ID NO:808)、MHD2(SEQ ID NO:811)、鸡腱糖蛋白C(TNC)的三聚化结构域(SEQ ID NO:804的残基110-139;SEQ ID NO:805),或人TNC的三聚化结构域(SEQ ID NO:806的残基110-139,SEQ ID NO:807),或与其具有至少95%、96%、97%、98%、99%序列相同性的变体。例如,多聚化结构域是IgG1 Fc或IgG4 Fc,并且IgG1 Fc或IgG4 Fc也是半衰期延长部分。这些构建体含有接头,包括本文所述和本领域技术人员已知的任何接头。这些构建体的示例是其中L1、L2和/或L3接头独立地选自(GGGGS)_n,其中n=1-5,以及全部或部分TNF茎区(SEQ ID NO:812)或与其具有至少95%、96%、97%、98%、99%序列相同性的变体。这些构建体包括其中TNFR2激动剂和半衰期延长部分之间的接头选自以下的那些构建体:GS接头(GlySer)_n,其中n=1-10;(GlySer)₂; (Gly₄Ser)_n,其中n=1-10;(Gly₃Ser)_n,其中n=1-5;(SerGly₄)_n,其中n=1-5;(GlySerSerGly)_n,其中n=1-5;GSGGSSGG;GSSSGSGSGSSG;GSSSGSGSGSSG;GGSSGG;GGSSGGSGSSSG;GSSSGSGSGSSSGSGSG;GGSSGGSSGGSSSGSSG;和GSSSGS;或选自曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列和纳武单抗的全部或部分铰链序列的接头;或其组合。半衰期延长部分可选自:IgG1 Fc,即人IgG1的Fc,如SEQ ID NO:10所示,或曲妥珠单抗的Fc,如SEQ ID NO:27所示;IgG4 Fc是人IgG4的Fc,如SEQ ID NO:16所示,或纳武单抗的Fc,如SEQ ID NO:30所示;PEG分子,其大小为至少或至少约30kDa;人血清白蛋白

(HSA), 以及与其具有至少95%、96%、97%、98%、99%序列相同性的多肽部分的变体。

[0178] 提供的构建体是或包含TNFR2激动剂构建体。这些构建体包括包含以下式的那些构建体:

[0179] MD-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-TNFmut(式II); 或者

[0180] TNFmut-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-MD(式III), 其中:

[0181] a) MD是多聚化结构域; TNFmut是TNFR2选择性TNF突变蛋白; 并且L1、L2和L3是可以相同或不同的接头, 其中:

[0182] i) MD选自EHD2(SEQ ID NO:808)、MHD2(SEQ ID NO:811)、鸡腱糖蛋白C(TNC)的三聚化结构域(SEQ ID NO:804的残基110-139; SEQ ID NO:805), 或人TNC的三聚化结构域(SEQ ID NO:806的残基110-139, SEQ ID NO:807);

[0183] ii) L1、L2和L3各自为(GGGGS)_n, 其中n=1-5, 或全部或部分TNF茎区(SEQ ID NO:812), 或其混合物; 和

[0184] iii) TNF突变蛋白包含TNFR2选择性突变D143N/A145R;

[0185] b) 半衰期延长部分选自:

[0186] 是人IgG1的Fc的IgG1 Fc, 如SEQ ID NO:10所示, 或曲妥珠单抗的Fc, 如SEQ ID NO:27所示;

[0187] 是人IgG4的Fc的IgG4 Fc, 如SEQ ID NO:16所示, 或纳武单抗的Fc, 如SEQ ID NO:30所示;

[0188] PEG分子, 其大小为至少或至少约30kDa; 和

[0189] 人血清白蛋白(HSA); 及

[0190] c) TNFR2-选择性激动剂和半衰期延长部分之间的接头, 其中所述接头包含:

[0191] GS接头, 选自(GlySer)_n, 其中n=1-10; (GlySer₂); (Gly₄Ser)_n, 其中n=1-10; (Gly₃Ser)_n, 其中n=1-5; (SerGly₄)_n, 其中n=1-5; (GlySerSerGly)_n, 其中n=1-5; GSGSSGG; GSSSGSGSSG; GSSSGSGSSGG; GGSSGG; GGSSGGSSSSG; GSSSGSGSSSGSSG; GGSSGGSSGGSSSGSSG; 和GSSSGS; 或

[0192] 选自曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列和纳武单抗的全部或部分铰链序列的接头; 或者

[0193] 其组合。

[0194] 所述构建体包括TNFR2激动剂构建体, 其包含下式:

[0195] MD-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-TNFmut(式II); 或者

[0196] TNFmut-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-MD(式III),

[0197] 其中MD是多聚化结构域; TNFmut是TNFR2选择性TNF突变蛋白; 并且L1、L2和L3是可以相同或不同的接头, 其中:

[0198] i) MD选自IgG1 Fc或IgG4 Fc;

[0199] ii) 式II中的L2和L3、以及式III中的L1和L2各自独立地为(GGGGS)_n, 其中n=1-5, 或全部或部分TNF的茎区(SEQ ID NO:812), 或其组合;

[0200] iii) 式II中的L1和式III中的L3各自独立地选自:

[0201] GS接头, 选自(GlySer)_n, 其中n=1-10; (GlySer₂); (Gly₄Ser)_n, 其中n=1-10; (Gly₃Ser)_n, 其中n=1-5; (SerGly₄)_n, 其中n=1-5; (GlySerSerGly)_n, 其中n=1-5;

GSGGSSGG;GSSSGSGSGSSG;GSSSGSGSGSSGG;GGSSGG;GGSSGGSGGSSSG;GSSSGSGSGSSSGSGSG;
GGSSGGSSGGSSGGSSG;和GSSSGS;或

[0202] 选自曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列和纳武单抗的全部或部分铰链序列的接头;或者

[0203] 其组合;以及

[0204] iv) TNF突变蛋白包含TNFR2选择性突变D143N/A145R。在这些构建体中,MD可以选自:

[0205] 是人IgG1的Fc的IgG1 Fc,如SEQ ID NO:10所示,或曲妥珠单抗的Fc,如SEQ ID NO:27所示;或者

[0206] 是人IgG4的Fc的IgG4 Fc,如SEQ ID NO:16所示,或纳武单抗的Fc,如SEQ ID NO:30所示;或者

[0207] 其组合或与其具有至少95%、96%、97%、98%、99%序列相同性的变体。

[0208] 示例的构建体是那些包括MD的构建体,所述MD是曲妥珠单抗的IgG1 Fc,并且MD和相邻TNF突变蛋白之间的接头是对应于SEQ ID NO:26的残基219-233的曲妥珠单抗的铰链序列的全部或部分,或是曲妥珠单抗的IgG1 Fc的MD,并且MD和相邻TNF突变蛋白之间的接头包含序列SCDKTH(SEQ ID NO:31的残基217-222)。示例的构建体是包含MD的构建体,所述MD是曲妥珠单抗的IgG1 Fc,其中MD和相邻TNF突变蛋白之间的接头包含(Gly₄Ser)₃和对应于SEQ ID NO:26的残基219-233的曲妥珠单抗的铰链序列。在一些实施方案中,MD是曲妥珠单抗的IgG1 Fc,MD和相邻TNF突变蛋白之间的接头包含(Gly₄Ser)₃和SCDKTH(SEQ ID NO:31的残基222-227),其中MD是纳武单抗的IgG4 Fc,以及MD和相邻TNF突变蛋白之间的接头包含对应于SEQ ID NO:29的残基212-223的纳武单抗的铰链序列的全部或部分,或那些其中:MD是纳武单抗的IgG4 Fc,MD与相邻TNF突变蛋白之间的接头包含(Gly₄Ser)₃和对应于SEQ ID NO:29的残基212-223的纳武单抗的铰链序列的全部或部分。

[0209] 可以修饰本文的构建体,包括激动剂构建体,以消除免疫原性序列,例如那些对人具有免疫原性的序列。本文提供了TNFR2激动剂构建体,其中TNFR2激动剂被修饰以消除在受试者例如人受试者中具有免疫原性的免疫原性序列或表位。

[0210] 在本文提供的构建体中,其是TNFR2激动剂构建体并且包含经修饰的IgG Fc,所述IgG Fc可以包含以下的一或多个修饰:

[0211] a) 引入凸出凹陷(knobs-into-holes)的一或多个修饰,其中:

[0212] 凸出突变选自根据EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W中的一或多个;和

[0213] 凹陷突变选自根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V中的一或多个;

[0214] b) 增加或增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的一或多个修饰,其中所述修饰选自以下的一或多个:

[0215] 根据EU编号的T250Q,T250R,M252F,M252W,M252Y,S254T,T256D,T256E,T256Q,V259I,V308F,E380A,M428L,H433K,N434F,N434A,N434W,N434S,N434Y,Y436H,M252Y/T256Q,M252F/T256D,M252Y/S254T/T256E,H433K/N434F/Y436H,N434F/Y436H,T250Q/M428L,T250R/M428L,M428L/N434S,V259I/V308F,V259I/V308F/M428L,E294del/T307P/N434Y,和T256N/A378V/S383N/N434Y;及

- [0216] c) 减少或消除免疫效应子功能的一或多个修饰,其中:
- [0217] 免疫效应子功能选自CDC、ADCC和ADCP中的一种或多种;和
- [0218] 减少或消除免疫效应子功能的一或多个修饰选自以下的一或多个:
- [0219] 在IgG1中:根据EU编号的L235E,L234A/L235A,L234E/L235F/P331S,L234F/L235E/P331S,L234A/L235A/P329G,L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S,G236R/L328R,G237A,E318A,D265A,E233P,N297A,N297Q,N297D,N297G,N297G/D265A,A330L,D270A,P329A,P331A,K322A,V264A,和F241A;及
- [0220] 在IgG4中:根据EU编号的L235E,F234A/L235A,S228P/L235E,和S228P/F234A/L235A。
- [0221] 提供了任何前述构建体,其是包含经修饰的IgG Fc的TNFR2激动剂构建体,其中IgG Fc包含以下一或多个修饰:
- [0222] a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰,其中:
- [0223] 凸出突变选自根据EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W中的一或多个;和
- [0224] 凹陷突变选自根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V中的一或多个;
- [0225] b) 增加或增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的一或多个修饰,其中所述修饰选自以下一或多个修饰:
- [0226] 根据EU编号的T250Q,T250R,M252F,M252W,M252Y,S254T,T256D,T256E,T256Q,V259I,V308F,E380A,M428L,H433K,N434F,N434A,N434W,N434S,N434Y,Y436H,M252Y/T256Q,M252F/T256D,M252Y/S254T/T256E,H433K/N434F/Y436H,N434F/Y436H,T250Q/M428L,T250R/M428L,M428L/N434S,V259I/V308F,V259I/V308F/M428L,E294del/T307P/N434Y,和T256N/A378V/S383N/N434Y;及
- [0227] c) 增加或增强免疫效应子功能的一或多个修饰,其中:
- [0228] 免疫效应子功能选自CDC、ADCC和ADCP中的一种或多种;和
- [0229] 增加或增强免疫效应子功能的一或多个修饰选自以下的一或多个:
- [0230] 在IgG1中:根据EU编号的S239D,I332E,S239D/I332E,S239D/A330L/I332E,S298A/E333A/K334A;F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L;L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L;F243L/R292P/Y300L;在第一重链中的L234Y/G236W/S298A和在第二重链中的S239D/A330L/I332E;在第一重链中的L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A和在第二重链中的D270E/K326D/A330M/K334E;A327Q/P329A;D265A/S267A/H268A/D270A/K326A/S337A;T256A/K290A/S298A/E333A/K334A;G236A;G236A/I332E;G236A/S239D/I332E;G236A/S239D/A330L/I332E;在残基N297引入双触角聚糖;在残基N297引入去岩藻糖基化聚糖;K326W;K326A;E333A;K326A/E333A;K326W/E333S;K326M/E333S;K222W/T223W;K222W/T223W/H224W;D221W/K222W;C220D/D221C;C220D/D221C/K222W/T223W;H268F/S324T;S267E;H268F;S324T;S267E/H268F/S324T;G236A/I332E/S267E/H268F/S324T;E345R;及E345R/E430G/S440Y。
- [0231] 提供了任何权利要求的任何前述TNFR2激动剂构建体,其包含经修饰以增加与抑制性Fc γ 受体(Fc γ R)Fc γ RIIb结合的IgG1 Fc。例如是其中增加与Fc γ RIIb结合的修饰选自根据EU编号的S267E、N297A、L328F、L351S、T366R、L368H、P395K、S267E/L328F和L351S/

T366R/L368H/P395K中的一或多个的修饰。

[0232] 本文提供的构建体可以是多特异性的,因为其与两个或多个靶标相互作用。此类多特异性构建体的示例是那些多特异性TNFR1抑制剂/TNFR2激动剂构建体并且具有以下任何式:

[0233] (TNFR1抑制剂)_n-接头(L)_p-(TNFR2激动剂)_q(式I),或

[0234] (TNFR1抑制剂)_n-接头(L)_p-(TNFR2激动剂)_q,或

[0235] (TNFR1抑制剂)_n-(TNFR2激动剂)_q-接头(L)_p,或

[0236] (TNFR2激动剂)_q-(TNFR1抑制剂)_n-接头(L)_p,或

[0237] 上述任何一项,包含任选的活性调节剂,其中:n=1或2,p=1、2或3,且q=1或2;

TNFR1抑制剂与TNFR1相互作用以抑制其活性;活性调节剂是与不存在所述活性调节剂的构建体相比,调节或改变所述构建体的活性或药理学性质的部分;以及接头,例如增加所述构建体的溶解度,或增加柔性,或改变所述构建体的空间效应。这些构建体包括那些是多特异性TNFR1抑制剂/TNFR2激动剂构建体的构建体,其中:TNFR1抑制剂选择性抑制或拮抗TNFR1信号传导而不抑制和不拮抗TNFR2信号传导;TNFR1抑制剂不干扰TNFR2的激活或激动;TNFR2激动剂选择性激活或激动TNFR2信号传导而不激活和不激动TNFR1信号传导;并且TNFR2激动剂不干扰TNFR1的抑制或拮抗作用。此类构建体的示例是以下a)至c)中那些:

[0238] a) TNFR1抑制剂选自:

[0239] i) 选自H398或ATROSAB的人抗TNFR1拮抗剂单克隆抗体的抗原结合片段或具有与其具有至少95%序列相同性的序列的多肽;或者

[0240] ii) SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb),或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab,或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体,或SEQ ID NO:701-703任一所示的TNF突变蛋白,或具有与任何前述多肽具有至少95%序列相同性且为TNFR1抑制剂的序列的多肽;或者

[0241] iii) 显性阴性肿瘤坏死因子(DN-TNF)或TNF突变蛋白,其包含可溶TNF分子,具有一个或多个赋予TNFR1选择性抑制的氨基酸置换并且选自:

[0242] 参考如SEQ ID NO:2所示的可溶TNF序列的V1M,L29S,L29G,L29Y,R31C,R31E,R31N,R32Y,R32W,C69V,A84S,V85T,S86T,Y87H,Q88N,T89Q,I97T,C101A,A145R,E146R,L29S/R32W,L29S/S86T,R32W/S86T,L29S/R32W/S86T,R31N/R32T,R31E/S86T,R31N/R32T/S86T,I97T/A145R,V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R,和A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q;

[0243] b) 接头选自:

[0244] i) GS接头,选自(GlySer)_n,其中n=1-10;(GlySer)₂; (Gly₄Ser)_n,其中n=1-10;

(Gly₃Ser)_n,其中n=1-5;(SerGly₄)_n,其中n=1-5;(GlySerSerGly)_n,其中n=1-5;

GSGGSSGG;GSSSGSGSGSSG;GSSSGSGSGSSG;GGSSGG;GGSSGGSGGSSSG;GSSSGSGSGGSSSGSGSG;

GGSSGGSSGGSSGGSSG;和GSSSGS;和/或

[0245] ii) 对应于SEQ ID NO:26的残基219-233的曲妥珠单抗的铰链序列的全部或部分,或对应于SEQ ID NO:29的残基212-223的纳武单抗的铰链序列的全部或部分;和

[0246] iii) IgG1 Fc或IgG4 Fc,其中:

[0247] IgG1 Fc选自人IgG1的IgG1 Fc,如SEQ ID NO:10所示,或曲妥珠单抗的IgG1Fc,如

SEQ ID NO:27所示;

[0248] IgG4 Fc选自人IgG4的IgG4 Fc,如SEQ ID NO:16所示,或纳武单抗的IgG4 Fc,如SEQ ID NO:30所示;及

[0249] 任选地,Fc包括一或多个修饰以引入凸出凹陷,和/或增加或增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环,和/或减少或消除免疫效应子功能;和

[0250] c) TNFR2激动剂选自:

[0251] i) 结合人TNFR2内一个或多个表位的抗原结合片段,该表位选自SEQ ID NO:839-865、1202和1204所示的表位;或者

[0252] ii) 选自MR2-1或MAB2261的激动性人抗TNFR2抗体的抗原结合片段;或者

[0253] iii) TNFR2选择性TNF突变蛋白,其是可溶TNF变体,包含一或多个选自以下的选择性TNFR2突变:参考SEQ ID NO:2的K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V,A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D,Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D,L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D,A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D,A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D,D143V/F144L/A145S,S95C/G148C,和D143V/A145S;或

[0254] iv) 单链TNFR2选择性TNF突变蛋白三聚体,包含突变D143N/A145R,其中TNF突变蛋白由(GGGGS)_n或全部或部分TNF茎区(SEQ ID NO:812)连接,其中n=1-5;或者

[0255] v) TNFR2-选择性激动剂,包含下式:

[0256] MD-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-TNFmut(式II);或者

[0257] TNFmut-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-MD(式III);

[0258] 其中MD是多聚化结构域;TNFmut是TNFR2选择性TNF突变蛋白;并且L1、L2和L3是可以相同或不同的接头,及其中:

[0259] MD选自EHD2(SEQ ID NO:808)、MHD2(SEQ ID NO:811)、鸡腱糖蛋白C(TNC)的三聚化结构域(SEQ ID NO:804的残基110-139;SEQ ID NO:805),或人TNC的三聚化结构域(SEQ ID NO:806的残基110-139,SEQ ID NO:807);

[0260] L1、L2和L3各自为(GGGGS)_n,其中n=1-5,或全部或部分TNF茎区(SEQ ID NO:812),或其混合物;和

[0261] TNF突变蛋白包含TNFR2选择性突变D143N/A145R。

[0262] 其它此类构建体包括那些多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体,其中:

[0263] a) TNFR1抑制剂包含SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb),或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab,或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体,或SEQ ID NO:701-703任一所示的TNF突变蛋白,或与其具有至少或至少约95%序列相同性的序列;

[0264] b) 接头包含(GGGGS)₃,包含序列SCDKTH(SEQ ID NO:26的残基222-227)的多肽和曲妥珠单抗的Fc;和

[0265] c) TNFR2激动剂包含TNFR2-选择性TNF突变蛋白,其是可溶TNF变体,包含选自以下的一或多个TNFR2选择性突变:参考SEQ ID NO:2的K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,

D143W, D143V, A145R, A145H, A145K, A145F, A145W, E146Q, E146H, E146K, E146N, D143N/A145R, A145R/S147T, Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D, Q88N/A145I/E146G/S147D, A145H/E146S/S147D, A145H/S147D, L29V/A145D/E146D/S147D, A145N/E146D/S147D, A145T/E146S/S147D, A145Q/E146D/S147D, A145T/E146D/S147D, A145D/E146G/S147D, A145D/S147D, A145K/E146D/S147T, A145R/E146T/S147D, A145R/S147T, E146D/S147D, D143V/F144L/A145S, S95C/G148C, 和D143V/A145S。

[0266] 其它此类多特异性构建体如下的那些, 其中:

[0267] a) TNFR1抑制剂包含SEQ ID NO: 52-672任一所示的域抗体(dAb), 或SEQ ID NO: 673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO: 679-682任一所示的Fab, 或SEQ ID NO: 683或684所示的纳米抗体, 或SEQ ID NO: 701-703任一所示的TNF突变蛋白, 或与其具有至少或至少约95%序列相同性的序列;

[0268] b) 接头包含(GGGGS)₃, 纳武单抗的全部或部分铰链序列, 以及纳武单抗的Fc; 和

[0269] c) TNFR2激动剂包含TNFR2选择性TNF突变蛋白, 其是可溶TNF变体, 包含一或多个选自以下的TNFR2选择性突变: 参考SEQ ID NO: 2的K65W, D143Y, D143F, D143N, D143E, D143W, D143V, A145R, A145H, A145K, A145F, A145W, E146Q, E146H, E146K, E146N, D143N/A145R, A145R/S147T, Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D, L29V/A145D/E146D/S147D, A145N/E146D/S147D, A145T/E146S/S147D, A145Q/E146D/S147D, A145T/E146D/S147D, A145D/E146G/S147D, A145D/S147D, A145K/E146D/S147T, A145R/E146T/S147D, A145R/S147T, E146D/S147D, D143V/F144L/A145S, S95C/G148C, 和D143V/A145S。

[0270] 其它这种多特异性构建体是以下那些构建体, 其中:

[0271] a) TNFR1抑制剂包含SEQ ID NO: 52-672任一所示的域抗体(dAb), 或SEQ ID NO: 673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO: 679-682任一所示的Fab, 或SEQ ID NO: 683或684所示的纳米抗体, 或SEQ ID NO: 701-703任一所示的TNF突变蛋白, 或与其具有至少或至少约95%序列相同性的序列;

[0272] b) 接头包含(GGGGS)₃和曲妥珠单抗的Fc; 和

[0273] c) TNFR2激动剂包含TNFR2选择性TNF突变蛋白, 其是可溶TNF变体, 包含一或多个选自以下的TNFR2选择性突变: 参考SEQ ID NO: 2的K65W, D143Y, D143F, D143N, D143E, D143W, D143V, A145R, A145H, A145K, A145F, A145W, E146Q, E146H, E146K, E146N, D143N/A145R, A145R/S147T, Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D, Q88N/A145I/E146G/S147D, A145H/E146S/S147D, A145H/S147D, L29V/A145D/E146D/S147D, A145N/E146D/S147D, A145T/E146S/S147D, A145Q/E146D/S147D, A145T/E146D/S147D, A145D/E146G/S147D, A145D/S147D, A145K/E146D/S147T, A145R/E146T/S147D, A145R/S147T, E146D/S147D, D143V/F144L/A145S, S95C/G148C, 和D143V/A145S。

[0274] 其它这种多特异性构建体是以下那些构建体, 其中:

[0275] a) TNFR1抑制剂包含SEQ ID NO: 52-672任一所示的域抗体(dAb), 或SEQ ID NO: 673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO: 679-682任一所示的Fab, 或SEQ ID NO: 683或684所示的纳米抗体, 或SEQ ID NO: 701-703任一所示的TNF突变蛋白, 或与其具有至少或至少约95%序列相同性的序列;

[0276] b) 接头包含(GGGGS)₃, 和纳武单抗的Fc; 和

[0277] c) TNFR2激动剂包含TNFR2选择性TNF突变蛋白,其是可溶TNF变体,包含一或多个选自以下的TNFR2选择性突变:参考SEQ ID NO:2的K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V,A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D,Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D,L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D,A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D,A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D,D143V/F144L/A145S,S95C/G148C,和D143V/A145S,及前述突变的任何组合。

[0278] 这些多特异性构建体可以包含经修饰的Fc,其中IgG Fc包含一或多个以下修饰:

[0279] a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰;

[0280] b) 增加或增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的一或多个修饰;和

[0281] c) 减少或消除免疫效应子功能的一或多个修饰。包含凸出凹陷的修饰的Fc的示例是:

[0282] 凸出突变选自根据EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W中的一或多个;和

[0283] 凹陷突变选自根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V中的一或多个。

[0284] 其它实例是包含Fc的多特异性构建体,例如其中Fc包含增加或增强FcRn再循环的修饰,所述修饰选自以下的一或多个:根据EU编号的T250Q,T250R,M252F,M252W,M252Y,S254T,T256D,T256E,T256Q,V259I,V308F,E380A,M428L,H433K,N434F,N434A,N434W,N434S,N434Y,Y436H,M252Y/T256Q,M252F/T256D,M252Y/S254T/T256E,H433K/N434F/Y436H,N434F/Y436H,T250Q/M428L,T250R/M428L,M428L/N434S,V259I/V308F,V259I/V308F/M428L,E294del/T307P/N434Y,和T256N/A378V/S383N/N434Y。Fc可包含对选自补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)中的一种或多种免疫效应子功能的修饰。Fc可以包含一或多个修饰以减少或消除IgG1和/或IgG4中的免疫效应子功能:

[0285] 在IgG1中:根据EU编号的L235E,L234A/L235A,L234E/L235F/P331S,L234F/L235E/P331S,L234A/L235A/P329G,L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S,G236R/L328R,G237A,E318A,D265A,E233P,N297A,N297Q,N297D,N297G,N297G/D265A,A330L,D270A,P329A,P331A,K322A,V264A,和F241A;和/或

[0286] 在IgG4中:根据EU编号的L235E,F234A/L235A,S228P/L235E,和S228P/F234A/L235A。

[0287] IgG Fc可包含一或多个以下修饰:

[0288] a) 引入凸出凹陷的一或多个修饰,其中:

[0289] 凸出突变选自根据EU编号的S354C、T366Y、T366W和T394W中的一或多个;和

[0290] 凹陷突变选自根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A和Y407V中的一或多个;

[0291] b) 增加或增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的一或多个修饰,其中所述修饰选自以下的一或多个:

[0292] 根据EU编号的T250Q,T250R,M252F,M252W,M252Y,S254T,T256D,T256E,T256Q,

V259I, V308F, E380A, M428L, H433K, N434F, N434A, N434W, N434S, N434Y, Y436H, M252Y/T256Q, M252F/T256D, M252Y/S254T/T256E, H433K/N434F/Y436H, N434F/Y436H, T250Q/M428L, T250R/M428L, M428L/N434S, V259I/V308F, V259I/V308F/M428L, E294del/T307P/N434Y, 和T256N/A378V/S383N/N434Y; 及

[0293] c) 增加或增强免疫效应子功能的一或多个修饰, 其中:

[0294] 免疫效应子功能选自CDC、ADCC和ADCP中的一种或多种; 和

[0295] 增加或增强免疫效应子功能的一或多个修饰选自以下的一或多个:

[0296] 在IgG1中: 根据EU编号的S239D, I332E, S239D/I332E, S239D/A330L/I332E, S298A/E333A/K334A; F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L; L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L; F243L/R292P/Y300L; 第一重链中的L234Y/G236W/S298A和第二重链中的S239D/A330L/I332E; 第一重链中的L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A和第二重链中的D270E/K326D/A330M/K334E; A327Q/P329A; D265A/S267A/H268A/D270A/K326A/S337A; T256A/K290A/S298A/E333A/K334A; G236A; G236A/I332E; G236A/S239D/I332E; G236A/S239D/A330L/I332E; 在残基N297引入双触角聚糖; 在残基N297引入去岩藻糖基化聚糖; K326W; K326A; E333A; K326A/E333A; K326W/E333S; K326M/E333S; K222W/T223W; K222W/T223W/H224W; D221W/K222W; C220D/D221C; C220D/D221C/K222W/T223W; H268F/S324T; S267E; H268F; S324T; S267E/H268F/S324T; G236A/I332E/S267E/H268F/S324T; E345R; 及 E345R/E430G/S440Y。

[0297] 其它此类多特异性构建体是其中: 包含经修饰以增加与抑制性Fc γ 受体(Fc γ R) Fc γ RIIb结合的IgG1 Fc的构建体。示例性的是其中增加与Fc γ RIIb结合的修饰选自根据EU编号的S267E、N297A、L328F、L351S、T366R、L368H、P395K、S267E/L328F和L351S/T366R/L368H/P395K中的一或多个的那些构建体。

[0298] 还提供了是多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂的构建体, 所述TNFR1拮抗剂是单价的; TNFR2激动剂是单价的。还提供了多特异性构建体, 其是多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体, 其中TNFR1拮抗剂是单价的; TNFR2激动剂是二价的。

[0299] 在一些实施方案中, 多特异性构建体是多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体, 其中:

[0300] a) TNFR1拮抗剂选自:

[0301] i) 选自H398或ATROSAB的人抗TNFR1拮抗剂单克隆抗体的抗原结合片段; 或者

[0302] ii) SEQ ID NO:52-672任一所示的域抗体(dAb), 或SEQ ID NO:673-678任一所示的scFv或SEQ ID NO:679-682任一所示的Fab, 或SEQ ID NO:683或684所示的纳米抗体, 或SEQ ID NO:701-703任一所示的TNF突变蛋白, 或与其具有至少或至少约95%序列相同性的序列; 或者

[0303] iii) 显性阴性肿瘤坏死因子(DN-TNF)或TNF突变蛋白, 其包含可溶TNF分子, 具有一个或多个赋予TNFR1选择性抑制的氨基酸置换并且选自:

[0304] 参考如SEQ ID NO:2所示的可溶TNF序列的V1M, L29S, L29G, L29Y, R31C, R31E, R31N, R32Y, R32W, C69V, A84S, V85T, S86T, Y87H, Q88N, T89Q, I97T, C101A, A145R, E146R, L29S/R32W, L29S/S86T, R32W/S86T, L29S/R32W/S86T, R31N/R32T, R31E/S86T, R31N/R32T/S86T, I97T/A145R, V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R, 和A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/

T89Q;

[0305] b) 接头是支链PEG分子,其大小为至少或至少约30kDa;和

[0306] c) TNFR2激动剂选自:

[0307] i) 结合人TNFR2内一个或多个表位的抗原结合片段,所述表位选自SEQ ID NO: 839-865、1202和1204所示的表位;或者

[0308] ii) 选自MR2-1或MAB2261的激动性人抗TNFR2抗体的抗原结合片段;或者

[0309] iii) TNFR2选择性TNF突变蛋白,其是可溶TNF变体,包含选自以下的一个或多个TNFR2选择性突变:

[0310] 参考SEQ ID NO:2的K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V,A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D,Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D,L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D,A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D,A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D,D143V/F144L/A145S,S95C/G148C,和D143V/A145S;或

[0311] iv) 单链TNFR2选择性TNF突变蛋白三聚体,包含突变D143N/A145R,其中TNF突变蛋白由(GGGGS)_n或由全部或部分TNF茎区(SEQ ID NO:812)连接,其中n=1-5;或者

[0312] v) TNFR2-选择性激动剂,包含下式:

[0313] MD-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-TNFmut(式II);或者

[0314] TNFmut-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-MD(式III);

[0315] 其中MD是多聚化结构域;TNFmut是TNFR2选择性TNF突变蛋白;并且L1、L2和L3是可以相同或不同的接头,其中:

[0316] MD选自EHD2(SEQ ID NO:808)、MHD2(SEQ ID NO:811)、鸡腱糖蛋白C(TNC)的三聚化结构域(SEQ ID NO:804的残基110-139;SEQ ID NO:805),或人TNC的三聚化结构域(SEQ ID NO:806的残基110-139,SEQ ID NO:807);

[0317] L1、L2和L3各自为(GGGGS)_n或全部或部分TNF茎区(SEQ ID NO:812)或其混合物,其中n=1-5;和

[0318] TNF突变蛋白包含TNFR2选择性突变D143N/A145R。

[0319] 还提供了多特异性构建体,其中每个TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂都是单价的。还提供了这样的构建体,其中TNFR1拮抗剂是单价的,而TNFR2激动剂是二价的。

[0320] 本文提供的构建体可用于治疗各种疾病、病症和病况和用于治疗各种疾病、病症和病况的用途。提供的多特异性构建体是多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂,用于治疗慢性炎症性、自身免疫性、神经退行性、脱髓鞘或呼吸系统疾病或病症,或其病因学中特征在于TNF过表达或TNFR1信号传导失调的疾病、病况或病症。提供了多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体在治疗慢性炎症性、自身免疫性、神经退行性、脱髓鞘或呼吸系统疾病或病症或其病因学中特征在于TNF过表达或TNFR1信号转导失调的疾病、病况或病症中的用途。

[0321] 还提供了组合物,其包含在药学上可接受的载体或运载体中的本文提供的任何构建体的构建体。这些组合物可用于治疗或治疗疾病、病症和病况和可用于治疗或治疗疾病、

病症和病况的方法中,这些疾病、病症和病况例如但不限于慢性炎症性、自身免疫性、神经退行性、脱髓鞘或呼吸系统疾病或病症,以及特征在于其病因学中TNF过表达或TNFR1信号传导失调的疾病、病况或病症。示例的慢性炎症性、自身免疫性、神经退行性、脱髓鞘或呼吸系统疾病或病症是特征在于其病因学中TNF过表达或TNFR1信号传导失调的疾病、病症和病况。这些包括选自以下的疾病、病症和病况:类风湿性关节炎(RA),银屑病,银屑病关节炎,幼年特发性关节炎(JIA),脊柱关节炎,强直性脊柱炎,克罗恩病,溃疡性结肠炎,炎性肠病(IBD),葡萄膜炎,纤维化疾病,子宫内膜异位症,狼疮,多发性硬化症(MS),充血性心力衰竭,心血管疾病,心肌梗死(MI),动脉粥样硬化,代谢性疾病,细胞因子释放综合征,感染性休克,败血症,急性呼吸窘迫综合征(ARDS),严重急性呼吸综合征(SARS),SARS-CoV-2,流感,急性和慢性神经退行性疾病,脱髓鞘疾病和病症,卒中,阿尔茨海默病,帕金森病,白塞氏病,掌腱膜挛缩症(dupuytren's disease),肿瘤坏死因子受体相关周期性综合征(TRAPS),胰腺炎,I型糖尿病,慢性阻塞性肺病(COPD),慢性支气管炎,肺气肿,移植物排斥,移植物抗宿主病(GvHD),肺部炎症,肺部疾病和病症,哮喘,囊性纤维化,特发性肺纤维化,急性暴发性病毒或细菌感染,肺炎,以TNF/TNFR1作为致病病理介质的遗传疾病,周期性发热综合征,或癌症。特别地,本文提供的构建体,例如但不限于TNFR1拮抗剂构建体,可用于治疗类风湿性关节炎的用途、治疗方法和组合物中。

[0322] 本文还提供了是TNFR2拮抗剂构建体的构建体,其包含TNFR2拮抗剂和任选存在的接头和任选存在的活性调节剂。例如,这种构建体具有式5:

[0323] (TNFR2拮抗剂)_n-接头_p-(活性调节剂)_q,或

[0324] 接头_p-(活性调节剂)_q-(TNFR2拮抗剂)_n,其中:

[0325] n和q均为整数,且各自独立地为1、2或3;

[0326] p是0、1、2或3;

[0327] TNFR2拮抗剂是与TNFR2相互作用以抑制(拮抗)TNFR2活性从而抑制Treg增殖和/或诱导其死亡的分子,并且还可以抑制表达TNFR2的肿瘤细胞的增殖并诱导其死亡;

[0328] 活性调节剂是与不存在所述活性调节剂的构建体相比,调节或改变所述构建体的活性或药理学性质的部分;和

[0329] 接头增加所述构建体的柔性,和/或缓和或减少所述构建体的空间效应或其与受体的相互作用,和/或增加所述构建体在水性介质中的溶解度。

[0330] 在这些构建体中,每种活性调节剂和接头都如上文和下文关于构建体所定义和描述的那样。它们可用于所述治疗方法和用途以及药物组合物中。

[0331] TNFR2拮抗剂可用于不同的疾病、病症和病况,例如减少和/或抑制髓源性抑制细胞(MDSC)的增殖;和/或通过结合存在于肿瘤微环境中的MDSC表面上表达的TNFR2,在MDSC内诱导凋亡;和/或通过抑制Treg扩增和活性诱导T效应细胞(包括细胞毒性CD8⁺T细胞)的扩增。构建体中的TNFR2拮抗剂包括这样的抗体、其抗原结合片段或单链抗体,其结合含有残基KCRPG(对应于SEQ ID NO:4的残基142-146)中一个或多个的人TNFR2内表位或含有残基130-149、137-144或142-149或这些表位中至少5个连续或不连续的残基的更大表位并且不结合含有残基KCSPG(对应于SEQ ID NO:4的残基56-60)的表位;或结合TNFR2表位PECLSCGS(对应于SEQ ID NO:4的残基91-98)、RICTCRPG(对应于SEQ ID NO:4的残基116-123)、CAPLRKCR(对应于SEQ ID NO:4的残基137-144)、LRKCRPGFGVA(对应于SEQ ID NO:4的

残基140-150),和/或VVCKPCAPGTFSN(对应于SEQ ID NO:4的残基159-171),和/或含有SEQ ID NO:4的残基75-128、86-103、111-128或150-190内至少5个连续或不连续残基的表位。例如,所述抗体、其片段或其单链形式结合含有KCRPG序列(SEQ ID NO:840)的一个或多个残基的表位,亲和力是相同抗体或抗原结合片段对含有人TNFR2的KCSPG序列的肽(SEQ ID NO:839)的亲和力的至少10倍大。在TNFR2拮抗剂构建体的一些实施方案中,TNFR2拮抗剂是选自以下的抗体或抗体的片段或单链形式:

[0332] TNFRAB1(见SEQ ID NO:1212和1213,分别为TNFRAB1的重链和轻链序列)、TNFRAB2和TNFR2A3(见例如美国专利公开号2019/0144556关于这些抗体的描述);

[0333] 含有TNFRAB1(QRVDGYSSYWFYFDV;对应于SEQ ID NO:1212的残基99-112)、TNFRAB2(ARDDGYSYSPFDYWG;SEQ ID NO:1217)或TNFR2A3(ARDDGYSYSPFDYFG;SEQ ID NO:1223)的CDR-H3序列或与其具有至少约85%序列相同性的CDR-H3序列的抗体和抗体片段及单链形式。例如,TNFRAB1特异性结合含有TNFR2残基KCRPG的残基130-149,其亲和力比结合含有TNFR2残基KCSPG的残基48-67的亲和力高40倍。在一些实施方案中,TNFR2拮抗剂结合TNFR2中选自以下的一个或多个表位:

[0334] 含有残基137-144(CAPLRKCR;SEQ ID NO:851)的表位;

[0335] 包括人TNFR2的位置80-86(DSTYTYQL;SEQ ID NO:1247)、91-98(PECLSCGS;SEQ ID NO:1248)和/或116-123(RICTCRPG;SEQ ID NO:1249)内的一个或多个残基的表位;和

[0336] TNFR2A3的表位,选自包括人TNFR2的残基140-150(LRKCRPGFGVA;SEQ ID NO:1463)并含有KCRPG基序的第一表位和/或含有人TNFR2的残基159-171(VVCKPCAPGTFSN;SEQ ID NO:1464)的第二表位。

[0337] 在一些实施方案中,所述构建体中的TNFR2拮抗剂是抗体、其片段或其单链形式,其含有具有SEQ ID NO:1214、1215和1231-1233任一所示序列的CDR-H1氨基酸序列,具有SEQ ID NO:1216、1224和1230任一所示序列的CDR-H2序列,具有SEQ ID NO:1217、1223和1225-1229任一所示序列的CDR-H3序列,和/或对应于SEQ ID NO:1212的残基99-112的TNFRAB1的CDR-H3;SEQ ID NO:1218和1234-1236任一所示的CDR-L1序列,和/或对应于SEQ ID NO:1213的残基24-33的TNFRAB1的CDR-L1序列;SEQ ID NO:1219、1220、1237和1238任一所示的CDR-L2序列,或对应于SEQ ID NO:1213的残基49-55的TNFRAB1的CDR-L2序列;和/或SEQ ID NO:1221、1222和1241-1244任一所示的CDR-L3序列,或对应于SEQ ID NO:1213的残基88-96的TNFRAB1的CDR-L3序列;和/或用表型中性、TNFR2特异性抗体的相应CDR序列替换的SEQ ID NO:1245的人抗体重链可变结构域的共有序列的CDR-H1和CDR-H2序列,和/或用表型中性、TNFR2特异性抗体的相应CDR序列替换的SEQ ID NO:1246的人抗体轻链可变结构域序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列,以产生人源化拮抗性TNFR2抗体。例如,所述构建体包含特异性结合SEQ ID NO:1247-1464任一所示的TNFR2内的表位的TNFR2拮抗剂。在一些实施方案中,TNFR2拮抗剂特异性结合选自以下的一或多个表位:

[0338] (a) 人TNFR2内的一个或多个表位,其含有对应于SEQ ID NO:4的残基142-146的残基KCRPG的一或多个,或含有残基130-149、137-144或142-149或这些表位内的至少5个连续或不连续的残基的更大表位,并且不结合含有对应于SEQ ID NO:4的残基56-60的残基KCSPG的表位;和/或

[0339] (b) 一个或多个TNFR2表位,其包含具有以下氨基酸序列:

[0340] 对应于SEQ ID NO:4的残基91-98的PECLSCGS,和/或对应于SEQ ID NO:4的残基116-123的RICTCRPG,和/或

[0341] 对应于SEQ ID NO:4的残基137-144的CAPLRKCR,和/或

[0342] 对应于SEQ ID NO:4的残基140-150的LRKCRPGFGVA,和/或

[0343] 对应于SEQ ID NO:4的残基159-171)的VVCKPCAPGTFSN,和/或

[0344] 含有在SEQ ID NO:4的残基75-128、86-103、111-128或150-190内的至少5个连续或不连续残基的表位。

[0345] 在一些实施方案中,TNFR2拮抗剂构建体包含是小分子的TNFR2拮抗剂。例如,TNFR2拮抗剂是沙利度胺(thalidomide)或其类似物,例如来那度胺(lenalidomide)和泊马度胺(pomalidomide)。

[0346] 在一些实施方案中,TNFR2拮抗剂构建体包含降低FoxP3表达并抑制Treg抑制性活性的TNFR2拮抗剂。此类拮抗剂的示例是组蛋白脱乙酰酶抑制剂,其降低FoxP3表达并抑制Treg的抑制性活性。这种抑制剂的实例是帕比司他(panobinostat)或环磷酰胺或雷公藤内酯(Triptolide)。

[0347] TNFR2构建体可用于治疗感染性疾病的方法和用途,以及用于治疗表达TNFR2的癌症的方法和用途。此类癌症的示例是选自以下的癌症:T细胞淋巴瘤例如霍奇金淋巴瘤和皮肤非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、结肠癌、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、头颈癌、肝癌和肺癌。

[0348] 以下和优先权申请中提出的权利要求及其主题通过引用并入本摘要。

[0349] 附图简述

[0350] 图1示出含有CMV启动子的pCBL-1表达质粒的质粒图,其中TE19080L是插入的片段。

[0351] 图2示出示例的双特异性构建体-具有连接两个配体的接头(铰链区的一部分)和活性调节剂,例如TNFR1抑制剂(TNFR1拮抗剂)和TNFR2激动剂。

[0352] 图3A-3D示出示例的以PEG为中心的多特异性构建体,其用于呈递/提供与一个或多个靶标或与在多个位点的一个靶标相互作用的两个或更多个部分。图3A示出示例的二价构建体。其中一个圆形是例如多肽激动剂、拮抗剂或结合蛋白,例如抗体或其抗原结合片段,或适体(核酸或肽)。另一个圆形代表多糖或受体配体或与感兴趣的靶标相互作用的其它部分。二价性质提供了用于受体激活的靶标的簇集。在本文提供的实施方案中,靶标包括TNFR1和TNFR2;并且如本文的整个公开内容所述,部分包括TNFR1抑制剂,例如抑制TNFR1信号传导的部分,和TNFR2激动剂或作为Treg增殖物的其它部分。图3B示出单价单配体,例如CD3+,以阻止细胞因子释放综合征,通过PEG部分连接于激动剂、拮抗剂或结合蛋白,这对于受体簇集是二价的。同样,示例的靶标包括TNFR1和/或TNFR2。图3C示出用于交联两种不同的细胞靶向剂或结合至同一受体上的不同位点的两种药剂例如曲妥珠单抗和帕妥珠单抗或其部分的异双功能PEG。例如,这种构建体可用于簇集检查点控制受体以刺激或抑制免疫应答,或交联两种不同的受体以实现受体活性的抑制(即CD3与CD450),或递送两种不同的配体例如刺激和共刺激配体到同一细胞上的两个不同受体。图3D示出一种同双功能PEG,用于在相同或不同的细胞上簇集相同的受体(取决于链长),或捕获循环疾病靶标,例如可溶性受体或配体,如TNF。此外,在所有这些实施方案中,其它PEG侧链,任选连接于另一个反应

基团或官能团,例如血清半衰期延长部分,如HSA或FcRn多肽,可以包括在这些构建体中。PEG部分可以被修饰或替换为具有相似性质的部分以呈递所述结合部分。

[0353] 图4示出用于展示或提供结合部分或反应性部分例如本文所述的TNFR1抑制剂和/或TNFR2激动剂的以PEG为中心的构建体的其它示例构型和结构。

[0354] 图5示出用于展示或提供结合部分或反应性部分例如TNFR1抑制剂和/或TNFR2激动剂的以PEG为中心的构建体的其它示例构型和结构。X和Y可以是配体和反应性部分。

[0355] 发明详述

[0356] 大纲

[0357] A. 定义

[0358] B. 构建体和方法概述

[0359] C. 肿瘤坏死因子(TNF)与慢性炎症性及自身免疫疾病和病症

[0360] 1. 肿瘤坏死因子(TNF)

[0361] 2. 肿瘤坏死因子受体(TNFR)

[0362] a. TNFR1

[0363] b. TNFR2

[0364] 3. 调节性T细胞(Treg)及其在自身免疫微环境中的作用

[0365] 4. 由TNF介导或参与的自身免疫/炎症性疾病

[0366] a. 关节炎

[0367] i. 类风湿性关节炎和其它类型的关节炎

[0368] b. 炎症性肠病(IBD)和葡萄膜炎

[0369] c. 纤维化疾病

[0370] d. 肿瘤坏死因子受体相关周期性综合征(TRAPS)

[0371] e. 其它由TNF介导或参与的疾病

[0372] i. 神经退行性疾病

[0373] a) 阿尔兹海默病

[0374] b) 帕金森病

[0375] c) 多发性硬化(MS)

[0376] ii. 子宫内膜异位症

[0377] iii. 心血管疾病

[0378] iv. 急性呼吸窘迫综合征(ARDS)

[0379] v. 严重急性呼吸系统综合征(SARS)和COVID 19

[0380] D. 类风湿性关节炎和其它慢性炎症和自身免疫性疾病和病症的治疗

[0381] 1. 传统合成的改变病情的抗风湿药物(csDMARD)

[0382] 2. 抗-TNF治疗剂/TNF阻滞剂

[0383] E. 靶向TNFR1/TNFR2的治疗剂

[0384] 1. TNFR1选择性拮抗剂

[0385] a. TNFR1拮抗性抗体

[0386] b. 单价TNFR1拮抗性抗体/抗体片段

[0387] i. 基于Fab和scFv的TNFR1拮抗剂

- [0388] ii. 基于域抗体 (dAb) 的TNFR1拮抗剂
- [0389] a) 抗TNFR1 dAb-抗白蛋白dAb融合构建体
- [0390] b) 称作GSK1995057和GSK2862277的域抗体片段
- [0391] iii. 纳米抗体 (Nb)
- [0392] iv. 抗TNFR1纳米抗体-抗白蛋白纳米抗体融合构建体
- [0393] c. TNF (DN-TNF) /TNF突变蛋白的显性阴性抑制剂
- [0394] 2. TNFR2-选择性激动剂
- [0395] a. TNFR2拮抗性抗体
- [0396] b. TNFR2选择性TNF突变蛋白及其融合体
- [0397] 3. 抗TNFR2拮抗性抗体及小分子抑制剂
- [0398] F. TNFR1和/或TNFR2轴的选择性靶向
- [0399] 1. 用TNFR1拮抗剂选择性阻断TNFR1
- [0400] 2. 用TNFR2激动剂选择性激活TNFR2
- [0401] 3. TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体;多特异性(包括双特异性)TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂构建体
- [0402] 4. TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体和多特异性(包括双特异性)TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体的组分
- [0403] a. TNFR1抑制剂部分(TNFR1拮抗剂)
- [0404] b. TNFR2激动剂构建体和TNFR2拮抗剂构建体
- [0405] c. 接头
- [0406] i. 肽接头
- [0407] a) 柔性接头
- [0408] b) 刚性接头
- [0409] ii. 化学接头
- [0410] d. 活性调节剂
- [0411] i. 对Fc部分的修饰
- [0412] a) 凸出凹陷(Knobs-in-Holes)
- [0413] b) 增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的修饰
- [0414] c) Fc免疫效应子功能的增强或降低/去除
- [0415] ii. Fc部分的其它修饰
- [0416] iii. 人血清白蛋白
- [0417] e. 多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体
- [0418] PEG化以连接多特异性构建体的组分,以PEG为中心的多特异性构建体,例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体
- [0419] f. 其它活性调节剂-包括增加血清半衰期的部分或完整多肽的融合蛋白
- [0420] 5. 蛋白质治疗剂中免疫原性的预测和去除
- [0421] a. B细胞和T细胞表位
- [0422] b. 经计算机的表位预测方法
- [0423] i. 经计算机的B细胞表位预测

- [0424] ii. 经计算机的T细胞表位预测
- [0425] iii. 肽-MHC II类结合预测
- [0426] c. 体外表位预测方法
- [0427] i. 体外B细胞表位预测方法
- [0428] ii. 体外T细胞表位预测方法
- [0429] MHC/HLA结合测定
- [0430] iii. 体外T细胞测定
- [0431] d. 体内表位预测方法
- [0432] e. 预测的B细胞和T细胞表位的去除(去免疫化)
- [0433] G. 泛-生长因子陷阱多肽
- [0434] 1. 受体酪氨酸激酶(RTK)
- [0435] a. 人表皮生长因子受体(HER)家族
- [0436] b. 人表皮生长因子受体(HER)家族及其配体相关疾病
- [0437] 2. Pan-生长因子抑制
- [0438] a. RB242配体陷阱
- [0439] b. 治疗自身免疫疾病的RB200和RB242
- [0440] c. RB242配体陷阱
- [0441] 3. 优化的多特异性如双特异性生长因子陷阱构建体
- [0442] a. 胞外结构域(ECD)多肽
- [0443] b. 胞外结构域修饰
- [0444] c. 多聚化结构域
- [0445] d. Fc结构域修饰
- [0446] i. 凸出凹陷的引入
- [0447] ii. 增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的修饰
- [0448] iii. 效应子功能
- [0449] 4. 组合物、治疗用途和治疗方法
- [0450] a. 药物组合物
- [0451] b. 治疗用途和治疗方法
- [0452] 5. 联合治疗
- [0453] H. 评估TNFR1拮抗剂和TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体活性和效力
- [0454] 1. 疾病活性评分(DAS28)
- [0455] 2. **SOMAscan®**蛋白质组学分析和其它用于定量分析物的蛋白质组学工具
- [0456] 3. 转录组分析以预测对治疗的反应并选择可能从治疗中受益的受试者
- [0457] 4. L929细胞毒性测定
- [0458] 5. HeLa IL-8测定
- [0459] 6. HUVEC测定
- [0460] 7. Treg细胞活性的量化和评估
- [0461] 8. TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体的结合性质评估
- [0462] 9. 抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)测定

- [0463] 10. 疾病模型
- [0464] a. 胶原蛋白诱导的关节炎 (CIA)
- [0465] b. 类风湿性关节炎滑膜单核细胞培养
- [0466] c. Tg197小鼠关节炎模型
- [0467] d. Δ ARE小鼠关节炎/IBD模型
- [0468] e. 人源化TNF/TNFR2小鼠
- [0469] I. 产生编码TNFR1拮抗剂构建体和TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体的核酸的方法
- [0470] 1. 编码TNFR1拮抗剂和TNRF2激动剂多肽的核酸的分离或制备
- [0471] 2. 突变或修饰核酸和编码多肽的产生
- [0472] 3. 载体和细胞
- [0473] 4. 表达
- [0474] a. 原核细胞
- [0475] b. 酵母细胞
- [0476] c. 昆虫和昆虫细胞
- [0477] d. 哺乳动物表达细胞
- [0478] e. 植物
- [0479] 5. 纯化
- [0480] 6. 其它修饰
- [0481] a. PEG化
- [0482] b. 白蛋白化
- [0483] c. 纯化标签
- [0484] 7. 核酸分子和基因治疗
- [0485] J. 组合物、配制和剂量
- [0486] 1. 配制
- [0487] 2. TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、多特异性如双特异性构建体和核酸的施用
- [0488] 3. 编码多肽的核酸的施用(基因治疗)
- [0489] K. 治疗用途和治疗方法
- [0490] 1. 慢性炎症性/自身免疫疾病和病症的治疗
- [0491] 2. 神经退行性和脱髓鞘疾病和病症的治疗
- [0492] 3. 癌症和其它免疫抑制疾病、病症和病况的治疗
- [0493] 4. 联合治疗
- [0494] L. 实施例
- [0495] A. 定义
- [0496] 除非另有定义, 否则本文使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的技术人员通常理解的含义相同。除非另有说明, 否则本文的整个公开内容中提及的所有专利、专利申请、已公布的申请和出版物、GenBank序列、数据库、网站和其它已公布材料均通过引用整体并入。如果本文中的术语有多种定义, 则以本节中的定义为准。在提及URL或其它此类标

识符或地址时,应了解此类标识符可能会发生变化,并且互联网上的特定信息可能会来来去去,但可以通过搜索互联网找到等效信息。对其的引用证明了此类信息的可用性和公开传播。

[0497] 如本文所用,构建体是含有一种或多种组分的产物,通常至少含有两种组分。所述组分可以是多肽、小分子、适体、核酸和/或本文所述或本领域技术人员已知的其它此类组分。本文描述和举例说明了各种构建体;从本文描述中可以明显获知其组分和种类。鉴于该描述,本领域技术人员可以设想在本文的公开和权利要求内的其它构建体。使用术语构建体是因为所述产物可以包括各种不同类型的组分。

[0498] 如本文所用,构建体是TNFR1构建体或TNFR2拮抗剂构建体,其是包含TNFR1抑制剂部分的构建体,该部分是抑制或降低TNFR1活性如信号传导的部分。

[0499] 如本文所用,构建体是TNFR2构建体或TNFR2激动剂构建体,其是包含TNFR2激动剂部分的构建体,该部分是激活或诱导TNFR2活性例如信号传导或导致Treg细胞增多的活性的部分。

[0500] 如本文所用,构建体是TNFR2拮抗剂构建体,其是包含TNFR2拮抗剂的构建体。

[0501] 如本文所用,构建体是多特异性构建体,其是包含一种以上拮抗剂或激动剂或这两部分的构建体,例如含有TNFR1抑制剂和TNFR2激动剂的构建体,或含有两种TNFR1拮抗剂的构建体,例如其中每个拮抗剂均与TNFR1上的不同表位相互作用或每个拮抗剂均具有不同的TNFR1拮抗剂活性,或两个TNFR2激动剂,例如其中每个激动剂均与不同的TNFR2表位相互作用,或每个激动剂均具有不同的TNFR2激动剂活性。

[0502] 如本文所用,“肿瘤坏死因子”、“肿瘤坏死因子 α ”、“TNF”、“TNF- α ”、“TNF- α ”和“TNF α ”可互换使用,是指多效性促炎细胞因子,其是TNF超家族的成员,与炎症和免疫调节活性相关,包括调节肿瘤发生/癌症、宿主对病原体感染的防御、细胞凋亡、自身免疫和感染性休克。当意指TNF超家族的其它成员时,将通过名称识别它们。TNF参与先天性和适应性免疫应答的协调,以及器官发生,特别是淋巴器官的发生。TNF是一种含有233个氨基酸的同源三聚体膜结合蛋白,可被蛋白酶TACE (TNF α 转化酶;也称为ADAM17) 裂解,释放出含有157个氨基酸的可溶性TNF (solTNF);膜结合和可溶形式的TNF具有生物活性。TNF的同源三聚体通过两个高亲和力的特异性受体TNFR1和TNFR2结合并发出信号;膜结合的TNF主要激活TNFR2,而可溶性TNF主要激活TNFR1。TNF不受控制或失调的产生与多种慢性炎症和自身免疫性疾病和病症有关,包括但不限于例如感染性休克、类风湿性关节炎、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、幼年特发性关节炎和炎症性肠病 (IBD), 以及神经退行性和脱髓鞘疾病和病症,包括但不限于例如阿尔茨海默病、帕金森病、卒中和多发性硬化症。

[0503] 如本文所用,“TNF突变蛋白”或“TNF- α 突变蛋白”或“经修饰的TNF多肽”是指这样的多肽,其氨基酸序列对于来自特定物种的TNF来说,与相应野生型TNF (TNF α) 的氨基酸序列相差一个或多个氨基酸。通常,此类经修饰的TNF多肽保留激活或抑制TNFR1和/或TNFR2的能力。TNF中的特定突变可使所得TNF突变蛋白选择性结合TNFR1或TNFR2,并可导致具有拮抗或激动性质的TNF突变蛋白。例如,如本文所述,存在TNFR1-选择性拮抗性TNF突变蛋白和TNFR2-选择性激动性TNF突变蛋白。

[0504] 如本文所用,“TNF的显性阴性抑制剂”或“DN-TNF”是具有一个或多个突变的TNF突变蛋白,该突变消除了与TNFR1和/或TNFR2的结合并通过其的信号传导。DN-TNF通过与天然

TNF同源三聚体快速置换亚基来选择性抑制可溶性TNF (sTNF或solTNF),形成具有破坏的受体结合表面的无活性混合的TNF异源三聚体,从而阻止与TNF受体的相互作用。DN-TNF使跨膜TNF (tmTNF) 不受影响,通过TNFR2维持TNF信号传导的保护作用。DN-TNF的实例是含有参考SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的置换L133Y、S162Q、Y163H、I173T、Y191Q和A221R中一个或多个的TNF突变体(参考如SEQ ID NO:2所示solTNF序列,对应于残基L57Y、S86Q、Y87H、I97T、Y115Q和A145R),其削弱了与TNFR的结合。

[0505] 如本文所用,“修饰”是指对多肽中的氨基酸序列或核酸分子中的核苷酸序列的修饰,并且分别包括氨基酸和核苷酸的缺失、插入、转座、置换及其组合。修饰多肽或核酸的方法对本领域技术人员来说是常规的,例如通过使用重组DNA方法。

[0506] 如本文所用,当提及核酸或多肽序列时,“缺失”是指与序列(例如靶多核苷酸或多肽)或天然或野生型序列相比,缺失一个或多个核苷酸或氨基酸。

[0507] 如本文所用,当提及核酸或氨基酸序列时,“插入”描述了在靶序列、天然序列、野生型序列或其它相关序列内包含一个或多个其它核苷酸或氨基酸。因此,与野生型序列相比,含有一个或多个插入的核酸分子在序列的线性长度内含有一个或多个额外的核苷酸。

[0508] 如本文所用,当提及核酸或氨基酸序列时,“添加”描述了与另一序列相比,在任一末端添加一个或多个核苷酸或氨基酸。

[0509] 如本文所用,“取代”或“置换”指天然序列、靶序列、野生型或其它核酸或多肽序列中的一个或多个核苷酸或氨基酸被替代核苷酸或氨基酸置换,而不改变分子的长度(如残基数所述)。因此,分子中的一个或多个取代不会改变该分子的氨基酸残基或核苷酸的数量。与特定多肽相比的氨基酸置换可以根据沿多肽序列长度的氨基酸残基数来表示。例如,在氨基酸序列的第100位氨基酸具有酪氨酸(Tyr;Y)被谷氨酸(Glu;E)取代/置换的经修饰的多肽可以表示为Y100E、Tyr100Glu或100E。Y100可以用来表示第100位被修饰的氨基酸为酪氨酸。出于本文的目的,由于修饰是在抗体的重链(HC)或轻链(LC)中,因此也可提及表示多肽链的HC-或LC-来表示修饰。

[0510] 如本文所用,“在对应于…的位置”,或核苷酸或氨基酸位置“对应于”例如序列表中所示的公开序列中的核苷酸或氨基酸位置的叙述,是指使用标准比对算法例如GAP算法与参考序列以最大化相同性比对时鉴定的核苷酸或氨基酸位置。通过比对序列,本领域技术人员可以鉴定相应残基,例如使用保守和相同氨基酸残基作为指导。通常,为了鉴定相应位置,将氨基酸序列进行比对,以便获得最高顺序匹配(见例如Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.,ed.,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing: Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.,ed.,Academic Press,New York,1993; Computer Analysis of Sequence Data,Part I,Griffin,A.M.,and Griffin,H.G.,eds., Humana Press,New Jersey,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.and Devereux,J.,eds.,M Stockton Press,New York,1991;及Carrillo et al.(1988)SIAM J.Applied Math 48:1073)。

[0511] 如本文所用,序列比对是指使用同源性来比对两个或更多个核苷酸或氨基酸序列。通常,比对具有50%或更多相同性的两个或更多个序列。比对序列组是指在相应位置比对的2个或更多个序列,并且可以包括与基因组DNA序列比对的RNA衍生的比对序列,例如

EST和其它cDNA。可以通过本领域技术人员已知的任何方法比对相关或变体多肽或核酸分子。这样的方法通常使匹配最大化,并且包括诸如使用手动比对和通过使用许多可用的比对程序(例如BLASTP)和本领域技术人员已知的其它方法。通过比对多肽或核酸的序列,本领域技术人员可以使用保守和相同的氨基酸残基作为指导来鉴定类似部分或位置。此外,本领域技术人员还可以利用保守的氨基酸或核苷酸残基作为指导来发现人和非人序列之间的对应的氨基酸或核苷酸残基。对应的位置也可以基于结构比对,例如,通过使用计算机模拟的蛋白质结构比对。在其它情况下,可以鉴定对应的区域。本领域技术人员还可以使用保守的氨基酸残基作为指导来发现人与非人序列之间的对应氨基酸残基。

[0512] 如本文所用,表述蛋白质“在相同条件下比较”是指对不同的蛋白质进行相同或基本相同的处理,使得可以影响蛋白质或制剂的活性或性质的任一种或多种条件在测试物质之间没有变化或基本没有变化。例如,当将一种抗体的活性与另一种抗体进行比较时,任一种或多种条件,例如多肽的量或浓度;配制剂中除活性剂(例如抗体)外的赋形剂、载体或其它组分的存在,包括量;温度;pH;储存时间;储存容器;储存性质(例如搅拌);和/或与暴露或使用相关的其它条件,在所比较的多肽/抗体之间是相同的或基本相同的。

[0513] 如本文所用,“不利影响”或“副作用”或“不利事件”或“不良副作用”是指与施用治疗剂相关的有害、不利和/或不期望的作用。例如,与施用抗TNF抗体如阿达木单抗(例如以商标Humira®销售)相关的副作用是本领域技术人员已知的,并且一些副作用在本文中有所描述。此类不良副作用包括例如严重感染,如肺结核,以及由病毒、真菌和细菌引起的其它感染,包括上呼吸道感染,以及皮肤病学和皮肤毒性,如皮疹、头痛和恶心。因此,“不利影响”或“副作用”是指施用治疗剂的有害、不利和/或不期望的作用。副作用或不良反应根据毒性分级,存在各种毒性等级量表,为每个等级提供定义。此类量表的示例是国家癌症研究所通用毒性标准(National Cancer Institute Common Toxicity Criteria)2.0版的毒性量表,以及世界卫生组织或不良事件通用术语标准(CTCAE)量表。指定严重程度等级在有经验的医生或其它医疗保健专业人员的技能范围内。症状的严重程度可以使用NCI不良事件通用术语标准(CTCAE)分级系统进行量化。CTCAE是用于不良事件(AE)报告的描述性术语。为每个AE术语提供了分级(严重性)量表。CTCAE显示1至5级,并根据以下一般指南对每个不良事件的严重程度进行临床描述:1级(轻度AE);2级(中度AE);3级(严重AE);4级(危及生命或致残的AE);和5级(与AE相关的死亡/致命)。

[0514] 如本文所用,多肽例如抗体的“性质”是指多肽表现出的任何特性,包括但不限于结合特异性、结构构型或构象、蛋白质稳定性、蛋白酶解抗性、构象稳定性、耐热性和对pH条件的耐受性。性质的变化可以改变多肽的“活性”。例如,抗体多肽的结合特异性的变化可以改变结合抗原的能力,和/或各种结合活性,例如亲和力或亲合力,或多肽的体内活性。

[0515] 如本文所用,多肽例如抗体的“活性”或“功能活性”是指多肽表现出的任何活性。这些活性可以凭经验确定。示例的活性包括但不限于与生物分子相互作用的能力,例如通过抗原结合、DNA结合、配体结合或二聚化;和酶活性,例如激酶活性或蛋白水解活性。对于抗体(包括抗体片段),活性包括但不限于特异性结合特定抗原的能力,抗原结合的亲和力(例如,高或低亲和力),抗原结合的亲合力(例如,高或低亲合力),结合率,解离率,效应子功能,例如促进抗原中和或清除、病毒中和的能力,以及体内活性,例如防止病原体感染或入侵的能力,或促进清除,或穿透体内的特定组织或液体或细胞的能力。可以使用公认的测

定法在体外或体内评估活性,例如ELISA、流式细胞术、表面等离子体共振或等效测定以测量结合率或解离率、免疫组织化学和免疫荧光组织学和显微镜检查、基于细胞的测定法、流式细胞术、和结合分析(例如淘选分析)。例如,对于抗体多肽,可以通过测量结合亲和力、亲合力 and/或结合系数(例如结合/解离率)和其它体外活性,或通过测量体内的各种效应来评估活性,例如测量免疫作用,如抗原清除;抗体渗透或定位到组织中;防止疾病,例如感染;血清或其它液体抗体滴度;或本领域熟知的其它测定。表明多肽表现出活性的此类测定的结果可以与多肽的体内活性相关,其中体内活性可以称为治疗活性或生物学活性。修饰的多肽的活性可以是未修饰多肽的任何百分比水平的活性,包括但不限于与未修饰的多肽相比是其活性的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、200%、300%、400%、500%或更多。确定修饰的(或变体)抗体的功能性或活性的测定是本领域众所周知的。

[0516] 如本文所用,“结合”、“结合的”及其语法变化是指一个分子参与与另一个分子的任何吸引相互作用,导致两个分子彼此紧密接近的稳定缔合。结合相互作用包括但不限于非共价键、共价键(例如可逆和不可逆共价键),并且包括分子之间的相互作用,例如但不限于蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质、和小分子,例如化合物,包括药物。示例的键是抗体-抗原相互作用和受体-配体相互作用。当抗体“结合”特定抗原时,“结合”是指抗体在抗体组合位点通过同源抗体-抗原相互作用特异性识别抗原。结合还可以包括通过二硫键相互作用的多个多肽链例如抗体链的缔合。

[0517] 如本文所用,“结合活性”是指分子例如多肽的特征,涉及其是否以及如何结合一个或多个结合配偶体。结合活性包括结合结合配偶体的能力、其与结合配偶体结合的亲和力(例如,高亲和力)、其与结合配偶体结合的亲合力、与结合配偶体的键的强度,和/或与结合配偶体结合的特异性。

[0518] 如本文所用,“亲和力”或“结合亲和力”描述了两个或更多个分子例如结合配偶体之间相互作用的强度,并且通常是两个结合配偶体之间的非共价相互作用的强度。抗体或其抗原结合片段对抗原表位的亲和力是对单个抗体组合位点与表位之间总的非共价相互作用强度的测量。低亲和力抗体-抗原相互作用较弱,分子倾向于快速解离,而高亲和力抗体-抗原结合强,分子保持较长时间结合。结合亲和力可以根据结合动力学来确定,例如通过测量结合率(k_a 或 k_{on})和/或解离率(k_d 或 k_{off})、半数最大有效浓度(EC_{50})值和/或热力学数据(例如Gibbs自由能(ΔG)、焓(ΔH)、熵($-T\Delta S$)和/或计算结合(K_a)或解离(K_d)常数。 EC_{50} ,也称为表观 K_d ,是抗体的浓度(例如,ng/mL),其中观察到与固定量的抗原的最大结合的50%。通常, EC_{50} 值由S形剂量-应答曲线确定,其中 EC_{50} 是拐点处的浓度。对其底物的高抗体亲和力与低 EC_{50} 值相关,低亲和力对应于高 EC_{50} 值。亲和常数可通过抗体反应的标准动力学方法确定,例如免疫测定法,如ELISA,然后进行曲线拟合分析。

[0519] 如本文所用,“亲和常数”是指用于测量抗体对抗原的亲合力的缔合常数(K_a)。亲和常数越高,抗体对抗原的亲和力越大。亲和常数以摩尔倒数的单位表示(即 M^{-1}),并且可以根据结合-解离反应的速率常数计算,如通过抗体反应的标准动力学方法测量(例如免疫测定、表面等离子体共振或本领域已知的其它动力学相互作用测定)。抗体的结合亲和力也可以表示为解离常数或 K_d 。解离常数是缔合常数的倒数,即 $K_d=1/K_a$ 。因此,亲和常数也可以用 K_d 表示。亲和常数可以通过抗体反应的标准动力学方法来确定,例如免疫测定、表面等离子

体共振 (SPR) (见例如 Rich and Myszka (2000) *Curr. Opin. Biotechnol* 11:54; Englebienne (1998) *Analyst*. 123:1599)、等温滴定量热法 (ITC) 或本领域已知的其它动力学相互作用测定法 (见例如 Paul, ed., *Fundamental Immunology*, 2nd ed., Raven Press, New York, pages 332-336 (1989); 也见美国专利号 7,229,619 关于计算抗体结合亲和力的示例 SPR 和 ITC 方法的描述)。用于实时检测和监测结合率的仪器和方法是已知的并且是可商购的 (例如 BIAcore 2000, BIAcore AB, Uppsala, Sweden 和 GE Healthcare Life Sciences; Malmqvist (2000) *Biochem. Soc. Trans.* 27:335)。

[0520] 计算亲和力的方法是众所周知的, 例如确定 EC_{50} 值的方法, 或确定缔合/解离常数的方法。例如, 就 EC_{50} 而言, 高结合亲和力是指抗体特异性结合靶蛋白, 其 EC_{50} 小于约 10 ng/mL、9 ng/mL、8 ng/mL、7 ng/mL、6 ng/mL、5 ng/mL、3 ng/mL、2 ng/mL、1 ng/mL 或更少。高结合亲和力还可以特征在于 10^{-6} M 或更低的平衡解离常数 (K_d), 例如 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、或 10^{-12} M, 或更低。就平衡缔合常数 (K_a) 而言, 高结合亲和力通常与大于或等于约 10^6 M⁻¹、大于或等于约 10^7 M⁻¹、大于或等于约 10^8 M⁻¹, 或大于或等于约 10^9 M⁻¹、 10^{10} M⁻¹、 10^{11} M⁻¹ 或 10^{12} M⁻¹ 的 K_a 值相关。可以根据经验估计亲和力, 或者可以比较地确定亲和力, 例如通过比较两种或更多种抗体对特定抗原的亲和力, 例如通过计算所测试抗体的亲和力的成对比率。例如, 这种亲和力可以很容易地使用常规技术确定, 例如通过 ELISA、平衡透析、表面等离子体共振、通过使用放射性标记的靶抗原的放射免疫测定法、或通过本领域技术人员已知的另一种方法。可以例如通过 Scatchard et al., (1949) *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 51:660 的方法分析亲和力数据, 或通过曲线拟合分析, 例如使用 4 参数 Logistic 非线性回归模型, 使用方程: $y = ((A-D) / (1 + ((x/C)^B))) + D$, 其中 A 是最小渐近线, B 是斜率因子, C 是拐点 (EC_{50}), 以及 D 是最大渐近线。

[0521] 如本文所用, “抗体亲合力”是指多价抗体与其同源抗原之间的多重相互作用的强度, 例如与含有与具有重复表位或表位阵列的抗原相关联的多个结合位点的抗体。与低亲合力抗体相比, 高亲合力抗体具有更高强度的此类相互作用。

[0522] 如本文所用, “对靶标的特异性”, 例如 TNFR1, 是指与非靶标相比, 优先、更高的结合亲和力与所述靶标结合。选择性结合是指以通常至少约 10^7 - 10^8 M⁻¹ 的亲和力结合靶标。其还可以指相对活性, 其中将一个部分或分子对一个靶分子的亲和力与对另一个分子的亲和力进行比较, 如果差异具有一定的幅度, 例如大约 10 倍, 则该部分或分子对第一个靶标相对于第二个靶标具有更大的特异性。

[0523] 如本文所用, 关于抗体或其抗原结合片段的 “特异性结合” 或 “免疫特异性结合” 在本文中可互换使用, 是指抗体或抗原结合片段与同源抗原通过抗体的抗体组合位点和抗原之间的非共价相互作用形成一个或多个非共价键的能力。通常, 免疫特异性结合 (或特异性结合) 例如 TNFR1 的抗体结合 TNFR1 的亲和常数 (K_a) 为约或为 1×10^7 M⁻¹ 或 1×10^8 M⁻¹ 或更大 (或解离常数 (K_d) 为 1×10^{-7} M 或 1×10^{-8} M 或更低)。免疫特异性结合特定抗原的抗体或抗原结合片段可以通过例如免疫测定法鉴定, 例如放射免疫测定法 (RIA)、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、表面等离子体共振 (SPR) 或其它本领域技术人员已知技术。

[0524] 如本文所用, “空间效应”是指原子或基团的大小对分子的影响。空间效应包括但不限于空间位阻和范德华斥力。空间效应是原子占据空间这一事实所产生的效应; 当原子彼此靠近时, 这会消耗能量, 因为原子附近的电子会相互排斥。

[0525] 如本文所用,“表现出至少一种活性”或“保留至少一种活性”是指与不含有所述修饰的靶标或未修饰的多肽相比,抗体多肽如变体抗体或其它治疗性多肽表现出的活性。保留靶多肽的活性的修饰的多肽或变体多肽可表现出改良的活性、降低的活性或保持未修饰多肽的活性。在一些情况下,修饰的多肽或变体多肽与靶多肽或未修饰的多肽相比可以保留增加的活性。在一些情况下,修饰的多肽或变体多肽与未修饰的多肽或靶多肽相比可以保留降低的活性。与未修饰的多肽或靶多肽相比,修饰的多肽或变体多肽的活性可以是未修饰的多肽或靶多肽的任何百分比水平的活性,包括但不限于活性的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、200%、300%、400%、500%或更多。在其它实施方案中,活性的变化是未修饰的多肽或靶多肽的至少约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10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倍或更多倍大。活性保留测定取决于要保留的活性。此类测定可以在体外或体内进行。可以例如使用本领域已知的和下文针对活性描述的测定来测量活性,例如但不限于ELISA和淘选测定。与未修饰的多肽或靶多肽相比,修饰的多肽或变体多肽的活性也可以根据施用所述多肽后的体内治疗或生物学活性或结果来评估。

[0526] 如本文所用,“表面等离子共振”是指允许通过检测生物传感器基质内蛋白质浓度的改变来分析实时相互作用的光学现象。商业形态是可获得的。例如BIAcore系统(GE Healthcare Life Sciences)是示例的商业系统。

[0527] 如本文所用,“抗体”是指免疫球蛋白和免疫球蛋白片段,无论是天然的,还是部分或完全合成的,例如重组产生的,包括其含有免疫球蛋白分子的至少一部分可变重链和/或可变轻链区的任何片段,其足以形成抗原结合位点并在组装后特异性结合抗原。因此,抗体包括具有与免疫球蛋白抗原结合结构域(抗体组合位点)同源或基本同源的结合结构域的任何蛋白质。例如,抗体是指含有两条重链(可以表示为H和H')和两条轻链(可以表示为L和L')的抗体,其中每条重链可以是全长免疫球蛋白重链或其足以形成抗原结合位点的部分(例如,重链包括但不限于 V_H 链、 V_H-C_H1 链和 $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ 链),以及每条轻链可以是全长轻链或其足以形成抗原结合位点的部分(例如,轻链包括但不限于 V_L 链和 V_L-C_L 链)。每个重链(H和H')与一条轻链(分别为L和L')配对。通常,抗体最低限度包括可变重(V_H)链和/或可变轻(V_L)链的全部或至少一部分。抗体还可以包括其它区域,例如恒定区的全部或部分,和/或铰链区的全部或部分(足以提供柔性)。

[0528] 出于本文的目的,除非另有说明,否则术语“抗体”包括全长抗体及其部分,包括抗体片段,例如抗-TNFR1抗体片段。抗体片段,包括但不限于例如Fab片段、Fab'片段、 $F(ab')_2$ 片段、Fv片段、二硫键连的Fv(dsFv)、Fd片段、Fd'片段、单链Fv(scFv)、单链Fab(scFab)、hsFv(螺旋稳定的Fv)、单域抗体(dAb或sdAb)、微型抗体、双抗体、抗独特型(抗-Id)抗体、纳米抗体和骆驼科抗体、游离轻链、 V_{HH} 抗体(或纳米抗体),或上述任一种抗体的抗原结合片段。抗体片段还可以包括任何上述片段的组合,例如串联scFv、Fab-scFv(HC C-端或LC C-端)、 $Fab-(scFv)_2$ (C-端)、scFv-Fab-scFv、 $Fab-C_H2-scFv$ 、scFv融合(C端或N端)、Fab融合(HC C端或LC C端)、scFv-scFv-dAb、scFv-dAb-scFv、dAb-scFv-scFv和三体。术语“抗体”包括合成抗体、重组产生的抗体、多特异性和异源偶联抗体(例如双特异性、三特异性和四特异性抗体,双抗体、三抗体和四抗体)、人抗体、非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和胞内抗体。本

文提供的抗体包括任何免疫球蛋白类别(例如IgG、IgM、IgD、IgE、IgA和IgY)、任何亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚亚类(例如IgG2a和IgG2b)的成员。

[0529] 如本文所用,“抗体形式”是指抗体的特定结构。本文中的抗体包括全长抗体及其部分,例如Fab片段或其它抗体片段。因此,Fab是一种特定形式的抗体。

[0530] 如本文所用,提及抗体的“相应形式”是指,当比较两种抗体的性质或活性时,使用相同形式的抗体比较该性质。例如,如果声明某抗体与第一抗体的相应形式的活性相比具有较低的活性,则意味着该抗体的特定形式例如Fab与所述第一抗体的Fab形式相比具有较低的活性。

[0531] 如本文所用,全长抗体是具有两个全长重链(例如 $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ 或 $V_H-C_H1-C_H2-C_H3-C_H4$)、两个全长轻链(V_L-C_L)和铰链区的抗体,例如由分泌抗体的B细胞产生的人抗体,以及合成产生的具有相同结构域的抗体。

[0532] 如本文所用,“多特异性构建体”是指一种构建体,例如抗体或包含抗体部分的构建体,其表现出对一种以上的靶抗原的亲和力,以便它可以与靶特异性相互作用。本文的多特异性构建体可具有与完整免疫球蛋白分子相似的结构,并包括Fc区,例如IgG Fc区,和抗原结合区,例如特异性结合TNFR1或TNFR2的部分。

[0533] 如本文所用,“双特异性构建体”是指对两种不同抗原具有结合特异性的多特异性构建体。双特异性构建体包括例如连接于修饰构建体活性的多肽区域例如Fc或修饰的Fc的单克隆抗体或其抗原结合片段。对于人治疗剂,构建体衍生自人类来源或衍生自人类来源或被人源化,并且构建体对至少两种不同抗原具有结合特异性。本文提供的双特异性构建体/分子可具有针对TNFR1和TNFR2的结合特异性。例如,双特异性构建体包括TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂。双特异性抗体或构建体包括抗体及其抗原结合片段,其包括两个独立的抗原结合结构域(例如两个scFv,或两个dAb,或两个Fab,通过接头连接)。抗原结合结构域可以结合相同抗原或不同抗原。

[0534] 如本文所用,“抗体片段”或“抗体部分”是指全长抗体的任何部分,其小于全长,但含有足以形成抗原结合位点的抗体可变区的至少一部分(例如,一个或多个互补决定区(CDR)),因此保留了全长抗体的结合特异性和/或活性;抗体片段包括通过酶促处理全长抗体产生的抗体衍生物,以及合成例如重组产生的衍生物。抗体片段的示例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab)₂、单链Fv(scFv)、Fv、dsFv、双抗体、三抗体、亲和抗体、纳米抗体、适体、dAb、Fd和Fd片段(见例如Methods in Molecular Biology, Vol 207: Recombinant Antibodies for Cancer Therapy Methods and Protocols (2003); Chapter 1; pp.3-25, Kipriyanov)。所述片段可以包括连接在一起的多个链,例如通过二硫键桥和/或通过肽接头连接。抗体片段通常含有至少约50个氨基酸,例如至少约或至少100个氨基酸,且通常至少约或至少110、120、150、170、180或200个氨基酸。

[0535] 如本文所用,“Fv抗体片段”由通过非共价相互作用连接的一个重链可变结构域(V_H)和一个轻链可变结构域(V_L)组成。

[0536] 如本文所用,dsFv(二硫键连的Fv)是指具有工程化的分子间二硫键的Fv,其稳定 V_H-V_L 对。

[0537] 如本文所用,“scFv片段”是指含有可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)的抗体片段,其通过多肽接头以任何顺序共价连接。接头的长度使得两个可变结构域在没有实质干扰的情况

下被桥接。示例性接头是(Gly-Ser)_n残基,一些Glu或Lys残基分散在各处以增加溶解度。

[0538] 如本文所用,“双抗体”是二聚体scFv;双抗体通常具有比scFv更短的肽接头,并且优选二聚化。

[0539] 如本文所用,“三体”是三聚体scFv;其含有三个肽链,每个肽链含有一个V_H结构域和一个V_L结构域,通过短接头(例如由1-2个氨基酸组成的接头)连接,以允许同一肽链内的V_H和V_L结构域的分子内结合;三体通常三聚化。

[0540] 如本文所用,“Fab片段”是由木瓜蛋白酶消化全长免疫球蛋白产生的抗体片段,或具有例如通过重组方法合成产生的相同结构的片段。Fab片段含有一个轻链(含有V_L和C_L)及含有重链可变域(V_H)和重链的一个恒定区域(C_{H1})的另一链。

[0541] 如本文所用,“F(ab')₂片段”是在pH 4.0-4.5用胃蛋白酶消化免疫球蛋白产生的抗体片段,或具有例如通过重组方法合成产生的相同结构的片段。F(ab')₂片段基本上含有两个Fab片段,其中每个重链部分含有另外的几个氨基酸,例如足以提供柔性的铰链区的全部或部分,包括形成连接两个片段的二硫键的半胱氨酸残基。

[0542] 如本文所用,Fab'片段是含有F(ab')₂片段的一半(即一个重链和一个轻链)的片段。

[0543] 如本文所用,Fd片段是含有抗体重链的可变结构域(V_H)和一个恒定区结构域(C_{H1})的抗体片段。

[0544] 如本文所用,Fd'片段是含有F(ab')₂片段的一个重链部分的抗体片段。

[0545] 如本文所用,Fv'片段是仅含有抗体分子的V_H和V_L结构域的片段。

[0546] 如本文所用,hsFv(螺旋稳定的Fv)是指这样的抗体片段,其中通常存在于Fab片段中的恒定域已被异二聚体卷曲螺旋域取代(见例如Arndt et al. (2001) J.Mol.Biol.7: 312:221-228)。

[0547] 如本文所用,可互换使用的“域抗体”、“单域抗体”、“sdAb”或“dAb”是指含有抗体的重链(V_H)或轻链(V_L)的可变域的单体小抗体片段。dAb是抗体的最小抗原结合片段;其大小约为11-15kDa(约100-150个氨基酸),约为完整单克隆抗体(mAb)大小的十分之一。每个V_H和每个V_L上有三个互补决定区(CDR)。每个dAb含有六个CDR中的三个,它们是来自抗体中V_H-V_L对的高度多样化的与靶抗原结合的环状区域。

[0548] 如本文所用,骆驼科抗体,也称为纳米抗体或VHH,缺少轻链并且由两个相同的重链组成。它们天然存在于骆驼科动物例如骆驼和羊驼中。

[0549] 如本文所用,多肽“结构域”是结构上和/或功能上可区分或可定义的多肽的一部分(3个或更多个、通常5个、10个或更多个氨基酸的序列)。示例的多肽结构域是多肽的一部分,它可以在由一个或多个结构基序(例如,通过环区连接的α螺旋和/或β链的组合)组成的多肽内形成独立折叠结构,和/或通过特定的功能活性识别,例如酶活性、二聚化或抗原结合。多肽可以具有一个或多个、通常一个以上不同的结构域。例如,多肽可以具有一个或多个结构域和一个或多个功能域。可以根据结构和功能区分单个多肽结构域。结构域可以涵盖连续的线性氨基酸序列。或者,结构域可涵盖多个非连续的氨基酸部分,其沿着多肽的线性氨基酸序列是非连续的。通常,多肽含有多个结构域。例如,抗体分子的每个重链和每个轻链含有多个免疫球蛋白(Ig)结构域,每个约110个氨基酸长。本领域技术人员熟悉多肽结构域并且可以凭借与其它此类结构域的结构和/或功能同源性来鉴定它们。为了本文的示

例,提供了定义,但应当理解,通过名称识别特定域在本领域的技术范围内。如果需要,可以使用适当的软件来鉴定结构域。

[0550] 如本文所用,多肽的“功能区”是含有至少一个功能结构域的多肽区域(其赋予特定功能,例如与生物分子相互作用的能力,例如通过抗原结合、DNA结合、配体结合或二聚化,或通过酶活性,例如激酶活性或蛋白水解活性);多肽的示例功能区是抗体结构域,例如 V_H 、 V_L 、 C_H 、 C_L ,及其部分,例如CDR,包括CDR1、CDR2和CDR3,或抗原结合部分,例如抗体组合位点。

[0551] 如本文所用,多肽的“结构区域”是含有至少一个结构域的多肽区域。

[0552] 如本文所用,“Ig结构域”是本领域技术人员公认的结构域,其以称为免疫球蛋白(Ig)折叠的结构加以区分,其含有两个 β -折叠片层,每个片层含有反平行的由环连接的氨基酸的 β 链。Ig折叠中的两个 β 片层通过疏水相互作用和保守的链内二硫键夹在一起。可以根据功能进一步区分抗体链中的各个免疫球蛋白结构域。例如,轻链含有一个可变区结构域(V_L)和一个恒定区结构域(C_L),而重链含有一个可变区结构域(V_H)和三个或四个恒定区结构域(C_H)。每个 V_L 、 C_L 、 V_H 和 C_H 结构域是免疫球蛋白结构域的实例。

[0553] 如本文所用,关于抗体的“可变结构域”是抗体重链或轻链的特定免疫球蛋白(Ig)结构域,其含有在不同抗体之间变化的氨基酸序列。每个轻链和每个重链均具有一个可变区结构域(分别为 V_L 和 V_H)。可变结构域提供抗原特异性,因此负责抗原识别。每个可变区含有互补决定区(CDR),它们是抗原结合位点结构域和框架区(FR)的一部分。

[0554] 如本文所用,“高变区”、“HV”、“互补决定区”、“CDR”和“抗体CDR”可互换使用,指每个可变区内的多个部分之一,它们一起形成抗体的抗原结合位点。每个可变区结构域含有三个CDR,命名为CDR1、CDR2和CDR3。这三个CDR沿线性氨基酸序列是不连续的,但在折叠的多肽中靠近。CDR位于连接可变结构域 β 折叠平行链的环内。

[0555] 如本文所用,“抗原结合结构域”、“抗原结合位点”、“抗原结合片段”、“抗原组合位点”和“抗体组合位点”同义使用,指抗体内识别同源抗原并与其物理相互作用的结构域。天然的常规全长抗体分子具有两个常规抗原结合位点,每个均含有重链可变区的部分和轻链可变区的部分。常规抗原结合位点含有连接可变区结构域内反平行 β 链的环。抗原结合位点可以含有可变区结构域的其他部分。每个常规抗原结合位点含有来自重链的三个高变区和来自轻链的三个高变区。高变区也称为互补决定区(CDR)。

[0556] 如本文所用,关于抗体重链或轻链或可变重链或轻链的“其部分”是指其足以形成抗原结合位点的连续部分,由此当组装成含有重链和轻链的抗体时,其含有可变重链(V_H)和可变轻链(V_L)的至少1或2个、通常是3、4、5或全部6个CDR,足以保留含有所有6个CDR的相应全长抗体的至少一部分结合特异性。通常,足够的抗原结合位点需要重链的CDR3(CDRH3)。它通常还需要轻链的CDR3(CDRL3)。如本文所述,本领域技术人员已知并可以基于Kabat或Chothia编号来鉴定CDR(见例如Kabat,E.A.et al.(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242;及Chothia,C.et al.(1987)J.Mol.Biol.196:901-917)。

[0557] 如本文所用,“构架区”或“FR”是位于 β 折叠内的抗体可变区结构域内的结构域;就其氨基酸序列而言,FR区比高变区相对更保守。每个可变区含有四个框架区,将三个高变区

分开。

[0558] 如本文所用,“恒定区”结构域是抗体重链或轻链中的结构域,其含有在抗体中比可变区结构域相对更保守的氨基酸序列。每个轻链具有单个轻链恒定区(C_L)结构域,每个重链含有一个或多个重链恒定区(C_H)结构域,包括 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 和 C_{H4} 。全长IgA、IgD和IgG同种型含有 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 结构域以及铰链区,而IgE和IgM含有 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 和 C_{H4} 结构域。 C_{H1} 和 C_L 结构域延伸抗体分子的Fab臂,从而有助于与抗原的相互作用和抗体臂的旋转。抗体恒定区可以发挥效应子功能,例如但不限于清除抗体特异性结合的抗原、病原体和毒素,例如通过与各种细胞、生物分子和组织的相互作用。

[0559] 如本文所用,“抗体铰链区”或“铰链区”是指 γ 、 δ 和 α 抗体同种型的重链中的多肽区,其出现在 C_{H1} 和 C_{H2} 结构域之间,连接Fab和Fc区,并且与其它抗体结构域没有同源性。这个区域富含脯氨酸残基并为IgG、IgD和IgA抗体提供柔性,允许Fab部分的两个“臂”(每个臂均含有一个抗体组合位点)是可移动的,假设随着其结合抗原而在彼此之间存在不同角度。这种柔性允许Fab臂移动,以对齐抗体组合位点,从而与细胞表面或其它抗原上的表位相互作用。铰链区内的两个链间二硫键稳定了两个重链之间的相互作用。在本文提供的一些实施方案中,合成产生的抗体片段含有一个或多个铰链区,例如以通过两个抗体链之间的相互作用促进稳定性。铰链区是二聚化结构域的示例部分,并且出于本文的目的是接头的一部分。

[0560] 如本文所用,“片段可结晶区”或“Fc”或“Fc区”或“Fc结构域”是指含有抗体重链恒定区但不包括第一个恒定区免疫球蛋白结构域的多肽。Fc是指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域(C_{H2} 和 C_{H3} ,也称为 $C_{\gamma 2}$ 和 $C_{\gamma 3}$),或IgE和IgM的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域(C_{H2} 、 C_{H3} 和 C_{H4})。任选地,Fc结构域可以包括全部或部分柔性铰链区,其位于这些结构域的N末端。对于IgA和IgM,Fc可以包括J链。对于示例的IgG的Fc结构域,Fc含有免疫球蛋白结构域 C_{H2} 和 C_{H3} ,以及任选 C_{H1} 和 C_{H2} (也称为 $C_{\gamma 1}$ 和 $C_{\gamma 2}$)之间的全部或部分铰链。Fc区的边界可以变化,但通常包括至少部分铰链区。出于本文的目的,Fc还包括任何等位基因或物种变体,或任何变体或修饰形式,例如改变了与Fc受体(FcR)的结合或改变Fc介导的效应子功能的Fc的任何变体或修饰形式。Fc区的突变及其影响在本领域中有详细记载。

[0561] 如本文所用,“Fc嵌合体”是指嵌合多肽,其中一个或多个多肽直接或间接连接于Fc区或其衍生物。通常,Fc嵌合体将免疫球蛋白的Fc区与另一多肽组合在一起。Fc多肽的衍生物或修饰的Fc多肽是本领域技术人员已知的。

[0562] 如本文所用,“Kabat编号”是指IgG1 Kabat抗体的索引编号(见例如Kabat,E.A.et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242);其允许在抗体之间易于进行比较,类似于糜蛋白酶编号允许在蛋白酶之间进行比较的方式。本领域技术人员可以使用Kabat编号来鉴定恒定区的区域。

[0563] 如本文所用,“EU编号”或“EU索引”是指EU抗体的编号方案,描述于Edelman et al., (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63:78-85。“Kabat中的EU索引”是指人IgG1 Kabat抗体的EU索引编号,如Kabat,E.A.et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242所述。本领域技术人员经常使用EU编号或如Kabat中的EU编号对

抗体轻链和重链的Fc区的氨基酸残基进行编号。例如,本领域技术人员可以使用EU编号来鉴定恒定区的区域。例如,根据Kabat和EU编号,Ig kappa轻链的C_L结构域对应于残基R108-C214(见例如下表2)。IgG1的C_{H1}结构域对应于残基118-215(EU编号)或114-223(Kabat编号);C_{H2}对应于残基231-340(EU编号)或244-360(Kabat编号);C_{H3}对应于残基341-447(EU编号)或361-478(Kabat编号)。

[0564] 下表根据EU、Kabat和顺序编号定义了IgG1和IgG4重链恒定域以及Igκ轻链恒定域的编号。表1示出根据EU、Kabat和顺序编号的IgG1重链恒定域,其中顺序编号是相对于SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列,并且鉴定了C_{H1}、C_{H2}和C_{H3}结构域内以及铰链区域的残基。表2示出根据EU、Kabat和顺序编号的免疫球蛋白(Ig)κ轻链恒定域,其中顺序编号是相对于SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。在表2中,第一行(粗体)按顺序编号列出了氨基酸残基编号(参考SEQ ID NO:17);第二行(粗体)提供了第一行数字所示位置的氨基酸残基的单字母代码;第三行(斜体)示出根据Kabat编号对应的Kabat编号;第四行示出根据EU编号对应的EU索引号。表3示出根据EU、Kabat和顺序编号的IgG4重链恒定域,其中顺序编号是相对于SEQ ID NO:15所示氨基酸序列,并鉴定了C_{H1}、C_{H2}和C_{H3}结构域内以及铰链区域的残基。

[0565] 表1:根据EU、Kabat和顺序编号的IgG1重链恒定域

[0566]

结构域	残基编号				结构域	残基编号				结构域	残基编号			
	EU索引	Kabat	序号 (SEQ ID NO:9)	IgG1序列		EU索引	Kabat	序号 (SEQ ID NO:9)	IgG1序列		EU索引	Kabat	序号 (SEQ ID NO:9)	IgG1序列
CH1	118	114	1	A	CH2	231	244	114	A	CH3	341	361	224	G
CH1	119	115	2	S	CH2	232	245	115	P	CH3	342	363	225	Q
CH1	120	116	3	T	CH2	233	246	116	E	CH3	343	364	226	P
CH1	121	117	4	K	CH2	234	247	117	L	CH3	344	365	227	R
CH1	122	118	5	G	CH2	235	248	118	L	CH3	345	366	228	E
CH1	123	119	6	P	CH2	236	249	119	G	CH3	346	367	229	P
CH1	124	120	7	S	CH2	237	250	120	G	CH3	347	368	230	Q
CH1	125	121	8	V	CH2	238	251	121	P	CH3	348	369	231	V
CH1	126	122	9	F	CH2	239	252	122	S	CH3	349	370	232	Y
CH1	127	123	10	P	CH2	240	253	123	V	CH3	350	371	233	T
CH1	128	124	11	L	CH2	241	254	124	F	CH3	351	372	234	L
CH1	129	125	12	A	CH2	242	255	125	L	CH3	352	373	235	P
CH1	130	126	13	P	CH2	243	256	126	F	CH3	353	374	236	P
CH1	131	127	14	S	CH2	244	257	127	P	CH3	354	375	237	S
CH1	132	128	15	S	CH2	245	258	128	P	CH3	355	376	238	R
CH1	133	129	16	K	CH2	246	259	129	K	CH3	356	377	239	D
CH1	134	130	17	S	CH2	247	260	130	P	CH3	357	378	240	E
CH1	135	133	18	T	CH2	248	261	131	K	CH3	358	381	241	L
CH1	136	134	19	S	CH2	249	262	132	D	CH3	359	382	242	T
CH1	137	135	20	G	CH2	250	263	133	T	CH3	360	383	243	K
CH1	138	136	21	G	CH2	251	264	134	L	CH3	361	384	244	N
CH1	139	137	22	T	CH2	252	265	135	M	CH3	362	385	245	Q
CH1	140	138	23	A	CH2	253	266	136	I	CH3	363	386	246	V
CH1	141	139	24	A	CH2	254	267	137	S	CH3	364	387	247	S
CH1	142	140	25	L	CH2	255	268	138	R	CH3	365	388	248	L
CH1	143	141	26	G	CH2	256	269	139	T	CH3	366	389	249	T

[0567]

CH1	144	142	27	C	CH2	257	270	140	P	CH3	367	390	250	C
CH1	145	143	28	L	CH2	258	271	141	E	CH3	368	391	251	L
CH1	146	144	29	V	CH2	259	272	142	V	CH3	369	392	252	V
CH1	147	145	30	K	CH2	260	273	143	T	CH3	370	393	253	K
CH1	148	146	31	D	CH2	261	274	144	C	CH3	371	394	254	G
CH1	149	147	32	Y	CH2	262	275	145	V	CH3	372	395	255	F
CH1	150	148	33	F	CH2	263	276	146	V	CH3	373	396	256	Y
CH1	151	149	34	P	CH2	264	277	147	V	CH3	374	397	257	P
CH1	152	150	35	E	CH2	265	278	148	D	CH3	375	398	258	S
CH1	153	151	36	P	CH2	266	279	149	V	CH3	376	399	259	D
CH1	154	152	37	V	CH2	267	280	150	S	CH3	377	400	260	I
CH1	155	153	38	T	CH2	268	281	151	H	CH3	378	401	261	A
CH1	156	154	39	V	CH2	269	282	152	E	CH3	379	402	262	V
CH1	157	156	40	S	CH2	270	283	153	D	CH3	380	405	263	E
CH1	158	157	41	W	CH2	271	284	154	P	CH3	381	406	264	W
CH1	159	162	42	N	CH2	272	285	155	E	CH3	382	407	265	E
CH1	160	163	43	S	CH2	273	286	156	V	CH3	383	408	266	S
CH1	161	164	44	G	CH2	274	287	157	K	CH3	384	410	267	N
CH1	162	165	45	A	CH2	275	288	158	F	CH3	385	411	268	G
CH1	163	166	46	L	CH2	276	289	159	N	CH3	386	414	269	Q
CH1	164	167	47	T	CH2	277	290	160	W	CH3	387	415	270	P
CH1	165	168	48	S	CH2	278	291	161	Y	CH3	388	416	271	E
CH1	166	169	49	G	CH2	279	292	162	V	CH3	389	417	272	N
CH1	167	171	50	V	CH2	280	295	163	D	CH3	390	418	273	N
CH1	168	172	51	H	CH2	281	296	164	G	CH3	391	419	274	Y
CH1	169	173	52	T	CH2	282	299	165	V	CH3	392	420	275	K
CH1	170	174	53	F	CH2	283	300	166	E	CH3	393	421	276	T
CH1	171	175	54	P	CH2	284	301	167	V	CH3	394	422	277	T
CH1	172	176	55	A	CH2	285	302	168	H	CH3	395	423	278	P
CH1	173	177	56	V	CH2	286	303	169	N	CH3	396	424	279	P
CH1	174	178	57	L	CH2	287	304	170	A	CH3	397	425	280	V
CH1	175	179	58	Q	CH2	288	305	171	K	CH3	398	426	281	L
CH1	176	180	59	S	CH2	289	306	172	T	CH3	399	427	282	D
CH1	177	182	60	S	CH2	290	307	173	K	CH3	400	428	283	S
CH1	178	183	61	G	CH2	291	308	174	P	CH3	401	430	284	D
CH1	179	184	62	L	CH2	292	309	175	R	CH3	402	433	285	G
CH1	180	185	63	Y	CH2	293	310	176	E	CH3	403	434	286	S
CH1	181	186	64	S	CH2	294	311	177	E	CH3	404	435	287	F
CH1	182	187	65	L	CH2	295	312	178	Q	CH3	405	436	288	F
CH1	183	188	66	S	CH2	296	313	179	Y	CH3	406	437	289	L
CH1	184	189	67	S	CH2	297	314	180	N	CH3	407	438	290	Y
CH1	185	190	68	V	CH2	298	317	181	S	CH3	408	439	291	S
CH1	186	191	69	V	CH2	299	318	182	T	CH3	409	440	292	K
CH1	187	192	70	T	CH2	300	319	183	Y	CH3	410	441	293	L
CH1	188	193	71	V	CH2	301	320	184	R	CH3	411	442	294	T
CH1	189	194	72	P	CH2	302	321	185	V	CH3	412	443	295	V
CH1	190	195	73	S	CH2	303	322	186	V	CH3	413	444	296	D

[0568]

CH1	191	196	74	S	CH2	304	323	187	S	CH3	414	445	297	K
CH1	192	197	75	S	CH2	305	324	188	V	CH3	415	446	298	S
CH1	193	198	76	L	CH2	306	325	189	L	CH3	416	447	299	R
CH1	194	199	77	G	CH2	307	326	190	T	CH3	417	448	300	W
CH1	195	200	78	T	CH2	308	327	191	V	CH3	418	449	301	Q
CH1	196	203	79	Q	CH2	309	328	192	L	CH3	419	450	302	Q
CH1	197	205	80	T	CH2	310	329	193	H	CH3	420	451	303	G
CH1	198	206	81	Y	CH2	311	330	194	Q	CH3	421	452	304	N
CH1	199	207	82	I	CH2	312	331	195	D	CH3	422	453	305	V
CH1	200	208	83	C	CH2	313	332	196	W	CH3	423	454	306	F
CH1	201	209	84	N	CH2	314	333	197	L	CH3	424	455	307	S
CH1	202	210	85	V	CH2	315	334	198	N	CH3	425	456	308	C
CH1	203	211	86	N	CH2	316	335	199	G	CH3	426	457	309	S
CH1	204	212	87	H	CH2	317	336	200	K	CH3	427	458	310	V
CH1	205	213	88	K	CH2	318	337	201	E	CH3	428	459	311	M
CH1	206	214	89	P	CH2	319	338	202	Y	CH3	429	460	312	H
CH1	207	215	90	S	CH2	320	339	203	K	CH3	430	461	313	E
CH1	208	216	91	N	CH2	321	340	204	C	CH3	431	462	314	A
CH1	209	217	92	T	CH2	322	341	205	K	CH3	432	463	315	L
CH1	210	218	93	K	CH2	323	342	206	V	CH3	433	464	316	H
CH1	211	219	94	V	CH2	324	343	207	S	CH3	434	465	317	N
CH1	212	220	95	D	CH2	325	344	208	N	CH3	435	466	318	H
CH1	213	221	96	K	CH2	326	345	209	K	CH3	436	467	319	Y
CH1	214	222	97	K	CH2	327	346	210	A	CH3	437	468	320	T
CH1	215	223	98	V	CH2	328	347	211	L	CH3	438	469	321	Q
Hinge	216	226	99	E	CH2	329	348	212	P	CH3	439	470	322	K
Hinge	217	227	100	P	CH2	330	349	213	A	CH3	440	471	323	S
Hinge	218	228	101	K	CH2	331	350	214	P	CH3	441	472	324	L
Hinge	219	232	102	S	CH2	332	351	215	I	CH3	442	473	325	S
Hinge	220	233	103	C	CH2	333	352	216	E	CH3	443	474	326	L
Hinge	221	234	104	D	CH2	334	353	217	K	CH3	444	475	327	S
Hinge	222	235	105	K	CH2	335	354	218	T	CH3	445	476	328	P
Hinge	223	236	106	T	CH2	336	355	219	I	CH3	446	477	329	G
Hinge	224	237	107	H	CH2	337	357	220	S	CH3	447	478	330	K
Hinge	225	238	108	T	CH2	338	358	221	K					
Hinge	226	239	109	C	CH2	339	359	222	A					
Hinge	227	240	110	P	CH2	340	360	223	K					
Hinge	228	241	111	P										
Hinge	229	242	112	C										
Hinge	230	243	113	P										

[0569]

表 2: Ig κ 轻链恒定域的 Kabat 和 EU 编号

[0570]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D
108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122
108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30

[0571]

E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N
123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137
123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N
138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152
138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D
153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167
153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S
168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182
168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T
183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197
183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G
198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212
198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212
106	107													
E	C													
213	214													
213	214													

[0572] 表3:根据EU、Kabat和顺序编号的IgG4重链恒定结构域

[0573]

结构域	残基编号				结构域	残基编号				结构域	残基编号			
	EU索引	Kabat	序号 (SEQ ID NO:15)	IgG4序列		EU索引	Kabat	序号 (SEQ ID NO:15)	IgG4序列		EU索引	Kabat	序号 (SEQ ID NO:15)	IgG4序列
CH1	118	114	1	A	CH2	231	244	111	A	CH3	341	361	221	G
CH1	119	115	2	S	CH2	232	245	112	P	CH3	342	363	222	Q
CH1	120	116	3	T	CH2	233	246	113	E	CH3	343	364	223	P
CH1	121	117	4	K	CH2	234	247	114	F	CH3	344	365	224	R
CH1	122	118	5	G	CH2	235	248	115	L	CH3	345	366	225	E
CH1	123	119	6	P	CH2	236	249	116	G	CH3	346	367	226	P
CH1	124	120	7	S	CH2	237	250	117	G	CH3	347	368	227	Q
CH1	125	121	8	V	CH2	238	251	118	P	CH3	348	369	228	V
CH1	126	122	9	F	CH2	239	252	119	S	CH3	349	370	229	Y

[0574]

CH1	127	123	10	P	CH2	240	253	120	V	CH3	350	371	230	T
CH1	128	124	11	L	CH2	241	254	121	F	CH3	351	372	231	L
CH1	129	125	12	A	CH2	242	255	122	L	CH3	352	373	232	P
CH1	130	126	13	P	CH2	243	256	123	F	CH3	353	374	233	P
CH1	131	127	14	C	CH2	244	257	124	P	CH3	354	375	234	S
CH1	132	128	15	S	CH2	245	258	125	P	CH3	355	376	235	Q
CH1	133	129	16	R	CH2	246	259	126	K	CH3	356	377	236	E
CH1	134	130	17	S	CH2	247	260	127	P	CH3	357	378	237	E
CH1	135	133	18	T	CH2	248	261	128	K	CH3	358	381	238	M
CH1	136	134	19	S	CH2	249	262	129	D	CH3	359	382	239	T
CH1	137	135	20	E	CH2	250	263	130	T	CH3	360	383	240	K
CH1	138	136	21	S	CH2	251	264	131	L	CH3	361	384	241	N
CH1	139	137	22	T	CH2	252	265	132	M	CH3	362	385	242	Q
CH1	140	138	23	A	CH2	253	266	133	I	CH3	363	386	243	V
CH1	141	139	24	A	CH2	254	267	134	S	CH3	364	387	244	S
CH1	142	140	25	L	CH2	255	268	135	R	CH3	365	388	245	L
CH1	143	141	26	G	CH2	256	269	136	T	CH3	366	389	246	T
CH1	144	142	27	C	CH2	257	270	137	P	CH3	367	390	247	C
CH1	145	143	28	L	CH2	258	271	138	E	CH3	368	391	248	L
CH1	146	144	29	V	CH2	259	272	139	V	CH3	369	392	249	V
CH1	147	145	30	K	CH2	260	273	140	T	CH3	370	393	250	K
CH1	148	146	31	D	CH2	261	274	141	C	CH3	371	394	251	G
CH1	149	147	32	Y	CH2	262	275	142	V	CH3	372	395	252	F
CH1	150	148	33	F	CH2	263	276	143	V	CH3	373	396	253	Y
CH1	151	149	34	P	CH2	264	277	144	V	CH3	374	397	254	P
CH1	152	150	35	E	CH2	265	278	145	D	CH3	375	398	255	S
CH1	153	151	36	P	CH2	266	279	146	V	CH3	376	399	256	D
CH1	154	152	37	V	CH2	267	280	147	S	CH3	377	400	257	I
CH1	155	153	38	T	CH2	268	281	148	Q	CH3	378	401	258	A
CH1	156	154	39	V	CH2	269	282	149	E	CH3	379	402	259	V
CH1	157	156	40	S	CH2	270	283	150	D	CH3	380	405	260	E
CH1	158	157	41	W	CH2	271	284	151	P	CH3	381	406	261	W
CH1	159	162	42	N	CH2	272	285	152	E	CH3	382	407	262	E
CH1	160	163	43	S	CH2	273	286	153	V	CH3	383	408	263	S
CH1	161	164	44	G	CH2	274	287	154	Q	CH3	384	410	264	N
CH1	162	165	45	A	CH2	275	288	155	F	CH3	385	411	265	G
CH1	163	166	46	L	CH2	276	289	156	N	CH3	386	414	266	Q
CH1	164	167	47	T	CH2	277	290	157	W	CH3	387	415	267	P
CH1	165	168	48	S	CH2	278	291	158	Y	CH3	388	416	268	E
CH1	166	169	49	G	CH2	279	292	159	V	CH3	389	417	269	N
CH1	167	171	50	V	CH2	280	295	160	D	CH3	390	418	270	N
CH1	168	172	51	H	CH2	281	296	161	G	CH3	391	419	271	Y
CH1	169	173	52	T	CH2	282	299	162	V	CH3	392	420	272	K
CH1	170	174	53	F	CH2	283	300	163	E	CH3	393	421	273	T
CH1	171	175	54	P	CH2	284	301	164	V	CH3	394	422	274	T
CH1	172	176	55	A	CH2	285	302	165	H	CH3	395	423	275	P
CH1	173	177	56	V	CH2	286	303	166	N	CH3	396	424	276	P

[0575]

CH1	174	178	57	L	CH2	287	304	167	A	CH3	397	425	277	V
CH1	175	179	58	Q	CH2	288	305	168	K	CH3	398	426	278	L
CH1	176	180	59	S	CH2	289	306	169	T	CH3	399	427	279	D
CH1	177	182	60	S	CH2	290	307	170	K	CH3	400	428	280	S
CH1	178	183	61	G	CH2	291	308	171	P	CH3	401	430	281	D
CH1	179	184	62	L	CH2	292	309	172	R	CH3	402	433	282	G
CH1	180	185	63	Y	CH2	293	310	173	E	CH3	403	434	283	S
CH1	181	186	64	S	CH2	294	311	174	E	CH3	404	435	284	F
CH1	182	187	65	L	CH2	295	312	175	Q	CH3	405	436	285	F
CH1	183	188	66	S	CH2	296	313	176	F	CH3	406	437	286	L
CH1	184	189	67	S	CH2	297	314	177	N	CH3	407	438	287	Y
CH1	185	190	68	V	CH2	298	317	178	S	CH3	408	439	288	S
CH1	186	191	69	V	CH2	299	318	179	T	CH3	409	440	289	R
CH1	187	192	70	T	CH2	300	319	180	Y	CH3	410	441	290	L
CH1	188	193	71	V	CH2	301	320	181	R	CH3	411	442	291	T
CH1	189	194	72	P	CH2	302	321	182	V	CH3	412	443	292	V
CH1	190	195	73	S	CH2	303	322	183	V	CH3	413	444	293	D
CH1	191	196	74	S	CH2	304	323	184	S	CH3	414	445	294	K
CH1	192	197	75	S	CH2	305	324	185	V	CH3	415	446	295	S
CH1	193	198	76	L	CH2	306	325	186	L	CH3	416	447	296	R
CH1	194	199	77	G	CH2	307	326	187	T	CH3	417	448	297	W
CH1	195	200	78	T	CH2	308	327	188	V	CH3	418	449	298	Q
CH1	196	203	79	K	CH2	309	328	189	L	CH3	419	450	299	E
CH1	197	205	80	T	CH2	310	329	190	H	CH3	420	451	300	G
CH1	198	206	81	Y	CH2	311	330	191	Q	CH3	421	452	301	N
CH1	199	207	82	T	CH2	312	331	192	D	CH3	422	453	302	V
CH1	200	208	83	C	CH2	313	332	193	W	CH3	423	454	303	F
CH1	201	209	84	N	CH2	314	333	194	L	CH3	424	455	304	S
CH1	202	210	85	V	CH2	315	334	195	N	CH3	425	456	305	C
CH1	203	211	86	D	CH2	316	335	196	G	CH3	426	457	306	S
CH1	204	212	87	H	CH2	317	336	197	K	CH3	427	458	307	V
CH1	205	213	88	K	CH2	318	337	198	E	CH3	428	459	308	M
CH1	206	214	89	P	CH2	319	338	199	Y	CH3	429	460	309	H
CH1	207	215	90	S	CH2	320	339	200	K	CH3	430	461	310	E
CH1	208	216	91	N	CH2	321	340	201	C	CH3	431	462	311	A
CH1	209	217	92	T	CH2	322	341	202	K	CH3	432	463	312	L
CH1	210	218	93	K	CH2	323	342	203	V	CH3	433	464	313	H
CH1	211	219	94	V	CH2	324	343	204	S	CH3	434	465	314	N
CH1	212	220	95	D	CH2	325	344	205	N	CH3	435	466	315	H
CH1	213	221	96	K	CH2	326	345	206	K	CH3	436	467	316	Y
CH1	214	222	97	R	CH2	327	346	207	G	CH3	437	468	317	T
CH1	215	223	98	V	CH2	328	347	208	L	CH3	438	469	318	Q
铰链	216	226	99	E	CH2	329	348	209	P	CH3	439	470	319	K
铰链	217	227	100	S	CH2	330	349	210	S	CH3	440	471	320	S
铰链	218	228	101	K	CH2	331	350	211	S	CH3	441	472	321	L
铰链	219	229	102	Y	CH2	332	351	212	I	CH3	442	473	322	S
铰链	220	230	103	G	CH2	333	352	213	E	CH3	443	474	323	L

[0576]	铰链	224	237	104	P	CH2	334	353	214	K	CH3	444	475	324	S
	铰链	225	238	105	P	CH2	335	354	215	T	CH3	445	476	325	L
	铰链	226	239	106	C	CH2	336	355	216	I	CH3	446	477	326	G
	铰链	227	240	107	P	CH2	337	357	217	S	CH3	447	478	327	K
	铰链	228	241	108	S	CH2	338	358	218	K					
	铰链	229	242	109	C	CH2	339	359	219	A					
	铰链	230	243	110	P	CH2	340	360	220	K					

[0577] 如本文所用,短语“衍生自”在指衍生自另一种抗体例如单克隆抗体的抗体片段时,是指保留了原始抗体的结合特异性的抗体片段(例如,Fab、F(ab')、F(ab')₂、单链Fv(scFv)、Fv、dsFv、dAb、双抗体、Fd和Fd'片段)的工程化。此类片段可通过本领域已知的多种方法衍生,包括但不限于酶促切割、化学交联、重组手段或其组合。通常,衍生的抗体片段与亲本抗体共享相同或基本相同的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),由此所述抗体片段和亲本抗体结合相同的表位。

[0578] 如本文所用,“亲本抗体”或“来源抗体”是指从中衍生抗体片段(例如,Fab、F(ab')、F(ab)₂、单链Fv(scFv)、Fv、dsFv、dAb、双抗体、Fd和Fd'片段)的抗体。

[0579] 如本文所用,术语“表位”是指抗体的互补位可与之结合的抗原或蛋白质上的任何抗原决定簇。表位决定簇通常含有分子的化学活性表面基团,例如氨基酸或糖侧链,并且通常具有特异性的三维结构特征,以及特异性的电荷特征。

[0580] 如本文所用,“人源化抗体”和人治疗剂是指被修饰以包括“人”氨基酸序列的抗体和其它蛋白质治疗剂,由此施用于人时不引起免疫应答。例如,人源化抗体通常含有衍生自非人物种免疫球蛋白的互补决定区(CDR或高变环),该抗体分子的其余部分主要源自人免疫球蛋白。将包括抗体在内的蛋白质人源化并产生它们的方法是本领域技术人员众所周知的并且容易获得。例如,可以通过重组DNA技术改变编码单克隆抗体的DNA以编码其中非可变区的氨基酸组成基于人抗体的抗体。鉴定这些区域的方法是已知的,包括设计用于鉴定免疫球蛋白的可变区和非可变区的计算机程序。因此,一般而言,人源化抗体基本上含有至少一个、通常是两个可变域,其中所有或基本上所有的高变环(例如,CDR)对应于非人免疫球蛋白的那些高变环,并且所有或基本上所有框架区(FR)都是人免疫球蛋白序列的框架区。人源化抗体任选还含有免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。

[0581] 如本文所用,“多聚化结构域”是指促进多肽分子与一个或多个另外的多肽分子稳定相互作用的氨基酸序列,每个多肽分子均含有互补的多聚化结构域,其可以是相同或不同的多聚化结构域,与第一个结构域形成稳定的多聚体。通常,多肽直接或间接连接于多聚化结构域。示例的多聚化结构域包括免疫球蛋白序列或其一部分、亮氨酸拉链、疏水区、亲水区和相容的蛋白质-蛋白质相互作用结构域。多聚化结构域例如可以是免疫球蛋白恒定区或结构域,例如来自IgG的Fc结构域或其部分,包括IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型、IgA、IgE、IgD和IgM,及其修饰形式。

[0582] 如本文所用,“二聚化结构域”是促进两个多肽序列(例如但不限于抗体链)之间相互作用的多聚化结构域。二聚化结构域包括但不限于含有促进两个多肽序列之间形成二硫键的半胱氨酸残基的氨基酸序列,例如全长抗体铰链区的全部或部分,或一个或多个二聚化序列,这是已知促进多肽之间相互作用的氨基酸序列(例如,亮氨酸拉链、GCN4拉链)。

[0583] 如本文所用,“嵌合多肽”是指含有来自至少两个不同多肽或来自单个多肽的两个非连续部分的的多肽。因此,嵌合多肽通常包括来自一种多肽的全部或部分的氨基酸残基序列,以及来自另一种不同多肽的全部或部分的氨基酸序列。这两个部分可以直接或间接连接,并且可以通过肽键、其它共价键或其它非共价相互作用连接,所述连接足够强度以在平衡条件和生理条件例如等渗pH 7缓冲盐水下保持嵌合多肽的大部分完整性。

[0584] 如本文所用,“融合蛋白”是一种多肽,其被工程化以含有对应于两个不同多肽的氨基酸序列,所述多肽被连接在一起,例如通过从含有沿着载体的长度彼此非常接近例如相邻的编码两个多肽的两个核酸的载体中表达融合蛋白。因此,融合蛋白是指含有直接或通过肽键间接连接的两个蛋白质或肽或其部分的嵌合蛋白质。这两个分子可以在构建体中相邻,或者可以被接头或间隔多肽分开。

[0585] 如本文所用,“接头”、“接头单元”或“连接”是指含有原子链的肽或化学部分,其将抗体或其抗原结合片段共价连接于另一治疗部分或另一抗体或其片段。包括接头以例如增加柔性、改变空间效应(包括空间位阻)和增加在水性介质中的溶解度。

[0586] 如本文所用,“接头肽”或“间隔肽”是指连接两个多肽序列(或编码诸如氨基酸序列的核酸)的短氨基酸序列。“肽接头”是指连接两个多肽序列的短氨基酸序列。多肽接头的示例是将肽转导结构域连接于抗体的接头,或连接合成抗体片段如scFv片段中的两条抗体链的接头。接头是众所周知的,并且任何已知的接头都可以用于所提供的方法中。示例的多肽接头包括(Gly-Ser)_n氨基酸序列,其中一些Glu或Lys残基分散在各处以增加溶解度。本文描述了其它示例接头;这些和其它已知接头中的任何接头都可以与本文提供的多肽、抗体和其它产物和方法一起使用。

[0587] 如本文所用,“标签”或“表位标签”是指这样的氨基酸序列,其通常被添加到多肽的N-或C-末端,所述多肽例如是本文提供的抗体和抗体片段/构建体。包含与多肽融合的标签可以促进多肽纯化和/或检测。通常,标签或标签多肽是指具有足够残基以提供被抗体识别的表位或可用于检测或纯化的多肽,但又足够短以致于它不会干扰与其连接的多肽的活性。标签多肽通常是足够独特的,使得与其特异性结合的抗体基本上不与其连接的多肽中的表位发生交叉反应。合适的标签多肽通常具有至少5或6个氨基酸残基,并且通常在约8-50个氨基酸残基之间,通常在9-30个残基之间。标签可以与多聚体中的一个或多个嵌合多肽连接,并允许从样品或混合物中检测多聚体或回收其。这样的标签是众所周知的并且可以容易地合成和设计。示例的标签多肽包括那些用于亲和纯化的多肽,包括例如FLAG标签; His标签; 流感血凝素(HA)标签多肽及其抗体12CA5(见例如Field et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165); c-myc标签及其8F9、3C7、6E10、G4、B7和9E10抗体(见例如Evan et al. (1985) Molecular and Cellular Biology 5:3610-3616); 及单纯疱疹病毒糖蛋白D(gD)标签及其抗体(见例如Paborsky et al. (1990) Protein Engineering 3:547-553)。用于检测表位标签的抗体的抗体在本文中通常称为二抗。

[0588] 如本文所用,“标记”或“可检测部分”是可检测标记(例如荧光分子、化学发光分子、生物发光分子、造影剂(例如金属)、放射性核素、生色团、可检测肽或催化可检测产物形成的酶),其可以直接或间接附着或连接于分子(例如,抗体或其抗原结合片段,例如本文提供的抗TNFR1抗体或其抗原结合片段),或与之结合,并且可以在体内和/或体外检测到。检测方法可以是本领域已知的任何方法,包括已知的体内和/或体外检测方法(例如,通过视

觉检查成像、磁共振(MR)波谱、超声信号、X射线、伽马射线波谱(例如,正电子发射断层扫描(PET)扫描、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)、荧光光谱,或吸光度)。间接检测是指测量直接或间接结合可检测部分的原子、分子或组合物的物理现象,例如能量或粒子发射或吸收(例如,检测结合一抗(例如,本文提供的抗-TNFR抗体或其抗原结合片段)的标记的二抗或其抗原结合片段)。

[0589] 如本文所用,“核酸”是指至少两个连接的核苷酸或核苷酸衍生物,包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA),通常通过磷酸二酯键连接在一起。还包括在术语“核酸”中的是核酸的类似物,例如肽核酸(PNA)、硫代磷酸酯DNA和其它此类类似物和衍生物或其组合。核酸还包括含有例如核苷酸类似物或磷酸二酯键以外的“主链”键的DNA和RNA衍生物,例如磷酸三酯键、氨基磷酸酯键、硫代磷酸酯键、硫酯键或肽键(即肽核酸)。该术语还包括由核苷酸类似物、单(有义或反义)和双链核酸制成的RNA或DNA的等同物、衍生物、变体和类似物。脱氧核糖核苷酸包括脱氧腺苷、脱氧胞苷、脱氧鸟苷和脱氧胸苷。对于RNA,尿嘧啶碱基是尿苷。

[0590] 如本文所用,“分离的核酸分子”是与存在于该核酸分子的天然来源中的其它核酸分子分离的分子。“分离的”核酸分子,例如cDNA分子,当通过重组技术产生时可以基本上不含其它细胞材料或培养基,或者当化学合成时基本上不含化学前体或其它化学品。本文提供的示例性分离的核酸分子包括编码所提供的抗体或抗原结合片段的分离的核酸分子。

[0591] 如本文所用,关于核酸序列、区域、元件或结构域的“可操作地连接”是指核酸区域在功能上彼此相关。例如,编码前导肽的核酸可以可操作地连接于编码多肽的核酸,由此所述核酸可以被转录和翻译以表达功能性融合蛋白,其中前导肽影响融合多肽的分泌。在一些情况下,编码第一多肽(例如,前导肽)的核酸可操作地连接于编码第二多肽的核酸,并且核酸被转录为单个mRNA转录物,但mRNA转录物的翻译可导致两种多肽之一被表达。例如,琥珀终止密码子可以位于编码第一多肽的核酸和编码第二多肽的核酸之间,由此当被引入部分琥珀抑制细胞时,所得的单个mRNA转录物可以被翻译以产生含有第一和第二多肽的融合蛋白,或者可以被翻译以仅产生第一多肽。在另一个实例中,启动子可以可操作地连接于编码多肽的核酸,由此启动子调节或介导核酸的转录。

[0592] 如本文所用,关于例如合成核酸分子或合成基因或合成肽的“合成”是指通过重组方法和/或通过化学合成方法产生的核酸分子或基因或多肽分子。

[0593] 如本文所用,天然存在的 α -氨基酸残基是自然界中发现的那些20种 α -氨基酸的残基,将其通过带电tRNA分子及其在人类中的同源mRNA密码子的特异性识别而掺入蛋白质中。

[0594] 如本文所用,“多肽”指共价连接的两个或更多个氨基酸。术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用。

[0595] 如本文所用,“肽”是指长度为2个至约或40个氨基酸的多肽。

[0596] 如本文所用,“氨基酸”是含有氨基和羧基的有机化合物。多肽含有两个或更多个氨基酸。出于本文的目的,提供的多肽例如抗体中的氨基酸包括二十种天然存在的氨基酸(表4)、非天然氨基酸和氨基酸类似物(例如,其中 α -碳具有侧链的氨基酸)。如本文所用,出现在本文中的多肽的各种氨基酸序列中的氨基酸根据其众所周知的三字母或一字母缩写来识别(见表4)。出现在各种核酸分子和片段中的核苷酸以本领域常规使用的标准单

字母名称命名。

[0597] 如本文所用,“氨基酸残基”是指在多肽的肽键处化学消化(水解)后形成的氨基酸。本文所述的氨基酸残基通常为“L”异构形式。“D”异构形式的残基可以取代任何L-氨基酸残基,只要多肽保留所需的功能性质即可。 NH_2 指存在于多肽氨基末端的游离氨基。 COOH 指存在于多肽的羧基末端的游离羧基。与J.Biol.Chem.,243:3557-59(1968)中描述的标准多肽命名法一致,并采用37C.F.R. §§1.821-1.822,氨基酸残基缩写见表4:

[0598] 表4:对应表

符号		
1-字母	3-字母	氨基酸
Y	Tyr	酪氨酸
G	Gly	甘氨酸
F	Phe	苯丙氨酸
M	Met	甲硫氨酸
A	Ala	丙氨酸
S	Ser	丝氨酸
I	Ile	异亮氨酸
L	Leu	亮氨酸
T	Thr	苏氨酸
V	Val	缬氨酸
[0599] P	Pro	脯氨酸
K	Lys	赖氨酸
H	His	组氨酸
Q	Gln	谷氨酰胺
E	Glu	谷氨酸
Z	Glx	谷氨酸和/或谷氨酰胺
W	Trp	色氨酸
R	Arg	精氨酸
D	Asp	天冬氨酸
N	Asn	天冬酰胺
B	Asx	天冬氨酸和/或天冬酰胺
C	Cys	半胱氨酸
X	Xaa	未知或其它

[0600] 本文中由式表示的所有氨基酸残基序列从左到右的方向均是按照常规的氨基末端到羧基末端的方向。此外,短语“氨基酸残基”被定义为包括对应表(表4)中列出的氨基酸、修饰的、非天然的和罕见的氨基酸。此外,氨基酸残基序列开头或结尾的破折号表示与一个或多个氨基酸残基的另一序列或与氨基末端基团(例如 NH_2)或与羧基末端基团(例如 COOH)结合的肽键。在肽或蛋白质中,合适的氨基酸保守取代是本领域技术人员已知的并且通常可以在不改变所得分子的生物学活性的情况下进行。本领域技术人员认识到,通常多肽非必需区域中的单个氨基酸取代不会显著改变生物活性(见例如Watson et al., Molecular Biology of the Gene,4th Edition,1987,The Benjamin/Cummings Pub.Co., p.224)。

[0601] 此类取代可根据下表5中列出的示例取代进行:

[0602] 表5:示例的保守氨基酸取代

[0603]	原始残基	保守取代
	Ala (A)	Gly;Ser
	Arg (R)	Lys
	Asn (N)	Gln;His
	Cys (C)	Ser
	Gln (Q)	Asn
	Glu (E)	Asp
	Gly (G)	Ala;Pro
	His (H)	Asn;Gln
	Ile (I)	Leu;Val
	Leu (L)	Ile;Val
	Lys (K)	Arg;Gln;Glu
	Met (M)	Leu;Tyr;Ile
	Phe (F)	Met;Leu;Tyr
	Ser (S)	Thr
	Thr (T)	Ser
	Trp (W)	Tyr
	Tyr (Y)	Trp;Phe
	Val (V)	Ile;Leu

[0604] 其它取代也是允许的,并且可以根据经验或根据其它已知的保守或非保守取代来确定。

[0605] 如本文所用,“天然存在的氨基酸”是指存在于多肽中的20种L-氨基酸。

[0606] 如本文所用,术语“非天然氨基酸”是指具有与天然氨基酸相似的结构但在结构上已被修饰以模拟天然氨基酸的结构和反应性的有机化合物。非天然存在的氨基酸因此包括例如除20种天然存在的氨基酸之外的氨基酸或氨基酸类似物,并且包括但不限于氨基酸的D-立体异构体。示例的非天然氨基酸是本领域技术人员已知的,并且包括但不限于2-氨基己二酸(Aad)、3-氨基己二酸(bAad)、 β -丙氨酸/ β -氨基丙酸(Bala)、2-氨基丁酸(Abu)、4-氨基丁酸/哌啶酸(4Abu)、6-氨基己酸(Acp)、2-氨基庚酸(Ahe)、2-氨基异丁酸(Aib)、3-氨基异丁酸(Baib)、2-氨基庚二酸(Apm)、2,4-二氨基丁酸(Dbu)、锁链素(Des)、2,2'-二氨基庚二酸(Dpm)、2,3-二氨基丙酸(Dpr)、N-乙基甘氨酸(EtGly)、N-乙基天冬酰胺(EtAsn)、羟赖氨酸(Hyl)、别羟基赖氨酸(Ahyl)、3-羟脯氨酸(3Hyp)、4-羟脯氨酸(4Hyp)、异锁链素(Ide)、别异亮氨酸(Aile)、N-甲基甘氨酸、肌氨酸(MeGly)、N-甲基异亮氨酸(MeIle)、6-N-甲基赖氨酸(MeLys)、N-甲基缬氨酸(MeVal)、正缬氨酸(Nva)、正亮氨酸(Nle)和鸟氨酸(Orn)。

[0607] 如本文所用,“DNA构建体”是单链或双链、线性或环状DNA分子,其含有以自然界中未发现的方式组合和并列的DNA节段。DNA构建体是人类操纵的结果,包括被操纵分子的克隆和其它拷贝。

[0608] 如本文所用,“DNA节段”是具有特定属性的较大DNA分子的一部分。例如,编码特定多肽的DNA节段是较长DNA分子的一部分,例如质粒或质粒片段,当从5'至3'方向读取时,编码特定多肽的氨基酸序列。

[0609] 如本文所用,术语“多核苷酸”是指从5'端到3'端读取的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸碱基的单链或双链聚合物。多核苷酸包括RNA和DNA,可以从天然来源分离、体外合成或由天然分子和合成分子的组合制备。多核苷酸分子的长度在本文中以核苷酸(缩写为“nt”)或碱基对(缩写为“bp”)给出。在上下文允许的情况下,术语核苷酸用于单链和双链分子。当该术语应用于双链分子时,用于表示总长度并且被理解为等同于术语碱基对。本领域技术人员将认识到,双链多核苷酸的两条链在长度上可以略有不同并且其末端可以交错;因此,双链多核苷酸分子中的所有核苷酸不能都配对。这种未配对的末端一般不会超过20个核苷酸的长度。

[0610] 如本文所用,通过使用重组DNA方法的重组方式生产是指使用众所周知的分子生物学方法来表达由克隆的DNA编码的蛋白质。

[0611] 如本文所用,“表达”是指通过多核苷酸的转录和翻译产生多肽的过程。可以使用本领域已知的任何方法评估多肽的表达水平,包括例如确定从宿主细胞产生的多肽的量的方法。此类方法可包括但不限于通过ELISA、凝胶电泳后的考马斯蓝染色、Lowry蛋白质测定和Bradford蛋白质测定对细胞裂解物中的多肽进行定量。

[0612] 如本文所用,“宿主细胞”是用于接收、维持、再生和/或扩增载体的细胞。宿主细胞也可用于表达由载体编码的多肽。当宿主细胞分裂时,载体中的核酸被复制,从而扩增核酸。

[0613] 如本文所用,“载体”是可复制的核酸,当将载体转化到合适的宿主细胞中时,可从中表达一种或多种异源蛋白质。提及的载体包括可以将编码多肽或其片段的核酸引入其中的那些载体,通常通过限制性消化和连接引入。提及的载体还包括那些含有编码多肽例如修饰的抗-TNFR1抗体的核酸的载体。载体用于将编码多肽的核酸引入宿主细胞以扩增核酸,或用于表达/展示由核酸编码的多肽。载体通常保持游离型,但可以设计成实现基因或其部分整合到基因组的染色体中。还涵盖了是人工染色体的载体,例如酵母人工染色体和哺乳动物人工染色体。此类载体的选择和使用是本领域技术人员众所周知的。载体还包括“病毒载体”或“病毒性载体”。病毒载体是被工程化为与外源基因可操作地连接以将外源基因转移(作为运载体或穿梭机)到细胞中的病毒。

[0614] 如本文所用,“表达载体”包括能够表达与调节序列(例如启动子区)可操作地连接的DNA的载体,其能实现此类DNA片段的表达。这种另外的节段可以包括启动子和终止子序列,并且任选可以包括一个或多个复制起点、一个或多个选择标记、增强子、聚腺苷酸化信号等。表达载体通常衍生自质粒或病毒DNA,或可含有这两者的元件。因此,表达载体是指重组DNA或RNA构建体,例如质粒、噬菌体、重组病毒或其它载体,其在引入合适的宿主细胞后导致克隆的DNA的表达。合适的表达载体是本领域技术人员所熟知的,包括可在真核细胞和/或原核细胞中复制的那些表达载体,以及保持游离型的表达载体,或整合到宿主细胞基因组中的那些表达载体。

[0615] 如本文所用,“一级序列”是指多肽的氨基酸残基序列或核酸分子的核苷酸序列。

[0616] 如本文所用,“序列相同性”是指在测试和参考多肽或多核苷酸之间进行比较时相同或相似的氨基酸或核苷酸碱基的数目。序列相同性可以通过核酸或蛋白质序列的序列比对来鉴定相似性或相同性区域。出于本文的目的,序列相同性通常通过比对来确定以鉴定相同的残基。所述比对可以是局部比对的或全局比对。可以在比较的序列之间鉴定匹配、错

配和空位。空位是插入比对序列残基之间的无效氨基酸或核苷酸,以便比对相同或相似的字符。通常,可能存在内部和末端空位。当使用空位罚分时,可以确定序列相同性而不对末端空位进行罚分(例如,对末端空位不罚分)。或者,可以在不考虑空位的情况下确定序列相同性,以相同位置的数量/总比对序列的长度 $\times 100$ 计算。

[0617] 如本文所用,“全局比对”是将两个序列从开始到末端进行比对的比对法,每个序列中的每个字母仅比对一次。无论序列之间是否存在相似性或相同性,都会产生比对。例如,基于“全局比对”的50%序列相同性是指在两个比较序列的全序列比对中,每个长度为100个核苷酸,50%的残基是相同的。应当理解,即使当比对序列的长度不同时,也可以使用全局比对来确定序列相同性。在确定序列相同性时考虑序列末端的差异,除非选择“没有末端空位罚分”。通常,全局比对用于在其大部分长度上具有显著相似性的序列。用于执行全局比对的示例性算法包括Needleman-Wunsch算法(Needleman et al. (1970) J.Mol.Biol.48:443)。执行全局比对的示例程序是可公开获得的,包括可在国家生物技术信息中心(NCBI)网站(ncbi.nlm.nih.gov/)上获得的全局序列比对工具(Global Sequence Alignment Tool),以及可在deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html上获得的程序。

[0618] 如本文所用,“局部比对”是比对两个序列的比对法,但仅比对具有相似性或相同性的那些序列部分。因此,局部比对确定一个序列的子节段是否存在于另一个序列中。如果没有相似性,则不会返回对齐。局部比对算法包括BLAST或Smith-Waterman算法(Adv.Appl.Math.2:482(1981))。例如,基于“局部比对”的50%序列相同性意味着在任意长度的两个比较序列的完整序列比对中,长度为100个核苷酸的相似性或相同性区域有50%的残基是在相似或相同的区域中相同。

[0619] 出于本文的目的,序列相同性可以通过使用每个供应商建立的默认空位罚分的标准比对算法程序来确定。GAP程序的默认参数可以包括:(1)一元比较矩阵(含有相同性值为1和非相同性值为0)和Gribskov et al.Nucl.Acids Res.14:6745(1986)的加权比较矩阵,如Schwartz and Dayhoff,eds.,Atlas of Protein Sequence and Structure,National Biomedical Research Foundation,pp.353-358(1979)所述;(2)每个空位罚分3.0,每个空位每个符号加罚0.10;及(3)对末端空位不罚分。无论任何两个核酸分子是否具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%“相同”的核苷酸序列,或任何两个多肽是否具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%“相同”的氨基酸序列,或陈述相同性百分比的其它类似变化用语,可以使用基于局部或全局比对的已知计算机算法来确定(见例如wikipedia.org/wiki/Sequence_alignment_software,提供了数十个已知和可公开获得的比对数据库和程序的链接)。通常,出于本文的目的,使用基于全局比对的计算机算法确定序列相同性,例如可得自NCBI/BLAST(blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&Page_TYPE=BlastHome)的Needleman-Wunsch全局序列比对工具;LAlign(执行Huang和Miller算法的William Pearson(Adv.Appl.Math.(1991)12:337-357));以及Xiaoqui Huang的程序,可在deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html获取。通常,将每个比较的多肽或核苷酸的全长序列在全局比对中跨越每个序列的全长进行比对。当被比较的序列长度基本相同时,也可以使用局部比对。

[0620] 如本文所用,术语“相同性”表示测试与参考多肽或多核苷酸之间的比较或比对。

在一个非限制性实例中，“至少90%相同”是指相对于参考多肽或多核苷酸从90%到100%的相同性百分比。90%或更高水平的相同性表明以下事实：假设为了举例说明，当比较长度为100个氨基酸或核苷酸的测试和参考多肽或多核苷酸时，测试多肽或多核苷酸中不超过10%（即10/100）的氨基酸或核苷酸与参考多肽或多核苷酸的氨基酸或核苷酸不同。可以在测试和参考多核苷酸之间进行类似的比较。这种差异可以呈现为随机分布在整个氨基酸序列长度上的点突变，或者其可以簇集在一个或多个不同长度的位置，直到最大允许值例如10/100氨基酸差异（大约90%相同性）。差异也可能是由于氨基酸残基的缺失或截短所致。差异被定义为核酸或氨基酸取代、插入或缺失。根据比较序列的长度，在约85-90%以上的同源性或相同性水平上，结果可以独立于程序和空位参数集；可以很容易地评估如此高级别的身份，通常无需依赖软件。

[0621] 如本文所用，“二硫键”（也称为S-S键或二硫键桥）是衍生自硫醇基偶联的单个共价键。蛋白质中的二硫键在半胱氨酸残基的硫醇基团之间形成，并稳定多肽结构域（例如抗体结构域）之间的相互作用。

[0622] 如本文所用，“偶联”或“缀合”是指通过共价或非共价相互作用连接。

[0623] 如本文所用，短语“缀合于抗体”或“连接于抗体”或其语法变体，当指的是将某部分连接于抗体或其抗原结合片段时，例如诊断或治疗部分，是指该部分通过任何已知的用于连接肽的方式连接于抗体或其抗原结合片段，例如通过重组方式或通过化学方式翻译后产生融合蛋白。缀合可以使用多种连接剂中的任一种来实现缀合，包括但不限于肽或化合物接头，或化学交联剂。

[0624] 如本文所用，“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”、“抗体依赖性细胞的细胞毒性”和“ADCC”可互换使用，是指细胞介导的反应，其中表达Fc受体（FcR）的非特异性细胞毒性细胞（例如，天然杀伤（NK）细胞、中性粒细胞和巨噬细胞）识别靶细胞上的结合抗体，随后导致靶细胞裂解。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII，而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。Ravetch et al. (1991) *Annu. Rev. Immunol*, 9:457-492的第464页表3总结了造血细胞上的FcR表达。为了评估目标分子的ADCC活性，可以进行体外ADCC测定（见例如美国专利号5,500,362和5,821,337）。用于此类测定的示例的效应细胞包括外周血单核细胞（PBMC）和自然杀伤细胞（NK）细胞。或者或另外地，可以在体内评估目标分子的ADCC活性，例如在动物模型中评估，例如在Clynes et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656中所公开。

[0625] 如本文所用，补体依赖性细胞毒性（CDC）是IgG和IgM抗体的效应子功能。当此类抗体与靶细胞（例如细菌细胞或病毒感染的细胞）上的表面抗原结合时，经典补体途径通过将蛋白质C1q与这些抗体结合而触发，从而导致膜攻击复合物（MAC）形成和随后的细胞裂解。

[0626] 如本文所用，抗体依赖性细胞吞噬作用（ADCP）是具有吞噬潜能的效应细胞（例如单核细胞和巨噬细胞）内化靶细胞的细胞过程。一旦被吞噬，靶细胞驻留在吞噬体中，吞噬体与溶酶体融合以通过氧依赖或非依赖性机制降解靶细胞。

[0627] 如本文所用，“治疗活性”是指治疗性多肽的体内活性。通常，治疗活性是与疾病或病症的治疗相关的活性。修饰的多肽的治疗活性可以是未修饰多肽的治疗活性的任何百分比水平，包括但不限于与未修饰多肽的治疗活性相比是其活性的1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97%、98%、99%、100%、200%、300%、400%、500%或更多。

[0628] 如本文所用,术语“评估”旨在包括获得样品中存在的蛋白质例如抗体或其抗原结合片段的活性的绝对值意义上的定量和定性测定,以及获得指示活性水平的指数、比率、百分比、目测值或其它值。评估可以是直接或间接评估。

[0629] 如本文所用,“疾病或病症”是指生物体中由包括但不限于感染、获得性病症和遗传病症的原因或病症引起的病理状况,并且以可识别的症状为特征。

[0630] 如本文所用,“治疗”患有疾病或病症的受试者意指受试者的症状被部分或完全减轻,或在治疗后保持静态。因此,治疗涵盖预防、治疗和/或治愈。预防是指防止潜在疾病和/或防止症状恶化或疾病进展。治疗还涵盖本文提供的任何抗体或其抗原结合片段或组合物的任何药物用途。

[0631] 如本文所用,治疗是指疾病、病症或病况的症状或表现的改善。

[0632] 如本文所用,“防止”或“预防”是指降低发生疾病或病症的风险的方法。预防疾病意味着降低患病风险。

[0633] 如本文所用,“药物有效剂”包括任何治疗剂或生物活性剂,包括但不限于例如麻醉剂、血管收缩剂、分散剂和常规治疗药物,包括小分子药物和治疗性蛋白质。

[0634] 如本文所用,“治疗效果”是指对受试者进行治疗获得改变、通常改善或减轻疾病或病症的症状或治愈疾病或病症的效果。

[0635] 如本文所用,“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是指在施用于受试者后至少足以产生治疗效果的药剂、化合物、材料或含有化合物的组合物的量。因此,其是预防、治愈、改善、阻止或部分阻止疾病或病症的症状所必需的量。

[0636] 如本文所用,“治疗功效”是指药剂、化合物、材料或含有化合物的组合物在已施用了所述药剂、化合物、材料或含有化合物的组合物的受试者中产生治疗效果的能力。

[0637] 如本文所用,“预防有效量”或“预防有效剂量”是指将药剂、化合物、材料或含有化合物的组合物在施用于受试者时具有预期的预防效果的量,所述预防效果例如是防止或延迟疾病或症状的发作或复发、降低疾病或症状发作或复发的可能性,或降低病毒感染的发生率。完全的预防效果不一定通过施用一次剂量而发生,并且只有在施用一系列剂量后才能发生。因此,可以在一次或多次施用中施用预防有效量。

[0638] 如本文所用,通过治疗如通过施用药物组合物或其它治疗剂来改善特定疾病或病症的症状是指可以归因于或与施用所述组合物或治疗剂相关的症状的任何减轻,无论是永久的还是暂时的,持续的还是短暂的。

[0639] 如本文所用,“前药”是药物活性物质的前体或衍生物形式,与母体药物相比,其对肿瘤细胞的细胞毒性较小,并且能够被酶促激活或转化为更具活性的母体形式(见例如Wilman,1986,Biochemical Society Transactions,615th Meeting Belfast,14:375-382;及Stella et al.,“Prodrugs:A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,”Directed Drug Delivery,Borchardt et al.,(ed.),pp.247-267,Humana Press,1985)。

[0640] 如本文所用,“抗癌剂”是指对恶性细胞和组织具有破坏性或毒性的任何药剂。例如,抗癌剂包括杀死癌细胞或以其它方式抑制或损害肿瘤或癌细胞生长的药剂。示例的抗癌剂是化学治疗剂。

[0641] 如本文所用,“抗血管生成剂”或“血管生成抑制剂”是阻断或干扰血管发育的化合

物。

[0642] 如本文所用, TNF相关或TNF介导的疾病是指其中TNFR1或TNFR1信号传导在病因学中起作用的疾病、病况或病症; 包括其中抑制TNFR1信号传导可以改善疾病、病况或病症的症状的疾病、病况和病症。

[0643] 如本文所用, “TNFR2激动剂”或“抗TNFR2激动剂”是指化合物, 包括小分子和TNFR2抗体或其抗原结合片段, 以及启动、促进或增加TNFR2活化和/或增强一种或多种由TNFR2介导的信号转导途径的其它多肽。例如, TNFR2激动剂可以促进或增加Treg细胞群的增殖。TNFR2激动剂可以通过结合TNFR2来促进或增加TNFR2活化, 例如以诱导使受体具有生物活性的构象变化。例如, TNFR2激动剂可以以类似于或模拟TNFR2与其同源配体TNF (TNF α) 之间相互作用的方式使TNFR2三聚化成核, 从而诱导TNFR2介导的信号传导。TNFR2激动剂还可以诱导CD4⁺、CD25⁺、FOXP3⁺Treg细胞的增殖。TNFR2激动剂还可以抑制细胞毒性T淋巴细胞 (例如CD8⁺T细胞) 的增殖, 例如通过激活免疫调节Treg细胞或通过直接结合自身反应性细胞毒性T细胞表面的TNFR2并诱导细胞凋亡。用于本文方法的TNFR2激动剂抗体或其片段可以特异性结合TNFR2, 并且通常具有足够的特异性, 因此它不会特异性结合肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族成员的另一个受体, 例如TNFR1。

[0644] 如本文所用, TNFR2-选择性激动剂是不会或基本上不会导致TNFR1信号传导活性的TNFR2激动剂。

[0645] 如本文所用, Treg扩增物是一种分子, 包括小分子和多肽, 其增加调节性T细胞 (Treg细胞或Treg), 调节性T细胞是T细胞的免疫抑制亚群, 通过产生细胞因子具有免疫抑制性质。

[0646] 如本文所用, 术语“泛生长因子陷阱构建体”、“泛-EGFR配体陷阱构建体”、“生长因子陷阱”、“多特异性生长因子陷阱构建体”、“双特异性生长因子陷阱构建体”、“EGFR配体陷阱构建体”、“泛HER配体陷阱构建体”、“泛HER治疗剂”、“EGFR配体陷阱构建体”、“HER配体陷阱构建体”和“生长因子陷阱构建体”可互换使用, 是指泛-细胞表面受体分子, 包括基于肽的化合物, 其调节两个或更多个人表皮生长因子受体 (EGFR) 的活性, 也称为HER或ErbB受体。通常, 泛生长因子陷阱靶向至少两种不同的HER受体, 例如通过配体结合和/或与受体的相互作用。

[0647] 如本文所用, “细胞外结构域”或“ECD”是出现在受体表面上的细胞表面受体部分, 包括配体结合位点。出于本文的目的, 提及的“ECD多肽”包括任何含有ECD的分子或其部分, 只要ECD多肽不含有与同源受体的另一结构域 (例如, 跨膜结构域、蛋白激酶结构域或其它结构域) 相关联的任何连续序列。

[0648] 如本文所用, “凸出凹陷 (knobs into holes)”或“凹陷中的凸出” (KIH) 是指多聚化结构域, 例如免疫球蛋白Fc结构域, 其被工程化为使得这些结构域之间和/或之中的空间相互作用促进稳定的相互作用, 并且与来自单体混合物的同源二聚体 (或同源多聚体) 相比, 促进异源二聚体 (或异源多聚体) 的形成。例如, 这可以通过在互补的多聚化结构域中构建凸出或突起及凹陷或空腔来实现。可以通过用较大的侧链 (例如酪氨酸或色氨酸) 替换第一个多聚化结构域多肽 (例如第一个Fc单体) 界面的小氨基酸侧链来构建“凸出”。通过用较小的氨基酸侧链 (例如丙氨酸或苏氨酸) 替换大的氨基酸侧链, 任选地在第二个互补多聚化多肽 (例如第二个Fc单体) 界面上产生与所述凸出相同或相似大小的补偿性“凹陷”。

[0649] 如本文所用,“束缚”是指受体单体的两个结构域之间的相互作用,由此单体以使其不太可用于相互作用的构象出现。例如,HER1、HER3和HER4中的亚域II可以与亚域IV相互作用,形成一个束缚的、无活性的结构。当处于束缚状态时,受体或其异构体较少或不可用于二聚化和/或配体结合。HER1、HER3和HER4单体形式的ECD以束缚形式出现,其配体亲和力低于未束缚形式。HER2在亚域IV中缺少某些残基,以不受束缚的形式出现,可用于与HER1、HER3和HER4的二聚化。在配体与束缚(单体)形式结合后,束缚相互作用被释放,ECD(或受体)处于可用于二聚化的构象,这涉及两个ECD的结构域II之间的相互作用。

[0650] 如本文所用,HER (ErbB) 相关疾病、HER相关疾病或HER介导的疾病是其中表皮生长因子受体(HER)和/或配体参与其病因学、病理学发展或其症状的某些方面的任何疾病、病况或病症。参与包括例如HER家族成员或配体的表达、过表达或活性。疾病包括但不限于增生性疾病,包括癌症,例如但不限于神经胶质瘤和胰腺癌、胃癌、头颈癌、宫颈癌、肺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、前列腺癌、食道癌、卵巢癌、子宫癌、膀胱癌或乳腺癌。其它病症包括那些涉及细胞增殖和/或迁移的病症,包括那些涉及病理性炎症和/或自身免疫应答的病症,例如类风湿性关节炎(RA)、非恶性过度增生性疾病、眼部病症、皮肤病症(例如银屑病),得自平滑肌细胞增殖和/或迁移的病症,例如狭窄,包括再狭窄、动脉粥样硬化、膀胱、心脏或其它肌肉的肌肉增厚,或子宫内膜异位症。

[0651] 如本文所用,术语“受试者”是指动物,包括哺乳动物,例如人。

[0652] 如本文所用,“患者”是指人受试者。

[0653] 如本文所用,“动物”包括任何动物,例如但不限于灵长类动物,包括人、大猩猩和猴子;啮齿动物,例如小鼠和大鼠;禽类,例如鸡;反刍动物,例如山羊、牛、鹿和绵羊;猪;和其它动物。非人动物是除人作为预期动物。本文提供的多肽来自任何来源,如来自动物、植物、原核生物和真菌。大多数多肽是动物来源的,包括哺乳动物来源,并且通常为了治疗用途是人的或人源化的。

[0654] 如本文所用,“组合物”是指任何混合物。其可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊状物、水性、非水性或其任何组合。

[0655] 如本文所用,“稳定剂”是指添加到配制剂中以在本文配制剂储存或使用的条件(例如,温度)下保护抗体或缀合物的化合物。因此,包括防止蛋白质免于在组合物中其它组分降解的制剂。此类制剂的示例是氨基酸、氨基酸衍生物、胺、糖、多元醇、盐和缓冲剂、表面活性剂、抑制剂或底物以及本文所述的其它制剂。

[0656] 如本文所用,“组合”是指两个或更多项之间或之中的任何关联。所述组合可以是两个或更多个单独的项目,例如两个组合物或两个集合,其混合物,例如两个或更多个项目的单一混合物,或其任何变体。组合的元件通常在功能上关联或相关,例如用于一种方法中的元件。

[0657] 如本文所用,“联合治疗”是指施用两种或更多种不同的治疗剂,例如本文提供的抗-TNFR构建体或例如抗体或其抗原结合片段,以及一种或多种治疗剂或其它治疗,例如放射和手术。可以单独、依次、间歇、同时或在单一组合物中提供和施用多种治疗剂。

[0658] 如本文所用,“试剂盒”是包装的组合,其任选包括其它元件,例如另外的试剂和使用该组合或其元件的说明,其目的包括但不限于激活、施用、诊断和评估生物活性或性质。

[0659] 如本文所用,“单位剂量形式”是指适用于人和动物受试者并单独包装的物理上分

立的单位,如本领域已知的。

[0660] 如本文所用,“单一剂量配制剂”是指直接施用的配制剂。

[0661] 如本文所用,“多剂量配制剂”是指含有多剂量治疗剂并且可以直接施用以提供数个单剂量治疗剂的配制剂。所述剂量可以在数分钟、数小时、数周、数天或数月的时间内施用。多剂量制剂可以允许剂量调整、剂量合并和/或剂量拆分。因为随着时间的推移使用多剂量配制剂,它们通常含有一种或多种防腐剂以防止微生物生长。

[0662] 如本文所用,“生产制品”是制造和销售的产品。如贯穿本申请所用,该术语旨在涵盖含在包装物品中或用于包装的本文提供的任何组合物。

[0663] 如本文所用,“流体”是指可以流动的任何组合物。因此,流体涵盖半固体、糊剂、溶液、水性混合物、凝胶、洗剂、乳膏和其它此类组合物形式的组合物。

[0664] 如本文所用,分离或纯化的多肽或蛋白质(例如分离的抗体或其抗原结合片段)或其生物活性部分(例如分离的抗原结合片段)基本上不含细胞物质或其它来自蛋白质来源的细胞或组织的污染蛋白质,或在化学合成时基本上不含化学前体或其它化学物质。如果通过技术人员使用用于评估这种纯度的标准分析方法如薄层色谱法(TLC)、凝胶电泳和高效液相色谱法(HPLC)确定制备物看起来不含易于检测的杂质,则可以确定所述制备物基本上不含这些杂质,或是足够纯的,由此进一步纯化不会可检测地改变所述物质的物理和化学性质,例如酶促和生物活性。纯化化合物以产生化学基本纯的化合物的方法是本领域技术人员已知的。然而,化学基本纯的化合物可以是立体异构体的混合物。在这种情况下,进一步纯化可能会增加化合物的比活性。

[0665] 如本文所用,“细胞提取物”或“裂解物”是指由裂解或破坏的细胞制成的制备物或级分。

[0666] 如本文所用,“对照”是指与测试样品基本相同的样品,除了对其没有用测试参数进行处理,或者,如果是血浆样品,其可以来自未受有意条件影响的正常志愿者。对照也可以是内部对照。

[0667] 如本文所用,单数形式“a”、“an”和“the”包括其复数指代对象,除非上下文另有明确规定。因此,例如提及含有“免疫球蛋白结构域”的多肽包括具有一个或多个免疫球蛋白结构域的多肽。

[0668] 如本文所用,术语“或”用于表示“和/或”,除非明确指示唯一指代项,或者指代项是相互排斥的。

[0669] 如本文所用,范围和量可表示为“约”特定值或范围。“约”也包括精确量。因此,“约5个氨基酸”意味着“大约5个氨基酸”也是“5个氨基酸”。对于特定参数,约是实验误差内的范围或本领域技术人员可接受的对于特定参数范围。

[0670] 如本文所用,“任选的”或“任选地”是指随后描述的事件或情况发生或不发生,并且描述包括其中所述事件或情况发生的情况和不发生的情况。例如,任选地是变体部分意味着该部分是变体或非变体。

[0671] 如本文所用,除非另有说明,否则任何保护基团、氨基酸和其它化合物的缩写均根据其常用用法、公认的缩写或IUPAC-IUB生物化学命名委员会命名(见Biochem. (1972) 11 (9):1726-1732)。

[0672] 为了清晰阐述而不是限制公开内容,详细描述分为以下小节。

[0673] B. 构建体和方法概述

[0674] 当身体的免疫系统攻击自身时,就会发生自身免疫性疾病。由此产生的炎症和组织破坏是由一种称作肿瘤坏死因子(TNF)的炎性激素引发的。自身免疫性疾病有100多种;总体而言,大约75%的自身免疫性疾病患者是女性。先前用于自身免疫性疾病的药物具有不良副作用,包括感染、心脏问题和其它疾病和病症。

[0675] TNF通过两个受体与免疫细胞相互作用,TNFR1在自身免疫性疾病中过度活性,TNFR2抑制自身免疫性疾病,但在TNFR1过度活性时被抑制。TNF阻滞剂,例如英夫利昔单抗(以Remicade®销售)、阿达木单抗(以Humira®销售)和依那西普(以Enbrel®销售)阻断TNFR1和TNFR2,导致不利的副作用。本文提供的构建体解决了这个问题。本文提供的构建体仅关闭导致TNFR2活性增加的TNFR1,从而不仅治疗自身免疫性疾病症状,而且提供改进的治疗并减少或没有不良副作用,因为TNFR2活性未被阻断。本文提供了解决现有技术TNF阻滞剂问题的多种构建体。下表总结了根据其活性鉴定并在本文中详细说明和提供的构建体类型:

构建体类型	待治疗的疾病	作用
TNFR1 拮抗剂	自身免疫性疾病和急性炎症	特异性阻断 TNFR1; 保留 TNFR2
[0676] 生长因子陷阱	类风湿性关节炎和癌症	捕获 EGF 家族的 9 个生长因子 (EGFR 和 HER3; 以及二聚化依赖性 HER2)
TNFR2 拮抗剂	癌症检查点抑制剂	抑制肿瘤抑制因子 Treg 功能从而提高主动免疫力
TNFR2 激动剂	炎症和纤维化	诱导 Treg 的增殖以减少炎症

[0677] 提供了用于治疗TNF介导的疾病、病症和病况的构建体,或其中TNF在病因学中起作用或干扰TNFR1信号传导具有改善作用的疾病、病症和病况的构建体。例如,TNFR1拮抗剂可用于治疗多种病症,包括自身免疫病症,以及例如子宫内膜异位症、得自例如化疗和COVID的脑雾、阿尔茨海默氏病、得自例如流感病毒和SARS-COV2感染的急性炎症,其对肺、肾和其它组织造成长期或永久性损害。由于现有TNF阻滞剂的副作用和随之而来的安全问题,它们不能用于大多数这些适应症。可以使用本文提供的TNFR1拮抗剂构建体。本文所述的这些构建体是单价的,因为其仅抑制TNFR1而不会引起受体簇集,其是特异性的、非免疫原性的,并且具有至少约3-4周的半衰期,允许大约每月一次施用。

[0678] 因此,提供了TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体和多特异性构建体例如包括TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂活性的双特异性构建体。所述构建体包括至少一个与TNFR1或TNFR2特异性相互作用的部分,以及通常直接或间接调节相互作用或为构建体提供药理学(药效学或药代动力学或两者)性质的另一部分。因此,本文提供的构建体包括至少两个部分:与TNFR1或TNFR2相互作用的结合部分,以及调节或改变构建体或结合部分的药理学性质或活性的第二部分。

[0679] 在本文提供的构建体中,有那些是TNFR1活性的拮抗剂。TNFR1拮抗剂构建体包含与TNFR1结合或相互作用并抑制TNFR1介导的信号传导的部分,及赋予另外的性质例如延长的血清半衰期、消除ADCC和/或CDC活性以及调节与特定受体的相互作用的第二部分。TNFR1拮抗剂和构建体还包括一或多个修饰,使得它们特别是在人体中没有免疫原性或免疫原性降低,并且还可以包括消除或减少与预先存在的抗体的结合的修饰。

[0680] 选择TNFR1拮抗剂构建体以特异性结合TNFR1,并与TNFR2具有最小结合或不结合或没有TNFR2拮抗剂活性。因此,所述构建体仅调节TNFR1。在一些实施方案中,选择TNFR1拮抗剂构建体以还具有或连接至具有TNFR2激动剂活性的第二结构域或部分。所述TNFR1构建体,包括那些被设计或选择以与TNFR1亲和性相互作用的构建体,其亲和力为例如 $K_d < 50\text{nM}$ 或 $< 10\text{nM}$ 或 $< 5\text{nM}$,特别是具有更高的亲和力(如 $K_d < 1\text{nM}$ 或 $< 0.1\text{nM}$ 或更高亲和力)和/或有效抑制TNFR1信号传导(例如, IC_{50} 为 50nM 或 $< 10\text{nM}$ 或 $< 5\text{nM}$ 或 $< 3\text{nM}$ 或 1nM 或 $< 0.5\text{nM}$)。

[0681] 还提供了多特异性例如双特异性构建体,其含有直接或通过接头连接至TNFR2激动剂部分的TNFR1拮抗剂部分。所述接头为分子提供了有利性质,例如增加的血清半衰期、增加的稳定性、适当的三维结构和柔性以及改进的药理学性质。这些构建体解决了与施用其它治疗相关的问题,例如抗TNF治疗(“TNF阻滞剂”,例如包括依那西普(Etanercept)、阿达木单抗(Humira®)、英夫利昔单抗),因为这些构建体增加了TNFR1炎症阻断的特异性并导致保护或放大TNFR2功能,这是一种天然的免疫抑制剂,至少部分是通过上调免疫抑制性Treg,以及诱导保护性和抗炎信号传导途径。此外,TNF阻断导致TNFR2功能的抑制,也减少T细胞诱导的单核细胞活化,从而增加机会性感染的可能性(见例如Rosse1 et al. (2007) J. Immunol. 179:4239-48)。

[0682] 本文提供的示例TNFR1拮抗剂构建体的活性与现有批准的TNF阻滞剂之间存在许多差异:TNF阻滞剂,例如依那西普、阿达木单抗、英夫利昔单抗,它们对TNFR1不是特异性的。其它阻滞剂,例如IL6、IL17、IL23仅阻断其自己的细胞因子级联反应的一部分,而不是全部。现有的TNF阻滞剂对TNFR1和TNFR2具有相同的作用机制,从而阻断两者的活性。JAK抑制剂也有类似的问题;它们具有炎症和抗炎活性。例如,JAK抑制剂不阻断炎症细胞因子IL11,JAK抑制剂阻断炎症细胞因子IL6(类风湿性关节炎治疗的二线药物),抗炎性IL10不被JAK抑制剂阻断。相比之下,本文提供的构建体将TNFR1和TNF抑制剂疗法的有效性与TNFR2激动剂的益处相结合,消除或减少抗TNFR1/抗TNF疗法的副作用,并且还提供额外的治疗方式优势,包括上调免疫抑制性Treg以及诱导保护性和抗炎信号传导途径。

[0683] TNFR1拮抗剂构建体含有一或多个TNFR1抑制剂、一或多个接头和一或多个活性调节剂。例如,本文提供的TNFR1拮抗剂构建体的结构可由式1表示:

[0684] (TNFR1抑制剂)_n-接头_p-(活性调节剂)_q,式1a,或

[0685] (活性调节剂)_q-接头_p-(TNFR1抑制剂)_n,式1b,其中:

[0686] n和q均为整数,且各自独立地为1、2或3;p是0、1、2或3;活性调节剂是被修饰为具有降低的或没有ADCC活性的部分,例如多肽,如白蛋白或Fc,其增加TNFR1抑制剂的血清半衰期;TNFR1抑制剂是与TNFR1结合并抑制其活性如信号传导活性的分子,如多肽或药物小分子。活性调节剂不是人血清白蛋白抗体或未修饰的单一Fc。活性调节剂包括修饰的Fc区,例如修饰以消除ADCC和/或CDC活性的Fc、Fc二聚体和其它抗体结构域。接头包括化学接头和多肽,例如GS接头,以及铰链区,例如来自抗体,因此所述构建体包括化学缀合物、融合蛋白和两者的组合。

[0687] 还提供了多特异性构建体。本文提供的多特异性例如双特异性构建体的构建体由下式(式2)表示:

[0688] (TNFR1抑制剂)_n-(活性调节剂)_{r1}-(接头(L))_p-(活性调节剂)_{r2}-(TNFR2激动剂)_q,

[0689] 其中n=1、2或3,p=1、2或3,q=0、1或2,并且r1和r2中的每一个独立地为0、1或2。

与式1的构建体一样,组件的顺序可以改变,并且可以根据需要具有额外的接头。构建体可以根据需要包括额外的接头以赋予诸如柔性的性质。每个接头可以含有多个组件。式2还可以包括活性调节剂来代替接头或除了接头之外还包括活性调节剂。活性调节剂和接头包括Fc或具有铰链区的Fc,或具有GS接头的Fc,或其它组分的组合。这些构建体中的Fc包括未修饰的Fc区;接头如上所述,并在下面详述。

[0690] 还提供了具有式3的TNFR2激动剂构建体:

[0691] (TNFR2激动剂)_n-接头_p-(活性调节剂)_q,式3a,或

[0692] (活性调节剂)_q-接头_p-(TNFR2激动剂)_n,式3b,

[0693] 其中n、p和q如式1所示,接头和活性调节剂如式1中所述。

[0694] 式1-3的组分可以是多肽或其它分子,例如与靶受体特异性结合或相互作用的小分子药物,将在以下部分详细讨论。本文提供的构建体/分子的每个组分在以下部分中依次描述。

[0695] 本文提供的构建体的每个组件的性质在以下部分中详细讨论。因此,所述构建体的组件包括但不限于以下组件,这些组件将在以下各章节中详细讨论:

[0696] 1. TNFR1拮抗剂

[0697] 2. TNFR2激动剂

[0698] 3. 接头

[0699] a. 甘氨酸-丝氨酸接头

[0700] b. 铰链区

[0701] c. 化学接头

[0702] 4. 活性调节剂

[0703] a. 修饰的Fc

[0704] b. 赋予改良或改变的药理学性质例如增加的血清半衰期、对内源性蛋白酶降解的抗性和其它此类性质的多肽和其它部分。

[0705] 还提供了其它构建体,详见后续章节。

[0706] 所述构建体用于治疗疾病、病症和病况的方法中,其中TNF是所述疾病、病症或病况的病理调节剂,由此降低或抑制了TNFR1信号传导的抑制,和/或其中抑制TNF或TNFR1信号传导可以抑制或导致所述疾病、病症或病况的消退,和/或其中抑制改善了所述疾病、病症和/或病况的症状。这种疾病、病症和病况包括炎症性疾病包括自身免疫性疾病将在以下章节讨论。

[0707] 还提供了用于所述方法和用途的药物组合物,以及用于产生包括多肽和融合蛋白的构建体的核酸和载体。以下章节描述了疾病、病症和病况、TNFR1/TNFR2活性及其在所述疾病、病症和病况中的作用、及所述疾病、病症和病况的现有治疗方法、本文提供的构建体和其组件、生产所述构建体、含有所述构建体和/或编码核酸的药物组合物的方法,以及治疗方法。

[0708] C. 肿瘤坏死因子(TNF)和慢性炎症和自身免疫性疾病和病症

[0709] 本节描述了肿瘤坏死因子(TNF)和/或其受体在炎症和自身免疫性疾病、特别是在示例疾病中的作用,和现有治疗的问题,并展示了本文提供的构建体如何解决这些问题。

[0710] 1. 肿瘤坏死因子(TNF)

[0711] 肿瘤坏死因子(TNF;参见例如SEQ ID NO:1;也称为TNF alpha、TNF- α 或TNF α)是一种多效性促炎细胞因子,与炎症和免疫调节活性相关,包括调节肿瘤发生/癌症、宿主对病原体感染的防御、细胞凋亡、自身免疫和感染性休克,并且在先天和适应性免疫应答的协调以及器官发生,特别是淋巴器官的发生中起着重要作用。在人类中,TNF主要由巨噬细胞产生,也可由单核细胞、树突状细胞(DC)、B细胞、T细胞、成纤维细胞和其它细胞类型产生。它是一种含有233个氨基酸(26kDa)的同源三聚体膜结合蛋白,可被蛋白酶TACE(TNF α 转化酶;也称为ADA17)裂解,释放出含有157个氨基酸(17kDa)的可溶性TNF;膜结合和可溶形式的TNF具有生物活性。跨膜人TNF含有233个氨基酸,并含有胞质结构域,对应残基1-35,及跨膜结构域,对应残基36-56,和胞外结构域,对应残基57-233,参见SEQ ID NO:1。TNF的可溶性形式对应于氨基酸残基77-233,如SEQ ID NO:1所示(参见SEQ ID NO:2所示可溶性TNF的氨基酸残基序列)。

[0712] 不受控制的TNF产生与多种炎症和自身免疫性疾病和病症相关,包括例如感染性休克、类风湿性关节炎、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、幼年特发性关节炎和炎症性肠病(IBD)。TNF的过表达也与神经退行性疾病和病症有关,例如阿尔茨海默病、帕金森病、卒中和多发性硬化症。此外,TNF促进破骨细胞生成,而TNF的过量产生与骨质流失有关。在类风湿性关节炎(RA)中,TNF在滑液和滑膜中过表达,而TNF受体(TNFR)在滑膜中的表达上调。例如,人TNF在小鼠体内的过表达会导致关节出现自发性RA样病变,形成增生性滑膜并破坏软骨和骨骼(见例如Blüml et al. (2010) *Arthritis&Rheumatism* 62(6):1608-1619; Keffer et al. (1991) *EMBO J.* 10(13):4025-4031; Esperito Santo et al. (2015) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464:1145-1150; Blüml et al. (2012) *International Immunology* 24(5):275-281; Dong et al. (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113(43):12304-12309)。

[0713] 如下文进一步讨论,TNF通过两个高亲和力的特异性受体TNFR1和TNFR2发出信号;TNFR1与有害的炎症过程相关,而TNFR2与有益的免疫调节过程相关。已经表明,膜结合的TNF主要激活TNFR2,而可溶性TNF主要激活TNFR1(Blüml et al. (2010) *Arthritis&Rheumatism* 62(6):1608-1619)。可溶的TNF(solTNF;对应于SEQ ID NO:1的残基77-233;也见SEQ ID NO:2所示序列),参与旁分泌信号(主要通过TNFR1)与慢性炎症相关,而跨膜TNF(tmTNF)通过细胞与细胞接触诱导近分泌信号(主要通过TNFR2),与解决炎症和诱导对病原体(如单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)和结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*))的免疫性相关(Zalevsky et al. (2007) *J. Immunol.* 179:1872-1883)。因此,TNF通过TNFR1和TNFR2的信号传导导致不同的结果,这取决于受体类型。

[0714] 由于TNF过表达与炎症和自身免疫性疾病和病症的发展之间的关联,阻断TNF已用于治疗各种此类疾病和病症,包括但不限于类风湿性关节炎(RA)、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、幼年特发性关节炎(JIA)和炎症性肠病(IBD;例如克罗恩病、溃疡性结肠炎)。使用TNF阻滞剂可阻断TNF并阻止通过TNFR1和TNFR2发出信号,这与免疫抑制引起的严重感染(如结核病和李斯特菌病)的风险增加有关。TNF阻滞剂不仅通过TNFR1阻断有害的炎症信号,而且通过TNFR2阻断有益的免疫调节信号。因此,TNF阻滞剂的使用可能会受到限制,特别是在需要长期给药的慢性疾病/病症(例如关节炎或IBD)的情况下。大约三分之一的RA患者在使用抗TNF治疗时没有应答,或者治疗效果没有持续。因此,需要具有改善的疗

效和安全性的疗法,特别是阻断TNFR1信号传导的炎症作用但维持或增强TNFR2信号传导的有益抗炎作用的疗法。这种疗法在本文中提供。

[0715] 2. 肿瘤坏死因子受体 (TNFR)

[0716] TNF同源三聚体结合两个特异性高亲和力同源三聚体受体并通过其发出信号, TNFR1 (TNF受体1型; 也称为TNFR1、p55、p60、CD120a、TNF受体超家族成员1A和TNFRSF1A) 和 TNFR2 (TNF2型受体; 也称为TNFR2、p75、p80、CD120b、TNF受体超家族成员1B和TNFRSF1B)。TNFR1由所有有核细胞类型表达; TNFR2表达仅限于免疫细胞(例如, 单核细胞、巨噬细胞、活化的T细胞、调节性T细胞 (Treg)、B细胞和自然杀伤(NK) 细胞)、内皮细胞、特定的中枢神经系统(CNS) 细胞, 以及特定的心肌细胞。Treg上的TNFR2表达在T细胞受体激活后被诱导。

[0717] 在体内, TNFR1和TNFR2作为膜结合受体和从细胞表面脱落后的可溶性“诱饵”(即非信号传导) 受体存在。可溶性TNF优先/选择性结合TNFR1; 然而, TNF的膜结合形式和可溶形式的结合会激活TNFR1。TNFR2的主要配体是膜结合TNF。可溶性TNF不会完全激活TNFR2, 但可溶性形式的TNFR2(在TNFR2脱落后) 对TNF具有高结合亲和力, 使其清除和抑制TNF结合膜结合信号传导受体, 从而有助于TNFR2的抗炎作用。膜结合TNFR2以快速的结合-解离动力学结合TNF, 使得TNFR2将TNF集中在细胞表面并将配体传递给TNFR1, 介导TNFR1信号传导。TNFR1和TNFR2各自均含有细胞外、跨膜和细胞质结构域。TNFR1和TNFR2的细胞外结构域含有配体结合所需的四个富含半胱氨酸的结构域(CRD)。应答TNF配体结合, TNFR1和TNFR2的细胞内结构域启动不同的信号级联反应, 并介导不同的效应子功能。

[0718] TNFR信号传导异常与多种自身免疫性疾病有关, 施用TNF可用作此类疾病的治疗策略。例如, 低剂量TNF选择性地破坏I型糖尿病和硬皮病患者血液样本以及Sjogren's综合征动物模型中的自身反应性T细胞。施用TNF在例如具有高TNF水平的癌症患者中可导致全身毒性。如本文所述, 所述毒性是由TNFR1普遍存在的细胞表达引起的; 如本文所述, 因为TNFR2更受限制的细胞表达, 因此激动TNFR2是比施用TNF更安全的治疗选择。通过TNFR2促进TNF信号传导可以通过施用TNFR1拮抗剂来实现(见例如Faustman et al. (2013) *Front. Immunol.* 4:478)。

[0719] a. TNFR1

[0720] 人TNFR1(参见SEQ ID NO:3) 是主要的炎症受体, 并且占归因于TNF的促炎、细胞毒性和细胞凋亡作用的大部分。人TNFR1是一种同源三聚体受体, 它与TNF的结合会诱导促炎反应(见例如Morton et al. (2019) *Sci Signal.* 12(592):eaaw2418, 关于TNFR1信号传导的描述)。TNFR1含有455个氨基酸残基; 残基1-29对应于信号肽, 残基30-211对应于胞外结构域, 残基212-232对应于跨膜结构域, 残基233-455对应于胞质结构域。在胞外结构域内, TNFR1含有富含半胱氨酸的结构域(CRD) 1-4, 分别对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基43-82、83-125、126-166和167-196。CRD 2和3接触结合的TNF, CRD1, 特别是参考SEQ ID NO:3的氨基酸残基30-82, 形成前配体结合装配域(PLAD), 这是配体结合和受体功能所必需的血友病相互作用基序。胞质结构域包含一个死亡结构域(对应于SEQ ID NO:3的残基356-441), 它在TNF与TNFR1结合后结合TNFR1相关死亡结构域(TRADD) 和Fas相关死亡结构域(FADD), 导致激活半胱天冬酶并诱导细胞凋亡的信号传导途径。TNF与TNFR1的结合还通过MAPK(丝裂原活化蛋白激酶; 例如p38、JNK、ERK) 和NF- κ B(活化B细胞的核因子kappa-轻链增强子) 信号传导途径启动促炎级联反应。TNFR1在淋巴器官发生和对病原体的免疫应答中发挥作用, 是

与宿主抗病毒防御机制相关的主要受体。已经表明,分枝杆菌的遏制取决于TNF衍生信号,并且接受TNF阻滞剂治疗的患者可能会遭受潜伏性结核病的内源性再激活。

[0721] TNFR1主要参与促炎信号传导,是关节炎发展的驱动力。例如,在小鼠中敲除TNFR1,以及通过RNA干扰沉默TNFR1表达,导致胶原诱导的关节炎(CIA)(一种关节炎动物模型)的减弱。过表达TNF的TNFR1缺陷小鼠免受关节炎的发生,并且将TNFR1重新引入间充质细胞导致TNF依赖性关节炎的发生。此外,TNFR1增强破骨细胞的生成,导致局部骨质破坏,并且已经表明,在侵蚀性关节炎模型中,造血细胞缺乏TNFR1减弱骨质破坏。TNFR1还与TNF诱导的心力衰竭和心肌梗塞模型中的心脏毒性作用相关,并且已被证明可促进视网膜缺血动物模型中的神经变性(见例如Schmidt et al. (2013) *Arthritis&Rheumatism* 65(9):2262-2273; Goodall et al. (2015) *PLoS ONE* 10(9):e0137065; McCann et al. (2014) *Arthritis&Rheumatology* 66(10):2728-2738; Ruspi et al. (2014) *Cellular Signaling* 26:683-690; Faustman and Davis (2013) *Front. Immunol.* 4:478; Blüml et al. (2012) *International Immunology* 24(5):275-281; Dong et al. (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113(43):12304-12309)。

[0722] b. TNFR2

[0723] 人TNFR2(参见SEQ ID NO:4)含有461个氨基酸残基;残基1-22对应于信号肽,残基23-257对应于细胞外结构域,残基258-287对应于跨膜结构域,残基288-461对应于细胞质结构域。与TNFR1不同,TNFR2缺少死亡结构域,但具有TNF受体相关因子2(TRAF2)结合位点。通过TRAF2的TNFR2信号传导通过NF- κ B和激活蛋白1(AP1)活化促进细胞存活和增殖,并且与PI3K-PKB/Akt介导的修复和迁移有关。如本文其它地方所讨论的,通过TNFR2的TNF信号传导还促进调节性T细胞(Treg)的扩增和激活,其在抑制炎症和自身免疫性疾病和病症中发挥重要作用。TNFR2信号传导参与伤口愈合和心肌梗死模型的修复和再生,而在侵蚀性关节炎小鼠模型中敲除TNFR2会导致关节炎和骨质破坏。

[0724] TNFR2主要参与抗炎信号传导,与神经、心脏、肠道和骨保护作用有关。TNFR2具有抗炎和保护作用;这些作用已在例如实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)、实验性结肠炎、心力衰竭/心脏病、心肌梗塞、炎性关节炎、脱髓鞘和神经退行性疾病以及感染性疾病中得到证实。例如,TNF激活TNFR2可抑制癫痫发作,减轻脑损伤后的认知功能障碍,促进小鼠心肌梗塞后的存活,防止心肌缺血/再灌注损伤,并减少心力衰竭后的重塑和肥大。TNFR2激动作用还与胰腺再生、髓鞘再生、神经元亚型存活和干细胞增殖有关。TNFR2激动剂选择性破坏I型糖尿病、多发性硬化症、Graves'病和Sjogren's综合征患者血液样本中的自身反应性T细胞,但不破坏健康细胞。在I型糖尿病动物模型中,使用低剂量TNF消除自身反应性T细胞会导致胰腺组织再生。通过TNFR2的TNF信号传导已显示可诱导髓鞘中少突胶质细胞前体的再生,因此可用于治疗脱髓鞘疾病,例如多发性硬化症(MS)。TNFR2还被证明可以促进视网膜缺血动物模型的神经保护作用。

[0725] TNFR2还调节破骨细胞生成。破骨细胞是一种分解骨组织的骨细胞。破骨细胞生成的调节对于维持骨量、防止关节炎和侵蚀性破坏很重要。缺乏TNFR2的小鼠表现出破骨细胞生成增强、TNF驱动性关节炎恶化和局部骨质破坏。侵蚀性关节炎动物模型中缺乏TNFR2会导致疾病进展,并且与对照小鼠相比,过表达TNF的TNFR2缺陷小鼠会出现加重的关节炎和关节破坏。造血细胞上TNFR2的表达减弱了TNF驱动性关节炎,而造血细胞上TNFR2的缺失

增加了炎症细胞向滑膜的募集。在实验性结肠炎中,CD4⁺T细胞上缺乏TNFR2表达会加速疾病的发作并增加炎症的严重程度,而在实验性自身免疫性脑炎(EAE)中,TNFR2缺陷小鼠的症状会加剧(见例如Schmidt et al. (2013) *Arthritis&Rheumatism* 65 (9):2262-2273; Goodall et al. (2015) *PLoS ONE* 10 (9):e0137065;McCann et al. (2014) *Arthritis&Rheumatology* 66(10):2728-2738;Ruspi et al. (2014) *Cellular Signaling* 26:683-690;Faustman and Davis (2013) *Front.Immunol.*4:478;Blüml et al. (2012) *International Immunology* 24 (5):275-281;Dong et al. (2016) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 113(43):12304-12309)。TNFR2基因的多态性与多种自身免疫性疾病相关,包括例如RA、克罗恩病、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、炎症性肠病、溃疡性结肠炎和硬皮病;所述多态性阻碍了TNF与TNFR2的结合,从而限制了NF- κ B的激活并阻碍了Treg中的TNFR2信号传导途径(见例如Yang et al. (2018) *Front.Immunol.*9:784)。

[0726] TNFR1含有一个细胞内死亡结构域,可以激活细胞凋亡和/或炎症途径,而TNFR2结合TRAF并可以激活经典和非经典NF- κ B途径以控制细胞存活和增殖。通常,表达TNFR2的细胞也以不同的比例表达TNFR1,具体取决于细胞类型和功能。由于TNFR1信号传导通常会诱导细胞死亡,而TNFR2信号传导通常会诱导细胞存活,因此它们在细胞上的共表达比例会使平衡转向细胞凋亡或细胞存活。如上文和本文别处所讨论的,已表明TNFR1是参与RA发病机制的主要TNF受体,而TNFR2起免疫调节作用。然而,这两种受体都参与介导TNF的抗病毒活性。例如,动物疾病模型表明TNFR1与炎症性神经变性有关,而TNFR2与神经保护有关。

[0727] TNFR1的选择性抑制或TNFR2的选择性激活通过施用ATROSAB(拮抗性TNF受体1特异性抗体),一种TNFR1选择性拮抗性IgG1抗体,或EHD2-scTNF_{R2},一种激动性TNFR2选择性TNF突变蛋白(即突变的蛋白质)已在NMDA诱导的急性神经变性小鼠模型中得到证实。EHD2-scTNF_{R2}含有共价稳定的人TNFR2选择性单链TNF三聚体,具有突变D143N/A145R(关于可溶性TNF的残基编号如SEQ ID NO:2所示,分别对应于SEQ ID NO:1的D219N和A221R,这些突变消除了对TNFR1的亲合力),融合于二聚化结构域EHD2,EHD2衍生自IgE的重链C_H2结构域,并产生含有六聚体TNF结构域的二硫键二聚体。在体内小鼠模型中,与对照组相比,将NMDA和ATROSAB、或NMDA和EHD2-scTNF_{R2}同时注射到大细胞基底核中会产生显著但不完全的神经保护作用。这些应答的不完全性质是由于ATROSAB的激动活性所致,ATROSAB是诱导异常受体簇集和激活的二价抗体副产物(Richter et al. (2013) *PLoS One* 8 (8):e72156。类似地,EHD2-scTNF_{R2}由于其多个融合配偶体在人类中具有免疫原性,并且在毒理学研究中对IgE片段的免疫应答导致自身免疫应答(见例如Weeratna et al. (2016) *Immun.Inflamm.Dis.*4 (2):135-147)。因此需要改良的TNFR1拮抗剂和改良的TNFR2激动剂来克服这些限制。

[0728] 3. 调节性T细胞(Treg)及其在自身免疫微环境中的作用

[0729] 调节性T细胞(Treg细胞或Treg)是T细胞的免疫抑制亚群,通过产生细胞因子具有免疫抑制性质。这些包括转化生长因子 β 、白细胞介素35和白细胞介素10。Treg功能的诱导可以抑制多种病理学状况。诱导可以提高移植的成功率,抑制过敏,控制对感染性疾病和自身免疫的应答,例如严重急性呼吸系统综合征。Treg抑制和/或下调效应T细胞(Teff)的诱导和增殖,调节免疫系统,维持免疫稳态和对自身抗原的耐受性,并可以预防自身免疫性疾病的发展和组织破坏。Treg表达CD4、CTLA-4、CD25(也称为IL-2受体 α 链或IL2RA)和FOXP3(转录因子叉头框P3)等标记物,并以比其表达TNFR1高十倍的强度表达TNFR2。TNFR2仅由

Treg的一个亚群表达,这是最大抑制性的子集;该子集含有表达TNFR2的 $CD4^+FoxP3^+$ Treg。TNF通过TNFR2信号传导促进Treg细胞增殖、上调FoxP3表达和Treg细胞抑制活性/功能。自身免疫微环境含有比免疫抑制性 $CD4^+$ Treg更多的自身反应性 $CD8^+$ 效应T细胞,导致组织破坏。因此,TNFR2功能的保留或增强的TNFR2功能会扩增Treg并消除自身反应性T细胞,从而恢复免疫平衡(参见Sharma et al. (2018) *Front Immunol*.9:883)。出于这些原因以及下文所述的其它原因,通过选择性抑制TNFR1并可能与TNFR2刺激(激动)一起药理学保留Treg功能,将改善许多急性和慢性炎症性疾病(严重急性呼吸系统综合征、自身免疫性疾病)的结果。

[0730] 除了上调Treg上TNFR2的表达外,TNF还上调Treg表面上TNF受体超家族(TNFRSF)其它共刺激成员的表达,例如4-1BB和OX40,从而实现Treg的最佳激活和增殖,以及过度炎症反应的减弱。TNF的中和(阻断TNFR2)阻断Treg的体内扩增(例如Hamano et al. (2011) *Eur. J. Immunol*.41:2010-2020)。

[0731] 与 $CD4^+FoxP3^-$ 常规T细胞相比, $CD4^+FoxP3^+$ Treg组成型表达TNFR2,促进Treg细胞活化、扩增和存活。通过TNFR2的TNF信号传导(即TNFR2激动)促进Treg的激活和扩增,而TNFR2拮抗作用导致Treg收缩。例如,在患有自身免疫性疾病的人和自身免疫动物模型中,TNFR2激动剂选择性杀死自身反应性T细胞并扩增抑制性Treg。TNFR2信号传导在实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE;炎症性中枢神经系统脱髓鞘疾病的动物模型,例如多发性硬化症)和糖尿病小鼠模型中促进Treg细胞扩增和抑制活性,并通过耐受性树突细胞诱导人抗原特异性Treg细胞。TNFR2缺陷的Treg在体内预防实验性结肠炎的能力降低,并且TNFR2是Treg上持续FoxP3表达所必需的,因此,为了维持Treg的表型和功能稳定性,表明了TNFR2是Treg的体内免疫抑制功能所需的(见例如McCann et al. (2014) *Arthritis&Rheumatology* 66(10):2728-2738;Faustman and Davis (2013) *Front. Immunol*.4:478;Schmidt et al. (2013) *Arthritis&Rheumatism* 65(9):2262-2273;Vanamee et al. (2017) *Trends in Molecular Medicine* 23(11):P1037-P1046;Chen et al. (2013) *J. Immunol*.190(3):1076-1084)。在一项研究中,体外产生的抗原特异性Treg在充分确立的抗原诱导的关节炎(AIA)模型中示出抑制疾病并减少关节炎症和骨破坏,在所述模型中,将小鼠用甲基化牛血清白蛋白(mBSA)免疫以诱导T细胞介导的组织损伤(见例如Wright et al. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(45):19078-19083)。在细胞疗法中使用Treg虽然很有前途,但由于制造和其它并发症所致,需要一种传统的生物疗法来提供Treg的优势而没有并发症。

[0732] 如本文所述和提供的,TNFR2及其通过Treg的表达是抑制炎症和自身免疫性疾病和病症所必需的。例如,牛分枝杆菌卡介苗(BCG)诱导Treg的瞬时扩增。在一项临床试验中,BCG在I型糖尿病患者中引发Treg产生,从而抑制疾病并暂时恢复胰岛细胞功能,表明在治疗I型糖尿病中Treg和/或增强Treg功能的调节剂的应用(见例如Spence et al. (2016) *Curr Diab Rep* 16(11):110.doi:10.1007/s11892-016-0807-6)。

[0733] 本文描述并确立了Treg功能的调节提供了一种用于预防或治疗炎症和自身免疫性疾病和病症的治疗方法。然而,Treg仅占血液中总 $CD4^+$ T细胞的1-5%。数量少阻碍了其临床应用。Treg的离体生成和/或刺激其在体内产生是限制其治疗用途的因素。例如,使用IL-2、抗CD3或抗CD28的体内刺激毒性太大,而使用这些制剂的体外刺激会产生异质的 $CD4^+$ 细胞群,这些细胞群可以释放促炎细胞因子并具有拮抗性质。另一些方法是使用TL1A-Ig,这

是一种天然存在的TNF受体超家族激动剂,或使用TNFR2单克隆抗体激动剂,其分别在体内和离体扩增Treg。本文提供的TNFR2激动剂构建体和多特异性构建体可以在体内保存和/或扩增Treg群体,而不干扰抗TNFR1活性的治疗活性。如本文所述和提供的,选择性抑制炎症性TNFR1活性,同时维持或增加TNFR2相关Treg抑制活性,有利于治疗炎症性和自身免疫性疾病和病症。这些疾病和病症包括但不限于RA、I型糖尿病、心力衰竭和多发性硬化症(见例如Goodall et al. (2015) PLoS ONE 10(9):e0137065)。

[0734] 在肿瘤微环境(TME)中,与自身免疫性微环境中TNFR2⁺Treg的扩增阻止组织破坏相反,肿瘤被大量的免疫抑制性TNFR2⁺Treg浸润,这阻止了肿瘤杀伤性CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的增殖,允许肿瘤生长,所述细胞也称为效应T细胞(Teff)。TNFR2对TME中淋巴细胞的拮抗作用通过抑制或消除Treg并允许效应T细胞的激活和扩增来恢复两种类型T细胞之间的平衡,这是一种可以控制或逆转肿瘤生长的状况。为了用作治疗剂,TNFR2抑制剂必须不能通过ADCC聚集免疫细胞,原因有二:1)聚集会瞬时导致TNFR2介导的免疫抑制的“超诱导”;2)最终导致Treg的全身耗竭,这对患者是有害的,因为必须保持基础水平的Treg活性以维持免疫稳态。肿瘤细胞和髓源性抑制细胞(MDSC)也表达TNFR2,抑制MDSC中的TNFR2可控制转移,如小鼠肝癌模型所示。因此,TNFR2的阻断,例如通过使用,如本文提供的非聚集拮抗性抗体或其它治疗剂,通过抑制免疫抑制性Treg提供了对某些类型癌症的有用治疗。然而,TNFR2拮抗剂仅应施用于根据免疫组织化学判断其肿瘤与邻近正常组织相比显示TNFR2过表达的患者。因此,这种治疗应伴随诊断以确认过表达(见例如Zhang et al. (2019) Thorac Cancer 10(3):437-444.doi:10.1111/1759-7714.12948;Yang et al. (2017) Oncol Lett. 14(2):2393-2398.doi:10.3892/ol.2017.6410;和Yang et al. (2018) Oncol Lett. 16(3):2971-2978.doi:10.3892/ol.2018.8998的示例测定)。

[0735] 4通过TNF介导的或TNF参与的自身免疫/炎症疾病

[0736] TNF水平升高或不受控制的表达以及TNF信号传导失调可导致慢性炎症,从而可导致自身免疫性疾病和组织损伤的发生。TNF- α 参与多种疾病、病症和病况。本文提供的构建体可用于治疗此类疾病、病症和病况。以下讨论描述了一些示例的疾病、病症和病况,其中阻断TNF可具有治疗效果。TNF阻滞剂,例如依那西普、英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗和戈利木单抗,有可能限制其用于治疗此类疾病、病症和病症的副作用。本文提供的构建体避免了一些或所有这些副作用,可用于治疗这些疾病、病症和病况(见例如Lis et al. (2014) Arch Med Sci. 10(6):1175-1185回顾了TNF在疾病中的作用以及TNF阻滞剂在治疗中的应用)。

[0737] 炎症性疾病包括一系列以炎症为特征的病症和病况,并且包括自身免疫性疾病。免疫系统通过应答入侵的微生物例如病毒和细菌而产生抗体和/或激活淋巴细胞来保护身体。在健康个体中,免疫系统不会触发针对机体自己的(即“自身”)细胞的应答;当免疫系统攻击健康的非侵入性的自身细胞和组织时,就会发生自身免疫性疾病。与升高的TNF水平相关的自身免疫/炎症性疾病和病症包括例如关节炎(例如类风湿性关节炎、银屑病关节炎、幼年特发性关节炎、脊柱关节炎)、炎症肠病(例如克罗恩病和溃疡性结肠炎)、葡萄膜炎、纤维化疾病、子宫内膜异位症、狼疮、强直性脊柱炎、银屑病、多发性硬化症(MS)、帕金森病和阿尔茨海默病等。可以用本文提供的构建体治疗的示例的自身免疫和炎症性疾病和病症在下文讨论。

[0738] a. 关节炎

[0739] 类风湿性关节炎及其它类型关节炎

[0740] 类风湿性关节炎(RA)是一种慢性自身免疫性炎症性疾病。与类风湿性关节炎相关的炎症会影响关节的内层(即滑膜内层),以及血管、心脏的内膜,并且也可能导致炎症。RA的特征在于免疫细胞(例如,活化的B细胞)浸润到滑膜和滑膜细胞增殖,这导致滑膜内层增厚。称为关节翳的增生性物质侵入并破坏软骨和骨骼,不可逆转地破坏关节结构和功能。这是通过诱导促炎细胞因子例如TNF、IL-1和IL-6介导的。肿瘤坏死因子 α (TNF α)是诱导和维持与RA相关的促炎活性的关键调节剂。TNF在滑液和滑膜中过表达,TNFR的表达在滑膜中上调(见例如Blüml et al. (2012) *International Immunology* 24(5):275-281; Schmidt et al. (2013) *Arthritis&Rheumatism* 65(9):2262-2273; Keffer et al. (1991) *EMBO J.* 10(13):4025-4031)。可以用本文的构建体治疗的其它类型的关节炎包括例如银屑病关节炎、幼年特发性关节炎和脊椎关节炎。

[0741] b. 炎症性肠病(IBD)和葡萄膜炎

[0742] 炎症性肠病(IBD)包括克罗恩病和溃疡性结肠炎,其是肠道和结肠的炎症性疾病。过表达TNF的小鼠会出现类似于克罗恩病的肠道炎症,而TNFR1缺陷则可以预防克罗恩病(见例如Fischer et al. (2015) *Antibodies* 4:48-70)。

[0743] 葡萄膜炎是一种眼部炎症,影响眼壁(葡萄膜)、视网膜和巩膜(眼白)之间的眼中间层,并可能导致视力丧失。TNF- α 参与其病理生理学,TNF阻滞剂已用于治疗。

[0744] c. 纤维化疾病

[0745] 本文的构建体可用于治疗纤维化疾病。Dupuytren病是此类疾病的示例。Dupuytren病(DD)是一种常见的手部纤维化疾病,其特征是手指出现不可逆的屈曲挛缩;这种情况仅限于手掌,导致手指不可逆转地卷曲,严重损害手部功能。早期疾病尚无批准的治疗方法,早期疾病表现为静止一段时间的结节,然后变得活跃并进展为手指的索状和屈曲畸形,导致手部功能丧失。治疗包括手术切除(筋膜切开术)患病组织或条索,或使用胶原酶或针刺筋膜切开术破坏条索。手术和非手术治疗具有很高的复发率和并发症。在疾病的早期阶段进行治疗干预,以防止进展为条索发生和随后的手指屈曲挛缩是有利的(见例如Nanchahal et al. (2018) *EBioMedicine* 33:282-288)。

[0746] 表达收缩蛋白 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)并聚集在结节中的肌成纤维细胞沉积过多的细胞外胶原基质,并导致其在所有纤维化病症包括DD中的重塑和收缩。TNF通过Wnt信号传导途径将DD患者的手掌成纤维细胞转化为肌成纤维细胞,在抗TNF疗法治疗后,DD肌成纤维细胞表现出剂量依赖性的收缩力降低以及 α -SMA和前胶原表达的降低。用完全人源化的IgG mAb阿达木单抗和戈利木单抗治疗是最有效的。然而,使用抗TNF疗法(例如阿达木单抗)与感染风险增加相关,在一项评估阿达木单抗治疗DD疗效的2a期试验中,1名患者(接受阿达木单抗治疗的21名患者中)发生了伤口感染需要住院治疗(见例如Nanchahal et al. (2018) *EBioMedicine* 33:282-288)。因此,需要其它疗法。

[0747] d. 肿瘤坏死因子受体相关的周期性综合征(TRAPS)

[0748] 肿瘤坏死因子受体相关周期性综合征(TRAPS)是第二常见的常染色体显性遗传性自身炎症性疾病,由编码TNFR1的TNFRSF1A基因突变引起。TRAPS的特点是无缘无故的周期性持续发热、全身炎症、腹痛、皮肤病变、结膜炎、肌痛和心包炎,炎症发作可持续数周。与更

严重的TRAPS临床表型相关的并发症是AA型血清淀粉样变性,可导致肾损伤和衰竭。疾病发作通常发生在儿童早期,但TRAPS也可能出现在成人身上。大多数TRAPS相关突变发生在TNFR1的胞外域,该域参与配体结合。与最严重的临床表型相关的高外显率突变发生在细胞外富含半胱氨酸的结构域(CRD)中。这些突变影响TNFR1的折叠和二级结构,从而导致缺陷的TNFR1运输、配体结合亲和力改变、激活诱导的脱落减少和细胞信号传导受损。例如, TNFR1的配体非依赖性功能获得诱导TRAPS病理生理学,某些突变导致TNFR1、NF- κ B和半胱天冬酶1的组成型活性。传统的抗TNF疗法,包括依那西普、英夫利昔单抗等,在TRAPS的治疗中仅部分有效(见例如Greco et al. (2015) *Arthritis Research&Therapy* 17:93),因此,需要其它疗法。

[0749] e. 由TNF介导或参与的其它疾病

[0750] i. 神经退行性疾病

[0751] 衰老和几种神经退行性疾病与中枢神经系统(CNS)中TNF水平升高有关。TNF参与启动和维持神经炎症,以及调节其它神经学过程,例如突触功能和可塑性。老年大鼠海马体中的TNFR1水平与TNFR2的水平相比大约高3倍。在疾病动物模型中, TNF通过其对TNFR1的作用参与慢性神经胶质细胞激活和神经元活力受损。在老年动物中,神经系统变化包括突触功能障碍和Ca²⁺失调,这些变化可以在健康的幼小动物和使用TNF人工升高的神经元培养物中复制。TNF还增强L型电压敏感Ca²⁺通道(L-VSCC)的活性;在记忆受损的老年大鼠的海马神经元中观察到类似的效果。在大鼠中的研究表明,小脑中的TNF阻滞加速延迟眨眼任务中的学习。使用优先抑制TNFR1信号传导的可溶性显性阴性TNF(DN-TNF)的XPro1595选择性阻断TNFR1信号传导,导致改善的Morris游泳任务的行为表现,减少小胶质细胞激活,预防海马体长期抑郁症(LTD),并降低了CA1神经元中L-VSCC的活性。这些结果表明,通过TNFR1的TNF信号传导参与改变老年动物的神经表型,并可导致与神经系统疾病相关的病理变化(见例如Sama et al. (2012) *PLoS ONE* 7(5):e38170)。

[0752] a) 阿尔兹海默病

[0753] TNF是炎症反应的核心参与者;TNF蛋白水平在健康大脑中较低,但在许多神经炎症性疾病、包括阿尔茨海默病(AD)中长期升高。在AD的动物模型中, TNF促进小胶质细胞激活、突触功能障碍、神经元细胞死亡、斑块和缠结的积累以及认知能力下降。例如,在三重转基因AD小鼠模型(3xTg-Ad)中,该模型具有早老素1、淀粉样前体蛋白(APP)和tau中的突变,在内嗅区皮质中TNF水平升高,与最早出现的病理学一致(见例如McCoy et al. (2006) *J. Neurosci.* 26(37):9365-9375)。TNF驱动的过程参与AD病理学,并导致认知功能障碍和加速AD进展。诱导炎症和TNF产生的细菌内毒素脂多糖(LPS)在AD的几种动物模型中加速AD病理学的出现和严重程度。当小胶质细胞(通常与AD大脑中的淀粉样斑块密切物理性相关)长期激活时,大脑中就会出现促炎介质(包括TNF)的过量产生。升高的TNF水平抑制AD患者大脑中淀粉样蛋白(A β)的吞噬作用,从而阻碍小胶质细胞有效去除斑块。通过施用DN-TNF(例如XENP345)或编码DN-TNF的慢病毒对sol1TNF的慢性抑制阻止了AD动物模型(3xTgAD小鼠)中由慢性全身炎症诱导的AD样病理学的加速,以及减少海马体、皮质和杏仁核中LPS诱导的6E10免疫应答蛋白,特别是C末端淀粉样前体蛋白(APP)片段(β -CTF)的神经元内积累。3xTgAD小鼠中TNFR1的遗传缺失也可防止LPS诱导的神经毒性的 β -CTF积累。携带家族性AD(FAD)突变的神经元细胞在细胞内积累 β -CTF,暗示其参与AD的发病机制。这些结果表明,可

溶性TNF是神经炎症对3xTgAD小鼠早期斑块前病变的影响的介质,并且在中枢神经系统(CNS)中靶向抑制solTNF可以减缓AD中出现淀粉样蛋白相关病变、认知障碍以及神经元的进行性损失(见例如McAlpine et al. (2009) *Neurobiol. Dis.* 34(1):163-177)。

[0754] b) 帕金森病

[0755] 帕金森病(PD)是美国第二大流行的神经退行性疾病,在65岁以上的人群中发病率为5%。帕金森病的临床表现是由于腹侧中脑黑质致密部(SNpc)中多巴胺能神经元的选择性丧失,导致纹状体多巴胺减少所致。PD患者和PD动物模型的脑脊液(CSF)和死后大脑显示TNF水平升高。日本的一组早发性PD患者显示TNF基因启动子中多态性等位基因(-1031C)的频率增加,导致更高的转录活性和更高的TNF水平。TNFR1在黑质纹状体多巴胺能神经元中高度表达,这增加了对TNF诱导的神经炎症和多巴胺能神经元毒性的脆弱性。显性阴性TNF突变蛋白(XENP345)对可溶性TNF(solTNF)的体内中和具有神经保护作用,并且将在大鼠中通过纹状体注射氧化性神经毒素6-羟基多巴胺(6-OHDA)引起的逆行性黑质变性减少50%,并减弱大鼠中苯丙胺诱导的旋转行为,表明纹状体多巴胺水平得以保留。在暴露于脂多糖(LPS)的胚胎大鼠中脑神经元/神经胶质细胞培养物中延迟施用XENP345可以防止多巴胺能神经元的退化,但是具有持续的小胶质细胞激活和solTNF分泌。XENP345还在体外减弱6-OHDA诱导的多巴胺能神经元毒性。因此,TNF与帕金森病的发展有关,并且有可能通过使用TNF阻断疗法来延缓人黑质纹状体途径的进行性退化,特别是在帕金森病的早期阶段(见例如McCoy et al. (2006) *J. Neurosci.* 26(37):9365-9375)。

[0756] c) 多发性硬化症(MS)

[0757] TNF在转基因小鼠中的CNS特异性过表达导致自发性脱髓鞘,这表明TNF在多发性硬化症(MS)中的作用。编码TNFR1的基因的多态性与发生MS的易感性增加有关。TNFR1对于实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的疾病诱导是必需的,EAE是的一种MS动物模型,而TNFR2缺乏会使疾病恶化。表达不可切割的膜结合TNF的小鼠受到保护免受EAE,表明可溶性TNF与TNFR1的相互作用与疾病病理学相关(见例如Fischer et al. (2015) *Antibodies* 4:48-70)。

[0758] ii. 子宫内膜异位症

[0759] TNF- α 与子宫内膜异位症的病理生理学有关。患有子宫内膜异位症的女性腹膜液中的TNF- α 水平升高,并且其水平与疾病的严重程度相关(见例如Koninckx (2008) *Hum Reprod.* 23:2017-2023)。腹膜液TNF- α 由活化的腹膜巨噬细胞局部产生,TNF- α 诱导腹膜间皮细胞分泌IL-8。TNF- α 和IL-8的腹膜液浓度与活动性腹膜病变的大小和数量相关(Bullimore, (2003) *Med Hypotheses.* 60:84-88)。血清TNF- α 水平升高,与对照组的单核细胞相比,子宫内膜异位症患者的单核细胞在体外释放更多的TNF- α 。子宫内膜异位症患者的MCP-1腹膜液水平升高。TNF- α 、IL-8和MCP-1驱动子宫内膜异位症患者腹膜液中的炎症Th-1型反应。TNF- α 介导的炎症可能是与子宫内膜异位症相关的疼痛的致病因素。在动物模型中阻断TNF- α 似乎可以抑制疾病的发展,并且可能对人类有效。由于现有TNF阻滞剂的不良副作用,不推荐使用此类阻滞剂治疗子宫内膜异位症(参见Koninckx (2008) *Hum Reprod.* 23:2017-2023)。然而,本文提供的构建体旨在避免有害作用,并可考虑用于治疗子宫内膜异位症中TNF- α 介导的炎症。

[0760] iii. 心血管疾病

[0761] TNF α 是第一个在人动脉粥样硬化斑块中鉴定的细胞因子;TNF α 参与内皮细胞的激

活和粘附分子的上调,这发生在动脉粥样硬化疾病发生的早期。TNF还通过影响脂质代谢和诱导血管炎症参与动脉粥样硬化的发病机制。TNF结合蛋白对TNF α 的阻断,或IL-1受体拮抗剂对IL-1的阻断,部分保护了apoE基因敲除小鼠免于动脉粥样硬化。动脉粥样硬化主要是骨髓细胞产生TNF α 的结果。高脂肪饮食的apoE^{-/-}和TNF^{-/-}小鼠的斑块面积是apoE^{-/-}小鼠斑块面积的一半。将来自apoE^{-/-}和TNF^{-/-}小鼠的骨髓移植到apoE^{-/-}小鼠中,动脉粥样硬化病变的大小减少了83%。在用重组可溶性p55 (TNFR1) TNF阻滞剂处理apoE^{-/-}小鼠后,动脉粥样硬化病变的大小也有所减小,表明TNF在动脉粥样硬化中的作用。NF- κ B信号传导参与人动脉粥样硬化斑块中TNF- α 的产生。心血管疾病患者外周血TNF α 水平也与心肌梗死的发生有关。心脏毒性主要归因于TNF诱导的心肌细胞凋亡。在治疗心力衰竭的临床试验中使用抗TNF疗法(如英夫利昔单抗和依那西普)失败,并导致死亡率增加;因此,抗TNF疗法尚未针对心血管疾病的治疗进行测试(见例如Udalova et al. (2016) *Microbial Spectrum* 4(4):MCHD-0022-2015;Kallioliias and Ivashkiv (2016) *Nat. Rev. Rheumatol.* 12(1):49-62)。因此,需要替代疗法。

[0762] iv. 急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)

[0763] 在美国,急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 每年影响大约190,000名患者,死亡率高达40%。目前还没有针对ARDS潜在病理生理机制的有效疗法。ARDS的特征是免疫细胞介导的肺损伤,这与炎性细胞因子和蛋白酶的释放有关。ARDS中不受控制的局部炎症反应会导致肺泡毛细血管屏障受损和非心源性肺水肿。肺中性粒细胞募集是ARDS发病机制的核心,它由启动和活化的中性粒细胞与肺微血管内皮的相互作用介导,并因促炎介质作用引起的肺泡毛细血管屏障损伤而增加。TNF- α 已被鉴定是ARDS以及脓毒症中的关键效应分子,脓毒症是ARDS的常见原因。例如,TNF- α 有助于增加内皮细胞的通透性。涉及使用非选择性抗TNF抗体治疗脓毒症的临床试验未能证明任何生存益处,一项试验表明更高剂量是有害的。

[0764] TNFR1缺陷小鼠免受肺损伤、脓毒症和其它急性器官损伤,而TNFR2缺陷小鼠在这些模型中更容易受到损伤,这表明TNFR1的选择性拮抗作用在治疗上是有效的。GSK1995057是一种短效全人域抗体 (dAb) 片段,其选择性拮抗TNFR1,但不拮抗TNFR2,减轻急性呼吸窘迫综合征小鼠模型疾病严重程度,并可减轻非人灵长类动物的炎症和肺损伤迹象。在对37名接受低剂量吸入内毒素挑战的健康人进行的雾化GSK1995057随机、安慰剂对照试验中,GSK1995057治疗减轻了肺中性粒细胞增多、炎性细胞因子释放以及支气管肺泡灌洗液和血清样本中的内皮损伤迹象。这些结果表明选择性TNFR1拮抗剂的肺部递送用于预防和治疗ARDS的潜力(见例如Proudfoot et al. (2018) *Thorax* 73:723-730)。

[0765] v. 严重急性呼吸系统综合征 (SARS) 和COVID-19

[0766] 感染严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 (SARS-CoV) 的受试者会出现发烧和呼吸道疾病、全身不适和下呼吸道症状,包括咳嗽和呼吸急促,总死亡率约为10%。TNF信号传导通过诱导过度炎症促进SARS的发病机制,从而导致严重的组织损伤。细胞因子释放综合征 (CRS) 的发生在严重的COVID-19中发挥作用,该疾病是由严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 引起。在某些受试者中,持续的病毒刺激会导致循环细胞因子水平升高,例如IL-6和TNF α ,这会导致淋巴细胞计数减少并引发炎症器官损伤,尤其是肺和血管。SARS-CoV-2与SARS-CoV有几个相似之处,SARS-CoV是导致2002年SARS大流行的冠状病毒株。SARS-CoV和SARS-CoV-2使用刺突 (S) 蛋白来接合它们的细胞受体ACE2(血管紧张素转换

酶2),用于侵入细胞。ACE2受体的表达被SARS-CoV-2感染和炎性细胞因子刺激上调。在SARS-CoV感染中,S蛋白诱导ACE2胞外域的TNF- α 转换酶(TACE)依赖性脱落,这是一个与TNF α 产生严格关联的过程。脱落引起的ACE2活性丧失与肾素-血管紧张素系统活性增加引起的肺损伤有关。ACE2敲除小鼠在化学攻击后容易出现严重的呼吸衰竭,并且ACE2已被证明可以缓和ACE诱导的细胞内炎症。ACE2下调与SARS-CoV感染相关的严重呼吸窘迫有关。因此,增加的TNF α 产生可以促进病毒感染并导致器官损伤,例如肺损伤。

[0767] 正如所讨论的,调节性T细胞(Treg)是一种免疫抑制细胞,在移植、过敏、感染性疾病、GVHD、自身免疫和癌症方面显示出多种临床应用。Treg共表达CD4⁺和白细胞介素2受体 α 链CD25^{hi},并具有可诱导水平的细胞内转录因子叉头框P3(FOXP3)。天然存在的Treg以比表达TNFR1更高的强度表达TNFR2。通过TNFR2的TNF信号传导促进Treg活性:TNF介导的TNFR2激活并诱导Treg增殖(100),并且TNFR2表达表示Treg的最大抑制性。因此,在TNF因应答感染(流感、SARS型病毒、内毒素血症)而过量产生时,Treg可以防止对炎症刺激的过度反应。

[0768] 抗TNF可以治疗SARS和COVID-19。阿达木单抗正用于治疗COVID-19(中国临床试验,2020年2月(ChiCTR2000030089));见例如Lucchino et al. (2020) *Rheumatology* (Oxford) 59(6):1200-1203;Haga et al. (2008) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105:7809-7814)。在感染SARS-CoV的小鼠中敲除TNFR2不会提供任何保护作用;TNFR1和TNFR2的双重敲除保护受感染的小鼠免受与感染相关的体重减轻(见例如McDermott et al. (2016) *BMC Systems Biology* 10:93)。这些结果表明,通过TNFR1的TNF信号传导主要通过增加促炎过程促进SARS-CoV感染的发病机制,并且选择性抑制TNFR1而不是抑制TNF是更好的治疗方法。本文提供的构建体可用于治疗SARS和COVID-19的急性炎症。所述构建体与抗感染剂联合使用;所述构建体用于抑制或改善细胞因子风暴的急性影响。

[0769] TNF α 抑制降低病毒引起的肺部疾病的严重程度,例如小鼠呼吸道合胞病毒(RSV)或流感病毒引起的肺部疾病。在这些小鼠模型中使用抗TNF抗体耗竭TNF减少了炎症细胞的在肺部募集,减少了T细胞产生促炎细胞因子(例如IFN γ 、IL-4、IL-5、TNF),并降低了疾病的严重程度而不干扰病毒清除(见例如Hussell et al. (2001) *Eur.J.Immunol.* 31:2566-2573)。这些结果表明,TNF抑制剂和TNF受体拮抗剂可通过阻止或减少TNF诱导的免疫激活和肺损伤,有益于治疗人病毒性肺病,例如由SARS-CoV和SARS-CoV2引起的肺病。

[0770] 异基因造血干细胞移植因发生非感染性特发性肺炎综合征(IPS)而变得复杂,IPS是一种类似于SARS肺炎的急性肺功能障碍。在同种异体干细胞移植(SCT)后发生肺损伤的患者的血清中发现了升高的TNF α 水平,并且已经表明供体来源的同种异体反应性T细胞与该过程相关。在人类中,使用依那西普的抗TNF疗法有利于治疗同种异体干细胞移植后的IPS。由于SCT预处理方案的免疫抑制作用、需要长期使用免疫抑制药物来预防或治疗移植抗宿主病(GvHD),因此同种异体干细胞移植的接受者发生细菌和真菌感染的风险很高,以及其它可能损害宿主防御的SCT并发症(包括急性GvHD)(见例如Yanik et al. (2002) *Biol.Blood Marrow Transplant.* 8:395-400)。可以通过本文提供的构建体治疗的其它适应症包括化疗脑,这是在化学疗法期间和之后经历的病症,特别是接受乳腺癌治疗的女性。此外,本文的治疗方法和构建体可用于治疗长COVID。

[0771] 因此,使用选择性TNFR1拮抗剂,其保留通过TNFR2的保护性TNF信号传导,并且与抗TNF疗法不同,不增加严重感染的风险,为治疗、预防或减轻病毒和非病毒引起的肺损伤

提供了更安全、更有效的治疗选择。因此,本文提供的构建体是这些适应症的理想疗法。

[0772] D. 类风湿性关节炎和其它慢性炎症及自身免疫性疾病和病症的治疗

[0773] 类风湿性关节炎(RA)无法治愈,但治疗可以改善症状并减缓疾病进展,例如最大限度地减少疼痛和肿胀、防止骨骼畸形和维持日常功能。RA的主要治疗方法是改善病情的抗风湿药(DMARD),其也用于治疗其它慢性炎症和自身免疫性疾病和病症,例如银屑病、斑块状银屑病、银屑病关节炎、幼年特发性关节炎、强直性脊柱炎、白塞氏病、炎症性肠病(IBD;例如克罗恩病和溃疡性结肠炎)、多发性硬化症和狼疮,以及一些癌症的治疗。

[0774] DMARD是免疫抑制剂和免疫调节剂,分为常规合成DMARD(csDMARD)或生物DMARD(bDMARD;例如,抗体和融合蛋白)。常规的合成DMARD包括例如甲氨蝶呤(MTX),一种化疗剂和免疫抑制剂;羟氯喹(HCQ; Plaquenil®),一种抗疟疾药物;柳氮磺胺吡啶(Azulfidine®),一种抗炎药;和来氟米特(Arava®),一种抑制二氢乳清酸脱氢酶的免疫抑制剂。生物DMARD包括例如阿巴西普(Orencia®),一种融合蛋白,可阻止T细胞活化并含有与CTLA-4胞外结构域融合的IgG1的Fc区;阿那白滞素(例如以商标Kineret®销售),一种重组人IL-1受体拮抗剂;利妥昔单抗(以包括Rituxan®、Truxima®、MabThera®商标销售),一种针对CD20的嵌合单克隆抗体,诱导CD20⁺细胞如B细胞的凋亡;托西珠单抗(托珠单抗, Actemra®、RoActemra®),一种针对IL-6受体(IL-6R)的人源化单克隆抗体;皮质类固醇;托法替尼(Xeljanz®),一种Janus激酶(JAK)的小分子抑制剂,JAK是一种参与介导细胞因子信号传导的蛋白酪氨酸激酶;和TNF抑制剂/抗TNF剂,例如聚乙二醇赛妥珠单抗(Cimzia®)、英夫利昔单抗(Remicade®)、阿达木单抗(Humira®)、戈利木单抗(Simponi®)和依那西普(Enbrel®)。联合治疗,特别是甲氨蝶呤与生物DMARD的联合治疗,比单独使用任何一种治疗更有效。联合疗法还可以包括多种csDMARD和多种csDMARD与一种生物DMARD的组合。由于存在严重副作用(包括严重感染)的风险,多种生物DMARD、尤其是抗TNF DMARD,通常不用于联合治疗方法。

[0775] 以下部分描述了现有疗法以及与每种疗法相关的问题,以强调本文提供的疗法如何解决这些问题。

[0776] 1. 常规合成的改善病情抗风湿药物(csDMARD)

[0777] 常规的合成的改善病情抗风湿药(csDMARD)通常是RA和其它自身免疫和慢性炎症性疾病和病症的一线治疗药物。csDMARDs包括甲氨蝶呤、来氟米特、羟氯喹和柳氮磺胺吡啶等药物,甲氨蝶呤是最常用的初始治疗药物,其作用机制包括刺激成纤维细胞释放腺苷,减少中性粒细胞粘附,抑制中性粒细胞合成白三烯B₄,抑制局部IL-1的产生,降低IL-6和IL-8的水平,抑制细胞介导的免疫,并抑制滑膜胶原酶基因表达。其它常规合成的DMARD通过抑制淋巴细胞增殖或引起淋巴细胞功能障碍起作用。例如,来氟米特抑制二氢乳清酸脱氢酶,从而抑制嘧啶合成,阻断淋巴细胞增殖。柳氮磺胺吡啶通过防止氧化、硝化和亚硝化损伤来介导其抗炎作用,而羟氯喹是一种温和的免疫调节剂,可抑制细胞内Toll样受体9(TLR9)。

[0778] 羟氯喹在常规DMARD中具有最佳安全性,不增加感染风险,也不引起肝毒性或肾功能障碍;羟氯喹的常见副作用包括皮疹和腹泻。视网膜病变/黄斑病变是羟氯喹疗法的一种罕见但严重的副作用,与剂量超过5毫克/千克/天、长期使用(治疗超过5年)、年龄较大和慢性肾病有关。羟氯喹的其它罕见副作用包括贫血、白细胞减少、肌病和心肌病。用甲氨蝶呤、来氟米特和柳氮磺胺吡啶治疗与恶心、腹痛、腹泻、皮疹/过敏反应、骨髓抑制、肝毒性以及

常见且有时严重的感染发生率较高有关。甲氨蝶呤和来氟米特也会引起脱发。与甲氨蝶呤治疗相关的其它副作用包括间质性肺病、叶酸缺乏和肝硬化。来氟米特还与高血压、周围神经病变和体重减轻有关。柳氮磺胺吡啶具有非常高的胃肠道不适风险,可罕见引起DRESS综合征(嗜酸性粒细胞增多和全身症状的药物反应)(见例如Benjamin et al. *Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs (DMARD)* [Updated 2020Feb 27]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020Jan. 可得自: URL: ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507863/)。这些药物之所以有效,是因为它们具有免疫抑制作用。本文提供的作为选择性抗-TNFR1拮抗剂的构建体有利地保留了TNFR2免疫抑制活性,可以不再需要这些免疫抑制药物。

[0779] 2. 抗-TNF治疗/TNF阻滞剂

[0780] 抗TNF治疗/TNF阻滞剂(一种生物DMARD)通常在常规DMARD失败后开处方施用,包括单克隆抗体(mAb),例如嵌合mAb英夫利昔单抗(**Remicade®**),含有鼠可变区和人IgG1恒定区;以及完全人源化的单克隆抗体(IgG1)阿达木单抗(**Humira®**)和戈利木单抗(**Simponi®**);靶向TNF的mAb的聚乙二醇化人源化Fab'片段,聚乙二醇赛妥珠单抗(**Cimzia®**);和TNFR2融合蛋白,例如TNFR2-Fc融合蛋白依那西普(**Enbrel®**),其含有细胞外受体区域,该区域包含与人IgG1的Fc融合的人TNFR2的结合位点。**Remsima®**和**Inflectra®**是英夫利昔单抗的生物仿制药,已获准在欧盟用于治疗各种自身免疫性和慢性炎症性疾病和病症。这些整合TNF的TNF抑制剂用于治疗各种疾病和病症,包括例如RA、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、幼年特发性关节炎(JIA)和/或炎症性肠病(IBD;例如克罗恩病和溃疡性结肠炎)。

[0781] 由于靶向TNF的疗法具有免疫抑制作用,此类疗法与严重的副作用相关,包括例如败血症和严重感染的风险增加,例如李斯特菌病、结核病再激活、乙型/丙型肝炎再激活、带状疱疹再激活、侵入性真菌和其它机会性感染。TNF是感染的炎症和免疫应答中的关键细胞因子,使用去除TNF的药物会削弱宿主对微生物的免疫力,从而增加感染的风险。例如,TNF阻滞剂与结核分枝杆菌感染的再激活有关。TNF在对结核分枝杆菌的耐药性中起重要作用,RA患者的阿达木单抗治疗显著降低了对结核分枝杆菌的反应性。如本文所述,免疫反应性降低可能与Treg的激活和效应淋巴细胞凋亡的诱导有关。已显示抗TNF治疗可诱导类风湿性滑膜中的巨噬细胞凋亡。英夫利昔单抗与克罗恩病患者肠道中炎症细胞浸润的细胞凋亡增加有关。其它抗风湿药如甲氨蝶呤和糖皮质激素,也可诱导免疫细胞凋亡(见例如Vigna-Pérez et al. (2005) *Clin. Exp. Immunol.* 141 (2): 372-380)。阿达木单抗和英夫利昔单抗,而不是依那西普,是TNFR2-Fc融合蛋白,在培养的单核细胞中诱导半胱天冬酶依赖性细胞凋亡,并下调单核细胞产生的IL-10和IL-12(见例如Shen et al. (2005) *Ailment Pharmacol. Ther.* 21: 251-258)。与TNF阻滞剂相关的最普遍的真菌感染是组织胞浆菌病、念珠菌病和曲霉菌病。抗TNF剂还会导致严重的充血性心力衰竭、药物性狼疮和脱髓鞘中枢神经系统(CNS)疾病以及淋巴瘤和非黑色素瘤皮肤癌的恶化(见例如Benjamin et al. *Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs (DMARD)* [Updated 2020Feb 27]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020Jan. 可得自: ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507863/)。

[0782] 英夫利昔单抗还与白细胞减少症、中性粒细胞减少症、血小板减少症和全血细胞减少症(有些是致命的)的发展有关。依那西普与RA患者机会性细菌和病毒感染的发生率增

加有关。依那西普还用于治疗严重的难治性移植物抗宿主病 (GvHD)。接受依那西普治疗的严重GvHD受试者发生侵袭性曲霉菌病 (IA) 的风险非常高 (在一项研究中为100%，参见 Zoran et al. (2019) *Sci.Rep.*9:17231)，这是一种危及生命的由烟曲霉菌引起的霉菌 (即真菌) 感染。依那西普治疗导致参与免疫应答和TNF信号传导的基因下调，包括参与NF- κ B信号传导、抗微生物体液应答和细胞凋亡过程的基因，以及趋化因子 (如CXCL10) 分泌减少，来自免疫细胞 (见例如Zoran et al. (2019) *Sci.Rep.*9:17231)。

[0783] 与使用TNF阻断疗法相关的其它副作用包括充血性心力衰竭、肝损伤、脱髓鞘疾病/中枢神经系统疾病、狼疮、银屑病、结节病，以及对其它自身免疫性疾病和癌症 (包括淋巴瘤和实体恶性肿瘤) 发生的易感性增加 (见例如Dong et al. (2016) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 113 (43):12304-12309; Zalevsky et al. (2007) *J.Immunol.*179:1872-1883; Zoran et al. (2019) *Sci.Rep.*9:17231)。因此，通过隔离TNF来消除所有TNF介导的信号并不是理想的治疗策略，因为它会导致严重的免疫抑制，从而导致严重的、有时是致命的感染和其它危险的副作用。

[0784] 抗TNF疗法可改善RA但不能治愈，并且需要多年的持续且昂贵的治疗。RA中TNF的抑制/阻断减少了炎症和关节破坏，但是，如上所述，由于免疫抑制导致与严重感染 (例如结核病和李斯特菌病) 的风险增加有关。因此，TNF阻滞剂的使用受到限制，特别是在需要长期给药的慢性疾病/病症 (例如关节炎和IBD) 的情况下。大约30%的RA患者在使用抗TNF治疗时没有反应，或者治疗效果没有持续 (见例如McCann et al. (2014) *Arthritis&Rheumatology* 66 (10):2728-2738)。无反应性也发生在接受抗TNF治疗的非RA患者中。根据抗TNF剂的不同，13-33%的接受治疗的患者对治疗没有反应，高达46%的患者停止反应，导致停药或剂量增加 (见例如Richter et al. (2019) *MABS* 11 (4):653-665)。因此，需要具有改善的疗效和安全性的疗法。

[0785] 抗TNF治疗阻断/隔离TNF并分别通过TNFR1和TNFR2抑制可溶性TNF (solTNF) 和跨膜TNF (tmTNF) 信号传导；solTNF信号传导与慢性炎症相关，而tmTNF信号传导与炎症的消退以及针对病原体 (如单核细胞增生李斯特菌和结核分枝杆菌) 的免疫力的诱导相关。抗TNF治疗的主要抗炎作用是通过阻断TNFR1实现的，而阻断TNFR2则抑制Treg细胞活性。如本文别处所讨论的，TNFR1信号传导主要是炎症性的并且参与炎症和自身免疫性疾病和病症的发病机制，例如RA、银屑病、IBD和神经退行性疾病，例如MS；而TNFR2信号传导在各种细胞和器官类型中具有抗炎和保护作用，包括神经、心脏、肠道和骨组织，并且还参与宿主防御病原体感染的防御机制。因此，如本文所述，与抗TNF治疗相比，选择性阻断TNFR1通过消除与RA和其它自身免疫和炎症性疾病和病症相关的不良促炎信号，同时保留TNFR2信号的有益作用，从而提高治疗效果 (见例如McCann et al. (2014) *Arthritis&Rheumatology* 66 (10):2728-2738; Schmidt et al. (2013) *Arthritis&Rheumatism* 65 (9):2262-2273; Blüml et al. (2012) *International Immunology* 24 (5):275-281; Zalevsky et al. (2007) *J.Immunol.*179:1872-1883)。

[0786] 抗TNF治疗未能治疗神经退行性疾病，例如阿尔茨海默病、帕金森病、卒中和多发性硬化症 (MS)，这些疾病与TNF的过表达有关。例如，在治疗复发缓解型MS的II期试验中，TNFR1受体-Fc IgG1融合蛋白抗TNF治疗药物来那西普 (Ro 45-2081) 失败，并且与接受安慰剂的患者相比症状加重/恶化，在接受来那西普治疗的患者中，神经功能缺陷更为严重。这

些结果表明抗TNF疗法可加重脱髓鞘疾病。虽然TNFR1已被证明介导炎症性神经变性,但TNFR2诱导神经保护作用,因此,通过抗TNF治疗阻断通过这两种受体的信号传导消除了TNFR2信号传导的神经保护作用。用ATROSAB(一种阻断TNFR1的人源化单克隆抗体)阻断TNFR1,或用EHD2-scTNFR2(一种激动性TNFR2选择性TNF突变蛋白)激活TNFR2,在NMDA诱导的急性神经变性小鼠模型中保护胆碱能神经元免于细胞死亡,并逆转与神经退行性变相关的记忆受损。这可能是免疫原性的。ATROSAB是一种部分TNFR1激动剂;本领域技术人员不施用TNFR1激动剂。然而,阻断TNFR1和TNFR2消除治疗效果,表明TNFR2在神经保护中起着重要作用,选择性阻断TNFR1可用于治疗抗TNF疗法失败的神经退行性疾病(见例如Dong et al. (2016)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 113(43):12304-12309)。

[0787] 由于与使用抗TNF药物相关的不良反应、一些患者的无反应性、具有初始反应的患者缺乏持续反应以及神经退行性疾病如MS的治疗失败和/或恶化,则需要其它疗法。此类疗法在本文中提供。

[0788] E. 靶向TNFR1/TNFR2的治疗剂

[0789] 以下部分讨论了靶向TNFR1/TNFR2的示例治疗剂,并描述了这些治疗剂的一些问题和局限性。现有治疗剂可如F部分和实施例中所述进行修饰,或全部或部分使用,或进行修饰以改善其在本文提供的构建体中的使用性质。

[0790] 1. TNFR1-选择性拮抗剂

[0791] 如本文讨论和提供的,用TNF阻滞剂例如依那西普、英夫利昔单抗、阿达木单抗等的治疗消除了通过TNFR1和TNFR2的TNF信号传导。虽然TNFR1信号传导导致炎症、细胞毒性和细胞凋亡,但TNFR2信号传导具有保护性和抗炎性,部分原因是其扩增和免疫抑制性Treg激活,破坏自身免疫环境中的效应T细胞,防止组织破坏和疾病进展。TNF阻滞剂通过抑制TNFR2信号传导以及随之而来的免疫抑制性Treg耗竭(导致促炎性微环境)进行治疗,可能无法治疗和/或加剧自身免疫和炎性疾病和病症。TNFR1和TNFR2的双重阻断也会导致机会性感染和癌症。

[0792] 如本文所提供的,TNFR1信号传导的特异性抑制维持了正常的TNFR2功能,这对于通过调节性和细胞毒性T细胞的亚群的产生维持促炎和抗炎活性之间的平衡是必需的。选择性TNFR1抑制保留了TNFR2信号传导的强效抗炎活性,减少了机会性感染和癌症,并保留了TNF诱导的Treg功能。

[0793] a. TNFR1拮抗剂抗体

[0794] 在TNFR1拮抗剂抗体中,提供了ATROSAB(拮抗性TNF受体1特异性抗体)。ATROSAB是第一个TNFR1阻断抗体,是一种全长IgG1,是中和小鼠抗人TNFR1单克隆抗体H398的人源化版本。它被放弃作为治疗剂的原因是其具有部分激动剂活性,可激活TNFR1,从而模拟TNF活性,这是一种毒性途径。ATROSAB维持TNFR1的构象处于非活性状态并阻碍TNF的结合。将ATROSAB中的Fc区突变以消除FC γ R受体结合和补体固定,从而避免不必要的免疫系统激活(见例如Kallioliias and Ivashkiv(2016)Nat.Rev.Rheumatol.12(1):49-62)。

[0795] 全长抗体具有增加体内半衰期的优点,但如本文别处所讨论的,由于趋于激动而不是拮抗TNFR1的受体交联,因此开发TNFR1拮抗剂是不可行的。这不是由Fc交联引起的,因为所述抗体的Fc相互作用部分已通过突变去除。例如,由于其二价分子结构,因此IgG ATROSAB在不存在TNF的情况下表现出一定的TNFR1激动活性,这是在狭窄的浓度范围内观

察到的有限程度。TNFR1的交联也可能由于次要事件而发生,例如与Fc γ R或抗药抗体(ADA)的相互作用,必须避免这种情况以保持TNFR1抑制剂的拮抗性质。在接受英夫利昔单抗或阿达木单抗治疗的患者中观察到ADA的发生率分别为50%和31%(见例如Richter et al. (2019)mAbs 11(4):653-665;Richter et al., (2019)mAbs11(1):166-177)。

[0796] b. 单价TNFR1拮抗剂抗体/抗体片段

[0797] 已经开发了小抗体片段,例如域抗体及其衍生物和修饰形式,并且示例性抗体片段和修饰形式在以下部分中讨论。然而,小抗体片段尚未成功开发成药物。它们在治疗方面的用途有限;它们具有较短的血清半衰期和较快的外周清除率,这是因其规格较小所致。例如,大小为50-60kDa或更小的分子要经过肾脏过滤;大小小于50-60kDa的dAb和其它抗体片段会被肾脏迅速清除。例如,称作DMS5541的dAb和类似分子表现出对TNFR1的选择性,并潜在地可抑制TNFR1信号传导的有害影响。DMS5541由两种dAb(抗TNFR1和抗人血清白蛋白)形成,大小仅为大约25kDa,并且由于其太小而不能具有用于治疗目的的理想药代动力学。它与HSA的结合,旨在稳定其半衰期,仅为34nM,这意味着它通常处于与HSA解离的状态。迄今为止测试过的单域抗体(sdAb)在大肠杆菌中表达,并且在制造过程中容易聚集(去折叠)。此外,以细胞质方式制备的sdAb(通过在大肠杆菌中直接表达)通常缺乏在可变重结构域中发现的保守二硫键,这既会降低它们的熔点,又会降低它们再折叠的能力。小抗体片段的快速清除和短消除半衰期(可能少于几小时)会降低体内功效,并且需要频繁施用和/或连续输注,这会降低患者的依从性。由于这些分子(见例如Holland et al. (2013) J Clin Immunol 33(7):1192-203)是在大肠杆菌中产生的,并且通常没有正确折叠,导致溶解度和免疫原性差,从而导致其临床失败(见例如adisinsight.springer.com/drugs/800037882)。

[0798] 本文提供的构建体,例如TNFR1拮抗剂构建体,解决了这个问题以及其它问题,例如免疫原性以及和预先存在的抗体的反应。本文提供的是含有小抗体片段(例如dAb)的构建体,对TNFR1和/或TNFR2具有特异性,其与现有技术的dAb相比表现出改善的药理学例如药代动力学性质,包括更长的血清半衰期、增加的稳定性、减少的/较慢的外周清除率,以及较低的免疫原性。

[0799] 多种结构的治疗性抗体可以是有效且耐受性良好的治疗剂。抗体用于治疗多种疾病和病症,包括例如类风湿性关节炎(例如阿达木单抗,以商标Humira®销售);癌症,例如非霍奇金淋巴瘤(例如利妥昔单抗和替伊莫单抗,分别以商标Rituxan®和Zevalin®销售)及乳腺癌和胃癌(例如曲妥珠单抗,以商标Herceptin®销售);以及呼吸道合胞病毒感染(例如帕利珠单抗,以商标Synagis®销售)。完整抗体的制造有几个局限性,例如对在哺乳动物细胞表达的依赖。因此,已经开发了抗体的抗原结合片段,如Fab(~57kDa)和单链Fv片段(scFv,~27kDa)和其它结构,可以在体外选择,例如通过噬菌体展示(规避动物免疫),并且可以使用细菌或酵母细胞培养物大量生产。Fab片段含有V_H-C_H1多肽,通过二硫键连接到V_L-C_L多肽;scFv是一种融合蛋白,含有通过短多肽接头连接的V_H结构域和V_L结构域。另一类治疗性小抗体片段是结构域抗体(dAb;也称为单结构域抗体或sdAb),它们是单体的并且含有抗体的重链(V_H)或轻链(V_L)的可变结构域。dAb是抗体的最小抗原结合片段;其大小约为11-15kDa,是完整单克隆抗体(mAb)大小的约十分之一(见例如Holt et al. (2003) Trends in Biotechnology 21(11):484-490)。与dAb类似,纳米抗体(Nb)是源自骆驼科动物重链抗体

的小抗原结合片段,不含轻链。纳米抗体很小(~15kDa),具有低免疫原性和高亲和力,可溶且稳定,由单个基因/外显子(VHH)编码,因此其是模块化的,可以在细菌和酵母中实现高产量生产(见例如Steeland et al. (2015) J. Biol. Chem. 290 (7):4022-4037; Steeland et al. (2017) Sci. Reports 7:13646)。

[0800] i. 基于Fab和scFv的TNFR1拮抗剂

[0801] 如上所述,人源化半激动性/拮抗性TNFR1特异性抗体ATROSAB抑制TNFR1介导的细胞亚。在没有TNF的情况下,ATROSAB表现出一定的TNFR1激动活性,这可能是由于其二价分子结构或由于其与TNFR1的结合所致。亲本小鼠抗体H398具有更强的抑制潜力,这是由于与H398相比ATROSAB的解离速度更快(即 k_{off} 值较高)。这是使用石英晶体微天平(QCM)测量确定的,其中降低芯片上的抗原密度以有利于单价相互作用;单价结合的H398与TNFR1的较慢解离,以及由此产生的较长的受体占据,有助于改善对TNFR1的阻断。因此,为了消除ATROSAB的TNFR1激动活性并提高其TNFR1拮抗活性,开发了ATROSAB的单价衍生物。

[0802] 为了增加ATROSAB的亲和力和拮抗活性,将ATROSAB的单链可变片段(scFv)通过对单个CDR或CDR组合中暴露的残基进行定点诱变,并通过针对人TNFR1-Fc的噬菌体展示进行选择,从而进行第一次亲和力成熟。ATROSAB的scFv含有 V_H 结构域,对应于ATROSAB重链的残基1-115(参见SEQ ID NO:31),通过短肽接头连接到 V_L 结构域,对应于ATROSAB轻链的残基1-113(参见SEQ ID NO:32)。克隆scFv IG11(参见SEQ ID NO:674),在ATROSAB重链的CDR-H2内具有6个突变,即Y52V、Y54T、S55Q、H57E、Y59K和E62D,参考SEQ ID NO:31,表现出较慢的受体解离和改善与人TNFR1-Fc的平衡结合,并改善对TNF诱导的TNFR1激活的抑制。将该克隆进一步进行随机诱变,产生克隆scFv T12B(参见SEQ ID NO:675),其在 V_H 结构域(参考SEQ ID NO:31)中含有突变Q1H、Y52V、Y54S、S55Q、H57E、Y59K和E62D和 V_L 结构域(参考SEQ ID NO:32)中的突变S96G。与ATROSAB的scFv和scFv IG11相比,scFv T12B与固定化的TNFR1-Fc的解离减少,并且TNFR1抑制活性增加(见例如Richter et al. (2019) mAbs 11(1):166-177;也见Richter, F. Thesis, entitled "Evolution of the Antagonistic Tumor Necrosis Factor Receptor One-Specific Antibody ATROSAB," Universität Stuttgart, 2015;可得自pdfs.semanticscholar.org/d8e7/8b87d76dce36225c1d497939ef37445cfa8a.pdf)。

[0803] H398的人源化通过用另一种系基因置换H398的VH和VL构架区来重新工程化,以优化CDR排列。scFv13.7含有scFv T12B的VH结构域,通过短肽接头连接到H398的新人源化VL结构域,在ELISA和QCM中具有与人TNFR1-Fc相似的结合,改善了对TNF诱导的TNFR1活性的抑制,并改善了热稳定性,与scFv T12B相比熔化温度高10°C。基于scFv 13.7,生成了具有与ATROSAB相同恒定区的IgG和Fab(分别为IgG 13.7和Fab 13.7),其与TNFR1的结合与ATROSAB(1.4倍)和ATROSAB的Fab(Fab ATR;8.7倍)相比增加。与Fab ATR相比,Fab 13.7还减少了与固定化TNFR1-Fc的解离,单价亲和力提高了18.8倍。因此,亲和力成熟和框架置换导致Fab 13.7与TNFR1的结合得到改善。Fab 13.7和IgG 13.7显示出对TNFR1-Fc的选择性,并且不与TNFR2-Fc融合蛋白结合;Fab 13.7与人和恒河猴TNFR1-Fc结合,但不与小鼠和大鼠TNFR1-Fc结合,显示出与ATROSAB相似的结合模式。在体外,单价Fab ATR和Fab 13.7不激活TNFR1,而ATROSAB显示TNFR1活性的边缘激活,而IgG 13.7强力激活TNFR1。IgG13.7的激动活性可能是由于增强的亲和力和较慢的TNFR1解离所致,导致形成稳定的信号传导感受

态受体-抗体复合物。与Fab ATR和ATROSAB相比,Fab 13.7显示出改善的对TNFR1活性抑制作用,并且没有任何激动活性。将Fab 13.7或ATROSAB与交联抗人Fab血清温育,表明Fab 13.7不激活TNFR-1,而ATROSAB激活TNFR-1(见例如Richter et al. (2019) mAbs 11(1):166-177)。

[0804] 将Fab 13.7(分子量约为47kDa)与初始半衰期为0.44小时、终末半衰期为32.1小时、曲线下面积(AUC)为 $181\mu\text{g}/\text{ml}\times\text{h}$ 的ATROSAB相比。Fab 13.7的初始半衰期为0.08小时,终末半衰期为1.4小时,AUC为 $4.2\mu\text{g}/\text{ml}\times\text{h}$,这与Fab ATR获得的值相似。为了延长半衰期,通过在 C_H1 结构域的C末端引入游离半胱氨酸残基生成Fab'片段Fab' 13.7,其与支链PEG_{40kDa}部分化学偶联,生成Fab 13.7PEG。Fab 13.7也通过其Fd和一个短柔性接头融合于小鼠血清白蛋白(MSA)的N末端,生成Fab13.7-MSA。通过将Fab 13.7与修饰的Fc融合生成单价Fab-Fc融合蛋白,所述修饰的Fc缺乏在铰链区的半胱氨酸残基以及通过 C_H3 结构域二聚化的能力,从而生成单臂半-IgG分子(IgG1_{half}13.7)。单价Fv-Fc分子也通过将VH和VL结构域融合于铰链区缺乏半胱氨酸残基的异二聚化凸出凹陷(kih)Fc链而生成(Fv13.7-Fc_{kih})。没有任何衍生物显示出任何激动性TNFR1活性,并且与Fab 13.7相比,观察到Fab13.7PEG、Fab13.7-MSA和IgG1_{half}13.7与人TNFR1-Fc的结合略有降低;Fv13.7-Fc_{kih}的结合不受影响。与Fab 13.7相比,TNF介导的TNFR1活性的抑制降低了1.5-3.3倍;Fab13.7PEG表现出最强的功能减弱,而Fv13.7-Fc_{kih}表现出最低的生物活性变化。IgG_{half}13.7显示出与Fab 13.7相似的半衰期,AUC值增加了7.1倍。Fab13.7PEG、Fab13.7-MSA和Fv13.7-Fc_{kih}延长了终末半衰期,分别为14.4小时、9.7小时和10.5小时,并增加了AUC值。因此,融合蛋白Fv13.7-Fc_{kih}是通过使用凸出凹陷技术对两条肽链的异二聚体组装工程化,显示出改善的药代动力学性质和TNFR1拮抗活性的最佳组合(见例如Richter et al. (2019) mAbs 11(1):166-177;也见Richter, F.Thesis,entitled“Evolution of the Antagonistic Tumor Necrosis Factor Receptor One-Specific Antibody ATROSAB,” Universität Stuttgart,2015;可得自pdfs.semanticscholar.org/d8e7/8b87d76dce36225c1d497939ef37445cfa8a.pdf)。

[0805] 在另一项研究中,为了改善Fab13.7的药代动力学性质,例如血清半衰期,将IgG样Fc掺入分子中,同时保留多肽链的Fab样异二聚化。为实现这一目标,将Fab13.7的重链和轻链的可变域融合于新生成的异二聚化Fc链的N末端,称为Fc-one/kappa(Fc1 κ)。Fc异二聚化方法基于散布的Ig结构域,源自异二聚化IgG1恒定重链结构域CH1和kappa轻链恒定结构域CL κ ,并含有IgG1 CH3序列一部分以介导FcRn结合并使FcRn介导体内药物再循环。散布的Ig结构域包括“CH31”,其中包含CH1和CH3的氨基酸序列片段,以及“CH3kappa”(CH3 κ),其含有CL κ 和CH3的氨基酸序列片段。IgG1 CH2结构域也融合于CH31和CH3 κ 结构域的N末端,以包括IgG分子的整个FcRn结合区。将IgG1铰链区添加到CH2结构域的N末端产生共价连接的异二聚化Fc部分,称为Fc1 κ 。与涉及在CH3-CH3界面上置换一个或多个氨基酸的其它Fc异二聚化技术(例如凸出凹陷)相比,Fc异二聚化是通过置换得自人抗体序列的更大的氨基酸序列节段来实现的。制备了不对称scFv-Fc1 κ 融合蛋白,并与具有含有凸出凹陷中的Fc的scFv融合体进行比较,异二聚体形成与含有凸出凹陷技术的融合体相比相似或有所改善(见例如Richter et al. (2019) mAbs 11(4):653-665)。

[0806] 将TNFR1特异性Fab 13.7分子的可变结构域与含有CH31或CH3 κ 的的Fc链的CH2结构域N末端用短肽接头融合,通过将VH融合于CH2-CH3 κ 链,将VL融合于CH2-CH31链(VL13.7-

CH2-CH31/VH13.7-CH2-CH3 κ ;VL1C/VH κ C),产生单价TNFR1特异性拮抗性抗体衍生分子(Fv-Fc1 κ 融合蛋白),称为Atrosimab(大小为72kDa)。由于引入Fc1 κ 中的突变导致Atrosimab缺乏介导Fc效应子功能的能力;由于与表达Fc γ R的细胞结合的Atrosimab的二次交联,缺乏与免疫系统效应分子的结合阻止TNFR1的激活。Atrosimab以高亲和力(K_D 2.7nM)与TNFR1结合,抑制TNF诱导的TNFR1激活,在各种体外测定中及在存在抗人IgG抗体(即交联抗体)抗体下,IC₅₀值为16-55nM,并显示出改善的药代动力学性质。与亲本Fab 13.7分子相比,TNFR1结合和抑制略有降低,这可归因于融合于CH2结构域后VH和VL配对的改变。Atrosimab的初始和终末半衰期分别确定为2.2+/-1.2小时和41.7+/-18.1小时,AUC为5856+/-1369.9 μ g/ml \times h。与Fab 13.7相比,Atrosimab的终末半衰期延长了近40倍,与ATROSAB相比延长了1.3倍;然而,这些值可能不准确,因为Fab 13.7和ATROSAB的注射剂量较低,这会影响药代动力学性质(见例如Richter et al. (2019)mAbs 11(4):653-665)。

[0807] ii. 基于域抗体(dAb)的TNFR1拮抗剂

[0808] 另一类治疗剂抗体的小片段,是域抗体(dAb;也称为单域抗体或sdAb),它们是单体的并且包含抗体的重链(V_H)或轻链(V_L)的可变域。dAb是抗体的最小抗原结合片段;其大小约为11-15kDa,是完整单克隆抗体(mAb)尺寸的约十分之一。与dAb类似,骆驼科动物中出现的纳米抗体产生仅含有重链的抗体,其中抗原结合位点是单个未配对的可变域,称为 V_{HH} 。在dAb中,每个 V_H 和每个 V_L 上有三个互补决定区(CDR);因此,每个dAb含有来自抗体 V_H - V_L 对的六个CDR中的三个,它们是与靶抗原结合的高度多样化的环区。

[0809] 由于其尺寸较小,dAb可以从细菌培养物中以更高的产量产生,并且更适合噬菌体展示,因为只产生一条多肽链。可以通过蛋白质工程快速生产具有高亲和力和效力的特定dAb。dAb的小尺寸还允许增加组织渗透、稳定性和递送制剂的选择。由于其尺寸小,因此可以创建含有特异于不同抗原/靶标的连接的dAb的分子,这对于传统抗体来说是不可能的,并且对于其它抗体片段(例如Fab和scFv)也很难实现。由于dAb的单体和单价结合方式,其适用于靶标不适合用单克隆抗体干预的情况。TNFR1就是这样一个靶标;TNFR1被抗体诱导的受体交联激活/激动(见例如Holt et al. (2003) Trends in Biotechnology 21(11):484-490;Schmidt et al. (2013) Arthritis&Rheumatism 65(9):2262-2273;Goodall et al. (2015) PLoS ONE 10(9):e0137065)。

[0810] 与大分子相比,dAb、scFvs、Fvs、二硫键结合的Fvs和Fab等小尺寸抗体片段更易于生产和处理,并可迅速分布于全身;然而,其较短的体内半衰期限制了其治疗效果。与其它抗体片段一样,增加dAb的血清半衰期可提高治疗效果并降低给药频率,特别是在需要结合血流中抗原的应用中,例如治疗类风湿性关节炎或癌症。这可以通过聚乙二醇化、与血清白蛋白偶联、与特异性结合血清白蛋白的第二dAb融合或与Fc片段或完整抗体恒定区融合来实现。与Fc区的融合还允许募集Fc效应子功能,包括补体激活、抗体依赖性细胞毒性或Fc介导的免疫复合物清除(见例如Holt et al. (2003) Trends in Biotechnology 21(11):484-490;Goodall et al. (2015) PLoS ONE 10(9):e0137065)。

[0811] a) 抗-TNFR1 dAb-抗-白蛋白dAb融合构建体

[0812] DMS5540是一种25kDa小鼠TNFR1拮抗剂,它是一种双特异性单可变域抗体,含有非竞争性(不干扰TNF结合)抗TNFR1 dAb,与白蛋白结合dAb(AlbudAb;以延长血清半衰期)融合。DMS5540不结合人TNFR1,发现其抑制小鼠成纤维细胞L929(对TNF α 介导的细胞毒性高度

敏感)中TNF α 介导的细胞毒性。将DMS5540静脉注射给小鼠,四小时后静脉推注TNF α ,并评估血清IL-6水平。与施用缺少特异性抗原结合但与AlbudAb融合的对照dAb(DMS5538)或无dAb的小鼠相比,DMS5540在体内表现出对TNF α 介导的信号传导效应的剂量依赖性抑制,这由IL-6应答所确定(见例如Goodall et al. (2015) PLoS ONE 10(9):e0137065)。

[0813] 在另一项研究中,从关节炎发作当天开始,将具有胶原诱导的关节炎(CIA)小鼠用DMS5540、同种型(阴性)对照dAb(DMS5538)或与小鼠IgG1 Fc结构域遗传融合的鼠TNFR2(mTNFR2-Fc;mTNFR2.Fc)治疗10天,后者阻断两种受体(TNFR1和TNFR2)并抑制小鼠TNF,并监测疾病进展。测量全身细胞因子的浓度,评估淋巴结和脾脏中T细胞亚群的数量,并评估内在Treg细胞功能。与阴性对照相比,用DMS5540阻断TNFR1和用mTNFR2-Fc阻断TNFR1/2类似地抑制了疾病进展,表明阻断TNFR1或TNF保护关节免受在关节炎中导致关节损伤的炎症介质的影响。根据促炎细胞因子(例如IFN γ 、IL-10和RANTES)的表达水平测量的效应T细胞活性,在用mTNFR2-Fc阻断TNFR1/2后增加,但在用DMS5540选择性阻断TNFR1后没有增加,表明对TNFR2信号传导的免疫调节作用(例如T细胞效应子功能抑制)。此外,阻断TNFR1而不是TNFR1/2导致Treg细胞的扩增和激活,而在经历缓解的关节中观察到FoxP3和TNFR2的表达增加,这两者均由Treg表达,表明其在炎症消退中的作用。这些结果表明,抑制TNFR1(而非TNFR2)信号传导可抑制炎症并促进Treg细胞抑制活性,与传统的TNF抑制方法相比可增强治疗效果(参见例如McCann et al. (2014) Arthritis&Rheumatology 66(10):2728-2738)。

[0814] 在脂多糖(LPS)诱导的骨质溶解的体内小鼠模型中,DMS5540也比mTNFR2.Fc(抗TNF)更有效地防止炎症诱导的破骨细胞形成和骨质流失。TNFR2缺陷小鼠表现出LPS诱导的骨破坏增加。在体外,DMS5540的人等效物DMS5541含有抗人TNFR1 dAb,在存在和不存在低剂量TNF的情况下比依那西普更有效地减少人破骨细胞生成。这些结果表明TNFR2信号传导具有骨保护作用。因此,TNFR1的选择性抑制也可用于炎症性骨质流失疾病的治疗干预,例如骨髓炎和假体周围骨溶解和无菌性松动(见例如Esperito Santo et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.464:1145-1150)。

[0815] DMS5541(也称为TNFR1-AlbudAb)含有与AlbudAb融合的非竞争性人TNFR1特异性dAb,在离体培养的人类风湿性关节炎(RA)滑膜单核细胞(MNC)中评估了通过TNFR1对TNF信号传导的选择性阻断,所述MNC表达TNFR1和TNFR2,并在没有外源性刺激的情况下自发产生炎性细胞因子和趋化因子。DMS5541抑制促炎细胞因子GM-CSF、IL-10、IL-1 β 和IL-6和趋化因子IL-8、RANTES(CCL5)和MCP-1(CCL2)的产生,其水平与依那西普对TNF配体阻断相似。这种抑制不是由于细胞毒性,因为DMS5541在人横纹肌肉瘤KYM-1D4中以剂量依赖性方式抑制TNF α 诱导的细胞毒性,类似于依那西普的TNF阻断作用。此外,DMS5541抑制可溶性TNFR1的产生,但不抑制可溶性TNFR2,表明对TNFR1具有选择性。这些结果表明,TNFR1途径是导致在离体培养的RA滑膜MNC疾病模型中观察到的TNF应答的主要炎症途径(见例如Schmidt et al. (2013) Arthritis&Rheumatism 65(9):2262-2273)。

[0816] b)称作GSK1995057和GSK2862277的域抗体片段

[0817] 称作GSK1995057的域抗体片段(参见SEQ ID NO:55)是一种短效的完全人域抗体(dAb)片段(含有VH链),它通过TNFR1而非TNFR2选择性地拮抗的TNF信号传导。由于其小尺寸,因此GSK1995057可以直接雾化到肺部,并且已经在通过吸入治疗急性呼吸窘迫综合征

(ARDS)的动物和人体模型中进行了研究。GSK1995057减少非人类灵长类动物(食蟹猴)和人ARDS模型的肺部炎症。肺中性粒细胞浸润是ARDS发病机制的核心,并且会因促炎介质作用引起的肺泡毛细血管屏障受损而增加。TNF- α 有助于增加内皮通透性,而GSK1995057可阻止这种增加,表明TNFR1信号传导介导了TNF诱导的内皮通透性(见例如Proudfoot et al. (2018) Thorax 73:723-730)。由于其固有的短半衰期和自身抗体的中和作用,试验失败。GSK1995057的免疫原性可能更多是由于大肠杆菌中产生的蛋白质折叠不当,而不是dAb的正确人源化失败;它源自人抗体片段,仅改变高变序列以适应TNFR1的特异性(见例如国际PCT公开号W02008/149148A2)。

[0818] 在暴露于单一吸入脂多糖(LPS)挑战的猴子中,这是一个成熟的模型,可触发临床相关的炎症反应模拟亚临床组织损伤,用GSK1995057预处理可以剂量依赖性方式减少肺中性粒细胞浸润、促炎趋化因子水平、内皮损伤标志物和肺泡-毛细血管渗漏。结果表明,吸入GSK1995057可以产生与更高剂量的肠胃外施用抗体相同的结果。在一项临床试验中,健康人受试者接受单次雾化剂量的GSK1995057预处理,然后暴露于低剂量吸入的LPS,接受预处理的受试者与接受安慰剂的受试者相比LPS应答挑战经历的全身炎症、中性粒细胞性肺部炎症和内皮损伤迹象较少。尽管有这些结果,但不太可能转化为临床。在试验中,GSK1995057在LPS攻击之前施用,但患有ARDS的患者通常需要在初始损伤后进行治疗(见例如Proudfoot et al. (2018) Thorax 73:723-730),而不是之前治疗。

[0819] 另一个困难是抗药物抗体(ADA)对抗TNFR1制剂的不利影响,这在GSK1995057的临床I期研究中观察到,其中由于预先存在的、天然发生的抗免疫球蛋白自身抗体(即ADA)高水平存在于大约50%的未经药物试验的健康受试者中,在2-10 μ g/kg剂量观测到细胞因子释放输注反应。具体而言,ADA是人抗VH(HAVH)自身抗体,HAVH自身抗体与GSK1995057框架序列的复合物导致TNFR1信号传导激活,并在具有高HAVH自身抗体滴度的受试者中发生轻度至中度输液反应(见例如Cordy et al. (2015) Clin. Exp. Immunol. 182:139-148)。

[0820] HAVH自身抗体与dAb GSK1995057框架区的结合在体外诱导细胞因子释放。对自身抗体的GSK1995057表位进行了鉴定。预先存在的抗药抗体(ADA)与靠近VH dAb的C末端区域的表位结合,包括dAb GSK1995057。为了解决这个问题,通过在修饰的dAb的C末端添加单个丙氨酸残基来生成称作GSK2862277(参见SEQ ID NO:56)的修饰的dAb。这种修饰减少了与HAVH自身抗体的结合。在筛选出与GSK1995057结合的HAVH自身抗体呈阳性的健康受试者的血清样本中,预先存在的自身抗体的频率从GSK1995057特异性HAVH自身抗体的51%降至GSK2862277特异性自身抗体的7%。人体体外系统和动物体内实验表明,即使存在GSK2862277特异性自身抗体的情况下,GSK2862277也不诱导TNFR1激活,并且GSK2862277的药理学和生物物理性质,包括靶标亲和力、体外效力和体内药代动力学和药效学与母体dAb (GSK1995057)相当。

[0821] 一项研究单次和重复剂量吸入(i.h.)和静脉注射(i.v.)GSK2862277的安全性、耐受性、药代动力学和药效学的I期临床试验发现,当通过吸入或静脉注射施用时,GSK2862277通常具有良好的耐受性。然而,一名受试者在重复静脉给药后出现了轻微的输液反应和细胞因子释放;该受试者具有高血清水平的预先存在的GSK2862277抗体,并且该受试者的血清抗体显示在体外试验中激活TNFR1信号传导。GSK2862277与自身抗体之间的相互作用导致抗体介导的、GSK2862277依赖性细胞TNFR1交联,激动受体并导致细胞因子释

放。因此,尽管GSK2862277与预先存在的HAVH自身抗体的结合减少,但不良反应仍然与存在新的预先存在的抗体应答有关,这种抗体应答特异于修饰的dAb框架。这些结果突出了开发针对TNFR1的生物拮抗剂的挑战(见例如Cordy et al. (2015) Clin. Exp. Immunol. 182:139-148)。因此,仍然需要改进的TNFR1拮抗剂。

[0822] iii. 纳米抗体(Nb)

[0823] 与dAb类似,纳米抗体(Nb)是源自骆驼科动物重链抗体的小抗原结合片段,不含轻链。其尺寸较小(15kDa),具有低免疫原性和高亲和力,可溶且稳定,并由单个基因/外显子(VHH)编码,使其模块化并允许在细菌或酵母中高产量生产。

[0824] iv. 抗-TNFR1纳米抗体-抗-白蛋白纳米抗体融合构建体

[0825] TROS(TNF受体单沉默剂;也称为Nb A1b-70-96)是一种基于三价高亲和力纳米抗体的人TNFR1选择性抑制剂,其与TNF竞争结合TNFR1。为了产生TROS,连接两种抗人TNFR1纳米抗体(Nb 70和Nb 96;分别参见SEQ ID NO:683和684),这两种纳米抗体已从VHH文库中产生,所述文库是通过用重组人可溶性TNFR1免疫羊驼而构建的,并通过(Gly4Ser)₃接头连接到抗白蛋白纳米抗体(Nb A1b)以增加血清半衰期以产生三价TROS。产生的TROS的血清半衰期为约24小时;单价Nb的血清半衰期仅为~1.5小时。用TROS治疗可延缓小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE;一种MS模型)的发病,并预防既定疾病;治疗效果是由于TNF通过TNFR2发出信号的转向以及这种信号传导的影响所致。TROS还在克罗恩病患者离体培养的结肠活检中抑制炎症,并在肝脏嵌合人源化小鼠的急性TNF诱导的肝脏炎症模型中拮抗炎症(见例如Steeland et al. (2015) J. Biol. Chem. 290(7):4022-4037;Steeland et al. (2017) Sci. Reports 7:13646)。

[0826] c. TNF(DN-TNF)/TNF突变蛋白的显性阴性抑制剂

[0827] 另一类TNF抑制剂是TNF的信号传导无能显性阴性抑制剂(DN-TNF),也称为TNF突变蛋白。DN-TNF是TNF的工程化变体,其具有消除与TNFR1和TNFR2的结合并通过其发出信号的突变。DN-TNF通过与天然TNF同源三聚体快速置换亚基而选择性抑制可溶性TNF(sTNF或solTNF),形成具有破坏的受体结合表面的无活性混合TNF异源三聚体,从而防止与TNF受体相互作用。DN-TNF使跨膜TNF(tmTNF)不受影响,维持通过TNFR2的TNF信号传导的保护作用。DN-TNF抑制TNF诱导的NF- κ B活性和半胱天冬酶介导的细胞凋亡,并降低关节炎和帕金森病动物模型的疾病严重程度。这些分子由于其结构而可能具有免疫原性。

[0828] 作为可溶性TNF的选择性抑制剂,DN-TNF与结合solTNF和tmTNF的抗TNF治疗不同,其不抑制tmTNF信号传导,也不抑制小鼠对单核细胞增生李斯特菌感染的抗性。DN-TNF的实例是含有一个或多个置换L133Y、S162Q、Y163H、I173T、Y191Q和A221R的TNF突变体,参考SEQ ID NO:1所示氨基酸序列(对应于参考如SEQ ID NO:2所示solTNF序列的残基L57Y、S86Q、Y87H、I97T、Y115Q和A145R),其削弱了与TNFR的结合。还可以包括额外的修饰,例如为了提高表达,允许位点特异性PEG化(见例如Zalevsky et al. (2007) J. Immunol. 179:1872-1883)。

[0829] 例如,参考SEQ ID NO:2,TNF突变R32W和S86T导致对TNFR2的亲和力损失数百倍,但不影响与TNFR1的结合。R32W/S86T双突变体消除了与TNFR2的所有结合,而与TNFR1的结合没有损失。参考SEQ ID NO:2的突变L29S、L29G、L29Y、R31E、R31N、R32Y、R32W、S86T、L29S/R32W、L29S/S86T、R32W/S86T、L29S/R32W/S86T、R31N/R32T、R31E/S86T、R31N/R32T/S86T和

E146R,也赋予对TNFR1的选择性。参考SEQ ID NO:2的突变D143N、D143Y、A145R和D143N/A145R使TNF变体对TNFR2具有选择性(见例如Loetscher et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268 (35):26350-26357;美国专利号5,422,104)。

[0830] 称作XPro1595的一种修饰的TNF (INmuneBio;参见SEQ ID NO:701),是聚乙二醇化的可溶性DN-TNF突变蛋白,其优先抑制TNFR1信号传导,并含有突变V1M、R31C、C69V、Y87H、C101A和A1456R,参考SEQ ID NO:2(见例如美国公开号2015/0239951)。XPro1595减少神经炎症,并且正在研究治疗阿尔茨海默氏病(见例如临床试验编号NCT03943264)。XPro1595阻断阿尔茨海默氏病小鼠模型(3xTgAD)中发生淀粉样蛋白病理学,阻止不同(tgCRND8)的阿尔茨海默氏病小鼠模型中神经元通讯的丧失和认知障碍,减轻正常老年大鼠正常神经元通讯的功能障碍和认知缺陷,以及在第三种阿尔茨海默病模型(5xFAD)中防止年轻小鼠发生淀粉样蛋白病理学、认知障碍和神经元通讯功能障碍。在具有阿尔茨海默病样病理学的老年小鼠中,XPro1595减少了淀粉样蛋白,改善了认知,挽救了神经元通讯,并且还使先天和适应性免疫应答正常化。

[0831] 与TNFR2相比,老年(22个月)而非年轻成年(6个月)Fischer 344大鼠的海马体中TNFR1水平更高。当用XPro1595治疗时,老年大鼠表现出更好的Morris水迷宫性能、减少小胶质细胞激活、降低对海马体长期抑郁症的易感性、增加GluR1型谷氨酸受体水平和降低L型电压敏感Ca²⁺通道(L-VSCC)海马CA1神经元的活性,表明与大脑老化相关的功能变化可能因TNF信号传导的选择性改变而发生。在帕金森病和衰老的动物模型中,XPro1595抑制神经炎症和小胶质细胞的激活。在EAE (MS模型)中,XPro1595可改善疾病、改善髓鞘再生并减少CNS损伤和神经炎症。XPro1595还可以改善炎症性关节炎,并降低接受治疗的动物对感染的易感性。与没有治疗效果的依那西普相比,使用XPro1595治疗可延缓EAE的发作并更有效地改善症状。施用XPro1595增加了EAE中病变区域的TNFR2表达水平,表明通过TNFR2的tmTNF信号传导与神经再生有关(见例如Yang et al. (2018) *Front. Immunol.* 9:784; Sama et al. (2012) *PLoS ONE* 7 (5):e38170)。由于XPro1595不抑制跨膜TNF的活性(激活TNFR1和TNFR2),因此它不能阻断TNFR1的炎症作用。这也适用于其它显性阴性TNF试剂,如下所述。

[0832] XENP345(参见SEQ ID NO:702)是聚乙二醇化的DN-TNF突变蛋白,含有突变I97T/A145R,参见SEQ ID NO:2。XENP345在帕金森病和阿尔茨海默病动物模型中对可溶性TNF(solTNF)的体内中和具有神经保护作用,减少神经元变性和认知功能障碍,并减缓神经退行性疾病的进展(见例如McCoy et al. (2006) *J. Neurosci.* 26 (37):9365-9375;McAlpine et al. (2009) *Neurobiol. Dis.* 34(1):163-177)。

[0833] R1antTNF(参见SEQ ID NO:703)是一种TNFR1选择性拮抗性突变体TNF,从展示结构性人TNF变体的噬菌体文库中鉴定,其中对应于SEQ ID NO:2残基84-89的在受体结合位点的六个氨基酸残基中的每一个均被突变。R1antTNF含有突变A84S、V85T、S86T、Y87H、Q88N和T89Q,与野生型人TNF具有相似的TNFR1亲和力,并且不干扰TNFR2活性。R1antTNF改善了肝损伤,在两种急性肝炎模型中,丙氨酸氨基转移酶和促炎细胞因子IL-2和IL-6的血清水平降低证明了这一点。然而,与野生型TNF一样,R1antTNF的血浆半衰期非常短(12分钟)。为了增加R1antTNF的体内半衰期,产生了聚乙二醇化形式的PEG-R1antTNF,其中PEG与R1antTNF的N末端位点结合。PEG-R1antTNF在EAE小鼠模型中降低发病率、改善疾病症状、改善脱髓鞘,并抑制脊髓中的Th1和Th17细胞活化和炎性T细胞浸润。PEG-R1antTNF还抑制NF-

κ B,抑制平滑肌细胞增殖,降低趋化因子和粘附分子表达,从而减少IL-1受体拮抗剂缺陷小鼠在外部血管套模型中诱导股动脉损伤后的内膜增生和动脉炎症。当使用重组腺病毒载体比较PEG-R1antTNF和依那西普对抗病毒免疫的影响时,PEG-R1antTNF不重新激活病毒感染,也不影响注射的腺病毒的清除,而依那西普治疗后病毒载量增加。PEG-R1antTNF治疗还在预防和治疗环境中延迟和改善了CIA症状,并且在用于治疗已确诊的CIA时比依那西普更有效(见例如Yang et al. (2018) *Front. Immunol.* 9:784;Shibata et al. (2008) *J. Biol. Chem.* 283(2):998-1007;Kitagaki et al. (2012) *J. Atheroscler. Thromb.* 19(1):36-46;Fischer et al. (2015) *Antibodies* 4:48-70;Horiuchi et al. (2010) *Rheumatology (Oxford)* 49:1215-1228)。

[0834] 可溶性TNFR1也与发生MS的风险增加有关;因此,DN-TNF/TNF突变蛋白无法实现的可溶性TNFR1的中和可能是有益的。与solTNF抑制剂(例如DN-TNF)相反,TNFR1拮抗剂可以阻断淋巴毒素- α (LT- α) (TNF超家族的另一个成员)与TNFR1的结合。LT- α 在RA和动物疾病模型(如CIA和EAE)中具有促炎作用;因此,与solTNF抑制相比,TNFR1拮抗剂同时阻断TNF和LT- α 与TNFR1的结合在急性和慢性炎症性疾病和病症中具有额外的益处(见例如Fischer et al. (2015) *Antibodies* 4:48-70)。

[0835] 2. TNFR2-选择性激动剂

[0836] $CD4^+FoxP3^+$ 调节性T细胞(Treg)维持免疫稳态并抑制自身免疫应答;Treg还调节抗肿瘤免疫应答,允许肿瘤免疫逃避。因此,Treg是治疗例如自身免疫性和慢性炎症性疾病和病症、移植物抗宿主病(GvHD)、移植排斥和癌症的治疗靶标。通过TNFR2的TNF信号传导调节Treg的功能和活性。TNFR2激动剂上调Treg活性,而TNFR2拮抗剂下调Treg活性。TNF-TNFR2信号传导途径的Treg刺激作用可用于杠杆式治疗多种人类疾病和病症,包括通过激动作用治疗自身免疫性疾病和慢性炎症性疾病,以及通过拮抗作用治疗癌症(见例如Zou et al. (2018) *Front. Immunol.* 9:594)。

[0837] TNFR2激动剂包括抗体,例如单克隆TNFR2激动剂抗体及其抗原结合片段,肽和蛋白质,例如TNFR2选择性TNF突变蛋白、融合蛋白和小分子。如本文所提供,TNFR2的特异性激动作用诱导Treg的扩增和激活,从而调节免疫系统,降低损害组织的自身反应性 $CD8^+$ T细胞的活性,并诱导具有抗炎作用的信号传导途径以及细胞存活、再生和保护作用,包括神经保护作用、心脏保护作用、肠道保护作用和骨保护作用。因此,用TNFR2选择性激动剂增强TNFR2信号传导可用于增强TNFR1特异性拮抗作用的治疗效果,特别是在治疗其中抗TNF治疗/TNF-阻滞剂治疗失败的自身免疫和慢性炎症性疾病和病症中,包括神经退行性疾病。

[0838] a. TNFR2激动剂抗体

[0839] 人TNFR2选择性激动剂抗体包括可商购的MR2-1(结合人、食蟹猴和恒河猴TNFR2的单克隆小鼠IgG1;Hycult Biotech),和克隆MAB2261(结合人TNFR2的单克隆小鼠IgG2A;R&D Systems)。TNFR2激动剂,例如抗体,可以有效地刺激 $CD4$ 细胞培养物中 $FoxP3^+$ Treg同质群体的扩增,并上调TNF、TRAF2、TRAF3、BIRC3(cIAP2)和 $FoxP3$ mRNA的表达。磁激活细胞分选(MACS)纯化的 $CD4^+CD25^+$ 细胞,使用标准体外Treg扩增方案(即,使用抗 $CD3$ 抗体、抗 $CD28$ 抗体、IL-2和雷帕霉素)培养,当存在TNFR2激动剂抗体的情况下与不存在TNFR2激动剂抗体相比产生具有更高水平 $FoxP3$ (和其它特征性Treg标记物)的扩增的Treg及更强力的抑制能力。从1型糖尿病患者分离出的Treg表现出静息表型,将其在体外用TNFR2激动剂抗体处理

后激活和扩增;此类Treg更有效地抑制自体CD8⁺T细胞(见例如Zou et al. (2018) Front. Immunol. 9:594)。

[0840] 使用MR2-1对使用标准体外方案扩增的分离的Treg进行处理,MR2-1是含有小鼠IgG1的可商购的激动性人TNFR2单克隆抗体(mAb),产生同源的FoxP3⁺Helios⁺CD127^{low} Treg群;这些Treg在人源化小鼠模型中保持其表型和高度抑制活性。因此,TNFR2激动剂可以增强来自不纯细胞群的Treg细胞的离体扩增,用于基于Treg的免疫疗法(见例如Zou et al. (2018) Front. Immunol. 9:594)。

[0841] b. TNFR2-选择性TNF突变蛋白及其融合体

[0842] 如本文所述,TNF可被工程化为选择性结合TNFR1或TNFR2;例如,TNFR2选择性TNF突变蛋白是TNF的一种变体,其含有增加与TNFR2的结合和/或减少或消除与TNFR1的结合的一个或多个突变。TNFR2选择性突变包括可溶性TNF(参见SEQ ID NO:2)位置143的Asp残基的非保守取代,例如D143Y、D143F或D143N,或可溶性TNF位置145的Ala残基的非保守取代,例如A145R(参见例如美国专利号9,081,017)。TNF中赋予对TNFR2选择性的其它突变包括但不限于例如:K65W,D143E,D143W,D143V,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D,Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D,L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D,A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D,A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D,D143V/F144L/A145S,和D143V/A145S,参考SEQ ID NO:2(见例如美国专利公开号2020/0102362)。

[0843] TNF配体三聚化对于通过TNFR发出信号至关重要。在低浓度下,例如在血清中,所述三聚体解离,导致其降解。为了生成具有功能活性的受体特异性TNF突变蛋白,必须创建稳定的三聚体。TNF07是一种可溶性TNF(sTNF或solTNF)突变蛋白,含有突变S95C/G148C(相对于SEQ ID NO:2所示残基序列),其形成稳定的TNF三聚体并充当TNFR2激动剂。S95C/G148C突变导致分子间Cys-Cys共价键的形成;由于sTNF在TNF单体之间的关键位置的共价内部二硫化物交联,因此形成了稳定的三聚体。尽管缺乏TNFR2选择性突变,但TNF07充当TNFR2激动剂。TNF07诱导有效的TNFR2信号传导,扩增FoxP3⁺Treg细胞,并选择性诱导从1型糖尿病患者分离的自身反应性CD8⁺T细胞死亡(见例如Ban et al. (2015) Molecular and Cellular Therapies 3:7;Zou et al. (2018) Front. Immunol. 9:594)。

[0844] 已经产生了几种TNFR2激动剂,含有单链TNFR2选择性TNF突变蛋白三聚体与多聚化结构域的融合。如本文所述,TNFR2的主要配体是膜结合TNF(memTNF;本文也称为跨膜TNF或tmTNF)。添加多聚化结构域,例如二聚化或三聚化结构域,分别生成关于TNF亚基的六聚体或九聚体分子;这些TNF的六聚体和九聚体模拟膜结合的TNF三聚体,因此能够有效激活TNFR2信号传导。常用的二聚化结构域包括EHD2,其源自IgE的重链C_H2域,和MHD2,其源自IgM的重链C_H2域。二聚化结构域还可以包括Fc结构域,例如衍生自IgG1和IgG4的那些Fc结构域,任选包括改变免疫效应子功能的修饰。常用的三聚化结构域包括鸡腱糖蛋白C(TNC)和人TNC。二聚化和三聚化增强了TNFR2信号传导,并改善了融合蛋白的半衰期,例如通过增加分子的分子量和/或通过引入FcRn再循环,例如当二聚化结构域是Fc时。

[0845] STAR2(也称为TNC-sc-mTNF(221N/223R))是一种九聚体激动性TNFR2特异性小鼠

TNF变体,其不结合TNFR1,是一种单链小鼠TNF三聚体,其中每个TNF亚基是SEQ ID NO:5的残基91-235,融合于鸡腱糖蛋白C(cTNC)的三聚化结构域,对应于SEQ ID NO:804的残基110-139(也参见SEQ ID NO:805)。三个单链小鼠TNF亚基由两个(GGGS)₄肽接头连接(见例如SEQ ID NO:707的残基116-120),并且TNC三聚化结构域连接到所述单链三聚体中第一个TNF亚基的N末端。STAR2对TNFR2的特异性得自单个TNF亚基内的突变D221N和A223R(参考小鼠TNF的序列,如SEQ ID NO:5所示),这在STAR2和小鼠TNFR1之间产生了空间冲突。融合于TNC三聚化结构域导致自发形成寡聚体,产生三个共价连接的TNF三聚体,并模拟膜结合TNF。STAR2在体外和体内以TNFR2依赖性、IL-2非依赖性机制刺激Treg的增殖。在小鼠中移植前用STAR2预处理同种异体造血干细胞以TNFR-2和Treg依赖性方式延长了存活期并降低了GvHD的严重程度。TNFR2特异性STAR2激动剂的人等效物TNC-scTNF(143N/145R),由可溶性TNF的残基9-157组成(参见SEQ ID NO:2),含有参考SEQ ID NO:2(so1TNF)的突变D143N/A145R,有效刺激从健康供体分离的CD4⁺T细胞中在体外扩增CD4⁺FoxP3⁺Treg(见例如Chopra et al. (2016) J. Exp. Med. 213(9):1881-1900; Zou et al. (2018) Front. Immunol. 9:594)。

[0846] TNC-scTNF_{R2}是一种可溶性人TNFR2激动剂,其是含有SEQ ID NO:806的残基110-139(另见SEQ ID NO:807)的人腱糖蛋白C(hTNC)的三聚化结构域与TNFR2选择性单链TNF变体(scTNFR2; SEQ ID NO:803)的N末端的融合体,含有通过两个短肽接头(GGGGS)连接的三个TNF结构域。TNFR2选择性TNF分子scTNFR2类似于可溶性三聚体TNF,每个TNF亚基包括SEQ ID NO:1所示全长TNF的氨基酸80-233(对应于SEQ ID NO:2的残基4-157),具有突变D143N/A145R,参考SEQ ID NO:2,其消除了与TNFR1的结合。由于TNFR2仅被膜结合TNF而不是可溶性TNF三聚体完全激活,因此TNC的三聚化结构域融合于scTNF_{R2}的N末端,生成TNC-scTNF_{R2}。TNC-scTNF_{R2}存在于单链融合蛋白的三聚体组装中,类似于九聚体TNF分子;这种寡聚TNF突变蛋白由于其亲合力增加而模拟膜结合TNF(memTNF)活性,诱导TNFR2簇集和TNFR2信号传导复合物的形成,有效激活TNFR2。TNC-scTNF_{R2}具有神经保护性质;其保护神经元免受超氧化物诱导的细胞死亡,并从儿茶酚胺能细胞死亡中拯救神经元。在帕金森病的体外模型中,TNC-scTNF_{R2}在6-OHDA诱导细胞死亡后拯救了神经元。这些结果表明TNC-scTNF_{R2}可以改善神经退行性过程(见例如Fischer et al. (2011) PLoS ONE 6(11):e27621)。

[0847] EHD2-scTNF_{R2}(参见SEQ ID NO:810)是一种激动性TNFR2选择性TNF突变蛋白融合蛋白,含有共价稳定的人TNFR2选择性单链TNF三聚体(scTNF_{R2}; SEQ ID NO:803),具有突变D143N/A145R(可溶性TNF的残基编号,如SEQ ID NO:2所示),所述突变消除与TNFR1的结合,融合于二聚化结构域EHD2(SEQ ID NO:808),所述结构域源自IgE重链C_H2结构域,并产生含有六聚体TNF结构域的二硫键二聚体。scTNF_{R2}内的每个TNF亚基含有SEQ ID NO:2的残基4-157。EHD2通过肽接头(GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEFLA; SEQ ID NO:809)融合于三价人单链scTNF_{R2}的N末端,scTNF_{R2}的三个TNF结构域通过两个GGGGS肽接头连接。EHD2-scTNF_{R2}在NMDA诱导的急性神经变性小鼠模型中表现出神经保护性质(见例如Dong et al. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 113(43):12304-12309; 和美国专利公开号2020/0102362)。

[0848] TNFR2激动剂融合蛋白还包括单链TNFR2激动剂(scTNF_{R2}),含有具有突变D143N/A145R的三个TNF突变蛋白(参考SEQ ID NO:2),其消除与TNFR1的结合,与作为Fc的二聚化结构域融合,导致相对于TNF结构域的二聚体蛋白质(scTNF_{R2}-Fc)。Fc可以是IgG4或IgG1 Fc,任选含有消除Fc效应子功能的突变,例如ADCC和CDC。含有SEQ ID NO:2的残基12-157的

三个TNF突变蛋白通过两个短肽接头连接在一起,二聚化结构域通过第三个短肽接头连接到单链三聚体TNF分子(scTNF_{R2})的N末端或C末端。三个接头可以全部相同或可以不同,并且可以包括GS接头,例如SEQ ID NO:707的残基116-121(GGGGS)_n,和/或Gly和Ser的其它组合,其中n=1-5,或可以包括TNF- α 茎区(GPQREEFPRLDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDK(SEQ ID NO:812),对应于SEQ ID NO:1的残基57-87)的全部或部分、至少10、15或20个连续残基。二聚化增强了TNFR2激动剂的信号传导,还改进了融合蛋白的半衰期。可用于融合蛋白的备选二聚化结构域包括衍生自其它二聚化分子的Fc融合蛋白,例如IgE重链结构域2(EHD2;参见SEQ ID NO:808)和IgM重链结构域2(MHD2;参见SEQ ID NO:811)(见例如国际申请公开号WO 2019/226750)。

[0849] 3. 抗TNFR2拮抗剂抗体和小分子抑制剂

[0850] TNFR2拮抗剂抑制Treg的增殖并诱导其死亡,也可抑制表达TNFR2的肿瘤细胞增殖并诱导其死亡。TNFR2拮抗剂可以通过结合在存在于肿瘤微环境中的MDSC表面上表达的TNFR2,减少或抑制髓源性抑制细胞(MDSC)的增殖,和/或诱导MDSC内的细胞凋亡。TNFR2拮抗剂还通过抑制Treg扩增和活性来诱导T效应细胞(包括细胞毒性CD8⁺T细胞)的扩增。因此,TNFR2拮抗剂可用于治疗感染性疾病和某些表达TNFR2的癌症,例如T细胞淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤和皮肤非霍奇金淋巴瘤)、卵巢癌、结肠癌、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、头颈癌、肝癌和肺癌(见例如美国专利公开号2019/0144556;Torrey et al.(2017)Sci.Signal.10:eaaf8608)。

[0851] 如本文所讨论的,TNFR2的表达限于特定的免疫细胞,包括Treg和MDSC、内皮细胞以及特定的神经元和心肌细胞。TNFR2的受限表达使其成为理想的药物靶标,因为抗TNFR2治疗剂不太可能发生全身毒性。

[0852] TNFR2拮抗剂抗体及其抗原结合片段结合人TNFR2内含有一个或多个残基KCRPG(对应于SEQ ID NO:4的残基142-146)的表位,或含有残基130-149、137-144或142-149或这些表位内至少5个连续或不连续的残基的更大表位,并且不结合含有残基KCSPG(对应于SEQ ID NO:4的残基56-60)的表位。TNFR2拮抗剂还可以结合TNFR2表位PECLSCGS(对应于SEQ ID NO:4的残基91-98)、RICTCRPG(对应于SEQ ID NO:4的残基116-123)、CAPLRKCR(对应于SEQ ID NO:4的残基137-144)、LRKCRPGFGVA(对应于SEQ ID NO:4的残基140-150)和VVCKPCAPGTFNS(对应于SEQ ID NO:4的残基159-171),和/或含有SEQ ID NO:4的残基75-128、86-103、111-128或150-190内的至少5个连续或不连续残基的表位(参见例如美国专利公开号2019/0144556)。

[0853] 一般而言,拮抗性TNFR2抗体或其抗原结合片段结合含有KCRPG序列(SEQ ID NO:840)的一个或多个残基的表位,其亲和力例如比同一抗体或抗原结合片段对含有人TNFR2的KCSPG序列(SEQ ID NO:839)的肽的亲和力高至少10倍。结合含有KCRPG序列的一个或多个残基的表位以及以相似亲和力(例如亲和力差异小于10倍)结合含有KCSPG基序的表位的抗体或抗体片段,不是拮抗性TNFR2抗体。拮抗性TNFR2抗体包括TNFRAB1(TNFRAB1的重链和轻链序列分别参见SEQ ID NOs:1213和1213)、TNFRAB2和TNFR2A3(参见例如美国专利公开号2019/0144556对这些抗体的描述)。TNFR2拮抗剂还包括含有TNFRAB1(QRVDGYSSYWFYDFV;对应于SEQ ID NO:1212的残基99-112)、TNFRAB2(ARDDGSYSPFDYWG;SEQ ID NO:1217)或TNFR2A3(ARDDGSYSPFDYFG;SEQ ID NO:1223)的CDR-H3序列或与其具有至少约85%序列相

同性的CDR-H3序列的抗体和抗体片段。例如，TNFRAB1特异性结合含有TNFR2残基KCRPG的残基130-149，其亲和力比结合含有TNFR2残基KCSPG的残基48-67高40倍（参见例如美国专利公开号2019/0144556）。

[0854] TNFRAB1（重链和轻链分别参见SEQ ID NO:1212和1213）是一种鼠抗体，其拮抗TNF-TNFR2相互作用，并且除了结合TNFR2的KCRPG序列外，还结合TNFR2（SEQ ID NO:4）的残基161-169（CKPCAPGTF；SEQ ID NO:1258）内的表位。TNFRAB2，另一种拮抗性TNFR2抗体，结合含有残基137-144（CAPLRKCR；SEQ ID NO:851）的表位，以及包括在人TNFR2的位置80-86（DSTYTQL；SEQ ID NO:1247）、91-98（PECLSCGS；SEQ ID NO:1248）和116-123（RICTCRPG；SEQ ID NO:1249）内一个或多个残基的表位。TNFR2A3是一种鼠拮抗性人TNFR2抗体，通过用人TNFR2免疫小鼠和随后的CDR诱变发现，其中生成的前体抗体的CDR-H3用CDR-H3序列ARDDGSYSPFDYFG（SEQ ID NO:1223）置换。TNFR2A3与人TNFR2中的两个不同表位结合；第一个表位包括人TNFR2的残基140-150（LRKCRPGFGVA；SEQ ID NO:1463），并含有KCRPG基序，第二个表位是下游序列，含有人TNFR2的残基159-171（VVCKPCAPGTFSN；SEQ ID NO:1464）。这些数据表明，拮抗性TNFR2抗体的CDR-H3序列在很大程度上决定了抗原结合性质，并且CDR-H3基序是一个模块化结构域，可以在不表现出拮抗活性的抗TNFR2抗体中取代，以赋予此类抗体或其抗原结合片段具有TNFR2显性拮抗特征。例如，用拮抗性TNFR2抗体的CDR-H3、例如TNFRAB1、TNFRAB2或TNFR2A3的CDR-H3序列置换中性抗TNFR2抗体（即既不是拮抗性也不是激动性的抗体）的CDR-H3序列，将表型中性抗体转化为拮抗性TNFR2抗体，例如显性拮抗性TNFR2抗体，其是即使在TNFR2激动剂例如TNF或IL-2存在下也抑制TNFR2活化的拮抗剂（见例如美国专利公开号2019/0144556）。

[0855] TNFR2拮抗剂抗体或其抗原结合片段可含有SEQ ID NO:1214、1215和1231-1233中任一所示CDR-H1序列；SEQ ID NO:1216、1224和1230中任一所示CDR-H2序列；SEQ ID NO:1217、1223和1225-1229中任一所示CDR-H3序列，或TNFRAB1的CDR-H3，对应于SEQ ID NO:1212的残基99-112；SEQ ID NO:1218和1234-1236任一所示CDR-L1序列，或TNFRAB1的CDR-L1序列，对应于SEQ ID NO:1213的残基24-33；SEQ ID NO:1219、1220、1237和1238中任一所示CDR-L2序列，或TNFRAB1的CDR-L2序列，对应于SEQ ID NO:1213的残基49-55；或SEQ ID NO:1221、1222和1241-1244任一所示CDR-L3序列，或TNFRAB1的CDR-L3序列，对应于SEQ ID NO:1213的残基88-96。可用于开发含有一个或多个上述CDR的人源化抗TNFR2抗体的示例构架区包括但不限于美国专利号7,732,578和8,093,068以及国际申请公开号W0 2003/105782中描述的那些构架区。工程化人源化抗TNFR2拮抗性抗体的另一种方法是将拮抗性TNFR2抗体例如TNFRAB1、TNFRAB2或TNFR2A3的重链可变区和轻链可变区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（见例如“VBASE”人种系序列数据库；也见Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242, (1991); Tomlinson et al., (1992) J.Mol.Biol.227:776-798; 和Cox et al., (1994) Eur.J.Immunol.24:827-836）。以此方式，可以通过序列比对来鉴定可变结构域框架残基和CDR。例如，可以将共有人抗体的CDR-H3取代为拮抗性TNFR2抗体的CDR-H3，例如TNFRAB1、TNFRAB2或TNFR2A3的CDR-H3，以产生人源化TNFR2拮抗剂抗体。示例的共有人抗体的可变域包括SEQ ID NO:1245中所示的重链可变域

和SEQ ID NO:1246中所示的轻链可变域,在美国专利号6,054,297中鉴定(见例如美国专利公开号2019/0144556)。SEQ ID NO:1245的人抗体重链可变结构域的示例共有序列的CDR-H1和CDR-H2序列可以置换为例如表型中性、TNFR2特异性抗体的相应CDR序列,以及SEQ ID NO:1246的人抗体轻链可变结构域的示例共有序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列可以置换为表型中性、TNFR2-特异性抗体的相应CDR序列,以产生人源化的拮抗性TNFR2抗体。

[0856] 可以通过使用本领域已知的技术,例如噬菌体展示、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,或本领域已知的任何其它方法,例如美国专利公开号2019/0144556中描述的那些方法,通过筛选与TNFR2内表位结合的肽鉴定其它TNFR2拮抗剂,例如SEQ ID NO:1247-1464任一所示那些。

[0857] 将人TNFR2拮抗剂mAb添加到标准Treg扩增培养条件时,抑制Treg的扩增并降低其抑制活性(参见Zou et al. (2018) *Front. Immunol.* 9:594)。两种有效的显性抗人TNFR2拮抗剂胜过TNF (TNFR2的天然激动剂),抑制TNF诱导的人Treg体外扩增,并可诱导Treg体外死亡。TNFR2拮抗剂通过F(ab)区特异性结合TNFR2,与Fc区或抗体的交联无关,并通过结合TNFR2的反平行二聚体阻断TNF与TNFR2的结合。结果,Treg中TNF诱导的NF- κ B途径激活受到抑制,跨膜TNFR2(tmTNFR2)向可溶性TNFR2(sTNFR2)的转化受到抑制。发现从卵巢癌组织中分离的Treg对TNFR2拮抗剂mAb诱导的细胞死亡更敏感,因为肿瘤浸润性Treg上的TNFR2表达水平更高。TNFR2拮抗剂还诱导TNFR2⁺OVCAR3(卵巢癌)肿瘤细胞死亡,该肿瘤细胞也表达TNFR2。这些结果表明TNFR2拮抗剂通过靶向肿瘤浸润性Treg和肿瘤细胞治疗肿瘤的治疗潜力(见例如Zou et al. (2018) *Front. Immunol.* 9:594;Torrey et al. (2017) *Sci. Signal.* 10:eaaf8608)。

[0858] 除了抗TNFR2拮抗单克隆抗体,小分子也可以抑制TNFR2。例如,沙利度胺是一种具有免疫调节和抗炎性质的小分子合成谷氨酸衍生物;沙利度胺及其结构类似物来那度胺和泊马度胺,被归类为免疫调节药物。沙利度胺及其类似物通过下调NF- κ B、破坏TNF mRNA以及靶向活性氧和 α 1-酸性糖蛋白来抑制TNF合成,并且还通过抑制细胞内TNFR2向细胞表面的转运来抑制TNFR2在T细胞上的表面表达。已经表明,沙利度胺可降低慢性淋巴细胞白血病患者Treg的数量和功能,而在急性髓性白血病患者中,来那度胺和阿扎胞苷的联合治疗可下调CD4⁺T细胞上的TNFR2表达并减少TNFR2⁺Treg的数量,增强效应子免疫功能。然而,在多发性骨髓瘤患者中,沙利度胺及其类似物治疗增加了Treg的数量,这可能是由于治疗后血清TNF水平升高所致,表明沙利度胺对TNFR2⁺Treg的影响是疾病特异性的(见例如Zou et al. (2018) *Front. Immunol.* 9:594)。

[0859] 另一种TNFR2小分子抑制剂是帕比司他,它是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,可降低FoxP3表达并抑制Treg的抑制活性。帕比司他和阿扎胞苷联合治疗可减少急性髓性白血病患者血液和骨髓中TNFR2⁺Treg的数量,从而增加效应T细胞产生的IFN γ 和IL-2,从而对这些患者产生治疗效果(见例如Zou et al. (2018) *Front. Immunol.* 9:594)。环磷酰胺是一种DNA烷化剂,通常用作癌症治疗中的细胞毒性化疗剂,可在低剂量下抑制Treg的免疫抑制功能,并在单剂量给药后耗尽携带PROb结肠癌小鼠的最大抑制性Treg,导致激活的抗肿瘤免疫应答。在间皮瘤小鼠模型中,环磷酰胺治疗耗尽了TNFR2^{hi} Treg。环磷酰胺与依那西普的组合通过阻断TNF-TNFR2相互作用和消除表达TNFR2的Treg活性来抑制小鼠中已建立的CT26肿瘤的生长(见例如Zou et al. (2018) *Front. Immunol.* 9:594)。雷公藤内酯是一种从

中草药雷公藤中分离出来的免疫抑制分子,抑制小鼠结肠炎模型结肠中的TNF和TNFR2表达,还减少Treg数量并抑制黑色素瘤小鼠的肿瘤生长(见例如Zou et al. (2018) *Front. Immunol.* 9:594)。

[0860] F. TNFR1和/或TNFR2轴的选择性靶向

[0861] 如本文所述,阻断TNF并抑制其通过TNFR1和TNFR2发出信号的现有抗TNF治疗剂在疗效、耐受性和安全性方面受到限制。抗TNF治疗剂通过阻止通过TNFR1进行的TNF信号传导,并消除细胞凋亡和炎症途径,从而改善RA和其它自身免疫和炎症性疾病和病症。然而,这些抗TNF治疗剂也会阻断TNFR2信号传导的有益作用,包括保护性、促生存、促进再生和抗炎信号途径,以及与TNFR2相关的免疫抑制性Treg的扩增,导致严重的、有时是致命的副作用,包括严重的感染。与使用TNF阻断疗法相关的其它副作用包括充血性心力衰竭、肝损伤、脱髓鞘疾病/中枢神经系统疾病、狼疮、银屑病、结节病,以及发生其它自身免疫性疾病和癌症(包括淋巴瘤和实体恶性肿瘤)的易感性增加。抗TNF治疗剂在治疗脱髓鞘和神经退行性疾病方面失败,并且会加剧疾病症状。

[0862] 本文提供了构建体,包括TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、多特异性如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体,以及用于选择性抑制通过TNFR1的TNF信号传导的核酸和方法(见例如图2描绘了示例的双特异性构建体)。还提供了用于选择性抑制通过TNFR1的TNF信号传导的构建体和方法,包括同时维持或增强TNFR2信号传导。这些构建体和方法为治疗TNF/TNFR1轴的疾病和病症提供了改进的治疗方法。这些治疗方法包括但不限于治疗自身免疫、慢性炎症、神经退行性变和脱髓鞘疾病、病症和病况,以及也具有炎症组分的癌症。如本文所述,TNFR1拮抗作用伴随或相继的选择性激动TNFR2具有治疗效果,并且可以通过激活所需的信号途径(例如控制细胞存活和增殖的抗炎途径和NF- κ B途径),并通过诱导免疫抑制性Treg的扩增,其从自身免疫微环境中去除导致组织破坏的过量自身反应性/效应T细胞,由此增强选择性TNFR1拮抗剂的治疗指数。

[0863] 章节1和2描述了针对TNFR1和TNFR2的方法;章节3概述了本文提供的构建体,这些构建体解决了先前方法中的问题,特别是那些针对TNFR1的方法;章节4描述了本文提供的构建体的结构和组件。

[0864] 1. 用TNFR1拮抗剂选择性阻断TNFR1

[0865] 然而,使用多价制剂例如针对TNFR1的抗体是不可行的。TNF三聚体结合三个TNFR1链作为前配体组装复合物,由每个单体TNFR的前配体组装域(plads)介导。这与其中在细胞表面形成簇集之前需要配体结合的大多数受体系统不同。TNF受体是单一跨膜糖蛋白,主要在其胞外域中与含有四个串联重复的富含半胱氨酸的基序的两种受体具有约28%的同源性。其细胞内序列在很大程度上是不相关的,彼此之间几乎没有同源性,并且先前的研究示出其信号传导功能的描述(Grell et al. (1994) *J. Immunol.* 153(5):1963-72)。它们含有几个具有已知功能意义的基序。每个TNFR1和TNFR2均含有一个预复合受体的胞外前配体结合装配域(PLAD)(不同于配体结合区)。当三聚体TNF配体与细胞膜中的TNFR三聚体结合时,会引起构象变化,从而导致信号激活(MacEwan (2002) *Br J Pharmacol.* 135(4):855-875;和Lo et al. (2019) *Sci Signal.* 12(592):eaav5637)。

[0866] 因此,与TNFR1结合的抗体和其它多价制剂可能不适合用作拮抗剂,因为它们会引起超簇集,从而激活TNFR信号传导。另一方面,单价拮抗剂,如单域抗体(dAb或sdAb)、纳米

抗体(Nb;骆驼单域抗体)、scFv片段和Fab片段,与一个TNFR1分子结合,不诱导受体在细胞表面交联或簇集,消除了TNFR1信号传导的任何激活作用。单价拮抗剂可以结合TNFR1胞外结构域的结构域1、2、3或4,或结合跨越多个结构域的表位(见例如美国专利号9,028,817和9,028,822),但这些现有的拮抗剂是无效的治疗剂。各种问题包括血清半衰期短、免疫原性和其它问题。可以用具有本文描述和提供的性质的TNFR1拮抗剂实现TNFR1的选择性阻断。

[0867] 2. 用TNFR2激动剂选择性激活TNFR2

[0868] 如本文所述,可使用TNFR2特异性激动剂实现TNFR2的选择性激活,其可包括例如TNFR2激动性抗体及其抗原结合片段,以及TNFR2选择性TNF突变蛋白及其融合蛋白。可以使用结合人TNFR2的第一和/或第二表位的抗体的抗原结合片段。TNFR2的第一个表位包括SEQ ID NO:4的氨基酸残基48-67,第二个表位包括SEQ ID NO:4的第135位,包括例如SEQ ID NO:4的残基128-147、130-149、135-147或135-153(见例如国际申请公开号WO 2014/124134;和美国专利号9,821,010)。TNFR2上的其它表位已被鉴定,可用于设计具有TNFR2选择性的抗原结合片段,如下所述。

[0869] 与TNFR1的拮抗作用相反,为了激动TNFR2,使用二聚体和三聚体分子模拟膜结合TNF的作用,所述TNF是激活TNFR2的主要配体。因此,TNFR2激动剂包括TNFR2选择性TNF突变蛋白和抗体片段。示例的是与多聚化结构域、特别是二聚化或三聚化结构域融合的TNF突变蛋白和抗体片段,如下所述。为了延长这些分子的半衰期,可以将其结合或偶联于具有或不具有可裂解接头的聚乙二醇(见例如Santi et al. (2012)

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.109:6211-6216),或融合或结合于半衰期延长蛋白或肽,例如人血清白蛋白(有或没有FcRn优化,以及本身是否被聚乙二醇化);以及抗体的ADCC失活的/FcRn优化的Fc域,有或没有聚乙二醇化(见例如Strohl (2015) BioDrugs 29(4):215-239的综述)。半衰期延长剂包括例如聚乙二醇化、糖基化修饰、唾液酸化、PAS化(PAS氨基酸的聚合物,长度约为100-200个残基)、ELP化(见例如Floss et al. (2010) J.Trends Biotechnol.28(1):37-45)、Hapylation(甘氨酸均聚物)、与人血清白蛋白融合、与GLK融合、与CTP融合、GLP融合、与人免疫球蛋白(IgG)的恒定片段(Fc)结构域融合、与转铁蛋白融合、与非结构化多肽融合,例如XTEN(也称为rPEG,非精确重复肽序列的基因融合,含有A、E、G、P、S和T,见例如Schellenberger et al. (2009) Nat Biotechnol.27(12):1186-90),以及其它增加尺寸、增加流体动力学半径、改变电荷或靶向受体以进行再循环而不是清除的修饰和融合,以及这种修饰的组合。下面详细讨论和举例说明半衰期延长剂的具体实例。

[0870] 3. TNFR1拮抗剂构建体,TNFR2激动剂构建体;多特异性、包括双特异性TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂构建体

[0871] 因此,本文提供了用于抑制TNFR1信号传导/活性和/或用于激动TNFR2的构建体。本文提供的构建体中包括以下讨论的构建体,其是多特异性的,例如抑制TNFR1信号传导和激动TNFR2的双特异性。在设计这些构建体时要注意,因为双特异性拮抗剂TNFR1或TNFR2可以抑制TNF诱导静息三聚体TNFR构象发生激活变化的能力,从而阻止其信号传导。其它多聚体分子有受体聚集的风险,从而迫使TNFR发出细胞炎症和细胞凋亡信号。本文的多特异性构建体通常靶向不同的受体,例如TNFR1和TNFR2中的每一个。通过抑制TNFR1信号传导,并有利地激动TNFR2活性,这提供了对涉及TNF的疾病、病症和病况的改进治疗。

[0872] 在本文提供的构建体中有TNFR1拮抗剂构建体。这些包括融合蛋白构建体,例如

TNFR1拮抗剂-Fc融合构建体。如本文所述和实施例中举例说明的,可以选择、产生或设计特异性靶向TNFR1、不拮抗或基本上不拮抗TNFR2、或包括或表现出TNFR2激动剂活性的TNFR1拮抗剂。TNFR1拮抗剂构建体改进了先前TNFR1拮抗剂的治疗功效和安全性,包括单价拮抗剂例如dAb、scFvs和Fab。

[0873] 还提供了选择性TNFR2激动剂构建体,例如改进现有TNFR2激动剂疗效的TNFR2-Fc融合构建体。例如,如本文所示,Fc融合构建体的半衰期增加了现有TNFR1拮抗剂或TNFR2激动剂的半衰期,例如这降低了给药频率,提高了患者依从性,并提高了治疗指数。还提供了选择性TNFR2激动剂构建体,例如改进现有TNFR2激动剂疗效的TNFR2-Fc融合构建体。例如,如本文所示,Fc融合构建体的半衰期增加了现有TNFR1拮抗剂或TNFR2激动剂的半衰期,例如这降低了给药频率,提高了患者依从性,并提高了治疗指数。包括聚乙二醇化和与肽融合的合备选候选半衰期延长剂,在上文进行了讨论,示例的延长剂在下文详述(综述于Strohl (2015) *BioDrugs* 29(4):215-239,另见Tan et al. (2018) *Current Pharmaceutical Design* 24:4932-4946),但也包括使用线性或支链PEG的PEG化(见例如Swierczewska et al. (2015) *Expert Opin Emerg Drugs* 20(4):531-536)。

[0874] TNFR1激动剂结构包括一个任意的接头和一个任意的活性调节剂。它们可以按任何顺序组装。TNFR1拮抗剂构建体的结构可由式1表示:

[0875] (TNFR1抑制剂)_n-接头_p-(活性调节剂)_q,式1a,或

[0876] (活性调节剂)_q-接头_p-(TNFR1抑制剂)_n,式1b,其中:

[0877] n和q均为整数,且各自独立地为1、2或3;p是0、1、2或3;活性调节剂是修饰成具有降低的或没有ADCC活性的部分,例如多肽,例如白蛋白或Fc,其增加TNFR1抑制剂的血清半衰期;TNFR1抑制剂是与TNFR1结合并抑制其活性的分子,例如多肽或药物小分子。所述活性调节剂不是人血清白蛋白抗体或未修饰的Fc。还提供了式3的TNFR2激动剂:(TNFR2激动剂)_n-接头_p-(活性调节剂)_q,其中n、p和q、接头和活性调节剂如式1所示。

[0878] 还提供了多特异性、包括双特异性的构建体,其含有直接或通过接头连接的TNFR1拮抗剂(TNFR1抑制剂)和TNFR2激动剂。此类构建体可包括上式的TNFR1拮抗剂或可具有如下式2所示的结构。所述双特异性和多特异性构建体选择性抑制炎症和有害的TNFR1信号传导,增强保护性和抗炎性TNFR2信号传导。与之前的TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂相比,它们包括提供有利的药代动力学性质的部分,包括增加的血清半衰期和稳定性,以及减少的外周清除率。

[0879] 本文提供的多特异性例如双特异性分子/构建体的结构由下式(式2)表示:

[0880] (TNFR1抑制剂)_n-(活性调节剂)_{r1}-接头(L)_p-(活性调节剂)_{r2}-(TNFR2激动剂)_q,

[0881] 其中n=1、2或3,p=1、2或3,r1和r2各自独立地=0、1、2,且q=0、1或2。

[0882] 与式1一样,组分的顺序可以变化。接头可以含有多个组分,例如GS接头、聚合物部分,例如PEG,或其它此类接头,或铰链区,或其它组分组合,并且所述活性调节剂是修饰构建体的活性,例如Fc区或修饰的Fc区,或增加半衰期或对内源性抑制剂的抗性的多肽。式1和2的组分可以是多肽或可以含有其它分子,例如特异性结合化学接头的小分子药物,或非肽活性调节剂。每个组件的示例如下所述。

[0883] 还提供了含有(式5)的构建体:

[0884] (TNFR2激动剂)_n-接头_p-(活性调节剂)_q,式5a,或

[0885] (活性调节剂)_q-接头_p-(TNFR2激动剂)_n,式5b,

[0886] 其中每个组分如上式1中所定义,并且TNFR2激动剂可以是小分子或多肽,例如TNFR2单链抗体激动剂或其部分。

[0887] 4. TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体和多特异性、包括双特异性的TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体的组分

[0888] 本文提供的构建体的描述和实例以及构建体的每个组分在以下章节中描述。每种构建体的示例形式由上文的式1和2以及下文的3和4描绘和描述。

[0889] a. TNFR1抑制剂部分(TNFR1拮抗剂)

[0890] 上式1和本文提供的多特异性分子/构建体(上式2)中的TNFR1抑制剂部分是抑制TNFR1信号传导的任何分子,包括多肽或小分子。这包括选择性抑制TNFR1传导信号而不抑制TNFR2信号传导的TNFR1抑制剂。

[0891] 为了避免激动TNFR1的受体簇集,TNFR1拮抗剂构建体通常是单体/单价的。构建体的TNFR1拮抗剂抑制剂组分可以是已知具有TNFR1拮抗剂活性的组分,或者可以例如通过从文库中选择来鉴定,例如噬菌体文库、抗体文库或适体文库。在TNFR1抑制剂部分中,那些是经过修饰或选择以对TNFR1具有更高的特异性或亲和力,及对TNFR1没有或几乎没有(由此这种活性产生的不良副作用低于2级,通常为1级或更低,根据NCI不良事件通用术语标准(CTCAE)分级系统)激动剂活性,并且任选还具有TNFR2激动剂活性。在那些情况下,TNFR1抑制剂部分可以作为单链抗体或本文所述的任何其它形式提供,包括例如连接于半衰期延长剂,例如上文和下文所述的任何半衰期延长剂如修饰的Fc区或Fc二聚体,或连接于增加血清半衰期的另一个或多个部分。

[0892] 例如,如本文所提供的,TNFR1拮抗剂构建体的TNFR1抑制剂组分可以是或可以包括特异性结合TNFR1的人域抗体(dAb)。dAb可以含有可变区重链(VH)或轻链(VL)结构域。用于本文的dAb包括例如以下名称的dAb:DOM1h-574-208(SEQ ID NO:54)(来自DMS5541;参见SEQ ID NO:38)、GSK1995057(参见SEQ ID NO:55)和GSK2862277(参见,SEQ ID NO:56),以及SEQ ID NO:57-672任一所示dAb;见例如:美国专利号9,028,817和9,028,822;美国公开号:2006/0083747、2010/0034831、和2012/0107330;及国际申请公开号:WO 2004/058820、WO 2004/081026、WO 2005/035572、WO 2006/038027、WO 2007/049017、WO 2008/149144、WO 2008/149148、WO 2010/094720、WO 2011/051217、WO 2011/006914、WO 2012/172070、WO 2012/104322、和WO 2015/104322,及其它相关家族成员的申请和专利;也见Enever et al., (2015) Protein Engineering, Design&Selection 28(3):59-66,其提供了各种dAb的序列和讨论)。提供了含有重链的Vhh dAb。这些dAb可以直接或间接连接于增加血清半衰期的部分,例如Fc或HSA,并且还可以赋予构建体其它性质或活性。

[0893] 抗-TNFR1抑制剂组分可以是或包括纳米抗体。其中的例子是(Nb)Nb 70和/或Nb 96(分别参见SEQ ID NO:683和684)。调查这些dAb和Nb的免疫原性,并且如果需要,使用分子建模和诱变对其进行修饰以去除预测的免疫原性序列。可通过本领域已知的标准方法消除免疫原性序列。例如,鉴定潜在的抗原性肽,并对每个氨基酸进行保守置换,以鉴定那些不具有抗原性且保留活性的氨基酸。其它方法是已知的(见例如Schubert et al. (2018) PLoS Comput Biol.14(3):e1005983,其描述了一种蛋白质去免疫方法)。

[0894] 因此,例如,TNFR1拮抗剂dAb部分可以是SEQ ID NO:54-672中任一所示dAb,或与

SEQ ID NO:54-672中任一所示dAb具有约或至少约85%、90%、95%、98%、99%或更高序列相同性的dAb,或本领域技术人员已知的TNFR1拮抗剂dAb。

[0895] 其它TNFR1拮抗剂包括例如抗原结合抗体片段。例如,TNFR1拮抗剂可以是Fab片段、Fab'片段、单链Fv(scFv)、二硫键连接的Fv(dsFv)、Fd片段、Fd'片段、单链Fab(scFab)、hsFv(螺旋-稳定的Fv),游离轻链,或上述任何一种的抗原结合片段。它还可以包括接头,例如构建体中的GS接头,例如以增加柔性。

[0896] 例如,拮抗剂的TNFR1抑制剂部分可以含有来自称为ATROSAB的TNFR1拮抗抗体的抗原结合片段。所述片段包括ATROSAB的一个或多个(或所有)重链或轻链CDR,或与其表现出至少85%、90%、95%或更多序列相同性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性)的CDR。TNFR1拮抗剂可含有ATROSAB的VH(SEQ ID NO:31的残基1-115)和/或VL(SEQ ID NO:32的残基1-113),或与ATROSAB的VH或VL具有至少85%、90%、95%或更多序列相同性VH或VL。例如,它可以含有源自ATROSAB的dAb。TNFR1拮抗剂可以含有ATROSAB的其它单价抗体片段,包括例如Fab或scFv片段,例如SEQ ID NO:679和680分别所示的ATROSAB Fab(FabATR)轻链和重链,或ATROSAB scFv(scFv IZI06.1)如SEQ ID NO:673所示。例如,scFv含有VH结构域,对应于ATROSAB重链的残基1-115(参见SEQ ID NO:31),通过短肽接头(例如,GGGSGGGSGGSAQ,如SEQ ID NO:673所示,或SEQ ID NO:813-834任一所示接头)连接于VL结构域,对应于ATROSAB轻链的残基1-113(参见SEQ ID NO:32)。TNFR1拮抗剂可含有对TNFR1具有增加的亲和力或选择性或两者的ATROSAB scFv变体,包括scFv IG11,其包括或具有SEQ ID NO:674所示序列,scFv T12B,其含有SEQ ID NO:675所示序列,或scFv 13.7,其含有SEQ ID NO:676所示序列,或含有与scFv IG11、scFv T12B和scFv 13.7序列至少90%序列相同性的变体。TNFR1拮抗剂还可包括来自Fab 13.7轻链和重链(源自scFv 13.7)的氨基酸残基序列,分别如SEQ ID NO:681和682所示。

[0897] TNFR1拮抗剂构建体中的TNFR1抑制剂还包括与TNFR1结合以减少或抑制信号传导的TNF变体(突变蛋白)。这些包括例如TNF变体(突变蛋白),例如但不限于含有一种或多种以下突变的TNF变体:L29S、L29G、L29Y、R31E、R31N、R32Y、R32W、S86T、L29S/R32W、L29S/S86T、R32W/S86T、L29S/R32W/S86T、R31N/R32T、R31E/S86T、R31N/R32T/S86T和E146R,参考SEQ ID NO:2,它们赋予对TNFR1的选择性。TNFR1拮抗剂可含有例如衍生自称作XPro1595(参见SEQ ID NO:701)的突变蛋白的TNFR1选择性拮抗性TNF突变蛋白。XPro1595含有突变V1M、R31C、C69V、Y87H、C101A和A1456R,参考SEQ ID NO:2。其它示例性TNFR1选择性拮抗性TNF突变蛋白源自XENP345(参见SEQ ID NO:702),其含有突变I97T/A145R,参考SEQ ID NO:2;和称作R1antTNF(参见SEQ ID NO:703)的TNFR1选择性拮抗性TNF突变蛋白,其含有突变A84S、V85T、S86T、Y87H、Q88N和T89Q,参考SEQ ID NO:2。用于TNFR1拮抗剂的TNFR1抑制剂还包括可以化学缀合到接头的小分子抑制剂。

[0898] 如本文所述,参见例如实施例,TNFR1抑制剂(拮抗剂)部分可以被修饰以提高其对TNFR1的特异性/选择性,并且还可以任选地被修饰以具有TNFR2激动剂活性。TNF以低pM亲和力(K_d 19pM)与TNFR1结合;一般而言,本文的拮抗剂至少具有与TNF相同的亲和力,除非其活性是由于将受体“锁定”在非活性构象中,否则就没有必要了,因为受体已被锁定。本文提供的TNFR1拮抗剂构建体包括那些以小于或小于约100nM的 K_D 值特异性结合TNFR1的TNFR1拮抗剂构建体(例如小于或等于:95nM,90nM,85nM,80nM,75nM,70nM,65nM,60nM,

55nM, 50nM, 45nM, 40nM, 35nM, 30nM, 25nM, 20nM, 15nM, 10nM, 5nM, 4nM, 3nM, 2nM, 或1nM)。在某些实施方案中, TNFR1拮抗剂特异性结合TNFR1, K_D 值小于1nM(例如, 小于或等于: 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)。

[0899] 本文提供的TNFR1拮抗剂构建体也经过选择或设计, 使其缺乏或减少对其它TNFR超家族成员的结合。例如, 使用任何合适的体外结合测定, 对其进行评估以鉴定那些不特异性结合另一TNFR超家族成员例如TNFR2的那些TNFR1拮抗剂构建体。测定包括例如基于ELISA的方法。例如, TNFR1拮抗剂构建体可以特异性结合人TNFR1或TNFR1衍生肽, 其TNFR1亲和力大于对另一个家族成员或其相应肽的亲和力。增加的亲和力是例如TNFR1拮抗剂对另一TNFR超家族成员如TNFR2的亲力的至少或至少约5倍高(例如至少或等于5倍, 6倍, 7倍, 8倍, 9倍, 10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, 1,000倍, 2,000倍, 3,000倍, 4,000倍, 5,000倍, 6,000倍, 7,000倍, 8,000倍, 9,000倍, 10,000倍高, 或更高)。

[0900] 在本文提供的TNFR1拮抗剂构建体中, 是那些在与TNFR1相互作用时表现出高 k_{on} 值和低 k_{off} 值的构建体, 与高亲和力受体结合一致。例如, 本文提供的TNFR1拮抗剂构建体在TNFR1存在下可表现出大于或等于或大于约 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 的 k_{on} 值(例如, 大于或等于 $1.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $1.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $2.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $2.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $3.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $3.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $4.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $4.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $5.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $5.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $6.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $6.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $7.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $7.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $8.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $8.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $9.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $9.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $1.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $1.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $2.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $2.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $3.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $3.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $4.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $4.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $5.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $5.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $6.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $6.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $7.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $7.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $8.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $8.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $9.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $9.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, $1.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$)。例如, 当与TNFR1复合时, 本文提供的TNFR1拮抗剂可以表现出小于或等于或小于约 $10^{-3} s^{-1}$ 的 k_{off} 值(例如小于或小于约 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$, $9.5 \times 10^{-4} s^{-1}$, $9.0 \times 10^{-4} s^{-1}$, $8.5 \times 10^{-4} s^{-1}$, $8.0 \times 10^{-4} s^{-1}$, $7.5 \times 10^{-4} s^{-1}$, $7.0 \times 10^{-4} s^{-1}$, $6.5 \times 10^{-4} s^{-1}$, $6.0 \times 10^{-4} s^{-1}$, $5.5 \times 10^{-4} s^{-1}$, $5.0 \times 10^{-4} s^{-1}$, $4.5 \times 10^{-4} s^{-1}$, $4.0 \times 10^{-4} s^{-1}$, $3.5 \times 10^{-4} s^{-1}$, $3.0 \times 10^{-4} s^{-1}$, $2.5 \times 10^{-4} s^{-1}$, $2.0 \times 10^{-4} s^{-1}$, $1.5 \times 10^{-4} s^{-1}$, $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$, $9.5 \times 10^{-5} s^{-1}$, $9.0 \times 10^{-5} s^{-1}$, $8.5 \times 10^{-5} s^{-1}$, $8.0 \times 10^{-5} s^{-1}$, $7.5 \times 10^{-5} s^{-1}$, $7.0 \times 10^{-5} s^{-1}$, $6.5 \times 10^{-5} s^{-1}$, $6.0 \times 10^{-5} s^{-1}$, $5.5 \times 10^{-5} s^{-1}$, $5.0 \times 10^{-5} s^{-1}$, $4.5 \times 10^{-5} s^{-1}$, $4.0 \times 10^{-5} s^{-1}$, $3.5 \times 10^{-5} s^{-1}$, $3.0 \times 10^{-5} s^{-1}$, $2.5 \times 10^{-5} s^{-1}$, $2.0 \times 10^{-5} s^{-1}$, $1.5 \times 10^{-5} s^{-1}$, 或 $1.0 \times 10^{-5} s^{-1}$)。

[0901] TNFR1拮抗剂(式1和式2的构建体的TNFR1抑制剂部分), 例如本文所述的任何TNFR1拮抗剂构建体的C末端可以直接连接或更通常通过接头或组合接头元件连接于活性

调节剂,或通过一个或多个接头与TNFR2激动剂(或小分子TNFR2激动剂)的N末端融合,如下文和本文其它地方所讨论的。或者, TNFR1抑制剂部分的N末端可以融合于TNFR2激动剂的C末端,或者TNFR1抑制剂部分(或小分子TNFR2激动剂)的C末端可以直接或通过接头融合于活性调节剂或接头。

[0902] 下文更详细讨论的接头(L) 是任何改善药理学性质的接头,包括增加稳定性和柔性以及降低空间位阻,以及任选赋予构建体额外的性质。接头可包括多于一个组分,其中每个组分赋予特定性质。例如, TNFR1拮抗剂可包括Ig Fc区和/或抗体较链区和/或短肽接头中的任一个或多个,例如甘氨酸-丝氨酸接头。Fc区被修饰,例如以消除或降低ADCC活性,和/或改变受体结合,和/或其它此类活性和性质。如下所述,接头还包括化学接头。例如,在一些实施方案中,接头是聚(乙二醇)(PEG)分子,或支链PEG分子,例如其分子量为或约30kDa或更高的那些分子。

[0903] b. TNFR2激动剂构建体和TNFR2拮抗剂构建体

[0904] TNFR2激动剂(调节性T细胞生成剂)构建体可用于治疗炎症和自身免疫性疾病以及实体瘤等疾病、病症和病况。调节性T细胞(Treg)抑制自身免疫,并具有免疫抑制作用,例如在肿瘤微环境中。Treg的增殖受TNFR2正向调节, TNFR2的缺失与Treg数量减少和实验性关节炎恶化相关。因此, TNFR2激动剂构建体可用于治疗许多自身免疫性疾病、其它慢性炎症和其它急性炎症(例如SARS、COVID-19)。

[0905] TNFR2拮抗剂构建体抑制调节性T细胞,用于治疗癌症和其它过度增殖性疾病(TNFR2是一种“检查点受体”)。调节性T细胞在肿瘤微环境中积累,并造成抑制抗肿瘤免疫应答。TNFR2拮抗剂构建体用于治疗癌症和其它过度增殖性疾病,例如掌腱膜挛缩症(Dupuytren's Contracture)和特发性肺纤维化。

[0906] 如上所述,还提供了含有TNFR2激动剂的TNFR2激动剂构建体。这些包括直接或通过接头连接于活性调节剂的TNFR2激动剂,还包括多特异性构建体,例如双特异性构建体,其含有各种构型的TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂及接头,具有适当的结构和性质。在一些实施方案中, TNFR2激动剂在双特异性构建体中。TNFR2激动剂,特别是在本文提供的多特异性如双特异性分子/构建体中,选择性地激活或激动TNFR2,而不激活或基本上不激活TNFR1和/或不干扰通过多特异性如双特异性分子的TNFR1拮抗剂部分的TNFR1信号传导的抑制。

[0907] TNFR2激动剂可以是本领域技术人员已知的任何一种,包括激动剂抗体及其抗原结合部分以及抗体的单链和其它构型衍生物,也可以是小分子激动剂。也可以产生TNFR2激动剂,例如通过计算机设计和/或通过制备候选物和筛选文库而产生。例如,可以筛选噬菌体文库或抗体文库或适体文库以鉴定TNFR2激动剂。TNFR2激动剂抗体或其抗原结合片段可通过筛选抗体及其抗原结合片段文库以寻找结合TNFR2内的表位并选择性促进受体激活的功能分子来产生。此类方法和分子的示例是国际申请公开号W0 2017/040312中描述的那些。

[0908] TNFR2选择性激动剂的开发可以包括阐明TNFR2内促进激动性受体结合的表位。使用源自TNFR2不同区域的线性肽以及受约束的环状和双环肽的表位作图分析,表明激动性TNFR2抗体以构象依赖性方式结合来自TNFR2多肽不同区域的表位。例如,一个已鉴定的TNFR2表位包括SEQ ID NO:4的残基56-60(KCSPG)。激动性TNFR2抗体MR2-1与这个表位结合;它不结合含有SEQ ID NO:4的残基142-146(KCRPG)的表位。可选择人TNFR2以结合表位

(例如包括SEQ ID NO:4的残基56-60)。通常,可以选择或设计人TNFR2激动剂以结合人TNFR2内的表位,其含有SEQ ID NO:4的残基96-154内(CGSRCSDDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVAPGT;SEQ ID NO:841)的至少五个不连续或连续的残基,和/或可以结合SEQ ID NO:4的残基111-150内(TREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVA;SEQ ID NO:842)的表位,MR2-1也与之结合。人激动剂还可以结合SEQ ID NO:4残基115-142(NRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK;SEQ ID NO:843)内的表位,和/或SEQ ID NO:4残基122-136(PGWYCALSKQEGCRL;SEQ ID NO:844),和/或SEQ ID NO:4残基96-122(CGSRCSDDQVETQACTR;SEQ ID NO:845),和/或SEQ ID NO:4残基101-107(SSDQVET;SEQ ID NO:846;MR2-1也与其结合)内的表位,和/或SEQ ID NO:4氨基酸48-67(QTAQMCCSKCSPGQHAKVFC;SEQ ID NO:847)内的表位,和/或含有SEQ ID NO:4残基130-149(KQEGCRLCAPLRKCRPGFGV;SEQ ID NO:848)的表位,和/或SEQ ID NO:4残基110-147(CTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRKCRPGF;SEQ ID NO:849),和/或含有来自SEQ ID NO:4位置106-155(ETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTE;SEQ ID NO:850)的至少5个连续或不连续残基的表位,和/或SEQ ID NO:4残基137-144(CAPLRKCR;SEQ ID NO:851),和/或SEQ ID NO:4残基141-149(RKCRPGFGV;SEQ ID NO:852)。

[0909] 另一方面,TNFR2激动剂抗体及其抗原结合片段特异性结合在SEQ ID NO:853-1211任一所示氨基酸残基内或含有所述氨基酸残基的表位,由此抗体或抗原结合片段特异性结合人TNFR2,但不特异性结合另一TNFR超家族成员,特别是TNFR1。人TNFR2激动剂抗体或其抗原结合片段不结合或减弱/减少结合TNFR超家族的其它成员,包括TNFR1(见例如国际申请公开号WO 2017/040312)。

[0910] 可用于筛选TNFR2激动剂的TNFR2内的表位包括其序列如SEQ ID NO:853-1211任一所示的肽。这些肽可以被转化为环状和多环形式(例如,通过将半胱氨酸残基掺入N和C末端位置,或肽链内的不同内部位置),以便将肽片段限制在不同的三维构象,模拟TNFR2的结构刚性框架和TNFR2内肽片段的构象约束。然后将环状和多环肽片段固定在固体表面上并使用ELISA筛选例如结合TNFR2激动性抗体MR2-1的分子。使用这个测定法,在TNFR2表位内含有促进受体激活的残基的肽可以在结构上预组织这些氨基酸,使它们类似于天然蛋白质中相应肽的构象。由此获得的环肽和多环肽(例如,具有SEQ ID NO:853-1194任一所示序列的肽,特别是那些含有KCSPG基序的肽,如SEQ ID NO:905、921、927、970和1085)可用于筛选抗体及其抗原结合片段的文库,以鉴定用于本文的TNFR2激动剂。受限肽充当TNFR2内促进受体激活的表位的替代物,因此使用该筛选技术生成的抗体或抗原结合片段与TNFR2中的相应表位结合并且是受体活性的激动剂(见例如国际申请公开号2017/040312)。为了产生TNFR2激动剂,使用噬菌体展示技术。在发生特异性结合的条件下接触噬菌体展示文库。将TNFR2衍生的肽(例如SEQ ID NO:853-1194任一所示肽)固定在固体支持物上或噬菌体中。含有TNFR2结合部分的噬菌体与固体支持物上的靶标形成复合物,未结合的噬菌体被洗掉。然后将缓冲液改变至极端pH(pH 2或10)、改变离子强度、添加变性剂或通过其它已知方法将结合的噬菌体从靶标中释放出来。为了分离结合噬菌体,可以进行蛋白质洗脱(参见例如国际申请公开号WO 2017/040312)。

[0911] MR2-1是一种示例的激动性TNFR2抗体,其结合TNFR2并增强TNFR2介导的Treg细胞增殖。然而,MR2-1结合骨保护素,可以对这个抗体的重链和/或轻链可变区、或者特别是

MR2-1的重链和/或轻链CDR进行修饰,以消除所得抗体或片段结合除TNFR2之外的TNFR超家族成员的能力,产生激动性TNFR2抗体或其抗原结合片段。这可以使用基因工程和/或抗体库筛选技术来实现,例如国际申请公开号WO 2017/040312中所述。

[0912] 如本文所提供,TNFR2激动剂可含有激动性人抗TNFR2抗体的抗原结合片段,例如MR2-1和MAB2261,例如来自Hycult Biotech的可商购的MR2-1;和来自R&D Systems的MAB2261。例如,MR2-1或MAB2261的 V_H 和 V_L 结构域,或其中包含的一个或多个CDR,用于生成TNFR2激动剂。这种激动剂可以含有对TNFR2具有特异性的人域抗体(dAb);dAb可以含有MR2-1或MAB2261的可变区重链(V_H)或轻链(V_L)结构域,或者与MR2-1或MAB2261的 V_H 或 V_L 具有至少或至少约85%、90%、95%或更高序列相同性的 V_H 或 V_L ,条件是所得TNFR2保留TNFR2激动剂活性。TNFR2激动剂还可以含有源自MR2-1或MAB2261抗体的其它抗原结合片段,或与其具有至少或至少约85%、90%、95%或更多序列相同性的氨基酸序列,例如Fab片段、Fab'片段、 $F(ab')_2$ 片段、Fv片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、Fd片段、Fd'片段、单链Fv(scFv)、单链Fab(scFab)、hsFv(螺旋稳定的Fv)、微型抗体、双抗体、抗独特型(抗Id)抗体、游离轻链或上述任何一种的抗原结合片段。抗体片段包括任何上述片段的组合,例如串联scFv、Fab-scFv(HC C末端,或LC C末端)、 $Fab-(scFv)_2$ (C末端)、scFv-Fab-scFv、 $Fab-C_H2-scFv$ 、scFv融合(C末端或N末端)、Fab融合(HC C末端或LC C末端)、scFv-scFv-dAb、scFv-dAb-scFv、dAb-scFv-scFv和三体。TNFR2激动剂包括其序列在本文中提供或本领域已知的任何dAb,与其具有大约或至少大约85%、90%、95%或更多的序列相同性,以及TNFR2激动剂活性。

[0913] 在一些实施方案中,TNFR2激动剂可以是TNFR2激动性单克隆抗体的scFv,包括本领域已知的任何scFv,或与这种scFv具有约或至少约85%、90%、95%或95%以上序列相同性的scFv,前提是所得构建体保留TNFR2激动剂活性。在一些实施方案中,TNFR2激动剂可以是TNFR2激动性单克隆抗体的Fab片段或其Fab或具有约或至少约85%、90%、95%或更多序列相同性和TNFR2激动剂活性的Fab。

[0914] TNFR2激动剂还可以是或包括经修饰以结合TNFR2并具有激动剂活性的TNF突变蛋白(参见例如SEQ ID NO:765-800)。这种实施方案的示例是含有TNFR2选择性TNF突变蛋白的TNFR2激动剂,所述突变蛋白例如是具有一种或多种以下TNFR2选择性突变的TNF变体:K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V,A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D,Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D,L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D,A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D,A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D,D143V/F144L/A145S,和D143V/A145S,及其组合,如D143V/A145S与S95C/G148C的组合,参考SEQ ID NO:2。例如,具有突变D143N/A145R(SEQ ID NO:781)的TNF变体结合并激动TNFR2,并且可用于本文提供的构建体中。参考SEQ ID NO:2,具有突变S95C/G148C以及与其它列出或已知或鉴定的任何突变的组合的TNF突变蛋白,也是可以包括在本文提供的构建体中的TNFR2选择性激动剂。

[0915] TNFR2激动剂可以含有单链TNFR2选择性TNF突变蛋白三聚体与多聚化结构域的融合。如本文所述,TNFR2的主要配体是膜结合TNF(memTNF;本文也称为跨膜TNF或tmTNF)。添加多聚化结构域,例如二聚化或三聚化结构域,分别生成与TNF亚基相关的六聚体或九聚体

分子;这些TNF的六聚体和九聚体模拟膜结合的TNF三聚体,从而激活TNFR2信号传导。二聚化结构域包括例如上文讨论的EHD2(SEQ ID NO:808)。EHD2来源于IgE的重链C_H2结构域,及MHD2(SEQ ID NO:811),其来源于IgM的重链C_H2结构域。二聚化结构域还包括Fc结构域,例如源自IgG1(参见SEQ ID NO:10)和IgG4(参见SEQ ID NO:16)的那些,任选包括修饰,例如改变免疫效应子功能和/或增强FcRn再循环的那些修饰。三聚化结构域包括,例如鸡腱糖蛋白C(TNC)的三聚化结构域(SEQ ID NO:805)和人TNC的三聚化结构域(SEQ ID NO:807)。二聚化和三聚化增强了TNFR2信号传导,并改善了构建体的药理学性质。例如,融合蛋白的半衰期通过增加分子的分子量和/或通过引入FcRn再循环而增加,例如当二聚化结构域是Fc时。

[0916] 如本文所提供,TNFR2激动剂可含有TNF突变蛋白(TNFmut)三聚体链,具有本文所述的赋予对TNFR2选择性和/或减少或消除与TNFR1结合的任何突变。此类突变的示例是置换D143N/A145R(参考SEQ ID NO:2),与多聚化结构域(MD)例如二聚化或三聚化结构域融合。多聚化结构域可以融合于TNF突变蛋白三聚体链的N或C末端,并且在每个TNF突变蛋白之间以及TNF突变蛋白三聚体链和多聚化结构域之间包括接头。

[0917] 此类TNFR2激动剂具有式4和5:

[0918] MD-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-TNFmut(式4),或

[0919] TNFmut-L1-TNFmut-L2-TNFmut-L3-MD(式5),

[0920] 其中MD是多聚化结构域(活性调节剂);TNFmut是TNFR2选择性TNF突变蛋白,例如具有突变D143N/A145R的突变蛋白;L1、L2和L3是如下所述接头,例如Gly-Ser接头,其可以相同也可以不同。

[0921] 在具体实施方案中,多聚化结构域是EHD2(SEQ ID NO:808)、MHD2(SEQ ID NO:811)、鸡TNC三聚化结构域(SEQ ID NO:805)、人TNC三聚化结构域(SEQ ID NO:807)、IgG1 Fc或IgG4 Fc。当二聚化结构域是IgG1 Fc或IgG4 Fc时,其是用于连接TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂的相同Fc,而不是额外的Fc。可以修饰IgG1或IgG4 Fc以增强或消除免疫效应子功能,例如ADCC、ADCP和/或CDC活性,和/或增强FcRn结合。多聚化结构域,例如Fc区,增加了构建体的体内稳定性和血清半衰期。为了本文的目的,在式1-5的构建体或其变体中的Fc区通常被修饰以改变或调节构建体的药理学性质或活性。下面更详细地讨论Fc修饰。本领域已知的任何多聚化结构域也被考虑用于本文的TNFR2激动剂。

[0922] TNF突变蛋白可以是具有任何一种或多种赋予TNFR2选择性的突变的TNF变体。突变包括例如:K65W,D143Y,D143F,D143N,D143E,D143W,D143V,A145R,A145H,A145K,A145F,A145W,E146Q,E146H,E146K,E146N,D143N/A145R,A145R/S147T,Q88N/T89S/A145S/E146A/S147D,Q88N/A145I/E146G/S147D,A145H/E146S/S147D,A145H/S147D,L29V/A145D/E146D/S147D,A145N/E146D/S147D,A145T/E146S/S147D,A145Q/E146D/S147D,A145T/E146D/S147D,A145D/E146G/S147D,A145D/S147D,A145K/E146D/S147T,A145R/E146T/S147D,A145R/S147T,E146D/S147D,D143V/F144L/A145S,和D143V/A145S,参考SEQ ID NO:2。考虑将具有突变D143N/A145R的TNF变体用于本文。本领域已知的赋予TNFR2选择性的任何其它突变也被考虑用于本文。TNF突变蛋白可含有可溶性TNF的完整序列(即SEQ ID NO:2的残基1-157),或可含有可溶性TNF的部分序列,例如SEQ ID NO:2的残基4-157、9-157或12-157,其长度足以结合和/或激动TNFR2。

[0923] L1、L2或L3接头可以相同或不同。特别地，接头可以含有短肽接头，例如GS接头。例如，接头可以含有(GGGGS)_n，其中n=1-5 (SEQ ID NO:1471)。接头还可以含有TNF- α 茎区的全部或一部分(至少10、15或20个连续残基)，含有氨基酸序列GPQREEFPRLDLSLISPLAQAVRSSRTPSDK (SEQ ID NO:812)，对应于SEQ ID NO:1所示TNF全长序列(跨膜TNF)的残基57-87。例如，含有茎区的全部或一部分、含有至少10、15或20个连续氨基酸残基的接头可以在TNF突变蛋白N-或C-末端和多聚化结构域之间。所有三个接头都可以是(GGGGS)_n，其中n通常为1-10 (SEQ ID NO:1472)，或Gly-Ser的其它组合，或者可以含有Gly-Ser残基的混合物，例如(GGGGS)_n和TNF茎区的全部或一部分，含有至少10、15或20个连续的氨基酸残基。示例接头在SEQ ID NO:813-834、1471和1472中示出。

[0924] 本文提供的TNFR2激动剂包括那些以小于或等于或小于约100nM的K_D值特异性结合TNFR2的激动剂(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)。在某些情况下，TNFR2激动剂特异性结合TNFR2，其K_D值小于1nM(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)。

[0925] TNFR2激动剂是一种例如在施用激动剂的受试者体内可以诱导Treg(例如CD4⁺、CD25⁺FOXP3⁺Treg)增殖的激动剂，或为了测试目的在含有Treg的样品中在体外与TNFR2激动剂接触。Treg的增殖相对于含有未用TNFR2激动剂处理的细胞群的受试者或样品可以被诱导例如约0.00001%至100.0%(例如0.00001%、0.00002%、0.00003%、0.00004%、0.00005%、0.00006%、0.00007%、0.00008%、0.00009%、0.0001%、0.0002%、0.0003%、0.0004%、0.0005%、0.0006%、0.0007%、0.0008%、0.0009%、0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%、7.0%、8.0%、9.0%、10.0%、20.0%、30.0%、40.0%、50.0%、60.0%、70.0%、80.0%、90.0%或100%)，例如通过FACS分析测量。

[0926] 因此，TNFR2激动剂可用于促进Treg细胞增殖，并可施用于患有自身免疫或慢性炎症性疾病或病症的哺乳动物受试者，例如人患者，以减弱患者中免疫应答的强度和持续时间(例如，应答自身或非威胁性外来抗原而在体内产生的CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞的数量)。例如，将TNFR2激动剂施用于人患者，或通过用TNFR2激动剂治疗离体扩增的Treg细胞群，相对于未用TNFR2激动剂治疗的受试者可导致与自身或非威胁性抗原交叉反应的分泌的免疫球蛋白(例如IgG)的量减少或减少约0.00001mg/mL至10.0mg/mL(例如0.00001mg/mL、0.0001mg/mL、0.001mg/mL、0.01mg/mL、0.1mg/mL、1.0mg/mL、或10.0mg/mL)、或0.001-

1.0mg/mL(例如0.001mg/mL、0.005mg/mL、0.010mg/mL、0.050mg/mL、0.10mg/mL、0.20mg/mL、0.30mg/mL、0.40mg/mL、0.50mg/mL、0.60mg/mL、0.70mg/mL、0.80mg/mL、0.90mg/mL、或1.0mg/mL)。另外或或者,相对于未用TNFR2激动剂治疗的受试者,TNFR2激动剂可以降低受试者中细胞毒性T细胞计数(例如CD8⁺T细胞的水平),例如降低或降低约0.00001至100.0%(例如0.00001%、0.00002%、0.00003%、0.00004%、0.00005%、0.00006%、0.00007%、0.00008%、0.00009%、0.0001%、0.0002%、0.0003%、0.0004%、0.0005%、0.0006%、0.0007%、0.0008%、0.0009%、0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%、7.0%、8.0%、9.0%、10.0%、20.0%、30.0%、40.0%、50.0%、60.0%、70.0%、80.0%、90.0%、或100%),例如通过例如FACS分析测量。例如,可以将TNFR2激动剂施用于受试者(例如,哺乳动物受试者,例如人)以治疗自身免疫或慢性炎症性疾病或病症,例如本文所述的那些。以这种方式治疗受试者会减少受试者体内自身反应性CD8⁺T细胞的数量。

[0927] 可对本文提供的TNFR2激动剂进行评估,以鉴定那些缺乏对另一个TNFR超家族成员、特别是TNFR1的特异性结合的激动剂。这可以使用本领域技术人员已知的多种体外结合测定中的任何一种来实现,例如基于ELISA的方法。例如,TNFR2激动剂包括特异性结合人TNFR2或TNFR2衍生肽的那些,例如含有人TNFR2内SEQ ID NO:4的残基48-67的肽片段(QTAQMCSKCSPGQHAKVFC,SEQ ID NO:847),亲和性比所述激动剂对另一种TNFR超家族成员例如TNFR1的亲和力例如至少或至少约2、3、4或5倍高(例如5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10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、1,000倍、2,000倍、3,000倍、4,000倍、5,000倍、6,000倍、7,000倍、8,000倍、9,000倍、10,000倍高或更高)。

[0928] 本文提供的TNFR2激动剂包括那些在与TNFR2相互作用时表现出高 k_{on} 值和低 k_{off} 值的激动剂,与高亲和力受体结合一致。例如,本文提供的TNFR2激动剂在TNFR2存在下可表现出 k_{on} 值大于或等于或大于约 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ (例如,大于或大于约 $1.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $1.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $2.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $3.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $3.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $4.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $4.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $5.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $5.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $6.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $6.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $7.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $7.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $8.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $8.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $9.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $9.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $1.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $2.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $3.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $3.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $4.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $4.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $5.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $5.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $6.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $6.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $7.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $7.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $8.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $8.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $9.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $9.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、或 $1.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$)。例如,当与TNFR2复合时,本文提供的TNFR2激动剂可表现出 k_{off} 值小于或小于约 $10^{-3} s^{-1}$ (例如,小于或小于约 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、 $9.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $9.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $8.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $8.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $7.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $7.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $6.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $6.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $5.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $5.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $4.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $4.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $3.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $3.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $2.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $1.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $9.5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $9.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $8.5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $8.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $7.5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $7.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $6.5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $6.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $5.5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $5.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $4.5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $4.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $3.5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $3.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $2.0 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $1.5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、或 $1.0 \times 10^{-5} s^{-1}$)。

-1)。

[0929] 如本文所提供的, TNFR2激动剂以任何顺序或合适的构型直接或通过接头间接连接于例如上述任何一种TNFR1拮抗剂。例如, TNFR2激动剂(例如本文所述的任何TNFR2激动剂)的N末端通过如下文和本文别处所讨论的一个或多个接头与TNFR1拮抗剂的C末端融合。或者, TNFR2激动剂的C末端可以与TNFR1拮抗剂的N末端融合。当TNFR2激动剂具有式3所示结构时, 多聚化结构域的N末端连接于TNFR1拮抗剂的C末端, 并且当TNFR2激动剂具有式4所示结构时, 多聚化结构域的C末端连接于抗TNFR1拮抗剂的N末端。TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂之间的接头(L)可以包括任何合适的接头及其组合, 例如Ig Fc区和/或抗体铰链区和/或短肽接头中的一种或多种接头, 例如甘氨酸-丝氨酸接头。在一些实施方案中, 接头是30kDa或更大的聚(乙二醇)(PEG)分子或支链PEG分子。如上所述, 当TNFR2激动剂具有式3或4所示的结构时, 如果多聚化结构域是Fc, 则其是用于将TNFR1拮抗剂连接于TNFR2激动剂的相同Fc。

[0930] c. 接头

[0931] 上文的TNFR1拮抗剂构建体(例如式1)、多特异性TNFR1拮抗剂-TNFR2激动剂构建体(例如式2)和TNFR2激动剂构建体(例如式3-5), 任选包括接头以及活性调节剂。所述接头具有多种功能, 包括提供额外或改进的生物学和药理学性质, 以及用于连接不同分子的结构目的。示例接头是Gly-Ser多肽、铰链区(参见例如上表1-4, 其列出了各种铰链区的序列及其组合)。

[0932] 包括的是多肽接头以及用于化学缀合的化学接头。包括接头肽作为多肽之间的间隔, 可以促进正确的蛋白质折叠和多肽的稳定性, 改善蛋白质表达, 并增强所述构建体组分的生物活性。肽接头主要设计为非结构化的柔性肽。接头可以如上文示例的式1-4所示包括在内。例如, 在提供的双特异性构建体中, 所述组分通过接头(L)以N末端融合于C末端或C末端融合于N末端的构型融合。接头通常是肽接头, 包括单独的多肽, 例如Fc区, 或与一个或多个其它接头组合, 包括例如短肽接头, 例如甘氨酸-丝氨酸(GS)接头, 和/或免疫球蛋白(Ig)的铰链区。在本文的实施方案中, 例如, TNFR1拮抗剂的C-末端融合于肽接头的N-末端, 并且肽接头的C-末端融合于TNFR2激动剂的N-末端。在其它实施方案中, TNFR2激动剂的C末端融合于肽接头的N末端, 并且肽接头的C末端与TNFR1拮抗剂的N末端融合。接头提供增加的分子量, 增加稳定性和血清半衰期, 增强组织保留, 并减少或降低外周消除率, 从而改进分子的治疗指数。接头还增加了分子的柔性, 允许分子的每个部分与其靶抗原/表位相互作用, 如本文提供的TNFR1和TNFR2。如下文和本文其它地方所讨论的, 在接头含有免疫球蛋白的Fc区(通常是修饰的Fc区)的实施方案中, 可以赋予额外的性质, 包括例如新生儿Fc受体(FcRn)再循环, 这进一步增加了血清稳定性和半衰期, 和/或增强或消除免疫效应子功能。

[0933] i. 肽接头

[0934] 融合蛋白的接头是本领域技术人员众所周知的。见例如Chen et al. (2013) Adv. Drug. Deliv. Rev. 65:1357-1369, 题目为“Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality”。接头可以被设计或者可以来自或基于来自天然存在的多结构域蛋白质的接头。研究人员根据经验设计的接头通常根据其结构分为3类: 柔性接头、刚性接头和体内可裂解接头, 例如用于递送通过原位接头裂解激活的前药。

[0935] 除了将功能域连接在一起(如柔性和刚性接头)或在体内释放游离功能域(如体内

可切割接头)的作用外,接头还可以连接的部分的性质。这些包括如,改进生物活性、增加表达产量和实现理想的药代动力学特征。用于选择接头的数据库和方法是本领域技术人员已知的(见例如George et al. (2002) “An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding”, Protein Eng. 15:871-879)。

[0936] a) 柔性接头

[0937] 当连接的结构域需要一定程度的移动或相互作用时,通常会应用柔性接头。柔性接头通常富含小氨基酸或极性氨基酸,例如Gly和Ser,以提供良好的柔性和溶解性。当融合蛋白结构域需要某些移动或相互作用(例如在scFv中)时,柔性接头是合适的选择。此外,虽然柔性接头不具有刚性结构,但它们可以作为被动接头以保持功能域之间的距离。可以调整柔性接头的长度以允许正确折叠或实现融合蛋白的最佳生物活性。

[0938] 正如Argos (1990) J. Mol. Biol. 211 (4) :943-958所建议的那样,柔性接头通常由小的非极性(例如Gly)或极性(例如Ser或Thr)氨基酸组成。这些氨基酸的小尺寸提供了柔性,并允许连接功能域的移动性。Ser或Thr的掺入可以通过与水分子形成氢键来维持水溶液中接头的稳定性,因此减少接头与蛋白质部分之间的不利相互作用。

[0939] 示例的柔性接头是主要或仅含有一段Gly和Ser残基序列的接头(“GS”接头)。一个例子是具有(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n序列的柔性接头。通过调整拷贝数“n”,可以选择或选定这个GS接头的长度以实现功能域的适当分离,或保持必要的域间相互作用。柔性接头还富含小氨基酸或极性氨基酸,如Gly和Ser,还可以含有额外的氨基酸,如Thr和Ala,以保持柔性,以及含有极性氨基酸,如Lys和Glu,以改进溶解度。

[0940] 为了赋予蛋白酶抗性并增加融合蛋白的柔性,SCDKTH较链序列和其它较链序列可以用短多肽接头置换或置于在其之前。多肽接头的示例是(Gly-Ser)_n氨基酸序列(GS接头),其中分散有一些Glu或Lys残基以增加溶解度。例如,多肽接头包括但不限于(GlySer)_n,其中n=1-10; (GlySer)₂; (Gly₄Ser)_n,其中n=1-10; (Gly₃Ser)_n,其中n=1-5; (SerGly₄)_n,其中n=1-5; (GlySerSerGly)_n,其中n=1-5; GSGGSSGG; GSSSGSGSGSSG; GSSSGSGSGSSGG; GGSSGG; GGSSGGSGGSSSG; GSSSGSGSGSSSGSGSG; GGSSGGSSGGSSSGSSG; 和GSSSGS(见SEQ ID NO:816-827所示GS接头)。接头可以是长度至少为2至18个残基或更长的聚Gly肽,或具有相同长度和柔性的类似接头。本文提供的分子中的示例多肽接头包括但不限于(Gly-Ser接头见SEQ ID NO:816-827所示):例如GSGS、GGGGS或GGGGSGGGGSGGGGS。另一个提供类似性能的接头是(GGGGS)₄(SEQ ID NO:819)接头。另一个富含Gly和Ser的柔性接头是GSAGSAAGSGEF(SEQ ID NO:828)。这个接头已显示在水溶液中保持良好的溶解度。可以使用仅含有甘氨酸的接头。例如,已知(Gly)₆(SEQ ID NO:1473)和(Gly)₈(SEQ ID NO:1474)接头,并且示出其在从表达生物体纯化蛋白质期间对蛋白水解酶消化是稳定的。

[0941] 一些其它类型的柔性接头,包括KESGSVSSEQLAQFRSLD(SEQ ID NO:829)和EGKSSSGSSESKST(SEQ ID NO:830)。接头中的Gly和Ser残基提供柔性,Glu和Lys改进溶解度。

[0942] b) 刚性接头

[0943] 虽然柔性接头具有被动连接功能域并允许一定程度移动的优势,但这些接头缺乏刚性可能会受到限制。当需要结构域的空间分离以保持融合蛋白的稳定性或生物活性时,则选择刚性接头。刚性接头通过采用 α -螺旋结构或含有多个Pro残基而表现出相对刚性的

结构。接头的长度可以通过改变拷贝数来轻松调整,以实现结构域之间的最佳距离。

[0944] 具有(EAAAK)_n(SEQ ID NO:831)序列的形成 α 螺旋接头已应用于许多重组融合蛋白的构建。 α -螺旋结构是刚性且稳定的,具有节段内氢键和紧密堆积的主链。坚硬的 α -螺旋接头可以充当蛋白质结构域之间的刚性间隔物。刚性接头的实例是:A(EAAAK)_nA(SEQ ID NO:832),其中n=2-5。这个接头显示 α -螺旋构象,由节段内的Glu-Lys⁺盐桥稳定。另一种类型的刚性接头具有富含Pro的序列(XP)_n,其中X表示任何氨基酸,通常是Ala、Lys或Glu。Pro在非螺旋接头中的存在增加了刚度,并允许有效分离蛋白质结构域。这种接头的实例是含有重复-Glu-Pro-和-Lys-Pro-的33个残基的肽。

[0945] 本领域技术人员可以从已知接头或设计接头中进行选择。所需的性质及其必要条件是已知的。以下讨论总结了一些示例接头(参见Chen et al.(2013) Adv. Drug. Deliv. Rev. 65:1357-1369),其中提供了柔性接头和刚性接头以及可裂解接头的详细信息,并且可以使用)。柔性接头富含小氨基酸和/或亲水性氨基酸,如Gly或Ser,以提供结构柔性,并已被用于连接有利于域间相互作用或移动的功能域。在需要充分分离蛋白质结构域的情况下,可以使用刚性接头。刚性接头被设计或选择是采用 α -螺旋结构或掺入脯氨酸的那些接头。刚性接头可以使蛋白质部分保持一定距离。柔性和刚性接头在体内稳定,不允许连接的蛋白质分离。可裂解接头允许通过还原或蛋白水解裂解在体内释放游离的功能域。它们通常用于将前药递送至靶位点。

[0946] 在上式2中,可以包括额外的接头,例如在TNFR1拮抗剂和/或TNFR2激动剂部分与活性调节部分例如Fc部分之间;此类接头可含有例如足以提供柔性的曲妥单抗的全部或部分铰链序列,包括至少残基SCDKTH(对应于SEQ ID NO:26的残基222-227),或含有足以提供柔性的纳武单抗的全部或部分铰链区,具有序列ESKYGPPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)或与其具有至少98%或99%序列相同性的序列,或本领域已知的任何其它合适的抗体铰链区或序列。

[0947] 在某些实施方案中,仅包括GS接头。本领域已知的其它短肽接头也被考虑用于本文提供的双特异性分子中。例如,Fc的N末端或C末端延伸可用作接头。来自人IgG的C末端延伸ELQLEESSAEAQDGELDG(SEQ ID NO:833)或与其具有至少98%或99%序列相同性的序列,或含有序列ELQLEESSAEAQGG(SEQ ID NO:834)的变体或与其具有至少98%或99%的序列相同性的序列,也可用作接头。

[0948] 可以包括第二个Fc亚基,其是或不是融合蛋白(见例如图2,并且可以被修饰以含有凸出凹陷(参见下面的讨论)。其在哺乳动物细胞表达系统中组装以形成凸出凹陷介导的Fc二聚体以产生Fc二聚体,进一步增加所述分子的血清半衰期和稳定性。在某些实施方案中,第二个Fc亚基与第二个TNFR2激动剂融合,产生二价抗体样结构。在其它实施方案中,仅包括一个Fc亚基(Fc单体)。

[0949] ii. 化学接头

[0950] 在一些实施方案中,接头是化学接头。这些包括作为不可切割部分、化学交联剂和多肽修饰剂例如聚合物分子、包括聚乙二醇化部分等接头。化学接头更适合创建支链构建体和使用肽接头无法实现的其它结构。

[0951] 示例的接头包括不可切割的接头。不可切割的接头包括例如酰胺接头和具有琥珀酸酯间隔物的酰胺和酯键(见例如Dosio et al., (2010) Toxins 3:848-883)。示例的化学

交联接头包括但不限于SMCC(琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯)和SIAB(琥珀酰亚胺基-(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯)。SMCC是一种胺-巯基交联剂,在中等长度的环己烷稳定的间隔臂的相对端含有NHS-酯和马来酰亚胺反应基团。SIAB是一种短的李HS酯和碘乙酰基交联剂,用于胺与巯基的缀合。其它示例性交联剂包括但不限于硫醚接头、化学不稳定的脞接头、4-巯基戊酸、BMPEO、BMPs、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SMPB、SMPH、硫代-EMCS、硫代-GMBS、硫代-KMUS、硫代-MBS、硫代-SIAB、硫代-SMCC,和硫代-SMPB,以及SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基磺酰基)苯甲酸酯),和双马来酰亚胺试剂,如DTME、BMB、BMDB、BMH、BMOE、BM(PEO)₃、和BM(PEO)₄,这些是可商购的(Pierce Biotechnology, Inc.)。双马来酰亚胺试剂允许抗体的半胱氨酸残基的游离硫醇基团以相继或同时的方式连接于含硫醇的靶向剂或接头中间体。除马来酰亚胺外,其它硫醇反应性官能团包括碘乙酰胺、溴乙酰胺、乙烯基吡啶、二硫化物、吡啶基二硫化物、异氰酸酯和异硫氰酸酯。其它示例接头和使用方法是本领域技术人员众所周知的,例如美国专利公开号2005/0276812和Ducry et al. (2010) *Bioconj. Chem.* 21:5-13中描述的接头和方法。

[0952] 接头任选可被调节性质如溶解度和反应性的基团取代。例如,磺酸盐取代基可以增加试剂的水溶性并促进接头试剂与抗体或药物部分的偶联反应,和/或促进偶联反应。接头试剂也可以通过商业来源获得,例如Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO.), 或根据以下所述方法合成: Toki et al. (2002) *J. Org. Chem.* 67:1866-1872; 美国专利号6,214,345; 美国公开号2003/130189和2003/096743; 及国际申请公开号WO 02/088172、WO 03/026577、WO 03/043583和WO 04/032828。例如,接头试剂如DOTA-马来酰亚胺(4-马来酰亚胺丁酰胺苄基-DOTA)可以通过氨基苄基-DOTA与用氯甲酸异丙酯(Aldrich)活化的4-马来酰亚胺丁酸(Fluka)反应制备,根据Axworthy et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(4):1802-1807所述方法进行。DOTA-马来酰亚胺试剂与半胱氨酸工程化抗体的游离半胱氨酸氨基酸反应并在抗体上提供金属络合配体(Lewis et al. (1998) *Bioconj. Chem.* 9:72-86)。螯合接头标记试剂,例如DOTA-NHS(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸单(N-羟基琥珀酰亚胺酯))是可商购的(MacroCyclics, Dallas, TX)。

[0953] 接头可以是树突状接头,用于通过分支的多功能接头部分将超过一个的部分共价连接于抗体(见例如Sun et al. (2002) *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun et al. (2003) *Bioorganic&Medicinal Chemistry* 11:1761-1768; King et al. (2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990)。如果抗体仅带有一个反应性半胱氨酸硫醇基团,则可以通过树突状接头连接许多其它部分。示例的树突状接头试剂是已知的(参见例如美国专利公开号2005/0276812)。

[0954] 化学接头(也可以是用于本文构建体的活性调节剂)的另一个实例是PEG分子和支链PEG分子,特别是那些具有30kDa或更大分子量的分子。PEG接头提供了多特异性和二价性的引入(在TNFR2激动剂的情况下,受体簇集增强了信号传导),并增加了分子的分子量,从而增加了体内血清半衰期。PEG接头还改进了抗体再工程化中的困难,例如通过避免引入快速降解和清除和/或引起免疫原性的非天然结构。

[0955] d. 活性调节剂

[0956] 在构建体的组分中是调节或改变构建体的活性和/或药理学性质的部分或区域(见上式1和2)。此类的示例是Fc区、修饰的Fc区、其它多聚化结构域、Fc和修饰的Fc的二聚

体以及其它部分,例如聚合物部分,包括多肽例如半衰期延长多肽,白蛋白例如人血清白蛋白(HSA)和转铁蛋白,以及聚合物,例如本文别处讨论的PEG,它们可以增加血清半衰期。活性调节剂可以赋予一些性质,例如但不限于通过减少对蛋白酶的接触、降低肾脏过滤和/或通过受体介导的再循环改变细胞内路径来延长血浆半衰期;通过与经历转胞吞作用的受体结合,提供跨上皮双层的吸收;靶向过表达或独特表达特定受体或抗原的体内位点;和其它性质,如在下面的讨论中举例说明的,并且也是本领域已知的性质。

[0957] 如本文所提供的,构建体可以包括作为活性调节剂的人免疫球蛋白例如IgG的Fc区,例如IgG1 Fc (SEQ ID NO:10)、IgG2 Fc (SEQ ID NO:12)、IgG3 Fc (SEQ ID NO:14)或IgG4 Fc (SEQ ID NO:16)。特别地,Fc来源于IgG1或IgG4抗体。例如,接头可以包括IgG1 kappa Fc区,例如源自曲妥珠单抗的IgG1 Fc,含有曲妥珠单抗重链(见例如SEQ ID NO:26的残基234-450;另见SEQ ID NO:27)的C_H2和C_H3结构域。本文提供的双特异性分子中的Fc亚基也可以是IgG4 Fc,例如源自纳武单抗(Opdivo®)的IgG4 Fc,其含有纳武单抗重链(见例如SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)的C_H2和C_H3结构域。

[0958] 如下所述,可以突变或修饰Fc区,以消除、减少或增强免疫效应子功能,包括例如抗体依赖性细胞毒性(ADCC;也称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)和补体依赖性细胞毒性(CDC)中的任何一种或多种功能。在本文的一些实施方案中,例如在构建体是用于治疗炎症和自身免疫性疾病和病症的双特异性分子的情况下,所述免疫效应子功能被消除或降低。当治疗剂用于治疗肿瘤或癌症时,可以增强免疫效应子功能以改进抗肿瘤免疫应答和治疗效果。此外或或者,Fc区被修饰以增强FcRn再循环,以增加本文提供的分子的体内血清稳定性和半衰期。

[0959] 出于本文的目的,修饰了Fc区域或结构域,特别是为了减少或消除ADCC。小分子治疗剂,例如抗体片段(例如Fab、scFv、dAb)是有利的。它们可以高产量生产,并具有其它有利性质。与单克隆抗体(mAb)相比,它们表现出增强的组织穿透力和靶标可及性,并且可以防止mAb的不良影响,例如受体簇集、免疫效应子功能的激活、在血管化不良的区域的组织穿透力差和无法接近靶标。然而,小抗体片段的药代动力学性质较差。例如,由于尺寸小,dAb和其它抗体片段会迅速被肾脏清除,因为50-60kDa或更小的分子会被肾脏过滤。小抗体片段的快速清除和短消除半衰期(可能少于几个小时)会降低体内功效,并且需要频繁施用和/或连续输注。

[0960] 可以使用几种方法来增加小抗体片段例如dAb的保留和体内半衰期。例如,如本文所提供的,TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂和组合/多特异性构建体中的dAb融合于作为或包括半衰期延长剂的接头,例如IgG如IgG1或IgG4的Fc区。Fc可以是单体或二聚体。将小抗体片段如dAb融合于IgG分子的Fc区增加所述分子的大小,从而防止其被清除/从体内排出,并介导与在内皮细胞上表达的新生儿Fc受体(FcRn)的结合,(FcRn)保护抗体免受溶酶体降解并延长其体内半衰期。然而,添加Fc会引入不需要的性质,例如诱导可导致补体激活的免疫效应子功能、释放促炎细胞因子和细胞毒性。由于TNFR1几乎普遍表达,而TNFR2由许多组织表达,因此通常不希望使用ADCC增强的抗体,而是依赖于抗体的拮抗剂活性来发挥功效。

[0961] 如本文所述,修饰TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂和多特异性如双特异性构建体中的Fc区,以改善药代动力学和药效学(即药理学)性质,并消除不良性质。例如,Fc区被修饰以利用/增强新生儿FcR再循环以增加体内半衰期,和/或被突变以消除Fc相关的免疫效应子

功能,例如抗体依赖性细胞毒性(ADCC;也称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。此外,在构建体是多特异性例如双特异性的实施方案中,例如其含有TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂并且含有Fc二聚体的实施方案,所述二聚体被突变以引入凸出凹陷,以防止同二聚化。对Fc部分(或区域)的许多修饰是本领域技术人员已知的(见例如Li et al., (2014) *Expert Opin Ther Targets* 18: 335-350)。

[0962] i. Fc部分的修饰

[0963] a) 凸出凹陷

[0964] 双特异性抗体(bsAb)包括两个不同的抗原结合位点,允许使用替代传统治疗性单克隆抗体(mAb)的治疗方法,从而可以避免与mAb相关的限制,例如受体共聚类。虽然小抗体片段更容易以高产量生产且成本更低,并且可以轻松穿透组织,但它们存在局限性,例如稳定性、溶解度和药代动力学性质不佳。例如,其小尺寸导致较短的血清半衰期、减少的组织保留以及通过肾脏从血液中快速清除。因此,没有相同限制的IgG样双特异性(bs)抗体是有利的。例如,bsAb可以包括一个Fc区以增加血清半衰期,并且还可以在需要时允许效应子功能。然而,纯化的bsAb的高产量生产可能具有挑战性,因为必须防止重链的同二聚化。“凸出凹陷”(KiH;也称作“knobs-into-holes”)方法提供了解决此问题的方案。将抗体(IgG)重链的C_H3结构域工程化用于异二聚化,以可以构建不会自缔合的含有Fc的双功能治疗分子。

[0965] 凸出凹陷方法涉及以互补方式不对称地突变两条亲本重链的C_H3结构域中的界面残基。通过在C_H3结构域之间的界面用具有较大侧链的氨基酸如酪氨酸或色氨酸置换具有小侧链的氨基酸来创建“凸出”,并且通过用具有较小侧链的氨基如丙氨酸或苏氨酸置换具有大侧链的氨基酸来创建“凹陷”。凸出和凹陷变体通过将凸出插入配偶体C_H3结构域上相应设计的凹陷中而异二聚化。由于空间排斥,凸出-凸出的结合被阻止,并且凹陷-凹陷的同源二聚体不稳定。例如,凸出突变可以是S354C、T366Y、T366W或T394W,而凹陷突变可以是Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A或Y407V(均根据EU编号)。已经表明,朝向二聚体界面中心创建的凸出,例如在残基T366处,比位于二聚体界面边缘附近的凸出对同源二聚体形成更具破坏性。第一个C_H3结构域上的残基T366在第二个或配偶体C_H3结构域上的残基Y407的氢键距离内,因此,T366Y和Y407T代表一个共同的凸出-凹陷对;这个配对已显示以超过90%的产量生成异二聚体(见例如Ridgway et al. (1996) *Protein Eng.* 9 (7): 617-621)。

[0966] 例如在本文提供的双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体中的IgG Fc区,可以使用凸出凹陷方法进行修饰,以产生高产率的异二聚化分子。下面的表6显示了根据Kabat编号和序号的相应的凸出和凹陷突变,参考SEQ ID NO:9中列出的IgG1重链恒定结构域的序列。本领域技术人员已知的引入凸出凹陷的任何突变均可用于本文的构建体中。

[0967] 表6

引入凸出凹陷的 IgG1 Fc 修饰			
修饰类型	根据 EU 编号的修饰	根据 Kabat 编号的修饰	根据顺序编号的修饰(SEQ ID NO:9)
[0968] 凸出	S354C	S375C	S237C
凸出	T366Y	T389Y	T249Y
凸出	T366W	T389W	T249W
凸出	T394W	T422W	T277W
凹陷	Y349C	Y370C	Y232C
凹陷	T366S	T389S	T249S
凹陷	L368A	L391A	L251A
凹陷	F405A	F436A	F288A
凹陷	Y407T	Y438T	Y290T
凹陷	Y407A	Y438A	Y290A
凹陷	Y407V	Y438V	Y290V

[0969] 配体陷阱构建体

[0970] 如上所述修饰为具有“凸出凹陷中”的Fc也可以与其它双特异性分子一起使用以产生异二聚体。例如,美国专利公开号2010/0055093和Jin et al. (2009) Mol. Med. 15:11-20, 描述了靶向EGF受体家族配体的双特异性“配体”陷阱构建体, 包括一个称作RB200和另一个称作RB242。这些构建体的一个问题是它们是异质的, 并且含有同源二聚体和异源二聚体, 后者是预期的治疗剂。RB200和RB242是示例的配体陷阱, 可以通过将Fc部分用具有互补凸出和凹陷的修饰的Fc区域置换来进行修饰, 以便所得二聚体都是异二聚体。RB242靶向HER1 (EGFR)、HER2和HER3配体, 以及一些HER4配体。其被设计为使其不捕获HER4特异性配体, 因为HER4在神经元发育中具有EGFR家族其它成员不具有的作用。RB242由HER1/ErbB1 (SEQ ID NO:41的氨基酸1至621) 和HER3/ErbB3 (SEQ ID NO:45的氨基酸1至621) 的胞外结构域(ECD) 组成, 与人免疫球蛋白G1 (IgG1) 的Fc结构域融合 (HER1-HER3/Fc), 并充当嵌合双特异性配体陷阱。RB242的HER3/Fc组分在COOH末端包含一个6×组氨酸标签(见例如Jin et al. (2009) Mol. Med. 15:11-20)。RB200以高亲和力结合HER1/ErbB1配体 (EGF、TGF- α 、HB-EGF、AR、BTC、EPR和EPG) 和HER3/ErbB3配体 (NRG1- α 和NRG1- β 3)。RB242抑制HER家族蛋白 (HER1、HER2和HER3) 的EGF刺激和NRG1- β 1刺激的酪氨酸磷酸化, 并在多种细胞增殖试验中显示出效力。RB200在体内动物模型中抑制肿瘤生长。

[0971] 表皮生长因子 (EGF) 配体/受体家族在多种疾病、病症和病况中发挥作用, 包括类风湿性关节炎 (RA)。细胞表面受体的EGF家族 (ErbB和人表皮生长因子受体 (HER)) 属于受体酪氨酸激酶 (RTK) 超家族, 含有胞外结构域 (ECD) 和胞内酪氨酸激酶信号传导结构域。EGF家族有四个成员: EGF受体 (EGFR) /HER1/ErbB1、HER2/ErbB2、HER3/ErbB3和HER4/ErbB4, 它们被一个配体大家族激活, 包括EGF、转化生长因子 α (TGF- α)、肝素结合表皮EGF样生长因子 (HB-EGF)、双调蛋白 (AR)、 β -动物纤维素 (BTC)、上皮调节蛋白 (EPR)、表观基因 (EPG) 和神经调节蛋白 (NRG)。在EGFR中有四个ECD; 结构域I和III是配体结合结构域, 结构域II和IV介导相互结合以及与该受体家族其它成员的结合。配体结合诱导受体之间形成同二聚体或异二聚体。例如, TGF- α 和EGF与EGFR/HER1/ErbB1结合, 而NRG4与HER4/ErbB4结合。根据形成的二聚体, 细胞内区域发生转磷酸化, 导致许多下游信号传导途径的激活, 从而导致细胞增殖、存活和分化(见例如Jin et al. (2009) Mol. Med. 15:11-20)。

[0972] 表皮生长因子受体家族由四种密切相关的受体酪氨酸激酶组成:EGFR (ErbB-1)、HER2 (ErbB-2)、HER3 (ErbB-3) 和HER 4 (ErbB-4)。在许多癌症类型中,一个家庭成员的突变或扩增与癌症患者的生存恶化有关。在自身免疫性疾病中,TNF信号传导通过诱导巨噬细胞上表皮调节蛋白和肝素结合EGF (HB-EGF) 的合成来反式激活EGFR信号传导途径,这两种生长因子都激活EGFR。

[0973] 以互补的方式,EGFR和HER2在滑膜成纤维细胞上上调,从而驱动其增殖。EGFR、HER2 (ErbB2) 和EGF样生长因子例如在RA滑膜成纤维细胞和巨噬细胞中过表达。因此,TNF和EGFR途径在狼疮和类风湿性关节炎以及其它自身免疫性疾病的进展中协同作用。本文提供的构建体是称作“配体陷阱”的构建体。配体陷阱构建体拦截EGFR家族的大多数炎症生长因子,从而抑制受影响的RA关节中快速生长的滑膜成纤维细胞的生长。这些配体陷阱用于与本文提供的是TNFR1和/或TNFR2靶向构建体的TNF阻断构建体在联合治疗方案中施用。这种例如针对类风湿性关节炎的联合治疗可以协同组合以实现疾病消退。

[0974] 生长因子的EGFR家族在过度增殖/炎症性疾病如RA中过表达,也在卵巢癌和其它癌症中过表达。EGFR家族和/或其同源物水平升高是多种癌症的常见组成部分。当过表达(或有时发生突变)时,这些受体与多种恶性肿瘤的较短生存期存在因果关系。通过EGFR家族发挥作用的靶向治疗的实例有(列出通用名称和示例商标提供来源)西妥昔单抗(Erbitux®)、帕尼单抗(Vectibix®)、曲妥珠单抗(Herceptin®)和帕妥珠单抗(Perjeta®)。小分子抑制剂还针对EGFR家族的细胞内酪氨酸激酶活性。小分子的实例包括拉帕替尼(Tykerb®)、厄洛替尼(Iressa®)和来那替尼(Nerlynx®)。这些药物仅针对EGFR家族的一个成员,因此该家族的其它成员可以上调和补偿肿瘤生长。同样,单一生长因子的抗体(例如TGF- α 、EGF、HB-EGF等)仅抑制该生长因子,肿瘤细胞将通过上调其它生长因子来补偿。本文提供的配体陷阱构建体通过将HER1、HER2和HER3一起阻断来解决这个问题。这导致EGFR家族对癌细胞的泛抑制。卵巢癌是需要治疗的癌症之一。

[0975] 本文提供的配体陷阱构建体通过优化异二聚体产生和FcRn再循环得到改进,使用如下文针对TNFR1/TNFR2构建体所述修饰的Fc区。配体陷阱构建体与TNFR1拮抗剂构建体、和/或TNFR2激动剂构建体、和/或多特异性TNFR1拮抗剂/双特异性构建体、和/或本文提供的任何其它构建体的联合治疗方案施用,用于治疗TNF在其中发挥如本文所述和/或本领域技术人员已知的作用的疾病、病症和病况。

[0976] b) 增强新生儿受体(FcRn)再循环的修饰

[0977] 有许多方法可以增加短小多肽或蛋白质治疗剂的短血清半衰期。聚乙二醇化增加小蛋白治疗剂的血清半衰期,但有缺点。聚乙二醇化可降低蛋白质治疗剂的效力或活性,可导致异质性,并可导致蛋白质的免疫反应性。其它方法包括与白蛋白融合,这可以通过增加分子量和降低肾脏清除率来改善蛋白质循环。

[0978] 还可以通过与IgG的Fc部分融合来延长血清半衰期。IgG大约2-3周的长循环半衰期和缓慢的清除率至少部分是得自其与新生儿Fc受体(FcRn)的相互作用,后者在酸性pH条件下以高亲和力结合IgG,并在中性或更高的pH值下释放IgG。FcRn以2:1的FcRn:IgG构型(二价相互作用)与酸性(~pH6)内体中胞饮的IgG的Fc部分(在CH2-CH3结构域内)结合,将其从溶酶体降解途径中转移到细胞表面,并在暴露于细胞外生理pH值(约7.4)后将其再循环到循环中,在此过程中Fc-FcRn复合物解离。在酸性pH条件下与FcRn的不良结合导致抗体

转运至溶酶体并在那里被降解。再循环受体,如FcRn,也提供了IgG穿过上皮细胞(转胞吞作用)并进入血流的途径。利用与FcRn的相互作用可以改善蛋白质跨上皮屏障的转运,例如在肠道和肺部,从而实现无创施用。Fc C_H2和C_H3结构域中的残基参与FcRn结合,并且它们在mAb中的突变已被证明影响体内血清半衰期。通过将小蛋白治疗剂与IgG的Fc结构域融合,可以改善小蛋白治疗剂的循环和递送,从而使所得融合蛋白与FcRn结合并利用IgG血清稳定途径。与Fc结构域的融合也增加了治疗剂的分子量,降低了肾脏清除率,但由于潜在降低的融合蛋白的组织渗透和比活性,因此可能是不受欢迎的。或者,研究表明,短的FcRn结合肽(FcRnBP)允许小蛋白与FcRn相互作用,不再需要融合于高分子量Fc结构域。例如,与Fc或白蛋白融合相比,与FcRnBP融合使分子量增加约3kDa,使分子量增加约50-70kDa(见例如Datta-Mannan et al. (2019) *Biotechnol. J.* 14:1800007; Sockolosky et al. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(40):16095-16100)。

[0979] 例如,短的(16个残基)线性和环状FcRnBP(见例如SEQ ID NO:48-51)已经融合于Fab重链和轻链的C末端、N末端或二者(FcRnBP-Fab构建体),每个Fab有1-4个FcRnBP。在食蟹猴中的药代动力学研究表明,FcRnBP-Fab构建体的FcRn结合随着与Fab融合的肽数量的增加而增加。这是由于亲合力增加所致,其中含有四个线性FcRnBP的构建体融合于Fab的重链和轻链的N末端和C末端,相对于亲本Fab,在食蟹猴中的药代动力学表现出最大的改善。例如,半衰期从亲代Fab的3.7小时提高到各种FcRnBP-Fab构建体的15-60小时(见例如Datta-Mannan et al. (2019) *Biotechnol. J.* 14:1800007)。虽然这些结果表明血清半衰期有所改善,但仍远低于IgG的半衰期,后者约为2-3周。FcRnBP的使用也不降低肾脏清除率,因为它们不显著增加治疗剂的分子量。

[0980] 如上所述,与IgGFc的融合通过利用FcRn结合以及通过增加治疗剂的分子量,从而增加了小蛋白治疗剂的半衰期,并且使其不太快速地从体内清除,例如通过肾脏清除。为了改善药代动力学和整体药理学性质,可以突变Fc区域内的残基以增加对FcRn的亲合力,通常超过30倍,进一步增加体内半衰期。跨越C_H2和C_H3结构域界面的Fc区与FcRn相互作用。经鉴定在FcRn结合中起作用的人Fc残基包括例如L251、M252、I253、S254、L309、H310、Q311、L314、E380、N434、H435和Y436(根据EU编号,参见表1)。位于Fc-FcRn界面的残基突变,包括M252、S254、T256、H433、N434和Y436(根据EU编号),提高了人FcRn-IgG1复合物的稳定性。例如,M252Y/S254T/T256E和H433K/N434F/Y436H置换在pH6.0下与人FcRn的结合相对于野生型IgG1分别提高了11倍和6.5倍,并在pH7.4下有效释放。这些置换的组合导致对FcRn的结合亲合力增加57倍。IgG1 Fc中显示与FcRn结合改善的其它突变包括例如M252W、M252Y、M252Y/T256Q、M252F/T256D、E380A和N434F/Y436H(见例如Dall'Acqua et al. (2002) *J. Immunol.* 169:5171-5180)。

[0981] 三重取代M252Y/S254T/T256E,当引入MEDI-524(一种人源化抗呼吸道合胞病毒(RSV)mAb)的C_H2结构域时,当与未修饰的MEDI-524相比时,该mAb在食蟹猴中的血清半衰期增加了大约4倍。当引入MEDI-522(一种针对人 $\alpha v \beta 3$ 整合素复合物的人源化、亲和力优化的mAb)的Fc部分时,置换M252Y/S254T/T256E(YTE)降低了其ADCC活性及其与人Fc γ RIIIA(F158同种异型)的结合。通过引入增强ADCC的置换S239D/A330L/I332E(根据EU编号),MEDI-522-YTE的ADCC活性可以恢复,并且与未修饰的MEDI-522相比有所增加,表明置换YTE提供了调节人IgG1的ADCC功能的可逆机制(见例如Dall'Acqua et al. (2006)

J.Biol.Chem.281(33):23514-23524)。

[0982] 在所有四种人IgG亚型中保守的人IgG重链位置250、314和428(根据EU编号)的残基也位于Fc-FcRn界面附近。将突变T250Q、M428L和T250Q/M428L引入人IgG2 mAb的Fc时,导致在pH6.0下与FcRn的结合分别增加约3、7和28倍,但在pH值7.5未观察到结合。当在恒河猴中评估突变体的药代动力学时,发现与未修饰抗体相比,平均清除率(即每单位时间清除的血清抗体体积)在M428L突变体低约1.8倍,T250Q/M428L突变体低约2.8倍,在消除半衰期在M428L突变体长约1.8倍,T250Q/M428L长约1.9倍。由于这些残基在IgG亚型中是保守的,因此预期突变M428L和T250Q/M428L在人IgG1、IgG3和IgG4抗体中具有相似的效果(见例如Hinton et al. (2004) J.Biol.Chem.279(8):6213-6216)。显示修饰T250R/M428L导致在恒河猴中在pH6.0选择性结合FcRn,并且血清IgG2和IgG1的降解降低2.8倍(见例如Saxena et al. (2016) Front.Immunol.7:580)。

[0983] 当引入人抗HER2 IgG1曲妥珠单抗时,突变N434A(根据EU编号)导致在pH6对人FcRn的亲合力比未修饰抗体高约4倍,但在pH7.4的结合可忽略不计。在食蟹猴体内测试时,与野生型抗体相比,N434A变体的暴露增加、清除率降低(约2倍)及半衰期增加(约2倍)。相比之下,突变N434W导致在pH6与FcRn的结合增加约80倍,表现出与野生型相似的清除率;该突变体在pH7.4时还表现出与FcRn的显著结合,表明维持Fc突变体与FcRn的pH依赖性结合对于改善体内药代动力学至关重要(Yeung et al. (2009) J.Immunol.182:7663-7671)。N434A突变还抵消了引入增加与Fc γ R结合的突变可能导致的不佳的FcRn亲合力;N434A通常添加到突变S298A/E333A/K333A以创建具有增强的Fc γ R结合和正常或改善的FcRn结合的变体。改善FcRn结合的Fc突变还包括N434Y、E294del/T307P/N434Y和T256N/A378V/S383N/N434Y。E294缺失导致Fc上N297聚糖的较高唾液酸化程度,从而延长了抗体的体内半衰期。表明唾液酸化在调节血清半衰期中也发挥作用(见例如Saunders,K.O. (2019) Front.Immunol.10:1296)。

[0984] 当引入人源化抗VEGF IgG1抗体贝伐珠单抗(Avastin®)时,置换M428L/N434S(根据EU编号)导致在pH6.0对FcRn的亲合力增加11倍,并在食蟹猴中将体内血清半衰期从9.7天延长到31.1天,提高了3.2倍。当引入抗EGFR抗体西妥昔单抗时,M428L/N434S修饰导致类似的FcRn结合增加和半衰期延长,由于受体介导的内化作用而迅速清除。这些抗肿瘤抗体的半衰期延长与小鼠模型中体内肿瘤减少的增强相关,表明当药代动力学(例如清除率)得到改善时,抗体的体内治疗效果会增加。在贝伐珠单抗Fc中工程化的其它突变包括(根据EU编号):N434S,其导致在小鼠中FcRn结合提高约3倍,血清半衰期增加约2.8倍;V259I/V308F,在小鼠和食蟹猴中FcRn结合提高约6倍,血清半衰期分别增加约3倍和约2倍;M252Y/S254T/T256E,在小鼠和食蟹猴中FcRn结合提高约7倍,血清半衰期分别增加约4倍和2.5倍;和V259I/V308F/M428L,在小鼠和食蟹猴中FcRn结合提高约20倍,血清半衰期分别增加约4-5倍和2.6倍(Zalevsky et al. (2010) Nat.Biotechnol.28(2):157-159)。

[0985] 可将上述鉴定的突变和其它此类突变引入本文提供的构建体中的IgG Fc区。这些包括例如式1和2的那些构建体,其中接头包括Fc或Fc二聚体,这取决于构建体的结构。

[0986] 在一些实施方案中,本文构建体中的IgG Fc区、此类双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体和本文提供的TNFR1拮抗剂构建体被修饰以增强新生儿FcR再循环以增加体内半衰期。这可以通过突变IgG Fc的C_H2和C_H3结构域界面处的残基来实现,这些残基负责与

FcRn结合。这些残基包括但不限于残基T250、L251、M252、I253、S254、T256、V259、T307、V308、L309、H310、L314、Q311、A378、E380、S383、M428、H433、N434、H435和Y436，根据EU编号。增加与FcRn结合的示例的Fc修饰包括但不限于以下一种或多种：T250Q，T250R，M252F，M252W，M252Y，S254T，T256D，T256E，T256Q，V259I，V308F，E380A，M428L，H433K，N434F，N434A，N434W，N434S，N434Y，Y436H，M252Y/T256Q，M252F/T256D，M252Y/S254T/T256E，H433K/N434F/Y436H，N434F/Y436H，T250Q/M428L，T250R/M428L，M428L/N434S，V259I/V308F，V259I/V308F/M428L，E294del/T307P/N434Y，T256N/A378V/S383N/N434Y，及其组合，根据EU编号。下表7示出根据Kabat编号和顺序编号的相应突变，参考SEQ ID NO:9所示IgG1重链恒定域的序列。本领域已知的赋予增强或增加的FcRn结合的其它修饰也预期用于本文。

[0987] 表7

增强 FcRn 结合的 IgG1 Fc 修饰		
根据 EU 编号的修饰	根据 Kabat 编号的修饰	根据顺序编号的修饰 (SEQ ID NO:9)
T250Q	T263Q	T133Q
T250R	T263R	T133R
M252F	M265F	M135F
M252W	M265W	M135W
M252Y	M265Y	M135Y
S254T	S267T	S137T
T256D	T269D	T139D
T256E	T269E	T139E
T256Q	T269Q	T139Q
V259I	V272I	V142I
V308F	V327F	V191F
E380A	E405A	E263A
M428L	M459L	M311L
H433K	H464K	H316K
N434F	N465F	N317F
N434A	N465A	N317A
N434W	N465W	N317W
N434S	N465S	N317S
N434Y	N465Y	N317Y
Y436H	Y467H	Y319H
M252Y/T256Q	M265Y/T269Q	M135Y/ T139Q
M252F/T256D	M265F/T269D	M135F/T139D
M252Y/S254T/T256E	M265Y/S267T/T269E	M135Y/S137T/T139E
H433K/N434F/Y436H	H464K/N465F/Y467H	H316K/N317F/Y319H
N434F/Y436H	N465F/Y467H	N317F/Y319H
T250Q/M428L	T263Q/M459L	T133Q/M311L
T250R/M428L	T263R/M459L	T133R/M311L
M428L/N434S	M459L/N465S	M311L/N317S
V259I/V308F	V272I/V327F	V142I/ V191F
V259I/V308F/M428L	V272I/V327F/M459L	V142I/V191F/M311L
E294del/T307P/N434Y	E311del/T326P/N465Y	E177del/T190P/N317Y
T256N/A378V/S383N/N434Y	T269N/A401V/S408N/N465Y	T139N/A261V/S266N/N317Y

[0990] c) Fc免疫效应子功能的增强或降低/消除

[0991] 有四种人IgG亚类，其在效应子功能、循环半衰期和稳定性方面有所不同。IgG1具

有Fc效应子功能,是最丰富的IgG亚类,是FDA批准的治疗性蛋白中最常用的亚类。IgG2缺乏Fc效应子功能,但会与其它IgG2分子二聚化,并且由于铰链区二硫键的混乱而不稳定。IgG3具有Fc效应子功能和一个非常长的刚性铰链区。IgG4缺乏Fc效应子功能,循环半衰期比其它亚类短,并且IgG4二聚体由于铰链区存在单个二硫键而生化不稳定,这导致不同的IgG4分子之间H链的置换。因此,来自IgG2和IgG4的Fc区不具有效应子功能,并且可用于其中效应子功能不被需要或有害的情况,例如在自身免疫和炎症疾病和病症的情况下。

[0992] 大多数批准的治疗性mAb属于人IgG1亚类,可以与免疫系统的体液和细胞成分相互作用。例如,抗体通过与补体蛋白C1q的相互作用参与体液免疫应答,补体蛋白C1q启动补体级联反应,导致膜攻击复合物的形成,从而在靶细胞中诱导细胞溶解(即补体依赖性细胞毒性(CDC)),并通过与Fc γ 受体(Fc γ R)的相互作用参与细胞免疫应答。Fc γ R包括Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)和Fc γ RIII(CD16)类,它们在细胞表面表达和Fc结合亲和力方面有所不同。五种激活Fc γ R包括可以结合单价抗体的高亲和力Fc γ RI,以及需要基于亲和力的相互作用的低亲和力Fc γ RIIa、Fc γ RIIc、Fc γ RIIIa和Fc γ RIIIb。Fc γ RIIb是唯一的抑制性受体。在Fc与激活受体结合后,细胞内信号传导途径通过基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的磷酸化进行调节,导致效应子功能,例如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC;也称为抗体-依赖性细胞毒性)和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP;也称为抗体依赖性细胞吞噬作用),以及通过由于诱导细胞因子分泌所致的炎症而调节。通过抑制性Fc γ RIIb的信号传导,通过基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)的磷酸化进行调节,募集磷酸酶来抗衡激活的信号传导途径(见例如Wang et al. (2018)Protein Cell 9(1):63-73)。

[0993] 铰链和近端C_H2氨基酸序列(下铰链-上C_H2结构域区域),以及Fc区C_H2结构域Asn-X-Ser/Thr糖基化基序中保守的N297残基(根据EU编号)的糖基化,介导抗体与Fc γ R和补体蛋白C1q的相互作用。抗体/Fc工程化已用于通过改变抗体与C1q和各种Fc γ 受体的结合来改变抗体的免疫效应子功能。因此,根据应用,治疗性mAb的CDC、ADCC和ADCP活性可以增加或减少。例如,抗癌mAb的增效部分取决于它们对Fc γ R效应子功能的诱导。效应子功能包括通过Fc γ RIIIa激活自然杀伤(NK)细胞以及随后的ADCC活性和炎症细胞因子的释放,通过与多个Fc γ R的相互作用诱导巨噬细胞介导的ADCP,以及其它免疫细胞的募集和激活,例如中性粒细胞,这是NK细胞介导的ADCC的主要受体。Fc γ RIIIa有两种多态性变体:一种具有V158,对IgG1具有更高的亲和力;一种具有F158,对IgG1的亲和力较低。与具有低亲和力F158多态性的患者相比,具有高亲和力V158多态性的癌症患者在接受西妥昔单抗、曲妥珠单抗和利妥昔单抗治疗后可获得更好的结果。诸如此类的结果突出了Fc γ R介导的免疫效应子功能在治疗中的作用,并表明工程化抗体和相关分子以增加对Fc γ R的亲和力可以增强治疗效果(见例如Wang et al. (2018)Protein Cell 9(1):63-73)。

[0994] 已确定IgG的下铰链和近端C_H2区域中的残基对于结合Fc γ R至关重要。对于Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb和Fc γ RIIIb,距离Fc γ R:Fc界面5埃(angstroms)以内的残基包括残基(根据EU编号)P232、E233、L234、L235、G236、G237、P238、S239(对应于残基P115-S122,参考SEQ ID NO:9),D265、V266、S267、H268、E269、D270(对应残基D148-D153,参考SEQ ID NO:9),Y296、N297、S298、T299(对应残基Y179-T182,参考SEQ ID NO:9),及N325、K326、A327、L328、P329、A330、P331和I332(对应于残基N208-I215,参考SEQ ID NO:9)(见例如

Wang et al. (2018) *Protein Cell* 9(1):63-73)。

[0995] 增强或降低ADCC活性和/或增强受体亲和力/结合的Fc修饰是本领域技术人员已知的。例如,增加IgG1对Fc γ RIIIa的亲和力和结合和/或增强ADCC功能的Fc修饰包括以下置换(根据EU编号):F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L、L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L、F243L/R292P/Y300L、S239D、I332E、S239D/I332E、S239D/A330L/I332E、S298A/E333A/K334A,以及一条重链的L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A与一条相对链的D270E/K326D/A330M/K334E的组合,一条重链的L234Y/G236W/S298A和相对重链中的S239D/A330L/I332E的组合。此外,突变A327Q/P329A(与Fc γ RI相互作用)、D265A/S267A/H268A/D270A/K326A/S337A(与Fc γ RIIa相互作用)、G236A(与Fc γ RIIa相互作用)和T256A/K290A/S298A/E333A/K334A(与Fc γ RIIIa相互作用),导致与Fc γ R的高亲和力相互作用。

[0996] 增加与Fc γ RIIa和Fc γ RIIIa结合并增强ADCC和ADCP的Fc修饰包括(根据EU编号)G236A/I332E、G236A/S239D/I332E(也增加与Fc γ RI的结合)和G236A/S239D/A330L/I332E(见例如Wang et al. (2018) *Protein Cell* 9(1):63-73;Saxena et al. (2016) *Front. Immunol.* 7:580;和Saunders,K.O. (2019) *Front. Immunol.* 10:1296)。

[0997] IgG的糖基工程在C_H2结构域的残基N297处包含一个保守的N-连接糖基化位点,可以增强Fc效应子功能。N297的糖基化对于维持Fc构象和介导其与Fc γ R(和C1q)的相互作用至关重要。存在于残基N297处的聚糖通常具有两个N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、三个甘露糖和另外两个与甘露糖连接的GlcNAc,以形成双触角复合聚糖。额外的岩藻糖、半乳糖、唾液酸和GlcNAc可以添加到核心聚糖结构中。在人血清中发现的循环IgG通常是岩藻糖基化的,但重组IgG生产可以通过在植物细胞中表达抗体、敲入或敲除特定糖苷酶或在体外酶促消化糖基化IgG的来改变聚糖组成;因为两条重链都是糖基化的,所以单个IgG分子可能具有聚糖异质性。聚糖直接影响Fc γ R结合。例如,Fc上的N297聚糖可以与Fc γ RIII蛋白上的聚糖发生冲突,导致介导ADCC的效应细胞参与不良。N297处含有不同聚糖的Fc区采用不同的铰链区构象,这会影响Fc与Fc γ R相互作用的能力。当表达IgG时, β (1,4)-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III的表达会产生一种抗体,该抗体在N297位被双触角聚糖糖基化;这种抗体增加了与Fc γ RIIIa的结合并增强了ADCC活性。已经证明,岩藻糖缺陷的(去岩藻糖基化/非岩藻糖基化)的IgG1与Fc γ RIIIa的结合增加了50倍,并增强了ADCC活性。两种糖基工程化(去岩藻糖基化)单克隆抗体阿托珠单抗(抗CD20)和莫格利珠单抗(抗CCR4)已被批准用于临床,表明糖基工程具有增强效应自功能的潜力,并将其转化为临床批准的治疗药物(见例如Wang et al. (2018) *Protein Cell* 9(1):63-73;Saxena et al. (2016) *Front. Immunol.* 7:580;和Saunders,K.O. (2019) *Front. Immunol.* 10:1296)。

[0998] 还可以修饰Fc以与更广泛的Fc受体结合。某些白细胞上存在非 γ 同种型的Fc受体(即IgA、IgM和IgE),通过修饰Fc区域以与多个Fc受体结合,产生具有扩增能力的抗体来结合效应细胞。中性粒细胞是体内最丰富的白细胞,通过Fc α RI受体与IgA抗体的Fc结合。例如,为了结合Fc γ R和Fc α RI,将IgA2的单个结构域添加到IgG1恒定区的末端,创建一个四结构域恒定区,CH1g-CH2g-CH3g-CH3a。IgG1的CH1结构域被置换为 α 1恒定区结构域,生成结构更接近 α 恒定区的恒定区(CH1a-CH2g-CH3g-CH3a)。这些四结构域、交叉同种型IgGA嵌合抗体与天然IgA2类似地结合J链,减少了通过聚合Ig受体的转运,Fc γ RI亲和力降低了3-5倍,并且IgA2的短血清半衰期代替了IgG1的长时间血清循环。然而,四结构域、交叉同种型IgGA

嵌合抗体具有介导绵羊红细胞的补体依赖性裂解的能力,并且比IgG1更具有pH抗性。另一种交叉同种型Fc是通过将 γ 1和 α 恒定区融合在一起以产生串联G1-AFc区而产生的,其中IgA2的铰链、CH2和CH3结构域与IgG1的C末端融合。这种串联交叉同种型IgG/IgA融合显示与IgG1相似的表达水平、抗原结合和热稳定性,并且在体外与Fc α RI和Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIIIa和FcRn结合,亲和力分别与野生型IgA和IgG相似。与各种FcR的结合导致多形核细胞和NK细胞的ADCC活性;然而,与IgG1相比,C1q结合减少了3倍。串联IgG/IgA的体内半衰期与BALB/c小鼠中的IgG1相似。通过置换IgG1恒定区的C_H3结构域和C_H2 α 1环形残基245-258(根据EU编号,对应于序列PKPKDTLMISRTPE;(SEQ ID NO:9的残基128-141)),产生了另一种交叉同种型抗体,具有与IgA恒定区结构相似的区域。这种嵌合Fc能够结合Fc γ RI、Fc γ RIIa和Fc α RI,以及含有嵌合Fc介导的多形核细胞的ADCC和巨噬细胞的ADCP的抗体,以及激活的补体,但缺乏与调节抗体半衰期的FcRn的结合;因此,需要进一步优化才能在体内有效使用(见例如Saunders,K.O.(2019)Front.Immunol.10:1296)。

[0999] 另一种增强Fc γ R结合的方法是IgG的多聚化,这在自身免疫性疾病的治疗中显示出前景。例如,通过添加异源多聚化结构域如异亮氨酸拉链,或通过天然铰链的N末端添加另一个铰链区,或通过C_H3结构域的C末端添加另一个铰链区,产生IgG多聚体。IgG六聚体是通过将IgM尾片附加到IgG1 Fc的C末端并在位置309处形成半胱氨酸键而产生的;该多聚IgG与Fc γ RI、Fc γ RIIa和Fc γ RIIIa强结合,与Fc γ RIIb和Fc γ RIIIb弱结合。与单体IgG相比,各种多聚体IgG与Fc γ RI、Fc γ RIIb和Fc γ RIII的结合增加,并且在关节炎、神经病变和自身免疫性重症肌无力的临床前模型中显示出前景。这种多聚IgG设计正在进一步优化,以微调哪些免疫受体(包括FcRn)可以与多聚体结合(见例如Saunders,K.O.(2019)Front.Immunol.10:1296)。

[1000] IgG Fc区中参与与C1q(及因此CDC)相互作用和结合的残基包括(根据EU编号)S267、D270、K322、K326、P329、P331和E333。已显示通过增加C1q结合增强CDC的Fc修饰包括例如K326A、E333A、K326A/E333A、K326W、K326W/E333S、K326M/E333S、C220D/D221C、H268F/S324T、S267E、H268F、S324T、S267E/H268F/S324T和G236A/I332E/S267E/H268F/S324T(均根据EU编号)。在IgG1 Fc的上铰链区,以各种组合在位置222、223和224取代Trp(即K222W、T223W和H224W,根据EU编号),相对于野生型IgG1增加了C1q结合和CDC活性,而不影响Fc γ RIIIa结合和ADCC活性。具体而言,所述突变包括K222W/T223W、K222W/T223W/H224W和D221W/K222W。突变C220D/D221C和C220D/D221C/K222W/T223W也增加了C1q结合和CDC活性(见例如Wang et al.(2018)Protein Cell 9(1):63-73;Saxen et al.(2016)Front.Immunol.7:580;Saunders,K.O.(2019)Front.Immunol.10:1296;和Dall'Acqua et al.(2006)J.Immunol.177:1129-1138)。

[1001] IgG3与C1q的体外结合最佳;将IgG1的C_H1和铰链区与IgG3的C_H2和C_H3区组合(以保留IgG1的ADCC活性和IgG3的CDC活性),产生IgG1/IgG3交叉亚型抗体,同时增加C1q结合并增强CDC活性。另一种具有增加的C1q结合和增强的CDC活性的IgG1/IgG3交叉亚型抗体包括IgG1的C_H1、铰链和C_H3,以及IgG3的C_H2;这些修饰使得Cq1结合增加,因为C1q结合C_H2结构域,并且易于纯化,因为蛋白A结合C_H3结构域。此外,修饰E345R/E430G/S440Y导致形成IgG六聚体,其中K322定向在一个位置以有利地与六聚体C1q头部相互作用,增强了CDC活性。单独的突变E345R也导致IgG六聚体形成,具有增加的C1q结合和增强的CDC活性(见例如Wang

et al. (2018) Protein Cell 9(1):63-73; Saxena et al. (2016) Front. Immunol. 7:580; Saunders, K.O. (2019) Front. Immunol. 10:1296)。

[1002] 糖工程化也可用于改善补体结合;可以修饰Fc的C_H2域内的N297聚糖以提高CDC活性。例如,与未修饰的IgG1糖型相比,IgG1 Fc中过多的半乳糖基化增加了C1q结合和CDC活性,并且还提高了热稳定性。因此,Fc的半乳糖基化可用于产生具有增强的CDC活性的稳定生物制品(见例如Saunders (2019) Front. Immunol. 10:1296)。

[1003] 下表8总结了增加与Fc γ R或C1q结合并因此增强免疫效应子功能的Fc修饰,所述效应子功能包括ADCC、ADCP和CDC,并提供了根据Kabat编号和序号、参考SEQ ID NO:9所示IgG1重链恒定结构域序列的相应修饰。可以将这些修饰中的任何一个或多个单独或以各种组合引入本文提供的构建体的IgG1 Fc部分。本领域已知的赋予增强或增加的免疫效应子功能的其它修饰也被考虑用于本文。

[1004] 表8

[1005]

增强免疫效应子功能的 IgG1 Fc 修饰			
根据 EU 编号的修饰	根据 Kabat 编号的修饰	根据顺序编号的修饰 (SEQ ID NO:9)	作用
S239D	S252D	S122D	增加与 Fc γ RIIIa 的结合; 增强 ADCC
I332E	I351E	I215E	增加与 Fc γ RIIIa 的结合; 增强 ADCC
S239D/I332E	S252D/I351E	S122D/ I215E	增加与 Fc γ RIIIa 的结合; 增强 ADCC
S239D/A330L/I332E	S252D/A349L/I351E	S122D/A213L/I215E	增加与 Fc γ RIIIa 的结合; 增强 ADCC
S298A/E333A/K334A	S317A/E352A/K353A	S181A/E216A/K217A	增加与 Fc γ RIIIa 的结合; 增强 ADCC
F243L/R292P/Y300L/ V305I/P396L	F256L/R309P/Y319L/ V324I/P424L	F126L/R175P/Y183L/ V188I/P279L	增加与 Fc γ RIIIa 和 Fc γ RIIa 的结合; 增 强 ADCC
L235V/F243L/R292P/ Y300L/P396L	L248V/F256L/R309P/ Y319L/P424L	L118V/F126L/R175P/ Y183L/P279L	增加与 Fc γ RIIIa 的结 合; 增强 ADCC
F243L/R292P/Y300L	F256L/R309P/Y319L	F126L/R175P/Y183L	增加与 Fc γ RIIIa 的结 合; 增强 ADCC
L234Y/G236W/S298A (第一重链) 和 S239D/A330L/I332E	L247Y/G249W/S317A (第一重链) 和 S252D/A349L/I351E	L117Y/G119A/S181A (第一重链) 和 S122D/A213L/I215E	增加与 Fc γ RIIIa 的结 合; 增强 ADCC

[1006]

(第二重链) L234Y/L235Q/G236W/ S239M/H268D/D270E/ S298A (第一重链)和 D270E/K326D/A330M /K334E (第二重链)	(第二重链) L247Y/L248Q/G249W/ S252M/H281D/D283E/ S317A (第一重链)和 D283E/K345D/A349M /K353E (第二重链)	(第二重链) L117Y/L118Q/G119W/ S122M/H151D/D153E/ S181A (第一重链)和 D153E/K209D/A213M /K217E (第二重链)	增加与 FcγRIIIa 的结 合; 增强 ADCC
A327Q/P329A	A346Q/P348A	A210Q/P212A	增加与 FcγRI 的结 合
D265A/S267A/H268A/ D270A/K326A/S337A	D278A/S280A/H281A/ D283A/K345A/S357A	D148A/S150A/H151A/ D153A/K345A/S220A	增加与 FcγRIIa 的结 合
T256A/K290A/S298A/ E333A/K334A	T269A/K307A/S317A/ E352A/K353A	T139A/K173A/S181A/ E216A/K217A	增加与 FcγRIIIa 的结 合
G236A	G249A	G119A	增加与 FcγRIIa 的结 合; 增强 ADCP
G236A/I332E	G249A/I351E	G119A/I215E	增加与 FcγRIIa 和 FcγRIIIa 的结合; 增 强 ADCC 和 ADCP
G236A/S239D/I332E	G249A/S252D/I351E	G119A/S122D/I215E	增加与 FcγRI、 FcγRIIa 和 FcγRIIIa 的结合; 增强 ADCC 和 ADCP
G236A/S239D/A330L/ I332E	G249A/S252D/A349L/ I351E	G119A/S122D/A213L/I 215E	增加与 FcγRIIa 和 FcγRIIIa 的结合; 增 强 ADCC 和 ADCP
在 N297 的双触角聚糖	在 N314 的双触角聚糖	在 N180 的双触角聚糖	增加与 FcγRIIIa 的结 合; 增强 ADCC
在 N297 的去岩藻糖基 化聚糖	在 N314 的去岩藻糖基 化聚糖	在 N180 的去岩藻糖基 化聚糖	增加与 FcγRIIIa 的结 合; 增强 ADCC
K326W	K345W	K209W	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC
K326A	K345A	K209A	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC
E333A	E352A	E216A	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC
K326A/E333A	K345A/E352A	K209A/E216A	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC 并保留 ADCC 活性
K326W/E333S	K345W/E352S	K209W/E216S	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC
K326M/E333S	K345M/E352S	K209M/E216S	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC 并保留 ADCC 活性
K222W/T223W	K235W/T236W	K105W/T106W	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC
K222W/T223W/H224 W	K235W/T236W/H237 W	K105W/T106W/H107 W	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC
D221W/K222W	D234W/K235W	D104W/K105K	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC
C220D/D221C	C233D/D234C	C103D/D104C	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC 并保护 ADCC 活性
C220D/D221C/K222W /T223W	C233D/D234C/K235W /T236W	C103D/D104C/K105W /T106W	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC

	H268F/S324T	H281F/S343T	H151F/S207T	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC
	S267E	S280E	S150E	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC
	H268F	H281F	H151F	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC
	S324T	S343T	S207T	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC
[1007]	S267E/H268F/S324T	S280E/H281F/S343T	S150E/H151F/S207T	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC
	G236A/I332E/S267E/H 268F/S324T	G249A/I351E/S280E/H 281F/S343T	G119A/I215E/S150E/H 151F/S207T	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC
	E345R	E366R	E228R	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC; IgG1 六 聚体形成
	E345R/E430G/S440Y	E366R/E461G/S471Y	E228R/E313G/S323Y	增加与 C1q 的结合; 增强 CDC; IgG1 六 聚体形成

[1008] 还可以工程化治疗性抗体来降低或消除免疫效应子功能。出于本文的目的, 在一些实施方案中, 感兴趣的是例如降低或消除ADCC活性。本文中包含Fc的构建体通常被修饰以降低或消除ADCC活性。

[1009] 降低或消除免疫效应子功能是有意义的, 例如其中: 治疗性抗体是拮抗性的以防止受体-配体相互作用和信号传导; 抗体是交联受体并诱导信号传导的受体激动剂; 抗体是将药物递送至表达抗原的靶细胞的药物递送载体; 并且, 效应子功能的减少或消除可防止靶细胞死亡或不需要的细胞因子分泌。降低的效应子功能还可以防止抗体-药物缀合物与Fc γ R相互作用, 从而降低脱靶细胞毒性。在与第一个批准的单克隆抗体莫罗单抗(muromonab)的施用相关的不良事件发生后, 减少或消除效应子功能的重要性变得明显其被设计为防止接受供体肾脏、肺或心脏的移植患者的T细胞活化。施用了莫罗单抗的患者经历了促炎细胞因子的危险诱导(即细胞因子风暴); 这部分是由于莫罗单抗与Fc γ R的相互作用所致(见例如Wang et al. (2018)Protein Cell 9(1):63-73; 和Saunders, K.O. (2019)Front. Immunol. 10:1296)。

[1010] 有许多已知的突变会降低或消除受体功能。例如, 人IgG4中的L235E和F234A/L235A置换, 以及人IgG1中的L235E和L234A/L235A置换(均根据EU编号)可降低Fc γ R和C1q结合, 并降低效应子功能, 例如炎性细胞因子释放。治疗性抗体释放的炎性细胞因子可导致不良反应。将S228P/L235E置换引入IgG4时, 也会减少与Fc γ R的结合; S228P突变改善了IgG4的稳定性。IgG4 Fc中的突变S228P/F234A/L235A降低了与Fc γ RI、IIa和IIIa的结合, 并降低了ADCC和CDC。IgG1 Fc中的三重突变L234E/L235F/P331S降低与Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII和C1q的结合, 并降低CDC, IgG1Fc中的突变L234A/L235A/P329G消除Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII和C1q结合, 并降低ADCP。突变L234F/L235E/P331S也降低了与Fc γ R和C1q的结合, 并降低了IgG1 Fc的效应子功能。IgG1 Fc中的突变G237A和E318A均降低了与Fc γ RII的结合并降低了ADCP; 突变D265A和E233P降低与Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII的结合, 并降低ADCC和ADCP, 突变G236R/L328R降低与所有Fc γ R的结合并降低ADCC。晶体结构数据显示残基P329的构象变化, 其包含在所有Fc γ R中出现的两个保守色氨酸残基之间, 形成“脯氨酸夹心”, 可能不利于与Fc γ R的相互作用, 并且残基D270的修饰会对与C1q相互作用产生负

面影响(见例如Wang et al. (2018) *Protein Cell* 9(1):63-73;Saunders,K.O. (2019) *Front.Immunol.*10:1296;国际申请公开号W0 2019/226750)。

[1011] 补体级联的诱导与抗体注射部位的不良反应有关,并消除C1q与Fc的结合,这在CDC的激活中也是初始的。Fc区的修饰消除了C1q结合,可用于消除含有Fc区的构建体的CDC。许多消除Fc γ R结合的突变也消除了C1q结合,如上所示。例如,突变A330L破坏了C1q结合并减少了CDC,同时也消除了Fc γ RIIb结合。突变D270A、P329A、K322A和P331A也导致C1q结合减少和CDC活性降低(见例如Saunders,K.O. (2019) *Front.Immunol.*10:1296)。

[1012] 糖基工程可用于消除Fc γ R和C1q结合。如本文别处所讨论的,在残基N297的聚糖是复杂的双触角聚糖。将该聚糖修饰为高甘露糖聚糖(即高甘露糖糖基化)会降低IgG1Fc对C1q的亲合力并降低CDC活性。Fc中减少或消除C1q和Fc γ RI结合的突变也可导致N297聚糖的半乳糖基化和唾液酸化增加;这样的突变包括例如F241A、V264A和D265A。根据EU编号,突变N297A、N297Q、N297D和N297G分别通过消除Fc与C1q和Fc γ R的相互作用,去除N297处的糖基化位点并降低效应子功能,例如CDC和ADCC。N297G/D265A的组合几乎完全消除了与Fc γ R和C1q的结合。缺乏糖基化的IgG3Fc(糖苷配基Fc)与Fc γ RI和C1q的结合减少(见例如Wang et al. (2018) *Protein Cell* 9(1):63-73;Saunders,K.O. (2019) *Front.Immunol.*10:1296)。

[1013] 为了减少或消除Fc效应子功能,可以置换来自不同亚类的缺乏相反功能的大部分Fc区域以生成交叉亚类Fc区域。例如,IgG2与Fc γ R的结合较差但与C1q结合,而IgG4缺乏与C1q的结合但与Fc γ Rs反应;因此,可以构建缺乏C1q和Fc γ R结合的IgG2和IgG4 CH结构域的组合。通常,在IgG1/IgG4嵌合体中,铰链和C_{H1}结构域来自IgG2,C_{H2}和C_{H3}结构域来自IgG4。由于IgG1和IgG3比IgG2和IgG4更有效地募集补体,并且由于IgG2和IgG4诱导ADCC的能力有限,因此交叉亚类方法可以降低效应子功能。例如,抗C5 mAb依库丽单抗(eculizumab)含有IgG2残基118-260(根据EU编号;对应于Kabat编号的残基114-273,以及参考SEQ ID NO:11的残基1-139),和IgG4残基261-447(根据EU编号;对应于Kabat编号的残基274-478,以及参考SEQ ID NO:15的残基141-327),并且具有有限的或不可检测的效应子功能。类似地,具有来自IgG4的点突变H268Q/V309L/A330S/P331S的IgG2变体(IgG2m4)(根据EU编号;对应于Kabat编号的H281Q/V328L/A349S/P350S,以及参考SEQ ID NO:11的H147Q/V188L/A209S/P210S)缺少与所有Fc γ R和C1q的结合,并表现出降低的效应子功能。含有IgG2至IgG4交叉亚类突变V309L/A330S/P331S的变体(称为IgG2 σ)(根据EU编号;对应于Kabat编号的V328L/A349S/P350S,以及参考SEQ ID NO:11的V188L/A209S/P210S)以及非种系突变V234A/G237A/P238S/H268A(根据EU编号;对应于Kabat编号的V247A/G250A/P251S/H281A,以及参考SEQ ID NO:11的V114A/G116A/P117S/H147A),消除与Fc γ Rs和C1q的结合,并表现出不可检测的CDC、ADCC和ADCP活性。IgG1/IgG4交叉亚类变体IgG1 σ ,包括突变L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S,缺少与Fc γ RI和IIIa的结合,并且在高浓度抗体下与Fc γ RIIa和IIb的结合非常弱,导致ADCC和CDC活性降低(见例如Wang et al. (2018) *Protein Cell* 9(1):63-73;Saunders,K.O. (2019) *Front.Immunol.*10:1296)。

[1014] 下面的表9和10总结了一些IgG1和IgG4 Fc修饰,其减少或消除了与Fc γ R和/或C1q的结合,并因此减少或消除了免疫效应子功能,包括ADCC、ADCP和CDC,所述修饰可以被引入到本文构建体的Fc区域中。这些表参考SEQ ID NO:9所示的IgG1重链恒定域的序列或SEQ ID NO:15所示的IgG4重链恒定域的序列,提供了根据Kabat编号和序号的相应修饰。可

以将这些修饰中的任何一个或多个单独或以各种组合引入本文提供的构建体的IgG1 Fc部分。本领域已知的降低或消除免疫效应子功能的其它修饰也被考虑用于本文。

[1015] 表9

减少或消除免疫效应子功能的 IgG1 Fc 修饰			
根据 EU 编号的修饰	根据 Kabat 编号的修饰	根据顺序编号的修饰 (SEQ ID NO:15)	作用
L235E	L248E	L118E	减少 FcγR 结合; 减少 ADCC
L234A/L235A	L247A/L248A	L117A/L118A	减少 FcγR 和 C1q 结合; 减少的 ADCC, ADCP 和 CDC
L234E/L235F/P331S	L247E/L248F/P350S	L117E/L118F/P214S	减少 FcγR 和 C1q 结合; 减少 CDC
L234F/L235E/P331S	L247F/L248E/P350S	L117F/L118E/P214S	减少 FcγR 和 C1q 结合; 减少效应子功能
L234A/L235A/P329G	L247A/L248A/P348G	L117A/L118A/P212G	消除 FcγR 和 C1q 结合; 减少 ADCP 和 CDC
L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S	L247A/L248A/G250A/P251S/H281A/A349S/P350S	L117A/L118A/G120A/P121S/H151A/A213S/P214S	减少与 FcγR1、Iia、Iib 和 IIIa 的结合; 减少的 ADCC 和 CDC
G236R/L328R	G249R/L347R	G119R/L211R	减少与 FcγRs 的结合; 减少的 ADCC
G237A	G250A	G120A	减少与 FcγRII 结合; 减少的 ADCP
E318A	E337A	E201A	减少与 FcγRII 结合; 减少的 ADCP
D265A	D278A	D148A	减少与 FcγRI、II、III 的结合; 减少的 ADCC 和 ADCP
E233P	E246P	E116P	减少与 FcγRI、II、III 的结合; 减少的 ADCC 和 ADCP
N297A	N314A	N180A	去除糖基化部位; 降低与 FcγRs 的相互作用; 减少效应子功能 (CDC, ADCC, ADCP)
N297Q	N314Q	N180Q	去除糖基化部位; 降低与 FcγRs 的相互作用; 减少效应子功能 (CDC, ADCC, ADCP)
N297D	N314D	N180D	去除糖基化部位; 降低与 FcγRs 的相互作用; 减少效应子功能 (CDC, ADCC, ADCP)
N297G	N314G	N180G	去除糖基化部位; 降低与 FcγRs 的相互作用; 减少效应子功能 (CDC, ADCC, ADCP)
N297G/D265A	N314G/D278A	N180G/D148A	减少与 FcγRs 和 C1q 的结合; 减少效应子功能
A330L	A349L	A213L	减少的 C1q 结合; 减少的 CDC
D270A	D283A	D153A	减少的 C1q 结合; 减少的 CDC
P329A	P348A	P212A	减少的 C1q 结合; 减少的 CDC
P331A	P350A	P214A	减少的 C1q 结合; 减少的 CDC
K322A	K341A	K205A	减少的 C1q 结合; 减少的 CDC
V264A	V277A	V147A	减少的 C1q 结合; 减少的 CDC
F241A	F254A	F124A	减少的 C1q 结合; 减少的 CDC

[1016]

[1017]

[1018] 表10

减少或消除免疫效应子功能的 IgG4 Fc 修饰			
根据 EU 编号的修饰	根据 Kabat 编号的修饰	根据顺序编号的修饰(SEQ ID NO: 15)	作用
L235E	L248E	L115E	减少 Fc γ R 结合; 减少 ADCC
F234A/L235A	F247A/L248A	F114A/L115A	减少 Fc γ R 和 C1q 结合; 减少的 ADCC、ADCP 和 CDC
S228P/L235E	S241P/L248E	S108P/L115E	减少 Fc γ R 结合; 减少的效应子功能
S228P/F234A/L235A	S241P/F247A/L248A	S108P/F114A/L115A	减少与 Fc γ RI、IIa 和 IIIa 的结合; 减少的 ADCC 和 CDC

[1019] ii. Fc部分的其它修饰

[1020] 还可以修饰Fc部分以增加与抑制性Fc γ R的结合,从而抑制免疫应答。具有免疫抑制性Fc修饰的治疗性抗体有利于治疗炎症疾病。可以将这些突变并入本文构建体的Fc部分中,这些构建体旨在治疗具有炎症组分或病因学或参与的疾病和病症。例如,含有突变S267E/L328F(根据EU编号)的抗CD19抗体(XmAb5871;Xencor)的免疫抑制版本在系统性红斑狼疮(SLE)患者中结合抑制性Fc γ RIIb,亲和力增加约430倍,并耗竭CD19+B细胞。当将相同的突变引入人源化抗IgE抗体(XmAb7195;Xencor)时,阻止IgE与其存在于嗜碱性粒细胞和肥大细胞上的高亲和力受体(Fc ϵ RI)结合,增加对Fc γ RIIb的亲和力约430倍,用于治疗过敏症,包括过敏性哮喘。抗CD3抗体TRX4(Tolerx),含有去糖基化Fc突变N297A(根据EU编号)在1型糖尿病(自身免疫性)患者中抑制病原性T细胞并恢复正常Treg细胞活性(见例如Saxena et al. (2016)Front. Immunol. 7:580)。

[1021] 另一个实例是单体IgG1 Fc(mFc),其含有突变L351S/T366R/L368H/P395K(根据EU编号),结合FcRn并表现出与二聚体F相似的体内半衰期,并以高亲和力选择性结合Fc γ RI,但不结合Fc γ RIIIa,从而消除Fc介导的细胞毒性,包括ADCC和CDC。Fc γ RI在炎症相关细胞如炎症巨噬细胞上表达。靶向该受体可用于治疗慢性炎症性疾病,例如关节炎、多发性硬化症和癌症。当与假单胞菌(Pseudomonas)外毒素A片段(PE38)融合时,变体mFc杀死Fc γ RI⁺巨噬细胞样U937细胞。变体mFc和融合蛋白均未在体外表现出任何细胞毒性(ADCC或CDC)(见例如Ying et al. (2014)mAbs 6(5):1201-1210)。

[1022] 增加与抑制性Fc γ RIIb和/或Fc γ RI而非Fc γ RIIIa的结合或赋予其选择性结合的修饰可以工程化到本文提供的TNFR1拮抗剂和TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体中的IgG Fc区中。这些修饰包括但不限于根据EU编号的S267E、N297A、L328F、L351S、T366R、L368H、P395K、S267E/L328F、L351S/T366R/L368H/P395K中的一项或多项及其组合。下表11显示了通过Kabat编号和序号参考SEQ ID NO:9所示IgG重链恒定域序列的相应替换。

[1023] 表11:

增加与抑制性 Fc γ RIIb 结合的 IgG1 Fc 修饰		
根据 EU 编号的修饰	根据 Kabat 编号的修饰	根据顺序编号的修饰(SEQ

[1024]

		ID NO:9)
[1026]	S267E	S280E
	N297A	N314A
	L328F	L347F
	L351S	L372S
	T366R	T389R
	L368H	L391H
	P395K	P423K
	S267E/L328F	S280E/L347F
	L351S/T366R/L368H/P395K	L372S/T389R/L391H/P423K
		S150E
		N180A
		L211F
		L234S
		T249R
		L251H
		P278K
		S150E/L211F
		L234S/T249R/L251H/P278K

[1027] iii. 人血清白蛋白 (HSA)

[1028] 先前提供的dAb(见例如国际PCT申请号2008/149144)的一个问题是其血清半衰期不足以用作治疗剂。其与抗HSA抗体连接以结合HSA;所述半衰期是不足的。在本文中,dAb或Vhh抗体与HSA连接。HSA有33个半胱氨酸;Cys34是唯一具有不参与二硫键的游离巯基的半胱氨酸。HSA可以通过其N或C末端直接或通过接头例如Gly-Ser接头连接于dAb,以延长dAb的血清半衰期。它还可以通过游离半胱氨酸连接。实施例6举例说明了含有通过Gly-Ser接头连接于HSA的N末端的dAb的构建体。

[1029] e. 多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体

[1030] 为了选择性抑制TNFR1信号传导,同时增强TNFR2信号传导的有益作用,提供了含有TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂的多特异性例如双特异性构建体(见例如上式2)。如上文所讨论,这些多特异性构建体根据需要可以包括接头和活性调节剂以赋予有利性质。

[1031] 本文提供的构建体的TNFR1抑制剂和TNFR2激动剂部分可以是多肽或小分子或其组合;它们可以以任何顺序直接连接,或通过接头间接连接,例如Gly-Ser接头,包括本文所述的任何接头和/或铰链区,或者它们可以通过化学接头连接。所述构建体可以含有活性调节剂,例如Fc区或修饰的Fc,和/或其它活性调节剂,例如延长半衰期的多肽,例如HSA,并且可以是聚合物,例如PEG或聚合物部分。

[1032] 将人TNFR1拮抗剂例如SEQ ID NO:54-703任一所示TNFR1拮抗剂、或与SEQ ID NO:54-703任一所示TNFR1拮抗剂具有约或至少约95%序列相同性的TNFR1拮抗剂的C末端,与例如来自曲妥珠单抗的IgG1 Fc的第一IgG1 Fc的N末端融合。顺序可以颠倒。

[1033] Fc区含有曲妥珠单抗重链的C_H2和C_H3结构域(见例如SEQ ID NO:26的残基234-450)。在一些实施方案中,TNFR1拮抗剂和第一Fc亚基之间的接头含有抗体如曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列(SCDKTH;对应于SEQ ID NO:26的残基222-227)。为了赋予融合蛋白的蛋白酶抗性和增加柔性,将SCDKTH铰链序列或蛋白酶切割位点或这两者可以用Gly-Ser短肽接头替换,例如GSGS、GGGGS或GGGGSGGGSGGGGS及其它本文描述的和/或本领域已知的接头。在其它实施方案中,仅包括GS接头。在另一个实施方案中,接头含有PEG或支链PEG,分子量为30kDa或更大。

[1034] 在一些实施方案中,Fc亚基(也称为区域或结构域)可以是多聚化的。第一个Fc亚基通过二硫键附着于到第二个Fc亚基。对于双特异性构建体,第二个Fc亚基的C末端连接于TNFR2激动剂的N末端,例如SEQ ID NO:765-801、803和810任一所示TNFR2激动剂,或与SEQ ID NO:765-801、803和810任一所示TNFR2激动剂或小分子TNFR2激动剂具有约或至少约95%序列相同性的TNFR2激动剂。第二个Fc亚基和TNFR2激动剂通过接头连接,例如曲妥珠单抗的SCDKTH铰链序列,单独或与短GS接头组合,如上所述。在其它实施方案中,仅包括GS

接头。在备选实施方案中,可以使用TNFR2激动性单克隆抗体的单链Fv片段(scFv)或Fab区或其它抗原结合片段;scFv或Fab通过N末端与Fc的C末端融合而二聚化。如本文所提供,抗原结合片段可衍生自TNFR2激动性mAb MR2-1和MAB226。

[1035] 可以修饰Fc亚基以改变其活性。例如,修饰二聚体以防止同型二聚化,和/或消除免疫效应子功能,例如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),和/或增强新生儿FcR(FcRn)再循环以增加重组构建体的体内半衰期和稳定性,如下所述。

[1036] 在构建体用于治疗炎症疾病的实施方案中,对Fc部分进行修饰以具有降低或消除的效应子功能。例如,在构建体用于治疗癌症的实施方案中,修饰Fc二聚体以增强免疫效应子功能,例如ADCC、ADCP和/或CDC。具体的Fc修饰取决于预期的疾病目标。

[1037] 在一些实施方案中,Fc亚基可以含有IgG4 Fc区,例如源自纳武单抗(Opdivo®)的IgG4 Fc,其含有纳武单抗重链的C_H2和C_H3结构域(见例如SEQ ID NO:29残基224-440)。含有纳武单抗铰链序列ESKYGPPCPPCP(见例如SEQ ID NO:29的残基212-223)的全部或足以提供柔性的部分的短肽接头可以包含在纳武单抗Fc区和TNFR1拮抗剂和/或TNFR2激动剂之间。任选地或备选地,还可以包括GS接头。

[1038] 在示例的实施方案中,由于TNFR2可能需要受体聚集/簇集来进行信号传导,因此可以产生二价抗体样结构以实现优异的激动作用。在这个实施方案中,将第一和第二Fc亚基的C末端各自融合到TNFR2激动剂的N末端,如上所述。修饰Fc二聚体以防止同二聚化,消除抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC),并增强新生儿FcR再循环以增加重组构建体的体内半衰期,如本文别处所述。

[1039] 用于连接多特异性构建体、以PEG为中心的多特异性构建体例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体的组分的聚乙二醇化

[1040] 聚乙二醇化是指生物相容的和生物惰性的聚合物聚乙二醇(PEG)与分子如蛋白质、肽、药物和其它分子的共价连接,这是构建体活性的另一种调节剂。它可以增加分子的水溶性,增加分子的分子量,延长体内循环时间,降低外周清除率,最小化非特异性摄取,并通过增强的通透性和滞留性(EPR)作用靶向肿瘤。治疗剂(包括蛋白质治疗剂)的聚乙二醇化可以掩盖不需要的抗原性表面标记,以保护治疗剂免受抗体和抗原处理细胞的作用,并减少蛋白水解酶和其它失活过程的降解。聚乙二醇化还增加了蛋白质治疗剂的分子量,延长了体内半衰期及减少了外周清除率,并允许减少施用频率。

[1041] 治疗分子与PEG等聚合物的化学缀合可以形成稳定的酯键或酰胺键,以及二硫键。PEG与感兴趣的分子例如本文提供的TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂的缀合可以例如通过使用偶联剂实现,例如二环己基碳二亚胺(DCC)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、HATU(1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化六氟磷酸盐)或本领域已知的其它偶联剂,或通过使用N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯,例如PEG NHS酯。其它方法包括使用PEG马来酰亚胺,其与蛋白质或肽上的巯基反应;PEG五氟苯基(PFP)酯,其与伯胺和仲胺反应;硫醇PEG,其与半胱氨酸残基侧链上的硫醇反应;以及点击化学技术。PEG叠氮化物、炔丙基PEG、氨基PEG、羟基PEG、氨基PEG、PEG酸、生物素PEG、PEG甲苯磺酸酯和具有其它官能团的PEG也可商购,并可用于与肽和其它治疗分子缀合。

[1042] 制备PEG-蛋白质缀合物的常用方法是将蛋白质上的-NH₂基团与具有亲电官能团

的单甲氧基PEG (mPEG) 偶联;这种方法导致形成与核心球状蛋白质共价连接的聚合物链。这种性质在本文中被利用以提供以PEG为中心的构建体,其中PEG或化学上相似或合适的部分展示一个或多个不同靶标的多个结合或相互作用部分。为了增加药物(结合部分)荷载,可以使用多臂或支链PEG(或类似部分或支链部分)。或者,可以将药物与小PEG树突结合(见例如BROADPHARM®网站上的PEG缀合方案,可在**broadpharm.com/web/protocols.php**获得;另见Banerjee et al. (2012) *Journal of Drug Delivery*, Article ID 103973)。为了连接多个例如两个不同的治疗部分,可以使用例如在每个末端具有不同反应基团的异多功能例如异双功能PEG部分。PEG部分可以有两个、三个或更多不同的反应基团。此类分子可用于递送两种或多种不同的配体,靶向相同细胞或不同细胞上的两种不同受体,例如本文所述的TNFR1和TNFR2,或递送结合同一受体上不同位点的两种靶向剂,或簇集受体,例如以激活或抑制受体,或交联两个不同的受体,例如以抑制受体活性。同双功能PEG分子在每个末端具有相同的反应基团,可用于在同一细胞上或在PEG链长度允许的情况下在不同细胞上簇集相同的受体。此类构建体可用于捕获循环的可溶性受体或配体,例如TNF。本文的图3提供了使用PEG部分来展示药物(结合反应性部分)的示例性构建体。

[1043] 为了增加反应性和柔性、增强配体-蛋白质结合并降低空间位阻,所述构建体可以包括本文所述的一个接头分子或多个接头分子作为间隔分子。这样的间隔物包括例如氨基酸间隔物,例如丙氨酸、甘氨酸和小肽。本文所述的任何接头,包括GS接头和其它柔性接头以及刚性接头,均可用于将反应性部分如本文所述的TNFR1抑制剂部分和/或本文所述的TNFR2激动剂缀合至多功能PEG分子。这些构建体还可以包括活性调节剂,例如Fc区。

[1044] 如本文所述支链PEG部分或多臂PEG部分(见例如图5)在有或没有接头下的使用,不限于在含有TNFR1抑制剂部分或TNFR2激动剂或两者组合的构建体中使用,而是可用于呈递任何感兴趣的受体的其它抑制剂和/或激动剂部分和/或也可用于产生免疫毒素和其它毒性缀合物。用于合成大量PEG部分及其变体的方法是已知的(见例如美国专利公开号2010/0221213; Han et al., (2014) *Sci Rep* 4:4387. .)

[1045] 例如,在包含TNFR1抑制剂和TNFR2激动剂部分的一些实施方案中,所述构建体包括双功能PEG部分,并且还包含PEG部分与TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂中的每一个之间的接头。多特异性构建体包含支链PEG聚合物,接头连接于该聚合物上,TNFR1抑制剂部分和TNFR2部分之一或两者连接于该聚合物上。合适的PEG部分可具有30kDa或更大的分子量,例如30-40kDa或更大。示例性支链PEG分子可以是例如3臂、异双功能PEG分子,其含有一个臂,具有一种类型的反应基团(RG1;例如-NH₂),连接于TNFR1抑制剂部分,和两个臂,具有不同类型的反应基团(RG2;例如-COOH),每个都与TNFR2激动剂相连。这种3臂异双功能支链PEG分子是可商购的(例如,购自BROADPHARM®)。第一个PEG臂可以连接于TNFR1抑制剂部分的N末端或C末端,另外两个臂可以连接于TNFR2激动剂的N末端或C末端或TNFR2激动剂(如果是小分子)。在一些实施方案中,构建体还可以包括任选的接头,如本文所述。此类接头可包括在PEG臂与TNFR1抑制剂部分和/或TNFR2激动剂之间。这种以PEG为中心的双特异性构建体为TNFR1拮抗剂活性提供单价性,从而防止导致不需要的激动作用的TNFR1受体簇集,并为TNFR2受体簇集提供二价性,从而增强TNFR2信号传导。在图3中描述了本文描述的以PEG为中心的双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体的示例性结构。

[1046] 在另一个实施方案中,TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂之间的接头含有分子量为

30kDa或更大的支链PEG。支链PEG分子含有一个连接于TNFR1拮抗剂N末端的分支,以及两个分别连接于TNFR2激动剂的分支,为TNFR2受体簇集提供二价性,从而增强TNFR2信号传导。

[1047] 图3A-D描绘了多特异性构建体的各种构型,其中PEG部分连接功能部分。聚乙二醇化部分和聚乙二醇化程序在下文H部分中更详细地讨论。用于制备各种PEG接头和构型的方法是本领域技术人员熟知的(见例如creativepegworks.com/pegylation_literature.php;和broadpharm.com/web/protocols.php)。在图3中,每个n可以独立地为1-10,例如1-7、1-5和1-3、1或2。在图3A中,每个n通常为1-3,这取决于展示的特定配体。在图3的其余部分中,n通常为1至5。在所有实施方案中,N可以为1。本领域的技术人员将认识到用作中央接头的PEG部分的其它常规变化;类似的部分可以用来代替PEG。

[1048] 在图3A中:

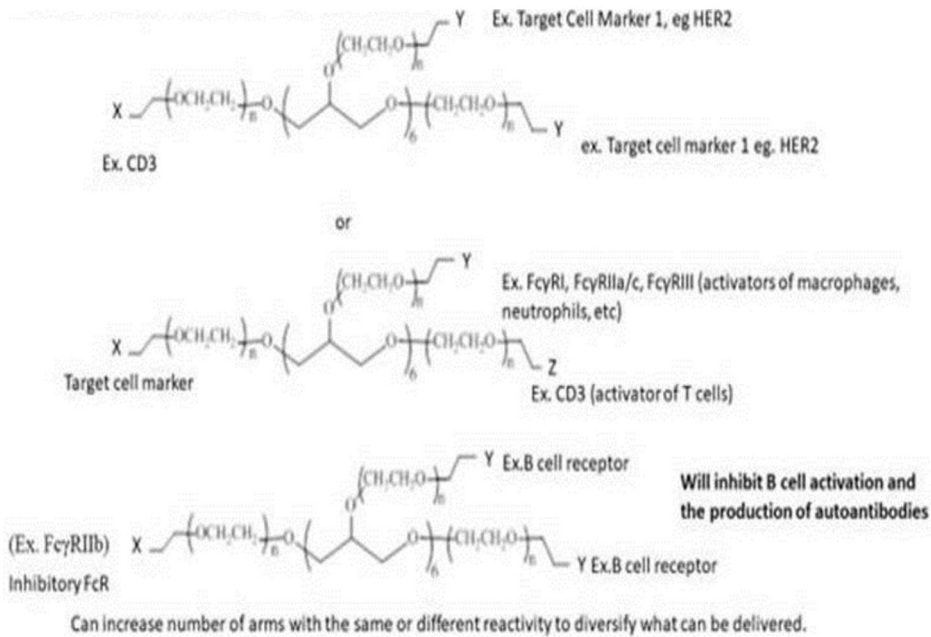
[1049] R^1 是H或低级烷基(C1至C5,或C1或C2),例如 CH_3 ,n通常为1至5,例如1或2。图中描绘了与多个靶标结合的配体或表位(即受体上的表位),例如靶标(圆圈)1a、b、c代表同一受体上的不同表位。靶标2可以是不同受体上的表位。在图3B和3C中,圆圈是靶向表位或受体的配体,n通常为1-5,通常n为1或2,通常为1。图3D描绘了同双功能构建体;n通常为1-3,通常为1或2,例如1。活性调节剂是任选的,例如本文所述或本领域技术人员已知的Fc或其它活性调节剂。在所有这些构建体中,PEG部分通常除了提供活性调节活性之外是“无活性的”,所述调节活性例如是半衰期延长和/或空间上连接与预期靶标(肽、小分子、适体等)结合的操作片段。

[1050] 图3A描绘了一个示例的二价构建体,其中PEG是中心部分。例如,一个圆圈是多肽激动剂、拮抗剂或结合蛋白,例如抗体或其抗原结合片段,或适体(核酸或肽)。另一个圆圈代表不同的部分,例如多糖或受体配体。二价结构提供了用于受体激活的靶标簇集。在本文提供的一些实施方案中,靶标包括TNFR1和TNFR2,并且圆圈代表本文公开内容中描述的TNFR1抑制剂和TNFR2激动剂。图3B描绘了一个单价单配体,例如 $CD3^+$,它可以防止细胞因子释放综合征,通过PEG部分连接于激动剂、拮抗剂或结合蛋白,这对于受体簇集是二价的。图3C描述了异双功能PEG(或其它此类载体),用于交联两种不同的细胞靶向剂,或两种结合同一受体或两种受体上不同位点的药剂例如曲妥珠单抗和帕妥珠单抗。例如,图3B和3C的构建体可用于簇集检查点控制受体以刺激或抑制免疫应答,或交联两种不同的受体以实现受体活性的抑制(即 $CD3$ 相对于 $CD450$),或者将两种不同的配体例如刺激配体和共刺激配体递送至相同细胞上的两个不同受体。这些构建体也可以用作前体药物,指向或积累在具有较低pH值的缺氧区域,在该区域可以通过质子化化学释放连接的部分。例如,对于肿瘤,这可以是毒素,也可以是局部释放的TNF失活剂(即适体或肽)。

[1051] 图3D描绘了同双功能PEG,用于根据链长将相同受体簇集在相同或不同细胞上,或捕获循环的疾病靶标,例如可溶性受体或配体,例如TNF。此外,在所有这些实施方案中,另外的PEG侧链,任选连接于另一个反应基团或功能基团例如血清半衰期延长部分如HSA,或FcRn多肽,可以包含在这些构建体中。

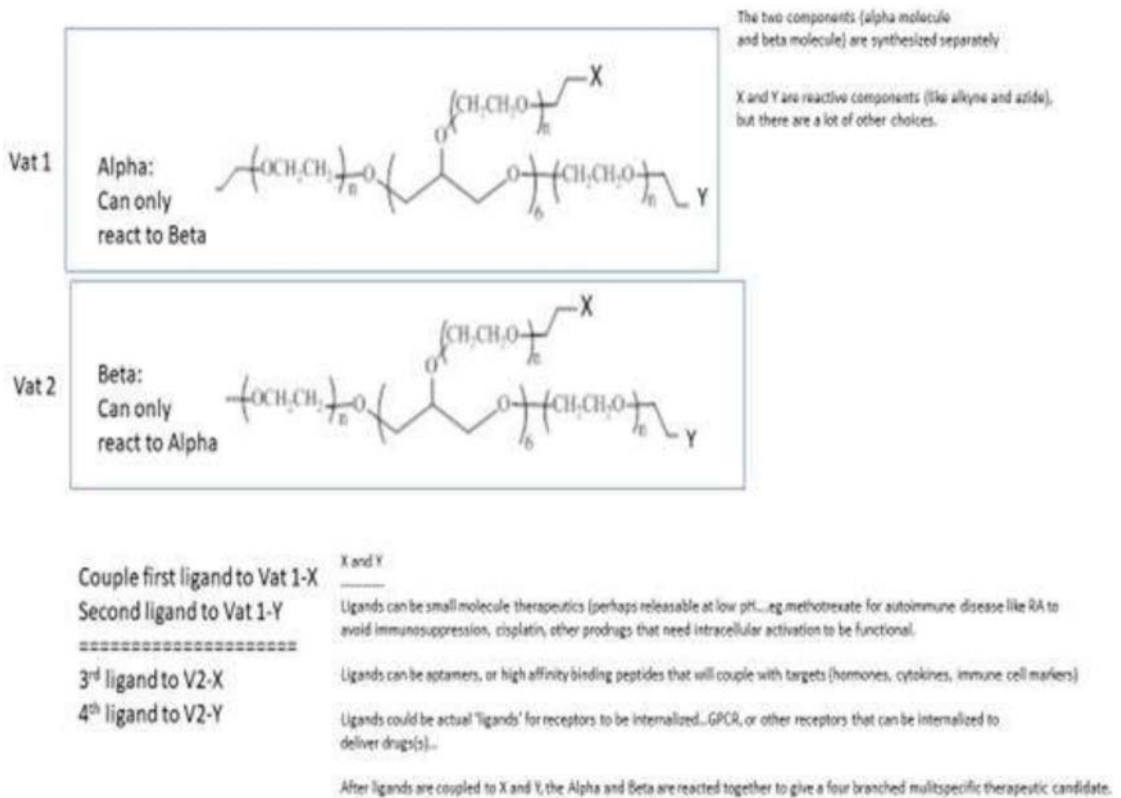
[1052] 还考虑了其它结构,其中X和Y指的是反应基团,例如结合部分,即与靶标相互作用的分子(见图4):

[1053]



[1054] 其它实例(见例如图5)如下所述,X和Y如上所述可以是任何靶向部分或结合部分或与靶标相互作用的药物:

[1055]



[1056] f. 其它活性调节剂-包括增加血清半衰期的部分或完整多肽的融合蛋白

[1057] 构建体的性质可以通过添加增加血清半衰期的全长多肽或其部分来改变,但基本上不改变或不改变构建体与TNFR1和/或TNFR2的相互作用。这包括白蛋白化和其它此类修饰(见上文关于半衰期延长剂的讨论;在Stroh1 (2015) BioDrugs 29(4):215-239中回顾,也见Tan et al. (2018) Current Pharmaceutical Design 24:4932-4946)。

[1058] 5. 蛋白质治疗剂中免疫原性的预测和去除

[1059] 许多蛋白质治疗剂,包括那些含有人类种系序列的蛋白质治疗剂,如重组人细胞因子和人抗体,都具有免疫原性,并诱导宿主对治疗剂的免疫应答。如本文所述,本文提供的构建体,包括本文描述和提供的TNFR1拮抗剂分子和TNFR2激动剂以及多特异性构建体,可在需要时进行修饰,例如通过氨基酸置换,以去除或消除免疫原性或预先存在的抗体相互作用的表位:。

[1060] 对构建体进行免疫原性B细胞和/或T细胞表位的预测、鉴定和去除,从而降低或消除任何潜在的免疫原性,并提高治疗分子的安全性、耐受性和功效。这些分子在体外试验和体内动物模型中进行测试,以确定免疫原性序列去除前后的免疫原性。

[1061] 如下文更详细讨论的,蛋白质治疗剂可含有免疫原性B细胞和/或T细胞表位。当免疫系统将一种蛋白质治疗剂识别为外来物质时,就会诱导针对该治疗剂的协调同、不需要的免疫应答。所述应答可导致临床并发症,包括例如药物快速清除、药物功能和功效降低、延迟的输注样过敏反应、过敏反应,以及在某些情况下危及生命的自身免疫。针对蛋白质治疗剂的免疫应答通过两种不同的机制发生;传统的免疫应答和打破耐受性。自身蛋白和非自身蛋白之间的免疫学区分决定了免疫应答的机制,被识别为外源的蛋白质引发传统的免疫应答,其特征在在于在施用后数日至数周内形成抗体,通常是在单次注射蛋白质治疗剂后。这种应答是持久的,一旦记忆B细胞形成就很难逆转。随后暴露于所述蛋白质会引发继发应答,其特征在在于大量的IgG会对治疗产生负面影响。诱导传统免疫应答的治疗性蛋白质包括替代疗法,例如rhGAA(重组人酸性 α -葡萄糖苷酶)和FVIII,以及单克隆抗体(mAb)疗法,其中互补决定区(CDR)具有高度免疫原性并导致由于缺乏对CDR区域的中心耐受性而产生抗独特型同种抗体。与内源性蛋白质同源的治疗性蛋白质由于已建立的免疫耐受性通常不会导致免疫应答,但是在重复施用后,它们可以通过破坏B细胞耐受性而变成具有免疫原性,例如在施用IFN- γ 、INF- β 和促红细胞生成素(EPO)的情况中(见例如Baker et al. (2010) *Self/Nonsel* 1(4):314-322;Choi et al. (2017) *Methods Mol.Biol.*1529:375-398;Dingman et al. (2019) *J.Pharm.Sci.*108(5):1637-1654)。

[1062] 影响蛋白质治疗剂免疫原性的因素包括例如治疗持续时间以及施用途径和频率;蛋白质治疗剂的皮下施用比静脉内施用更具免疫原性,并且长期、频繁施用治疗剂具有更高的免疫原性。患者相关的因素,例如患者的免疫状态和MHC(或人HLA)分子的多态性,也会影响蛋白质免疫原性。例如,MHC分子具有高度多态性,MHC II存在多个不同的等位基因,包括不同的亚基,如DP、DM、DOA、DOB、DQ和DR;这些受体亚型对表位的结合亲和力不同,因此,患者之间MHC亚型的差异会影响针对蛋白质治疗剂的免疫应答。患者的免疫状态也可以影响免疫原性,因为自身免疫患者比免疫功能低下的患者对蛋白质治疗剂的应答更强烈。影响免疫原性的其它因素包括蛋白产物的性质,包括例如MHC II识别的免疫原性表位的存在、最终产物中聚集体的形成、蛋白质的氧化、制剂中的聚集和翻译后修饰例如糖基化。重组蛋白可以在几种不同的细胞类型中产生,包括例如细菌细胞如大肠杆菌和哺乳动物细胞如CHO细胞。在细菌中表达的蛋白质不经历糖基化等翻译后修饰,但在哺乳动物细胞中产生的蛋白质会受到影响,这会导致不同的免疫原性。例如,以商标Betaseron®销售的干扰素,一种干扰素 β -1b,是在大肠杆菌细胞中产生的,未糖基化,而后来开发的以商标Avonex®销售的产物(干扰素 β -1a),是使用重组DNA技术在CHO细胞中产生。Betaseron的免疫原性比Avonex®干扰素高得多,分别为35%和5%。这种差异可部分归因于可能导致聚集的糖基化

模式差异(见例如Dingman et al. (2019) J.Pharm.Sci.108 (5):1637-1654)。

[1063] 施用蛋白质治疗后的效果是产生高亲和力抗治疗抗体,也称为抗药物抗体或ADA。ADA的产生涉及适应性和非适应性免疫应答的刺激,这些反应主要是多克隆的,并且可以对蛋白质治疗剂产生中和和非中和作用。ADA可以含有多种同种型(例如IgM、IgE和IgG)以及重链恒定区的亚类(例如IgG1-4),并且含有以高亲和力结合蛋白质治疗剂的可变区,因此经历了可变区基因的体细胞超突变。免疫应答是通过识别蛋白质治疗剂中的免疫原性肽片段例如B细胞和T细胞表位诱导的。因此,许多蛋白质治疗剂在应用于临床之前需要去免疫化,同时保留所需的治疗活性(见例如Baker et al. (2010) Self/Nonsel 1(4):314-322;Choi et al. (2017) Methods Mol.Biol.1529:375-398)。

[1064] 针对蛋白质治疗剂的抗药物抗体(ADA)的形成由抗原呈递细胞(APC)介导,例如树突状细胞(DC)和巨噬细胞,以及由B和T淋巴细胞介导。存在于蛋白质治疗剂序列中的MHC II类限制性T细胞表位可导致针对蛋白质治疗剂的体液应答的发生。例如,通过模式识别受体(PRR)刺激的DC刺激T细胞并诱导产生T细胞依赖性高亲和力ADA应答。在T细胞依赖性抗体应答的第一步,APC吞噬所述蛋白质治疗剂,将抗原加工成肽表位,并通过将表位与APC细胞表面上主要组织相容性复合物(MHC) II类分子偶联,将表位呈递给幼稚T细胞。为了完全激活B细胞活化所需的T细胞,T细胞受体(TCR)必须与MHC II表位复合物相互作用,并且这必须伴随来自自由APC提供的共刺激分子的额外信号,例如CD80和CD86。幼稚B细胞通过B细胞表面上的IgM和IgD受体与其同源抗原之间的相互作用而被激活。抗原特异性T细胞然后分泌刺激B细胞增殖和成熟为浆细胞的细胞因子,这导致CD40和CD40配体的结合,提供进一步的信号,通过B细胞克隆扩增和分化为分泌抗体的浆细胞和记忆B细胞而产生抗体。记忆B细胞保持休眠状态,直到随后暴露于所述治疗蛋白,而浆细胞分泌抗体,识别所述治疗蛋白上由APC MHC受体呈递的特定表位。许多蛋白质治疗剂,包括重组人蛋白质,都含有有效的T细胞表位。例如,在通过氨基酸突变作图和去除单个免疫显性(但不是亚显性)T细胞表位后,IFN β 1b的免疫原性得到改善。

[1065] 免疫原性也可以发生在T细胞非依赖性过程中,由此抗原直接与B细胞结合。蛋白质治疗剂的高分子量聚集体可以通过刺激DC或通过交联B细胞受体诱导T细胞依赖性和非依赖性抗药物抗体应答。例如,如果蛋白质治疗剂形成可以交联B细胞受体(BCR)以充分有效地避免T细胞共刺激需要的多聚体结构,则可能会发生B细胞的T细胞非依赖性刺激,从而产生ADA应答。在增强的免疫原性与聚集或多聚的蛋白质之间存在相关性。例如,聚集的而非单体的重组人干扰素(IFN) α 导致在人IFN α 转基因小鼠中产生IFN α 特异性抗体。聚集体的形成取决于药物溶解度和生产工艺(见例如Baker et al. (2010) Self/Nonsel 1(4):314-322;Dingman et al. (2019) J.Pharm.Sci.108(5):1637-1654;De Groot,A.S.and Moise (2007) Curr.Opin.Drug Discov.Devel.10(3):332-340)。

[1066] 针对蛋白质治疗剂的ADA应答可以是中和或结合抗体的形式。中和抗体识别蛋白质治疗剂内生物活性所必需的区域,并直接消除其活性。体液应答针对蛋白质治疗剂内的B细胞表位,从而产生中和蛋白质治疗剂的能力。例如,针对抗体治疗剂独特型的人抗小鼠(HAMA)或人抗人(HAHA)应答具有中和作用,可针对人源化抗体和全人抗体产生。例如,在30%的A型血友病患者中,中和性ADA针对施用的重组FVIII而产生,从而消除了其止血功效,而在89-100%的接受rhGAA的Pompe病患者中,抗rhGAA中和抗体破坏了治疗效力。结合

抗体改变了所述蛋白质治疗剂的药代动力学性质,并通过减少全身暴露而间接影响其功效,例如通过促进蛋白质的快速清除而减少全身暴露。例如,长期使用阿达木单抗会导致约28%的患者发生ADA,从而导致阿达木单抗浓度较低和临床结果较差(见例如Baker et al. (2010) *Self/Nonsel* 1(4):314-322;Dingman et al. (2019) *J.Pharm.Sci.*108(5):1637-1654)。

[1067] 可以在治疗前、治疗期间和治疗后评估和监测ADA水平。有多种检测可供选择。这些测定包括桥接免疫测定,其涉及标记药物,以及检测在两个标记药物分子之间形成桥梁的ADA。桥接检测可用于所有抗体类别和任何类型的样品。用于检测与靶标结合的配体结合测定(LBA)包括表面等离子共振(SPR)、电化学发光和生物层干涉测量法,也可用于检测ADA。可以使用蛋白质特异性测定法,例如Bethesda测定法,其已用于测量中和抗FVIII抗体的浓度。抗PEG抗体也可以在其中生物素-PEG与磁珠缀合的测定中测量,并且使用检测复合物大小变化的传感器测量结合到磁珠上的抗PEG抗体的量。药物耐受测定克服了样品中药物存在造成的限制,并改善了ADA的定量。这些测定包括例如pH位移独特型抗原结合测定、酸解离测定、温度偏移测定和电化学发光测定。酶联免疫吸附测定(ELISA)可用于检测ADA;将蛋白质治疗剂包被在平板上并与样品一起温育以测量结合的ADA。由于缺乏关于ADA的标准,用于检测ADA的ELISA可能会受到限制。其它方法包括免疫PCR,这是桥接测定的延伸,其中将复合物用生物素标记,使用与DNA缀合的抗生物素抗体进行检测。然后使用PCR扩增DNA并量化以评估ADA水平。免疫-LC/MS可用于检测血浆样品中的ADA;样品必须通过用生物素标记药物或在样品中掺加过量药物以饱和ADA结合而富集(见例如Dingman et al. (2019) *J.Pharm.Sci.*108(5):1637-1654)。

[1068] 从蛋白质治疗剂中预测和去除免疫原性表位(即去免疫)可以提高所述治疗剂的有效性和安全性,并防止可能导致临床试验药物失败的不良反应。例如,通过去免疫化从蛋白质治疗剂中耗竭T细胞表位已在蛋白质治疗剂、特别是抗体进入临床试验的过程中取得成功。这些结果表明T细胞表位在产生ADA应答中的重要性,并且去免疫化提供了更安全、免疫原性更低的治疗剂(见例如Baker et al. (2010) *Self/Nonsel* 1(4):314-322)。这些方法可用于检测或鉴定或预测本文提供的构建体的免疫原性,并且可用于鉴定氨基酸突变以消除或减少受试者的免疫原性或免疫应答。提供的是经过修饰以降低或消除免疫原性的构建体。蛋白质治疗剂的去免疫化涉及高免疫原性B细胞和/或T细胞表位的鉴定,以及通过关键氨基酸残基的诱变取代来缺失鉴定的表位。如下所述,蛋白质治疗剂序列内免疫原性区域的临床前预测和评估包括使用专注于表位作图的计算机工具、体外方法,例如表位作图、MHC/HLA亲和力测定和T细胞增殖测定,以及动物模型的体内测试。为了提高蛋白质治疗剂去免疫化的效率,使用了计算表位预测工具。计算机工具包括数据库和算法,可快速预测肽文库中的免疫原性序列。然后可以确认结果,并且可以使用体外测定法进一步评估所述表位对B细胞或T细胞的特异性免疫原性作用。可以在动物模型例如转基因小鼠和非人灵长类动物中使用体内测定来评估对蛋白质治疗剂的免疫应答的影响。

[1069] 一旦鉴定出免疫原性表位,就可以修饰所述治疗剂的氨基酸序列以去除该表位。去除方法包括随机或定点诱变以去除免疫原性序列(即使表位去免疫)。诱变后,重新评估免疫原性序列以确认它不再具有免疫原性。有一些计算机工具可以简化这个过程;例如,可用的程序是依次用其它19种天然存在的氨基酸(尤其是丙氨酸)之一置换免疫原性序列中

的每个氨基酸,然后重新评估该序列的免疫原性。以此方式,在肽合成和免疫原性的体外和/或体内重新评估之前,可以有效地将非免疫原性序列缩小到最有希望的候选者。然而,免疫原性表位的预测和诱变缺失不一定足以使蛋白质去免疫,因为蛋白质必须保持其折叠、稳定和活性结构才能保持其治疗功效。因此,必须选择与蛋白质结构和功能相容的表位缺失突变。

[1070] 下面讨论的方法和方式用于预测、鉴定和消除本文提供的构建体的表位。

[1071] a. B细胞和T细胞表位

[1072] 抗原和抗体之间的相互作用对于诱导针对入侵病原体的体液免疫应答很重要。特异性抗体在称为抗原决定簇或B细胞表位的分立区域识别特定抗原。B细胞表位包含氨基酸簇,这些氨基酸暴露于溶剂且表面可接近,并且被分泌的抗体或B细胞受体(BCR)识别和结合,该受体含有膜结合免疫球蛋白,可诱导细胞或体液免疫应答。

[1073] B细胞表位的鉴定是开发抗体和其它基于蛋白质的治疗剂的一部分。B细胞表位根据空间结构分为连续(也称为线性)表位和不连续(也称为构象)表位,前者含有连续的残基,后者是非线性和构象的。不连续的B细胞表位含有一组暴露于溶剂的氨基酸残基,这些氨基酸残基不完全连续,但当蛋白质/抗原折叠成其三维构象时,它们会靠得很近。大约90%的B细胞表位是构象的。线性B细胞表位可在抗原变性后被抗体识别,但如果抗原变性,构象表位将不再被识别。正确折叠不连续的B细胞表位所需的最小氨基酸序列或接触残基跨度范围是在天然蛋白质中大约为20至400个残基。大多数已鉴定的线性B细胞表位被认为是构象B细胞表位的组成部分,并且已经表明超过70%的不连续B细胞表位含有1-5个线性节段,每个片节段的长度为1至6个氨基酸(见例如Potocnakova et al. (2016) Journal of Immunology Research, Article ID 6760830; Sanchez-Trincado et al. (2017) Journal of Immunology Research, Article ID 2680160)。

[1074] T细胞表位是线性的,通过氨基酸侧链与MHC表位结合槽中结合袋的相互作用与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合。特定侧链的存在与否决定了表位是否与MHC结合以及结合的紧密程度(见例如De Groot, A. S. and Moise, L. (2007) Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 10(3):332-340)。T细胞具有T细胞受体(TCR),其识别在抗原呈递细胞(APC)表面展示并与MHC分子结合的抗原。T细胞表位由MHC I类(MHC I)和II类(MHC II)分子呈递,它们分别被CD8⁺和CD4⁺T细胞识别;因此,存在CD8⁺和CD4⁺T细胞表位。CD8⁺T细胞在CD8⁺T细胞表位识别后形成细胞毒性T淋巴细胞(CTL),同时引发的CD4⁺T细胞形成辅助T(Th)细胞,其扩大免疫应答,或形成调节性T(Treg)细胞,其是免疫抑制性的用(见例如Sanchez-Trincado et al. (2017) Journal of Immunology Research, Article ID 2680160)。

[1075] b. 计算机表位预测方法

[1076] 实验研究和计算机分析表明,大多数表位跨越15-25个残基和600-1000 Å²的面积,环状组构,并且表位序列富含酪氨酸、色氨酸、带电荷及极性氨基酸,具有暴露的侧链,并具有特定的氨基酸对。然而,已经证明表位和非表位残基之间的差异并不显著,仅氨基酸组成不足以区分表位和非表位。表位作图技术与生物信息学的组合导致了疫苗信息学的发展,涉及在免疫学中使用计算机方法来鉴定抗体、B细胞、T细胞和过敏原的结构,预测MHC结合,表位建模和免疫网络分析(见例如Potocnakova et al. (2016) Journal of Immunology Research, Article ID 6760830)。

[1077] i.B细胞表位的计算机预测

[1078] B细胞表位预测鉴定了免疫原性表位,以便其可以被置换/去免疫,例如用于治疗蛋白的生产。已经开发了已知B细胞表位的数据库,包括多方面的数据库,例如免疫表位数据库(IEDB)和IEDB-3D(可在iedb.org获得)和AntiJen(可在ddg-pharmfac.net/antijen/AntiJen/antijenhomepage.htm获得);面向B细胞的数据库,例如BciPep(可在imtech.res.in/raghava/bcipep/info.html获得)、Epitome(可在roslab.org/services/epitome/获得)和过敏原蛋白结构数据库(SDAP;可在fermi.utmb.edu/获得);以及面向单一病原生物的数据库,例如HIV分子免疫学数据库(可在hiv.lanl.gov/content/immunology/index.html获得)、FLAVIdB(可在cvc.dfci.harvard.edu/flavi/获得),以及流感序列和表位数据库(ISED;可在influenza.cdc.go.kr获得)。其它B细胞表位数据库包括构象表位数据库(CED;可在immunenet.cn/ced/获得)、蛋白质数据库(PDB;可在rcsb.org获得)和结构表位数据库(SEDB;可在sedb.bicpu.edu.in获得)(见例如Potocnakova et al. (2016) Journal of Immunology Research, Article ID 6760830)。

[1079] 可获得几种从其序列或结构中预测B细胞表位的算法。所述算法已经开发,最初依赖于通过倾向量表鉴定线性表位,但通过基于机器学习的方法的开发得到改进,例如隐马尔可夫模型(HMM)、递归神经网络(RNN)和支持向量机(SVM)。计算机B细胞表位预测工具包括那些预测连续/线性B细胞表位的工具,以及那些预测不连续/构象B细胞表位的工具。不连续B细胞表位的预测需要有关氨基酸统计信息、空间信息和表面暴露的信息。用于连续/线性B细胞表位预测的Web可用工具包括例如ABCpred(可在crdd.osdd.net/raghava/abcpred/获得)、APCPred(可在omictools.com/apcpred-tool获得)、BCPREDS(BCPred和FBCPred,可在ailab.ist.psu.edu/bcpred/获得)、BepiPred(可在cbs.dtu.dk/services/BepiPred/获得)、LBtope(可在crdd.osdd.net/raghava/lbtope/获得)、BcePred(可在crdd.osdd.net/raghava/bcepred/获得)、EPMLR(可在bioinfo.tsinghua.edu.cn/epitope/EPMLR/获得)、BEST(使用支持向量机工具的B细胞表位预测;可在biomine.csc.vcu.edu/datasets/BEST/获得)、COBEpro(可在scratch.proteomics.ics.uci.edu/获得)、PEOPLE(可在iedb.org/获得),及SVMtrip(可在sysbio.unl.edu/SVMtrip/获得)。用于不连续/构象B细胞表位预测的网络可用工具包括例如CEP(可在bioinfo.ernet.in/cep.htm获得)、DiscoTope(可在cbs.dtu.dk/services/DiscoTope-2.0/获得)、BEpro(先前称作PEPITO;可在pepito.proteomics.ics.uci.edu/获得)、ElliPro(可在tools.immuneepitope.org/ellipro/获得)、SEPPA(改进的蛋白质抗原的空间表位预测服务器;可在badd.tongji.edu.cn/seppa/获得)、EPITOPIA(可在epitopia.tau.ac.il/获得)、CBTOPE(可在crdd.osdd.net/raghava/cbtope获得)、EPCES(可在sysbio.unl.edu/EPCES/获得)、EPSVR(用支持向量回归服务器进行抗原表位预测;可在sysbio.unl.edu/EPSVR/获得)、EPMeta(可在sysbio.unl.edu/EPMeta/获得)、PEASE(使用抗体序列预测表位;可在ofranlab.org/PEASE获得)、EpiPred(可在opig.stats.ox.ac.uk/webapps/sabdab-sabpred/EpiPred.php获得)、3DEX(3D-Epitope-Explorer;在线不可得)、PEPOP(可在pepop.sys2diag.cnrs.fr/获得)、PEPOP 2.0(可在sys2diag.cnrs.fr/index.php?page=pepop获得),及EpiSearch(可在curie.utmb.edu/episearch.html获得)(见例如Potocnakova et al. (2016) Journal of Immunology

Research, Article ID 6760830; Sanchez-Trincado et al. (2017) Journal of Immunology Research, Article ID 2680160; Sun et al. (2013) Comput. Math Method M., Article ID 943636)。

[1080] 基于序列和结合位点的预测方法也可用于预测B细胞表位。基于序列的预测工具依赖于抗原的一级序列,并使用倾向量表来测量每个残基是表位一部分的概率。基于序列的预测工具包括BEST,其可以预测构象B细胞表位。结合位点预测工具,旨在鉴定抗体上构象B细胞表位的结合位点,其包括例如ProMate、ConSurf、PINUP和PIER(见例如Sun et al. (2013) Comput. Math Method M., Article ID 943636)。

[1081] 可以使用基于模拟表位的表位预测方法来鉴定具有已知3D结构的蛋白质或抗原中的构象B细胞表位。模拟表位是根据其结合针对天然抗原产生的抗体的能力选自随机肽文库的肽。基于模拟表位的方法需要输入抗体亲和力选择的肽(即模拟表位)和所选抗原的3D结构。已有基于噬菌体展示实验衍生的模拟表位的表位预测方法,利用模拟表位的统计特征将模拟表位作图到抗原表面重叠的位置片块上,或者通过比对使用模拟表位作图回到抗原序列,其可以指示B细胞表位位置。为了鉴定亲和选择的肽或模拟表位,将随机肽展示在丝状噬菌体的表面,并筛选、洗脱和扩增以一定程度的亲和力结合单克隆抗体的肽。这个选择过程总共重复3-5次,将肽范围缩小到那些具有最高亲和力的肽。模拟表位和表位可以组合单克隆抗体的相同互补位并引起免疫应答,因此具有相似的功能。所选模拟表位具有较高的顺序相似性,表明在与抗体相互作用期间存在某些关键结合基序和物理化学优选性。因此,将模拟表位作图回到源抗原可以帮助更准确地找到真正的表位。模拟表位具有相似的物理化学性质和空间组构,但很少显示出与天然抗原的序列相似性。提供模拟表位信息的数据库包括例如ASPD(可在mgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/aspd获得)、RELIC Peptides(可应要求提供)、PepBank(可在pepbank.mgh.harvard.edu获得)和MimoDB(可在immunt.cn/mimodb获得)。基于计算机模拟表位的预测工具对于将模拟表位作图回到源抗原的表面至关重要的,以便定位最佳比对序列并预测可能的表位区域。基于模拟表位分析的计算机模拟B细胞表位预测工具包括例如MIMOX(可在immunet.cn/mimox/获得)、MimoPro(可在informatics.nenu.edu.cn/MimoPro获得)、Pep-3D-Search(可在kyc.nenu.edu.cn/Pep3DSearch获得)、MIMOP/MimCons(可根据要求提供)、MIMOP/MimAlign(可根据要求提供)、LocaPep(可在atenea.monstes.upm.es/#soft获得)、EpiSearch(可在curie.utmb.edu/episeach.html获得)、Pepitope/PepSurf(可在pepitope.tau.ac.il/sources.html获得)、PepMapper(可在informatics.nenu.edu.cn/PepMapper/获得)、FINDMAP(在线不可得)、EPIMAP(在线不可得)、MEPS(可在capsur.it/meps获得)、3DEX(3D-Epitope-Explorer;在线不可得)、Mapitope(可在pepitope.tau.ac.il获得)及SiteLight(在线不可得)(见例如Potocnakova et al. (2016) Journal of Immunology Research, Article ID 6760830; Sanchez-Trincado et al. (2017) Journal of Immunology Research, Article ID 2680160; Sun et al. (2013) Comput. Math Method M., Article ID 943636)。

[1082] ii. T细胞表位的计算机预测

[1083] 线性T细胞表位通过其氨基酸侧链与MHC表位结合槽中结合袋的相互作用与MHC结合,特定侧链的存在与否决定了T细胞表位是否结合MHC以及结合的紧密程度。对于计算机

预测,有提供现有表位文库的数据库,例如IEDB、Epitome和SEDB,它们提供有关二维T细胞表位的信息。其它计算机T细胞表位数据库包括CED、AntiJen、Bcipep和HLA Epitope Registry。有几个网页和程序可用,可用于分析蛋白质治疗候选物的序列和预测免疫原性表位。例如,可获得许多基于MHC结合基序的工具,其扫描蛋白质序列的潜在的T细胞表位。这些T细胞表位作图工具包括例如EpiMatrix、IEDB、SYFPEITHI、MHC Thread、MHC Pred、MHC Pred 2.0、EpiJen、NetMHC、NetCTL、nHLA Pred、SVMHC和Bimas(见例如De Groot, A.S. and Moise, L. (2007) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 10 (3) :332-340)。例如,MHC Pred算法提供有关氨基酸序列与各种等位基因的MHC结合潜力的信息,EpiMatrix/JanusMatrix预测蛋白质治疗剂与MHC II类受体的等位基因特异性结合,并可以评估T细胞受体界面的结合。用于表位预测的其它算法和程序包括例如ProPred、MMBPred和Protean 3D。表位预测应与体外方法和活性评估相结合,以确保去除免疫原性序列的任何修饰保留治疗蛋白的活性(见例如Dingman et al. (2019) *J. Pharm. Sci.* 108 (5) :1637-1654)。

[1084] iii. 肽-MHC II类结合预测

[1085] 例如,用于鉴定T细胞表位的基于结构的方法依赖于对肽-MHC结构进行建模,并使用分子动力学模拟评估相互作用。基于结构的方法计算量大,预测性能低于数据驱动方法。基于结构的T细胞表位预测工具包括EpiDOCK(可从epidock.ddg-pharmfac.net获得)。肽-MHC结合预测的数据驱动方法基于已知与MHC分子结合的肽序列;所述肽序列可在表位数据库中获得,例如IEDB、EPIMHC、AntiJen以及本文所述和本领域已知的其它表位数据库。肽-MHC结合预测可以基于序列基序(SM),其包括在已知结合MHC分子的特定位置(锚定残基)频繁出现的氨基酸。基序矩阵(MM)评估每个残基(包括非锚定残基)对MHC分子结合的贡献,但不考虑结合亲和力。定量亲和矩阵(QAM)预测肽-MHC结合以及结合亲和力。定量构效关系(QSAR)加性模型预测肽与MHC的结合亲和力为每个位置氨基酸贡献的总和,加上相邻侧链相互作用的贡献。机器学习(ML)是最流行和最强大的方法,它使用的算法是在由结合或不结合MHC分子的肽组成的数据集上训练的,基于ML的辨别模型的实例包括那些基于人工神经网络(ANN)、支持向量机(SVM)、决策树(DT)和隐马尔可夫模型(HMM)的模型(见例如Sanchez-Trincado et al. (2017) *Journal of Immunology Research*, Article ID 2680160)。

[1086] 预测蛋白质治疗剂的免疫原性的模型包括计算机模拟肽-MHC II类算法,该算法以合理的准确性预测肽序列与MHC II类结合的能力。这样的算法允许快速筛选序列库。然而,计算机和体外MHC II类结合分析导致高水平的假阳性,其中鉴定出的免疫原性肽在体外和体内无法刺激T细胞应答。这种分析没有考虑影响表位形成的其它因素,例如蛋白质加工、T细胞受体(TCR)的识别和T细胞对肽的耐受性。为了解决这个问题,使用了体外T细胞测定。计算机分析和体外测定的组合对于表位的鉴定以及具有表位耗尽的蛋白质序列的肽变体的设计非常有用,这些蛋白质序列具有降低的MHC结合能力(见例如Baker et al. (2010) *Self/Nonsel* 1(4) :314-322)。

[1087] 通过肽-MHC结合模型预测T细胞表位也因MHC多态性而变得复杂;在人类中,MHC分子被称为人白细胞抗原(HLA),并且有数百种I类和II类HLA分子的等位基因变体,其结合不同的肽并且需要特定模型来预测肽-MHC结合(见例如Sanchez-Trincado et al. (2017) *Journal of Immunology Research*, Article ID 2680160)。基于肽-MHC结合模型的T细胞

表位预测工具包括例如EpiDOCK、MotifScan、Rankpep、SYFPEITHI、MAPPP、PREDIVAC、PEPVAC、EPISOPT、Vaxign、MHCpred、EpiTOP、BIMAS、TEPITOPE、Propred、Propred-1、EpiJen、IEDB-MHCI、IEDB-MHCII、IL4pred、MULTIPRED2、MHC2PRED、NetMHC、NetMHCII、NetMHCpan、NetMCHIpan、nHLApred、SVMHC、SVRMHC、NetCTL、和WAPP(见例如Sanchez-Trincado et al. (2017) *Journal of Immunology Research*, Article ID 2680160)。

[1088] EpiSweep是一套蛋白质设计算法,其将免疫原性T细胞表位的计算预测与基于序列或基于结构的评估表位缺失突变对蛋白质稳定性、结构和功能的影响相整合,允许选择优化蛋白质治疗剂以实现低免疫原性和高活性和稳定性的突变(见例如Choi et al. (2017) *Methods Mol. Biol.* 1529:375-398,逐步指导应用EpiSweep去免疫算法组)。

[1089] c. 体外表位预测方法

[1090] 体外方法可用于确定免疫应答的细胞机制,鉴定免疫原性表位,并评估MHC亲和力、T细胞增殖和整个蛋白质治疗剂的免疫原性作用。例如,表位作图通过单独分析肽片段来鉴定免疫原性表位。将肽片段暴露于免疫细胞,并通过测量指示炎症免疫应答的细胞因子和表面标记物来确定免疫原性。完整蛋白质的表位作图是费力的,将计算机程序与作图结合使用,以鉴定可能具有免疫原性的区域并缩小候选表位的范围。体外表位预测方法包括例如结构表位作图方法,如X射线晶体学、核磁共振和电子显微镜方法,以及功能表位作图,如抗原片段化/抗原结合测定、竞争性结合测定、修饰测试/诱变、展示技术,例如噬菌体展示和酵母展示,以及模拟表位分析。

[1091] i. 体外B细胞表位预测方法

[1092] 用于鉴定B细胞表位的实验方法包括例如解析抗原-抗体复合物的3D结构,筛选抗体结合的肽文库,或进行功能测定,其中抗原发生突变并分析对抗原-抗体相互作用的影响。产生抗体的B细胞识别结构表位,其大小约为16-22个残基,含有与抗体接触的氨基酸,以及功能表位,其大小约为3-5个残基并影响蛋白质和抗体之间的亲和力。鉴定结构表位最准确的方法是通过抗原-抗体复合物的X射线晶体学,其鉴定与抗体结合的序列,可用于定位表位在蛋白质结构中的确切位置,可以鉴定连续的和连续的表位,并提供有关结合强度的信息。结构表位作图鉴定了与抗体直接接触的残基,但并不总是提供有关哪些残基有助于结合强度的信息。免费提供的FTProd程序可用作X射线晶体学的计算替代方案。核磁共振(NMR)可用于鉴定结构表位而无需生成晶体,但其用途仅限于大小小于25kDa的小蛋白质和肽。NMR提供关于抗原-抗体复合物的结构、动力学和结合能的数据,并在溶液中进行,无需生成晶体。用于具有中等分辨率的表位作图的另外两种方法包括饱和转移差异NMR和抗原中氢-氘交换的抗体抑制。电子显微镜也可用于表位作图,但它是一种低分辨率结构方法,通常用于较大的抗原,例如整个病毒颗粒或病毒衣壳。电子显微镜无法检测接触残基,但可用于确认表位的表面可及性。冷冻电子显微镜是一种替代方法,其中在生理缓冲液中观察快速冷冻的抗原-抗体复合物,无需染色和固定剂(见例如Dingman et al. (2019) *J. Pharm. Sci.* 108(5):1637-1654;Potocnakova et al. (2016) *Journal of Immunology Research*, Article ID 6760830)。

[1093] 功能表位可以通过多种方法鉴定,包括抗原片段化、竞争性结合和修饰测试。例如,功能性B细胞表位作图方法通常包括为了抗体结合筛选抗原衍生蛋白水解片段或肽,以及测试已进行定点或随机诱变的突变蛋白的抗原-抗体反应性。因此,功能性表位作图工具

用于鉴别和鉴定对抗体结合很重要的表位内的残基。大多数功能性方法检测抗体与抗原片段、合成肽或重组抗原的结合,所述重组抗原例如是突变变体、通过原位无细胞翻译排列的抗原和/或使用可选择系统例如噬菌体展示表达的抗原。例如,抗原片段化和结合测定涉及将肽固定在固体支持物上,并使用Western印迹、斑点印迹和/或ELISA确定表位片段是否与抗体结合;结合则表示该肽片段可能具有免疫原性。竞争性结合测定提供低分辨率作图,通过评估多种抗体是否可以同时与蛋白质上的表位结合,或者它们是否相互竞争结合相同表位,提供有关蛋白质上潜在免疫原性表位数量的信息(见例如Dingman et al. (2019) J.Pharm.Sci.108 (5) :1637-1654;Potocnakova et al. (2016) Journal of Immunology Research,Article ID 6760830)。

[1094] 修饰测试或诱变是一种表位作图方法,其中功能性表位中的各个残基(称为热点)被取代,并评估修饰对抗体与免疫原性序列结合的影响。热点最常包括Tyr、Arg和Trp残基,是能量上重要的残基,包含完整蛋白质-蛋白质界面区域的一部分。各个残基的突变允许鉴定可以被替换的有害残基,前提是蛋白质保留其结构和活性。对于通过诱变的表位作图,通过随机或定点诱变生成肽文库;诱变与展示技术的结合允许筛选大量突变的蛋白质。饱和诱变是另一种表位作图方法,其中表位内特定位置的氨基酸残基被所有20个天然存在的氨基酸置换,并监测抗体结合的损失情况。这种方法的缺点是免疫反应性的丧失可能是由于抗原性结构的破坏,导致难以解释结果。表位和抗体之间的大部分接触通过氨基酸侧链发生,丙氨酸扫描诱变可用于定义每个残基侧链造成抗体结合的贡献。这是通过每次一次依次对每个非丙氨酸残基进行丙氨酸取代,这样将侧链截短到 β -碳,而不增加蛋白质主链的柔性。这种方法鉴定了其侧链造成互补位-表位相互作用做出最高能量贡献的关键残基。也可以使用计算丙氨酸扫描,以通过使用简单的自由能函数快速确定丙氨酸突变对蛋白质-蛋白质复合物中结合自由能的影响。组合诱变基于离散抗原区域的随机化组合,以及突变残基的分组(一级序列的接近性),以最大化鉴别由相邻残基介导的组合效应的机会;这样可以鉴别对结合不重要但有助于表位形成的残基,或者与单独较弱的互补位形成多重相互作用的残基。乌枪法诱变(Shotgun mutagenesis)是一种基于大规模诱变的高通量方法,其中每个克隆都有一个确定的氨基酸突变(例如,丙氨酸取代),并涉及对天然折叠的蛋白质的mAb反应性的直接细胞测试。乌枪法突变允许鉴定线性和构象表位,作图率超过20个表位/月(见例如Potocnakova et al. (2016) Journal of Immunology Research,Article ID 6760830)。

[1095] 用于表位作图的其它技术包括展示技术和模拟表位分析,这些技术便宜、灵活且快速。展示技术,如噬菌体展示和酵母展示,是基于通过生物淘选的亲和选择方法,测试在展示平台上展示的各种肽与感兴趣的mAb的结合能力(例如将肽系链于核糖体-mRNA复合物,或系链于噬菌体、细菌、哺乳动物、昆虫或酵母细胞)(见例如Potocnakova et al. (2016) Journal of Immunology Research,Article ID 6760830)。

[1096] ii. 体外T细胞表位预测方法

[1097] 体外方法,例如MHC或HLA结合测定和T细胞测定,可用于预测T细胞表位并评估T细胞对蛋白质治疗性抗原的应答。用于体外分析的数百或数千种重叠肽的合成是一个限制因素,可以通过使用计算机表位预测工具来克服,该工具可以准确地模拟MHC:表位界面并预测免疫原性肽序列(见例如De Groot, A.S. and Moise, L. (2007) Curr.Opin.Drug

Discov.Devel.10(3):332-340)。

[1098] MHC/HLA结合测定

[1099] T细胞表位预测鉴定了刺激CD8⁺或CD4⁺T细胞的抗原中的最短的肽序列,所述序列因此具有免疫原性。T细胞表位的免疫原性取决于抗原加工、肽与MHC分子的结合以及同源TCR的识别;MHC肽结合是最具选择性的方法,也是预测T细胞表位的主要基础。MHC结合测定可用于检测高亲和力肽,并且通常与表位作图结合应用以鉴定可能具有免疫原性的蛋白质区域。体外MHC II类结合测定包括基于细胞的结合测定和可溶性HLA结合测定。高通量MHC结合测定包括将不同剂量的感兴趣的肽与对照肽和可溶性MHC蛋白一起温育,以评估结合亲和力;高亲和力肽与MHC的结合更强,表位更容易被T细胞识别。例如,可以通过测量外源添加的肽与表达MHC II类等位基因的成淋巴母细胞样B细胞表面结合的能力来评估MHC II:表位结合,并且可以采用基于竞争的HLA测定法进行高通量筛选。用于鉴定潜在免疫原性表位的MHC结合测定是可商购的,例如购自ProImmune(见例如Dingman et al. (2019) J.Pharm.Sci.108(5):1637-1654;De Groot,A.S.and Moise,L. (2007) Curr.Opin.Drug Discov.Devel.10(3):332-340;Sanchez-Trincado et al. (2017) Journal of Immunology Research,Article ID 2680160)。

[1100] iii. 体外T细胞测定

[1101] 可以通过T细胞测定中评估体外T细胞应答来检测蛋白质治疗剂中T细胞表位的存在。T细胞在免疫原性蛋白刺激后增殖并释放细胞因子。T细胞表位通过效应子T细胞诱导细胞因子的分泌,例如IL-2,IL-4,IL-5和IFN γ ,并通过调节性T细胞(Treg)诱导细胞因子TGF β 和TNF α 以及趋化因子例如MIP1 α /1 β 的分泌。可以通过用胸苷放射性标记或用荧光染料例如羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记来测量应答免疫原性肽/表位的T细胞的增殖。ELISA或ELISpot方法以及流式细胞术可用于测量由T细胞分泌的细胞因子例如IL-2和IFN- γ 的水平,以确定免疫原性。ELISpot方法是高度敏感的,并且可以直接从脾细胞或外周血中检测各个T细胞,以及测量分泌特异性细胞因子的抗原特异性T细胞的数量。例如,用于测量IL-2和IL-4的ELISpot测定是可商购的。流式细胞术也可用于测量T细胞应答,从而可以使用四聚体(MHC II类:表位复合物)直接标记应答特定表位的T细胞。T细胞增殖和细胞因子释放测定可以与T细胞表型分型组合使用,以对发生的T细胞应答的类型进行分类。可以使用诸如流式细胞术确定应答抗原的T细胞的数量和表型,通过鉴定细胞表面标志物如针对效应子T细胞的CD25和针对Treg的FoxP3,和/或通过鉴定细胞内细胞因子表达而确定。因此,T细胞表位的鉴定可以与表型研究结合,以评估免疫应答是炎症性还是抑制性的。使用PBMC制剂的外周血单核细胞(PBMC)测定法包括几种类型的免疫细胞(例如CD4⁺和CD8⁺T细胞),更好地模拟体内免疫系统,并且可用于评估蛋白质的免疫原性,以及潜在的免疫应答,而不用在人体内测试。将在体外培养的PBMC用完整的治疗蛋白或源自治疗蛋白的肽刺激。使用先天细胞系统例如缺乏CD8⁺反应性T细胞的PBMC制备物或先天淋巴样细胞(ILC)的先天免疫筛查,可以用于区分对免疫原性蛋白质的先天和适应性免疫应答。为了有用,体外T细胞测定应测试针对来自具有广谱MHC II类同种型的大组群供体的PBMC的肽。体外T细胞测定可以提供有关T细胞表位的数量和效力的信息,这些信息可用于确定临床前期间发生免疫原性的风险,并指导通过靶向的氨基酸取代去除此类表位(见例如Baker et al. (2010) Self/Nonsel 1(4):314-322;Dingman et al. (2019) J.Pharm.Sci.108(5):1637-

1654;De Groot,A.S.and Moise,L. (2007) Curr.Opin.Drug Discov.Devel.10(3):332-340)。

[1102] d. 体内表位预测方法

[1103] 在人体内评估蛋白质治疗剂的免疫原性使用动物模型,例如小鼠。通常,当施用于非人动物时,任何人或人源化蛋白质治疗剂都可以是免疫原性的。然而,动物模型可用于预测免疫原性,比较产物、药物制剂或施用途径之间的相对免疫原性,确定聚集体的免疫原性以及阐明免疫机制。动物模型中的过继转移和T细胞增殖研究可用于确定T细胞和B细胞在蛋白质免疫原性中的作用。人蛋白质治疗剂的免疫原性在动物中很难评估,因为动物MHC受体不直接模拟人类HLA受体,并且因为HLA和MHC基因具有高度多态性,在HLA/MHC表达中具有高度对象间的可变性。为了克服这些局限性,已经产生了模拟人受试者的HLA转基因小鼠,并且可以使其耐受特定的蛋白质;小鼠将耐受待评估的蛋白质治疗剂,并且任何发生的免疫原性都是由于自身耐受性的破坏所致,而不是由于对外来抗原的经典免疫应答所致。确定蛋白质治疗剂的免疫原性的体内方法包括将HLA-转基因小鼠暴露于整个蛋白质或表位肽。已经产生了几种表达常见HLA基因产物例如HLA-A、HLA-B和HLA-DR分子的转基因小鼠品系,可用于测量暴露于蛋白质治疗剂诱导的T细胞应答及抗体,通过ELISA和中和抗体测定测量。蛋白质治疗剂中的B细胞表位也可以通过用所述蛋白质免疫HLA转基因小鼠来鉴定(见例如Dingman et al. (2019) J.Pharm.Sci.108(5):1637-1654;De Groot,A.S.and Moise,L. (2007) Curr.Opin.Drug Discov.Devel.10(3):332-340)。

[1104] 可以转染NOD scid gamma (NSG) 小鼠,其是高度免疫受损并且缺乏大多数免疫细胞以及补体和细胞因子信号传导,以在体内模型中研究人免疫系统。例如,CD34⁺人源化的NSG小鼠模型植入了脐带血衍生的造血干细胞,以开发具有正常T细胞和炎症功能的功能免疫系统。动物模型还包括非人灵长类动物,例如恒河猴和黑猩猩,它们在预测蛋白质免疫原性方面更有用,因为它们的蛋白质与人蛋白质表现出更高的同源性,并且其免疫机制类似于人(见例如Dingman et al. (2019) J.Pharm.Sci.108(5):1637-1654)。

[1105] e. 去除预测的B细胞和T细胞表位(去免疫)

[1106] 如本文所述,从蛋白质治疗剂中对免疫原性表位的预测和去除(即去免疫)可以提高本文提供的构建体的功效和安全性,并减少副作用的可能性或加以预防。例如,去除已鉴定的表位例如B细胞表位可以防止形成ADA,所述ADA通过中和所述治疗剂和/或诱导其从机体快速消除而降低施用的蛋白质治疗剂的效力。

[1107] 蛋白质治疗剂的去免疫涉及鉴定高度免疫原性B细胞和/或T细胞表位,以及通过诱变取代关键氨基酸残基来缺失所鉴定的表位。如上所述,对蛋白质治疗序列中免疫原性区域的预测和评估包括施用各种的经计算机、体外和体内方法。在鉴定出免疫原性表位后,将所述表位的氨基酸序列通过随机或定向诱变进行修饰,以去除免疫原性序列并使表位去免疫。例如,通过氨基酸侧链发生表位和抗体之间进行的大多数接触,丙氨酸扫描诱变可用于定义每个残基侧链对抗体结合的贡献。这是通过一次一个依次用丙氨酸取代丙氨酸取代每个非丙氨酸残基而进行的,以鉴定其侧链对互补位-表位相互作用提供最高能量贡献的关键残基。然而,由于蛋白质必须保留其折叠的、稳定和活性结构以保留其治疗功效,因此免疫原性表位的预测和诱变缺失不足以对蛋白质去免疫;必须选择与蛋白质结构和功能兼容的表位缺失突变。

[1108] 现有计算机工具可以提高此过程的效率。例如,可以获得这样的程序,其可以使用其它19个天然存在的氨基酸之一相继置换免疫原性序列中的每个氨基酸,然后重新评估新序列的免疫原性。例如,OptiMatrix是一种迭代取代肽序列任何给定位置的所有20种氨基酸的工具,然后重新分析修饰的序列的预测免疫原性(见例如De Groot, A.S. and Moise, L. (2007) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 10 (3) :332-340)。EpiSweep是一组蛋白质设计算法,其将免疫原性T细胞表位的计算预测与基于序列或基于结构的评估对表位缺失突变对蛋白质稳定性、结构和功能的影响相整合,由此可以选择针对低免疫原性和高活性和稳定性而优化所述蛋白质治疗剂的突变组合(见例如Choi et al. (2017) *Methods Mol. Biol.* 1529:375-398,关于应用EpiSweep去免疫算法组的逐步指导)。计算丙氨酸扫描也可用于通过使用简单的自由能函数快速确定丙氨酸突变对蛋白质-蛋白质复合物中结合自由能的影响(见例如Potocnakova et al. (2016) *Journal of Immunology Research*, Article ID 6760830)。

[1109] G. 泛生长因子陷阱构建体

[1110] 1. 受体酪氨酸激酶(RTK)

[1111] 受体酪氨酸激酶(RTK)是许多多肽生长因子、细胞因子和激素的高亲和力细胞表面受体。RTK参与许多信号传导途径,并在各种细胞过程中发挥作用,包括细胞分裂、增殖、分化、迁移和代谢。RTK可以被特异性结合其同源受体的配体激活。这种激活反过来又激活了信号传导途径中的事件,例如通过触发自分泌或旁分泌细胞信号途径,例如激活第二信使,从而导致特定的生物学效应。已经鉴定了大约20种不同类别的RTK,其中包括表皮生长因子受体(EGFR)家族(I类,也称为ErbB家族);胰岛素受体家族(II类);血小板衍生的生长因子受体(PDGFR)家族(III类);血管内皮生长因子受体(VEGFR)家族(IV类);成纤维细胞生长因子受体(FGFR)家族(V类);肝细胞生长因子受体(HGFR)家族(VIII类);以及Eph受体家族(Ephs,产生红细胞生成素的人肝细胞受体;IX类)等。

[1112] RTK与调节参与血管生成的途径有关,包括生理和肿瘤血管形成,并参与细胞增殖,迁移和存活的调节。RTK与许多疾病有关,包括自身免疫性疾病和癌症,例如乳腺癌和结肠直肠癌,胃癌,胶质瘤和中胚层衍生的肿瘤。RTK的失调与多种癌症有关。例如,乳腺癌与P185-HER2的扩增表达有关。RTK还与眼部疾病有关,包括糖尿病性视网膜病和黄斑变性。此外,已经示出在类风湿关节炎(RA)患者的滑膜成纤维细胞和巨噬细胞中,表皮生长因子受体(EGFR)家族以及EGF样生长因子(配体)的成员过表达。

[1113] a. 人表皮生长因子受体(HER)家族

[1114] 与疾病相关的RTK是I类人EGFR(HER,也称为ErbB)受体家族,其中包括HER1/EGFR(ErbB1)、HER2(ErbB2/Neu)、HER3(ErbB3)和HER4(ErbB4)。HER1、HER3和HER4共同结合11个规范配体,包括表皮生长因子(EGF)、转化生长因子(TGF)- α 、肝素结合(HB)-EGF、双调蛋白、 β -动物纤维素(BTC)、上皮调节蛋白、Epigen和神经调节蛋白(NRG)1-4。HER2不结合任何这些配体,而是通过与其它HER家族成员如HER3和HER4的异二聚化来充当信号放大器(见例如Jin et al. (2009) *Mol. Med.* 15(1-2):11-20)。HER1、HER2和HER4作为酪氨酸激酶具有活性,而HER3作为激酶无活性(尽管具有激酶结构域),及通过磷脂酰肌醇3-激酶途径发信号。

[1115] HER家族的所有成员都有一个胞外配体结合结构域、一个跨膜结构域和一个含有胞质酪氨酸激酶的结构域。每个HER家族成员的胞外区域含有四个子结构域,即L1、CR1、L2

和CR2,其中“L”指富含亮氨酸的重复结构域,“CR”指富含半胱氨酸的区域/结构域(也称为弗林蛋白酶样重复结构域);这四个子域也分别称为结构域I-IV。结构域I和III是配体结合结构域,结构域II和IV介导相互结合以及与受体家族其它成员的结合。结构域II含有二聚化所需的序列,称为二聚化臂,结构域IV含有允许结构域II/IV系链的序列,但HER2除外,它不经历系链构象。在没有配体的情况下,EGFR、HER3和HER4子结构域II和IV形成分子内自抑制系链。在配体结合后,所述子结构域发生构象变化,使子域I和III形成高亲和力的配体结合袋。已经表明,由于子结构域II和IV形成的系链的诱变破坏,或子结构域IV的C末端缺失,可将配体结合亲和力提高多达15倍(见例如Jin et al. (2009)Mol.Med.15(1-2):11-20)。

[1116] HER家族成员在各种上皮、间充质和神经元来源的组织中表达。在正常生理条件下,HER的激活受其配体的空间和时间表达控制,所述配体是生长因子的EGF家族成员。配体结合诱导受体同二聚体和异二聚体的多种组合的形成,导致固有激酶结构域的激活,胞质尾部特定酪氨酸残基的自身磷酸化,一些细胞内蛋白质的募集和磷酸化,以及与多个下游信号级联偶联。激活的信号途径包括Ras-Raf-丝裂原激活蛋白激酶促有丝分裂途径、磷脂酰肌醇3-激酶-AKT细胞存活途径以及应激激活的蛋白激酶C和Jak/Stat途径。诱导的信号传导途径导致多种细胞应答,包括例如细胞迁移、侵袭、增殖、存活和分化(见例如Sarup et al. (2008)Mol.Cancer Ther.7(10):3223-3236)。

[1117] b. 与人表皮生长因子受体(HER)家族及其配体相关的疾病

[1118] HER家族成员及其配体因过表达或突变而失调,已被证明在癌症和其它疾病中发挥作用。例如,HER1和HER2与许多人类癌症的发生和病理有关,这些受体的改变与更具侵袭性的疾病和较差的临床结果有关。TGF- α 过表达与前列腺癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌和结肠癌相关,而NRG1过表达与乳腺癌相关。HER1过表达与神经胶质瘤、头颈癌、乳腺癌、膀胱癌、前列腺癌、肾癌和非小细胞肺癌相关,HER1突变与神经胶质瘤以及肺癌、乳腺癌和卵巢癌相关。HER2过表达与乳腺癌、肺癌、胰腺癌、结肠癌、食道癌、子宫内膜癌和宫颈癌有关;HER3与乳腺癌、结肠癌、胃癌、前列腺癌和口腔鳞状细胞癌有关;HER4与乳腺癌和前列腺癌以及儿童髓母细胞瘤有关(见例如Yarden et al. (2001)Nat.Rev.Mol.Cell Biol.2:127-137)。

[1119] EGF配体和受体家族已被证明在炎症性关节炎的发生中起作用。例如,已在RA滑膜中检测到HER2的表达以及EGFR配体EGF、双调蛋白和TGF- α 的存在。人EGFR家族抑制剂herstatin是HER2的一种可变剪接变体,已经示出其腺病毒递送可以消除小鼠胶原诱导的关节炎(CIA)的所有临床症状。Herstatin破坏二聚化,并作为天然HER1、HER2和HER3的天然抑制剂起作用。一名长期RA患者先前曾接受过利妥昔单抗和阿达木单抗治疗,在接受抗EGFR/HER1抗体西妥昔单抗治疗头颈癌后,关节疼痛明显减轻。这些结果表明,HER靶向治疗可治疗性用于治疗自身免疫性和炎症性疾病,例如类风湿性关节炎(RA)(见例如Gompels et al. (2011)Arthritis Research&Therapy 13:R161)。

[1120] 巨噬细胞是慢性炎症的RA关节组织中TNF的来源。RA患者滑膜组织巨噬细胞的表型分析显示大量的HBEGF⁺(肝素结合的EGF样生长因子⁺)炎症巨噬细胞,其过表达促炎基因NR43A(核受体亚家族4组A成员3)、PLAUR(纤溶酶原激活剂、尿激酶受体)和CXCL2,以及生长因子HB-EGF和上皮调节蛋白(EGFR家族配体)。HBEGF⁺炎症巨噬细胞还产生促炎细胞因子IL-1,并以表皮生长因子受体依赖性方式促进滑膜成纤维细胞的侵袭。已经示出,大多数用于治疗RA的药物在离体滑膜组织测定中靶向HBEGF⁺巨噬细胞,而EGFR抑制剂在离体测定中

有效阻断RA组织中巨噬细胞诱导的成纤维细胞应答,表明EGFR应答的阻断可以为RA提供非免疫抑制性治疗方法(见例如Kuo et al. (2019) *Sci. Transl. Med.* 11 (491))。这种方法优于使用传统的抗TNF疗法,后者具有免疫抑制作用,并且通常与严重感染如结核病的发生有关。

[1121] HER家族信号传导也与冠状动脉粥样硬化有关,冠状动脉粥样硬化涉及动脉内膜中血管平滑肌细胞的迁移。平滑肌细胞迁移和增殖需要凝血酶受体的激活,并且这种G蛋白偶联受体的激活依赖于HER1/EGFR应答HB-EGF的反式激活。EGFR表达也与银屑病相关;在正常皮肤中,EGFR的表达仅限于基底层,而在银屑病患者中,EGFR及其配体双调蛋白在整个表皮层均有高表达(见例如Yarden et al. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:127-137)。

[1122] 其它HER介导的疾病和病症包括神经退行性疾病和病症,例如多发性硬化症、帕金森病、精神分裂症和阿尔茨海默病。例如,几种疾病和病症与暴露于一种或多种神经调节蛋白(NRG)配体例如NRG1(包括I、II和III型)、NRG2、NRG3和/或NRG4相关。NRG相关疾病的实例包括神经或神经肌肉疾病,包括精神分裂症和阿尔茨海默病(见例如美国专利公开号2010/0055093)。

[1123] 由于其在癌症和其它增殖性疾病、类风湿性关节炎、神经退行性疾病和自身免疫性疾病中的作用,HER是治疗干预的靶标。抗HER治疗剂包括靶向胞外结构域(或胞外域)的抗体,在本文中称为ECD,以及小分子酪氨酸激酶抑制剂。批准用于治疗由HER蛋白家族驱动癌症的治疗剂包括单克隆抗体,例如曲妥珠单抗(针对HER2)、帕妥珠单抗(针对HER2)、帕尼单抗(针对HER1/EGFR)和西妥昔单抗(针对HER1/EGFR),以及小分子酪氨酸激酶抑制剂,例如HER1激酶抑制剂吉非替尼(gefitinib)和厄洛替尼(erlotinib),以及双重HER2激酶和HER1激酶抑制剂拉帕替尼(lapatinib)。例如,曲妥珠单抗用于治疗HER2过表达的淋巴结阳性或淋巴结阴性乳腺癌;西妥昔单抗用于治疗转移性结直肠癌以及头颈癌;帕尼单抗用于治疗转移性结直肠癌;拉帕替尼用作三阳性乳腺癌的一线治疗,以及曲妥珠单抗治疗进展后的患者的辅助治疗;厄洛替尼用于治疗非小细胞肺癌和胰腺癌。

[1124] 抗HER疗法表现出有限的效力和有限的应答持续时间。曲妥珠单抗(例如作为Herceptin®销售)是鼠单克隆抗体的人源化版本,靶向HER2的胞外结构域。然而,曲妥珠单抗的有效性需要HER2的高表达(至少3至5倍过表达),因此只有不到25%的乳腺癌患者有资格接受治疗。在这一人群中,很大一部分人对治疗没有反应。此外,小分子酪氨酸激酶抑制剂通常缺乏特异性。除了高表达HER2并接受曲妥珠单抗联合化疗的患者外,使用单靶点抗HER抗体或小分子酪氨酸激酶抑制剂观察到的疗效在10-15%范围内。治疗,特别是那些只针对一个HER家族成员的治疗,也会受到内在或获得性耐药的影响,这与其它RTK、特别是其它HER家族成员的共表达和配体激活有关。例如,耐药性通常与其它HER家族成员例如HER3和HER4的上调或补偿有关,或者与肿瘤细胞增加的HER1或HER3配体的表达有关。HER受体家族成员之间的同源二聚化和异源二聚化也对针对单个HER家族受体的治疗有影响。由于可用疗法的有效性有限,因此需要替代的抗HER疗法。本文提供了用于靶向RTK的HER家族及其配体的替代的、更有效的疗法。

[1125] 2. 泛-生长因子抑制

[1126] 如本文所述,对单一靶向抗HER疗法(例如曲妥珠单抗、西妥昔单抗、吉非替尼和厄洛替尼)的抗性通常与其它HER家族成员的共表达和/或上调和/或其配体的过表达有关。减

少或克服这种耐药性并改善HER靶向治疗功效的一种策略是同时抑制多个配体诱导的HER家族成员。例如,这可以通过嵌合的HER配体结合分子来实现,该分子的行为类似于受体诱饵并隔离多个HER家族配体,从而防止配体依赖性受体激活并下调异常HER家族活性。

[1127] a. RB242配体陷阱

[1128] 称作RB242的拮抗剂是嵌合双特异性配体陷阱,是EGFR (HER1) 和HER3配体结合域的Fc介导的异二聚体,靶向EGFR/HER家族的所有四个成员。EGFR和HER3配体结合域通过每个配体结合域与人IgG1的Fc域融合而二聚化。在RB200中,EGFR的胞外结构域(ECD) (对应于成熟EGFR蛋白的残基1-621,如SEQ ID NO:41所示) 和HER3的胞外结构域(对应于成熟的HER3蛋白,如SEQ ID NO:45所示),均融合到人IgG1的Fc片段(对应于SEQ ID NO:9的P100-K330残基)的N末端,在Fc片段的N末端加入Gly-Arg-Met-Asp (GRMD) 接头。RB200的HER3/Fc组分在COOH末端包含一个6xHis标签用于纯化。

[1129] 已示出RB200以高亲和力结合EGFR和HER3配体(分别包括EGF、TGF- α 、HB-EGF、双调蛋白、 β -细胞蛋白、上皮调节蛋白和epigen蛋白,以及NRG1- α 、NRG1- β 1和NRG1- β 3),抑制配体诱导的HER家族成员(HER1、HER2和HER3)酪氨酸磷酸化,在裸鼠模型中在体外抑制多种肿瘤细胞的增殖,抑制肿瘤异种移植物(表皮样癌和非小细胞肺癌)的生长。RB200还与针对EGFR/HER1和HER2激酶的酪氨酸激酶抑制剂如AG-825、厄洛替尼、吉非替尼或拉帕替尼的体外抑制肿瘤细胞增殖方面表现出协同作用。与靶向HER1 (C225) 或HER2(曲妥珠单抗和2C4) 的单克隆抗体相比,RB200对配体刺激的HER1、HER2和HER3磷酸化的抑制更有效(见例如Sarup et al. (2008) Mol. Cancer Ther. 7 (10):3223-3236;Gompels et al. (2011) Arthritis Research&Therapy 13:R161)。

[1130] 为了表达RB200和RB242异二聚嵌合融合蛋白,将编码HER1/Fc和HER3/Fc构建体的载体以1:3 (HER1/Fc:HER3/Fc) 的比例共转染到HEK293T细胞中。除了感兴趣的HER1/Fc:HER3/Fc异二聚体之外,这还导致HER1/Fc和HER3/Fc同二聚体的表达。表达的蛋白质通过蛋白质-A、Ni-Sepharose和EGFR-亲和体柱色谱方法的组合进行纯化。分析型反相高效液相色谱(HPLC) 显示RB242异二聚体含有大约10%的两个同二聚体的组合污染(见例如Sarup et al. (2008) Mol. Cancer Ther. 7 (10):3223-3236)。因此,需要改进方法来提高异二聚体的产量和纯度。

[1131] b. 治疗自身免疫疾病的RB200和RB242

[1132] 如本文别处所讨论的,很大一部分RA患者对抗TNF疗法如抗TNF抗体的治疗没有应答或停止应答,这与严重感染(包括结核病)的风险增加有关。因此,需要替代疗法。类风湿性关节炎(RA) 患者的滑膜和滑液中EGF配体和受体(HER) 的表达增加,表明靶向EGFR的疗法可用于治疗RA和其它自身免疫和炎症性疾病和病症。

[1133] 双特异性EGFR配体陷阱RB200(及其衍生物RB242) 在胶原诱导的关节炎(CIA) 中表现出剂量依赖性的疾病严重程度降低。在疾病发作当天(第1天) 和第4天和第7天,用RB200(或RB242) 经腹膜内注射治疗患有CIA的小鼠,剂量为0.1mg/kg、1mg/kg或10mg/kg。用1mg/kg或10mg/kg RB200治疗以剂量依赖性方式抑制临床评分和爪肿胀的增加。EGF已被证明促进血管生成,RB200处理的小鼠显示出CD31免疫阳性染色的减少,反映出滑膜血管的减少和滑膜血管生成的抑制。用PBS对照处理的小鼠关节切片显示,在炎症的滑膜中有大量浸润细胞,以及滑膜对骨的侵袭和侵蚀,这与显著的CD31表达有关。用1mg/kg或10mg/kg RB200处

理的小鼠关节受到保护,外观正常,关节结构保存完好,CD31阳性血管很少。这些结果表明,抑制EGFR介导的应答可用于治疗RA(见例如Gompels et al.(2011)Arthritis Research&Therapy 13:R161)。

[1134] TNF抑制与EGFR介导的信号传导抑制剂的组合可以提高抗TNF疗法的疗效,并可用于治疗RA。已经表明,低剂量的RB200(0.5mg/kg)与次优剂量的依那西普(1mg/kg)的联合施用抑制了临床评分和爪肿胀的增加,并完全消除了CIA,与单独施用最佳剂量的依那西普(5mg/kg)观察到的效果相似。相比之下,单独施用低剂量RB200或单独施用低剂量依那西普是无效的。一种针对E-选择素的荧光标记单克隆抗体可用于在体内定位炎症组织中的内皮激活,是一种用于评估CIA的灵敏、特异性和可量化的分子成像技术。低剂量RB200和低剂量依那西普的组合将在爪中检测到的E-选择素的量降低到健康动物的水平,而在单独接受低剂量RB200或低剂量依那西普的CIA小鼠的爪中检测到E-选择素。虽然单独使用RB200和单独使用依那西普对关节结构有剂量依赖性影响,严重破坏的关节逐渐减少,轻度或中度破坏的关节越来越多,但联合治疗观察到最显著的效果,64%的关节呈现正常,而在单独使用低剂量RB200或单独使用低剂量依那西普的小鼠中为0%。联合治疗也比单独使用大剂量依那西普更有效,表明联合pan-EGFR和TNF靶向治疗在促进关节保护方面的有效性(见例如Gompels et al.(2011)Arthritis Research&Therapy 13:R161)。

[1135] c.RB242配体陷阱

[1136] 称作RB242的配体陷阱源自RB200,是一种亲和力优化的Fc介导的三重突变体EGFR:HER3异二聚体,参考成熟EGFR的序列(SEQ ID NO:41),在EGFR ECD子域I和IV中分别包含突变T15S和G564S,以及参考成熟HER3蛋白质的序列(SEQ ID NO:45),在HER3 ECD子域II中包含突变Y246A。与亲本分子RB200相比,RB242对各种配体(包括EGF、TGF- α 、HB-EGF和NRG1- β)的亲和力平均提高了22倍,并证明对培养的单层BxPC3胰腺癌细胞和人非小细胞肺癌小鼠模型中的抗增殖活性有所提高。与RB200相比,RB242在抑制配体诱导的HER磷酸化方面也表现出10到60倍的改善(见例如Jin et al.(2009)Mol.Med.15(1-2):11-20)。

[1137] 3.优化的多特异性如双特异性生长因子陷阱构建体

[1138] 本文提供多特异性的,例如双特异性的生长因子陷阱构建体,其被设计成通过特异性靶向多于一种细胞表面受体的泛细胞表面受体治疗剂,例如通过结合一种或多种受体的配体和/或与一种或多种细胞表面受体相互作用,只要多于一种细胞表面受体的活性被调节即可。这些构建体包括那些靶向超过一个HER家族成员的那些构建体,以及那些靶向一个或多个HER和其它受体的构建体,例如靶向有助于或参与抗HER治疗抗性发生的HER。本文提供的生长因子陷阱构建体包含多个、特别是两个嵌合融合多肽,每个多肽都含有一个受体、特别是HER家族的成员如EGFR/HER1、HER2、HER3或HER4的全部或部分细胞外结构域(ECD),其融合于多聚结构域,如人免疫球蛋白(Ig)的Fc,如人IgG的Fc。嵌合融合多肽中的ECD或其部分可以直接连接于Fc,或通过接头例如肽接头间接连接。通常,ECD多肽的C末端连接于多聚化结构域的N末端,例如IgG Fc。

[1139] 本文中的生长因子陷阱构建体如Sarup et al.(2008)Mol.Cancer Ther.7(10):3223-3236、Gompels et al.(2011)Arthritis Research&Therapy 13:R161、Jin et al.(2009)Mol.Med.15(1-2):11-20和美国专利公开号2010/0055093所述表达和纯化。以下部分描述了本文提供的多特异性生长因子陷阱构建体的每个部分。

[1140] a. 胞外结构域(ECD)多肽

[1141] 本文提供的是多特异性的例如双特异性的生长因子陷阱构建体,其包含两个或多个细胞表面受体(CSR)的细胞外结构域(ECD)或其部分。在具体实施方案中,所述构建体是双特异性异二聚体构建体,包含两种不同的细胞表面受体。所述构建体包括第一ECD多肽和第二ECD多肽,其各自直接或通过接头间接连接于多聚化结构域。在一些实施方案中,第一ECD多肽包含HER1/EGFR的ECD(对应于SEQ ID NO:41的残基1-621)或其一部分,第二ECD多肽包含HER2(对应于SEQ ID NO:43的残基1-628)、HER3(对应于SEQ ID NO:45的残基1-621)或HER4(对应于SEQ ID NO:47的残基1-625)的ECD或其部分,特别是HER3或HER4的ECD或其一部分。在ECD多肽包含少于HER蛋白的全长ECD的实施方案中,其含有至少足够部分的子结构域I、II和III,用于配体结合和受体二聚化。例如,ECD可以含有足够部分的用于配体结合的子结构域I和III,和/或可以含有足够部分的ECD以与细胞表面受体二聚化,包括足够部分的子结构域II。在一些实施方案中,ECD含有子结构域I、II和III以及结构域IV的至少模块1。

[1142] 在一些实例中,多特异性例如双特异性生长因子陷阱构建体含有第一ECD多肽,其含有HER1/EGFR、HER2、HER3或HER4、特别是EGFR/HER1的全部或部分ECD,以及第二嵌合多肽,其含有来自不同CSR的ECD,例如来自HER2、HER3、HER4、胰岛素生长因子-1受体(IGF1-R)、血管内皮生长因子受体(VEGFR,例如、VEGFR1)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR,例如FGFR2或FGFR4)、TNFR、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)、肝细胞生长因子受体(HGFR)、具有免疫球蛋白样和EGF样结构域1的酪氨酸激酶(TIE,例如TIE-1或TEK(TIE-2))、晚期糖基化终产物的受体(RAGE)、Eph受体或T细胞受体。

[1143] 在一个特定实施方案中,第一ECD多肽包含HER1/EGFR的全长ECD(对应于SEQ ID NO:41的残基1-621)或其部分(例如,SEQ ID NO:41的残基1-501,其对应于子结构域I-III和结构域IV的模块1),第二ECD多肽包含HER3的全长ECD(对应于SEQ ID NO:45的残基1-621),或其一部分(例如,SEQ ID NO:45的残基1-500,其对应于子结构域I-III和结构域IV的模块1),其中ECD部分含有至少足够部分的子结构域I和III以结合HER受体的配体,以及含有ECD的足够部分以与细胞表面受体二聚化,包括子结构域II的足够部分。第一和第二ECD多肽通过其多聚化结构域的相互作用形成多聚体,例如二聚体。与单独的第一或第二嵌合多肽或其同二聚体相比,本文提供的所得多聚构建体结合额外的配体,和/或与单独的第一或第二嵌合多肽或其同二聚体细胞与更多的细胞表面受体二聚化。例如,第一和第二ECD多肽形成结合HER1配体和HER3配体的异源二聚体。

[1144] b. 胞外结构域修饰

[1145] 在一些实施方案中,与未修饰的ECD多肽相比,至少一个ECD结构域或其部分包括改变配体结合、特异性或其它活性或性质的修饰。在此类多聚构建体中,第二ECD部分可以是相同的ECD结构域、野生型或突变形式,或者可以是来自任何其它细胞表面受体的ECD。每个单体的ECD或其部分直接或通过接头连接于多聚化结构域,或直接或通过接头连接于第二ECD或其部分。例如,与未修饰的ECD或全长受体相比,所述修饰改变了ECD或含有此类ECD的全长受体的配体结合、特异性或其它活性或性质,由此异源多聚体表现出改变的活性或性质,例如配体结合或特异性改变。此类修饰包括消除或增加或增强活性的任何修饰,例如与额外配体的结合。此类多聚构建体的示例是含有至少一个HER1 ECD的构建体,所述ECD在

子结构域III中含有增加了其对EGF以外的配体的亲和力的突变。这种亲和力的增加为至少2至10倍,通常为100、1000、 10^4 、 10^5 、 10^6 倍或更多。

[1146] 在特定实施方案中,所述生长因子陷阱构建体是含有HER1 (EGFR) 嵌合融合多肽和HER3嵌合融合多肽的异源二聚体,其中每个嵌合融合多肽包含与人IgG1的Fc连接的受体的ECD,任选地通过肽接头连接。此类嵌合融合多肽在本文中称为HER1/Fc和HER3/Fc。通常,ECD多肽的C末端连接于多聚化结构域的N末端,例如IgG1 Fc。

[1147] 在一些实例中,HER1部分已针对配体结合和/或生物活性而增强。在其它实例中,HER3部分的配体结合和/或生物活性已得到增强。在另一个实例中,HER1和HER3部分的配体结合和/或生物活性都得到了增强。

[1148] 示例的修饰包括例如HER1中的S418F (参考成熟蛋白的序列,如SEQ ID NO:41所示),其允许HER3配体NRG2- β 刺激HER1。产生的ECD与至少两种配体结合或相互作用,一种用于HER1,如EGF,另一种用于HER3,如NRG2- β 。其它修饰包括例如分别在EGFR/HER1 ECD子域I和IV中的突变T15S和G564S,参考成熟EGFR蛋白的序列 (SEQ ID NO:41),以及HER3 ECD子域II中的Y246A,参考成熟HER3蛋白的序列 (SEQ ID NO:45),当组合时,导致对各种配体 (包括EGF、TGF- α 、HB-EGF和NRG1- β) 的亲和力平均提高22倍。HER1 ECD中的其它突变包括E330D/G588S、S193N/E330D/G588S和T43K/S193N/E330D/G588S,参考SEQ ID NO:40所示前体HER1序列 (包括信号肽),和对应于E306D/G564S、S169N/E306D/G564S和T19K/S169N/E306D/G564S,参考成熟HER1多肽的序列,如SEQ ID NO:41所示。这些突变增加了HER1对配体EGF、HB-EGF和TGF- α 的结合亲和力 (参见例如美国专利公开号2010/0055093)。

[1149] c. 多聚化结构域

[1150] 在特定具体实施方案中,多聚化结构域是实现多聚化的Fc结构域或其变体。Fc结构域可以来自任何免疫球蛋白 (Ig) 分子,包括来自IgG、IgM或IgE。例如,Fc结构域可以来自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4,并且包括C_H2和C_H3结构域,以及任选全部或部分铰链区。在某些实例中,Fc部分是人IgG1的Fc,任选地包括全部或部分铰链区,并且对应于例如SEQ ID NO:9的残基99-330、100-330、104-330、109-330、111-330、113-330或114-330。还包括如上文所述的修饰的Fc域,其被修饰为具有凸出凹陷中和改变的性质。

[1151] 多特异性生长因子陷阱构建体中的每个ECD多肽直接或通过接头例如化学或多肽接头间接连接于Fc,形成嵌合融合多肽 (即ECD/Fc融合多肽)。每个嵌合融合多肽的多聚化结构域,例如Fc结构域,相互作用 (在Fc结构域的情况下通过二硫键) 形成异源多聚体,例如异源二聚体。

[1152] 每个嵌合融合多肽的ECD和Fc部分之间的接头可以是柔性肽接头,例如IgG的铰链区,或其它由小氨基酸以各种长度和组合组成的多肽接头,例如甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和/或丙氨酸。例如,接头可以是 (Gly)_n、(GGGGS)_n、(SSSSG)_n或 (AlaAlaProAla)_n,其中n是1-6,或者可以是GKSSGSGSESKS、GGSTSGSGKSSSEKKG、GSTSGSGKSSSEKSGSTKG、GSTSGSGKPGSGEGSTKG、EGKSSGSGSESSKEF、Gly-Arg-Met-Asp (GRMD)、Ser-Cys-Asp-Lys-Thr (SCDKT) 或Glu-Lys-Thr-Ile-Ser (EKTIS) (参见SEQ ID NO:816-834) 或本文别处描述的或本领域已知的适用于这种目的的任何其它接头。

[1153] d. Fc结构域修饰

[1154] 本文提供的生长因子陷阱构建体中的Fc结构域经过修饰以改善或增强蛋白质表

达和纯度,以及改善药效学和药代动力学性质,包括例如通过延长体内半衰期和/或改变免疫效应子功能,如下所述,并导致异二聚体的产生作为主要或唯一产物。

[1155] i. 凸出-凹陷的引入

[1156] 本文提供的生长因子陷阱构建体中的Fc结构域可以被工程化,使得空间相互作用促进稳定的相互作用,并促进由嵌合ECD多肽单体的混合物形成异源二聚体而不是同源二聚体。如本文别处所讨论的,将“凸出凹陷中”(KiH;也称为“knobs-into-holes”)引入抗体(例如IgG)重链的C_H3结构域中优化了异二聚体的产生。所述凸出凹陷中方法涉及以互补方式不对称地突变两个Fc单体的C_H3结构域中的界面残基。通常,“凸出”或突起是通过在C_H3结构域之间的界面处用具有较大侧链的氨基酸(例如酪氨酸或色氨酸)置换具有小侧链的氨基酸而产生的,以及通过用具有较小侧链的氨基酸(例如丙氨酸或苏氨酸)置换具有大侧链的氨基酸产生与所述凸出相同或相似大小的补偿性“凹陷”或腔。Fc单体的凸出和凹陷变体通过将凸出插入到配偶体C_H3结构域上相应设计的凹陷中而异二聚化。由于空间排斥,阻止凸出-凹陷结合,并且凹陷-凹陷同源二聚体是不稳定的。

[1157] 在一些实施方案中,本文提供的异二聚体生长因子陷阱构建体的Fc部分被设计为含有凸出凹陷中。凸出突变可以是例如根据EU编号的S354C、T366Y、T366W或T394W,分别对应于参考SEQ ID NO:9所示人IgG1重链恒定区序列的S237C、T249Y、T249W或T277W。T所述凹陷突变可以是例如根据EU编号的Y349C、T366S、L368A、F405A、Y407T、Y407A或Y407V,分别对应于参考SEQ ID NO:9所示人IgG1重链恒定结构域序列的Y232C、T249S、L251A、F288A、Y290T、Y290A或Y290V。例如,与RB200和RB242相比,凸出凹陷的引入增加了感兴趣的异二聚体的产量,减少了同二聚体杂质的数量,并促进了本文提供的双特异性异二聚生长因子陷阱构建体的蛋白质纯化过程。

[1158] ii. 增强新生儿Fc受体(FcRn)再循环的修饰

[1159] 如本文别处所述,与IgG Fc的融合通过利用新生儿Fc受体(FcRn)结合以及通过增加治疗剂的分子量来延长小蛋白治疗剂的半衰期,从而使其较慢地从身体例如肾脏清除。为了改善药代动力学和总体药理学,可以突变本文提供的生长因子陷阱构建体的Fc区域内的残基以增加对FcRn的亲合力,通常大于30倍,进一步增加体内半衰期。

[1160] 在一些实施方案中,本文的生长因子陷阱构建体的Fc部分被修饰以增强新生儿FcRn再循环,从而增加体内半衰期。这可以通过突变IgG Fc的C_H2和C_H3结构域界面处的残基来实现,这些残基负责与FcRn结合。增加与FcRn结合并可引入本文生长因子陷阱构建体的Fc部分的示例性Fc修饰包括但不限于以下的一种或多种:T250Q、T250R、M252F、M252W、M252Y、S254T、T256D、T256E、T256Q、V259I、V308F、E380A、M428L、H433K、N434F、N434A、N434W、N434S、N434Y、Y436H、M252Y/T256Q、M252F/T256D、M252Y/S254T/T256E、H433K/N434F/Y436H、N434F/Y436H、T250Q/M428L、T250R/M428L、M428L/N434S、V259I/V308F、V259I/V308F/M428L、E294del/T307P/N434Y,和T256N/A378V/S383N/N434Y,及其组合(根据EU编号)。参考SEQ ID NO:9所示IgG1重链恒定结构域的序列,通过Kabat编号和序号的相应突变在描述Fc的部分中的表7(增强FcRn结合的IgG1 Fc修饰)中列出相应修饰。本领域已知的赋予增强或增加的FcRn结合的其它修饰也预期用于本文。

[1161] 对本文提供的生长因子陷阱构建体的Fc部分进行的以增强FcRn结合和再循环的修饰,与RB200和RB242相比增加了所述治疗剂的体内半衰期,需要较低剂量和/或较低施用

频率施用,并提高了治疗效果。

[1162] iii. 效应子功能

[1163] 如本文所述,IgG Fc_s介导的免疫效应子功能包括补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC;也称为抗体依赖性细胞毒性)和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP;也称为抗体依赖性细胞吞噬作用)。如下文和本文别处所讨论的,本文的生长因子陷阱构建体的Fc区可以被突变或修饰,以消除、减少或增强免疫效应子功能,包括例如CDC、ADCC和ADCP中的任何一种或多种。

[1164] 由于生长因子陷阱构建体靶向的生长因子作为膜蛋白和游离(即可溶性)配体存在,因此在某些实施方案中,保留了ECD/Fc融合多肽中Fc部分的免疫效应子功能、特别是ADCC。在备选实施方案中,除了人IgG1 Fc之外,其它Fc区也可以包括在本文提供的ECD/Fc嵌合融合多肽中。例如,在Fc/Fc γ R相互作用介导的效应子功能被最小化的情况下,考虑了与不佳地募集补体或效应细胞的IgG同种型融合,并且不表现出效应子功能,例如IgG2或IgG4的Fc。这种方法可用于不需要效应子功能或效应子功能有害的情况,例如在自身免疫和炎症性疾病和病症的情况下。

[1165] 在某些实例中,可以修饰Fc部分以增强或增加免疫效应子功能。例如,这可以通过增加结合C1q(对于CDC)和/或某些激活Fc γ R(例如,Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIc、Fc γ RIIIa和Fc γ RIIIb)的修饰来实现。修饰为与Fc受体结合增加的Fc区可以更有效地促进患者体内癌细胞的破坏,即使在与ECD多肽连接时也是如此。抗体通过多种可能的机制破坏肿瘤细胞,包括例如通过阻断生长途径的抗增殖、导致细胞凋亡的细胞内信号传导、增强的受体下调和/或更新、ADCC、ADCP、CDC和促进适应性免疫应答。因此,在本文的生长因子陷阱构建体用于治疗癌症的实施方案中,可以修饰构建体的Fc部分以增强或增加免疫效应子功能。F.4.d.i.c)部分(增强或减少/消除免疫效应子功能)中的表8(增强免疫效应子功能的IgG1 Fc修饰)总结了增加与Fc γ R或C1q结合并因此增强免疫效应子功能的Fc修饰,包括ADCC、ADCP和CDC,并提供了参考SEQ ID NO:9所示IgG1重链恒定结构域的序列根据Kabat编号和序号的相应修饰。可以将这些修饰中的任一种或多种单独或以各种组合引入本文提供的生长因子陷阱构建体的IgG1 Fc部分。本领域已知的赋予增强或增加的免疫效应子功能的其它修饰也被考虑用于本文。这些在上一节中列出,描述了增强免疫效应子功能的IgG1 Fc修饰。

[1166] 在备选实施方案中,本文提供的生长因子陷阱构建体的Fc部分被修饰以降低或消除免疫效应子功能。例如,这可以通过减少或消除结合C1q的(对于CDC)和/或某些激活Fc γ R(例如,Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIc、Fc γ RIIIa和Fc γ RIIIb)的修饰来实现。这在例如在需要拮抗作用而不是杀死携带靶抗原的细胞的情况下,或者在需要减少不希望的或有害的免疫效应子功能(例如不希望的促炎细胞因子释放和脱靶细胞毒性)的情况下是希望的。因此,在本文提供的生长因子陷阱构建体用于治疗慢性炎症和自身免疫疾病和病症例如RA的实施方案中,可以修饰构建体的Fc部分以降低或消除免疫效应子功能。

[1167] F.4.d.i.c)部分(Fc免疫效应子功能的增强或减少/消除)中的表9(减少或消除免疫效应子功能的IgG1 Fc修饰)总结了示例性IgG1 Fc修饰,所述修饰减少或消除与Fc γ R和/或C1q的结合并激活其,及因此减少或消除免疫效应子功能,包括ADCC、ADCP和CDC,并且可以被引入本文的生长因子陷阱构建体的Fc区。该表提供了参考SEQ ID NO:9所示IgG1重

链恒定域的序列根据Kabat编号和序号的相应修饰。可以将这些修饰中的任一种或多种单独或以各种组合引入本文提供的生长因子陷阱构建体的IgG1 Fc部分。本领域已知的降低或消除免疫效应子功能的其它修饰也被考虑用于本文。

[1168] 本文提供的生长因子陷阱构建体的Fc部分也可以进行修饰以增加与抑制性Fc γ R的结合,从而导致免疫应答的抑制。具有免疫抑制性Fc修饰的治疗性抗体有利于治疗炎症疾病。可以将这些突变并入本文的生长因子陷阱构建体的Fc部分,旨在治疗具有炎症组分或病因学或参与的疾病和病症,例如RA和其它炎症和自身免疫性疾病。

[1169] 增加与抑制性Fc γ RIIb和/或Fc γ RI而不是Fc γ RIIIa的结合或赋予选择性结合的修饰可以被工程化到本文提供的生长因子陷阱构建体中的IgG1 Fc区中。这些修饰包括但不限于S267E、N297A、L328F、L351S、T366R、L368H、P395K、S267E/L328F、L351S/T366R/L368H/P395K及其组合中的一项或多项(根据EU编号)。F.4.d.i.i部分的表11(增加与抑制性Fc γ RIIb结合的IgG1 Fc修饰)示出参考SEQ ID NO:9所示IgG1重链恒定域根据Kabat编号和序号的相应置换。这些修饰在上文描述增加与抑制性Fc γ RIIb结合的IgG1 Fc修饰的部分中进行了总结。

[1170] 4. 组合物、治疗用途和治疗方法

[1171] 提供了编码嵌合融合多肽(即ECD/Fc)和生长因子陷阱构建体的核酸分子,含有所述核酸分子的载体。还提供了含有本文所述载体的细胞,以及含有本文所述任何生长因子陷阱构建体、编码核酸分子、载体或细胞的药物组合物。本文中的生长因子陷阱构建体如先前所述产生和纯化,例如Sarup et al. (2008) *Mol. Cancer Ther.* 7 (10):3223-3236、Gompels et al. (2011) *Arthritis Research&Therapy* 13:R161、Jin et al. (2009) *Mol. Med.* 15(1-2):11-20和美国专利公开号2010/0055093所述。

[1172] 本文的多特异性(包括双特异性)生长因子陷阱构建体含有两个或多个、尤其是两个嵌合蛋白,这些嵌合蛋白是通过将两个或多个、尤其是两个相同或不同的ECD多肽直接或间接连接于多聚化结构域而产生的。在一些实例中,在多聚化结构域是多肽例如免疫球蛋白Fc的情况下,将编码ECD-多聚化结构域嵌合多肽的基因融合体插入合适的表达载体中。得到的ECD-多聚化结构域嵌合蛋白可以在宿主细胞中表达,特别是哺乳动物细胞(例如HEK293T或CHO细胞,或本文所述或本领域已知的任何其它合适的哺乳动物细胞),将这些细胞用重组表达载体转化,并使其组装成多聚体例如二聚体,其中多聚化结构域相互作用形成多价多肽。所得的嵌合多肽和由其形成的多聚体可以通过本领域已知的任何合适的方法纯化,例如通过蛋白A或蛋白G柱上的亲和色谱。另外或或者,可以使用用于蛋白质纯化的其它技术,包括例如凝胶电泳、透析、离子交换色谱、乙醇沉淀、HPLC如反相HPLC、二氧化硅色谱、肝素琼脂糖色谱、色谱聚焦、SDS-PAGE,和硫酸铵沉淀。当编码不同ECD嵌合多肽的两个核酸分子被转化到细胞中时(例如HER1/Fc和HER3/Fc),将形成同源二聚体和异源二聚体。可以调整表达条件,使得异二聚体形成优于同二聚体形成。例如,可以调整编码不同ECD嵌合多肽的核酸分子的比例,由此一种核酸分子过量导致形成较少的同源二聚体。此外,如上所述,将凸出凹陷引入Fc单体有利于形成异二聚体而不是同二聚体。

[1173] 还可以将含有Fc区的ECD嵌合多肽工程化为包括带有金属螯合物或其它表位的标签,例如6xHis标签、c-myc标签、FLAG标签、麦芽糖结合蛋白(MBP)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或硫氧还蛋白(TRX)。带标签的结构域可用于通过金属螯合色谱和/或抗体进行快速

纯化,并允许在Western印迹、免疫沉淀或生物测定中的活性消耗/阻断中进行检测。

[1174] a. 药物组合物

[1175] 本文提供的是含有本文提供的多特异性例如双特异性生长因子陷阱构建体或编码核酸分子的药物组合物。还提供了含有分离细胞的药物组合物,所述分离细胞含有本文提供的核酸分子或载体。这样的组合物含有治疗有效量的生长因子陷阱构建体。所述药物组合物可以任何常规方式配制,通过将选定量的生长因子陷阱构建体或核酸分子与一种或多种生理上可接受的载体或赋形剂混合而配制。所述药物组合物可用于治疗、预防和/或诊断性应用。所述组合物中活性化合物的浓度将取决于所述活性化合物的吸收、失活和排泄速率、施用方案和施用量,以及本领域技术人员已知的其它因素。

[1176] 适于施用本文提供的化合物的药物载体或运载体包括本领域技术人员已知的适于特定施用方式的任何此类载体。所述载体或赋形剂的选择在专业人员的技能范围内,并且可以取决于许多参数。这些包括例如施用方式(即全身、口服、经鼻、肺、病灶、局部或任何其它方式)和治疗的病症。包含治疗有效量的本文所述多特异性例如双特异性生长因子陷阱构建体或核酸分子的药物组合物也可以提供为冻干粉末,将其在即将施用之前例如用无菌水重建。

[1177] 本文提供的药物组合物可以是多种形式,例如固体、半固体、液体、粉末、水性或冻干形式。本文提供的药物组合物可以配制用于单剂量(直接)施用,或稀释或其它修饰施用。所述配制剂中化合物的浓度在施用时有效递送对于预期治疗是有效的量。通常,组合物被配制成单剂量施用。所述化合物可以微粒化或其它合适的形式悬浮,或者可以衍生化以产生更易溶解的活性产物。所得混合物的形式取决于许多因素,包括预期的施用方式和化合物在所选载体或运载体中的溶解度。有效浓度足以改善靶向病症并且可以凭经验确定。为了配制组合物,将重量分率的化合物以有效浓度溶解、悬浮、分散或以其它方式混合在选定的运载体中,使得靶向病症得到缓解或改善。

[1178] 用于产生编码本文提供的生长因子陷阱构建体的核酸的方法包括在H部分中描述的方法。H部分还描述了可以使用的载体和细胞,以及用于蛋白质表达和纯化的方法。I部分中描述的组合物、配制剂、剂量和施用方法可以适用于生产包括本文描述的生长因子陷阱构建体和编码核酸分子的组合物和配制剂。剂量和施用方法可以由专业人员确定,并且是本领域已知的并且在本文别处描述。

[1179] b. 治疗用途和治疗方法

[1180] 本文提供的多特异性(包括双特异性)生长因子陷阱构建体可用于本领域技术人员已知的使用此类分子的任何目的。例如,本文提供的生长因子陷阱构建体可用于治疗、诊断、工业和/或研究目的中的一种或多种。特别地,本文提供的多特异性生长因子陷阱构建体可用于治疗涉及CSR、包括RTK及特别是HER蛋白家族的多种疾病和病症,包括本文所述的那些。HER信号传导涉及多种疾病和病症的病因学,并且任何此类疾病或其病症预期通过本文提供的生长因子陷阱构建体来治疗。

[1181] 本文提供的生长因子陷阱构建体和编码核酸分子以及药物组合物可用于治疗应用抗HER疗法(例如,曲妥珠单抗、西妥昔单抗、吉非替尼、厄洛替尼和拉帕替尼以及本文所述和/或本领域已知的其它制剂)的任何病症,包括但不限于癌症和其它增殖性疾病和病症、血管生成相关疾病和病症、类风湿性关节炎和其它慢性炎症和自身免疫性疾病和病症,

以及神经退行性疾病和中枢神经系统 (CNS) 病症。例如,使用本文提供的生长因子陷阱构建体的治疗包括但不限于血管生成相关疾病和病症、炎症疾病和病症、自身免疫性疾病和病症、神经退行性疾病和与细胞增殖相关的病症的治疗。此类疾病和病症包括例如眼部疾病、动脉粥样硬化、血管损伤、阿尔茨海默病、癌症、平滑肌细胞相关病症、类风湿性关节炎 (RA) 和各种自身免疫性疾病。

[1182] 剂量水平和方案可以基于已知的剂量和方案来确定,并且如果需要可以根据本文提供的多肽和构建体的性质的变化进行外推,和/或可以根据多种因素凭经验确定。这些因素包括例如个体的体重,以及其一般健康状况、年龄、性别和饮食,以及所用特定化合物的活性、施用时间、排泄速率、药物组合、疾病的严重程度和病程,以及患者易患病倾向和主治医师的判断。活性成分通常与药学上有效的载体组合。可与载体材料组合以产生单一剂量形式或多剂量形式的活性成分的量可根据所治疗的宿主和特定施用方式而变化。

[1183] 剂量取决于所治疗的特定病症、疾病或病况,以及特定受试者。典型剂量类似于已知的抗HER疗法,例如抗体,包括曲妥珠单抗、西妥昔单抗、帕妥珠单抗和帕尼单抗,以及小分子酪氨酸激酶抑制剂,如吉非替尼、厄洛替尼和拉帕替尼。对于受试者,包括人和其它动物,示例性剂量范围为约或0.1mg/kg至100mg/kg,例如1mg/kg至约或30mg/kg,例如5mg/kg至25mg/kg。剂量可以基于人平均体重约为75kg的假设来确定。可以针对儿童、婴儿和较小的成人调整剂量。

[1184] 患者病情改善后,必要时可给予维持剂量的化合物或组合物;并且可以修改剂量、剂型或施用频率或其组合。在一些情况下,受试者可能需要根据疾病症状的任何复发情况或根据预定剂量方案进行长期间歇治疗。

[1185] 用本文提供的多特异性生长因子陷阱构建体治疗疾病和病症可以使用本文所述的合适制剂通过任何合适的施用途径来实现,包括但不限于输注、皮下注射和吸入,或肌肉内、皮内、口服、局部和透皮施用途径。

[1186] 本文提供了一种治疗HER介导或HER相关疾病或病症的方法,包括测试患有该疾病的受试者以确定哪些HER受体表达或过表达,并基于结果选择多特异性生长因子陷阱构建体靶向至少一个、通常是两个HER受体。在一个实施例中,所述疾病是癌症。本文治疗的示例性癌症包括神经胶质瘤,以及胰腺癌、胃癌、头颈癌、宫颈癌、肺癌、结直肠癌、子宫内膜癌、前列腺癌、食道癌、卵巢癌、子宫癌、膀胱癌或乳腺癌。可用本文的生长因子 (HER配体) 陷阱构建体治疗的癌症通常是表达至少一种HER受体、通常多于一种HER受体的癌症。可以通过本领域已知的检测HER表达的任何方式来鉴定此类癌症。例如,可以使用可商购的诊断/预测测定法评估HER2表达,例如HercepTest™ (Dako)。对来自肿瘤活检的石蜡包埋组织切片进行免疫组织化学 (IHC) 测定并与HER2蛋白染色强度标准一致。符合低于阈值评分的肿瘤被鉴定为不过表达HER2,而那些大于或等于阈值评分的肿瘤被鉴定为过表达HER2。在一个治疗实例中,评估HER2过表达的肿瘤作为用多特异性生长因子陷阱构建体例如本文提供的任何构建体治疗的候选者。

[1187] 在另一个实施方案中,HER介导的或HER相关的疾病或病症是炎症或自身免疫病症,特别是类风湿性关节炎。关节炎的动物模型,例如胶原诱导的关节炎 (CIA) 小鼠模型,可用于测试本文提供的生长因子陷阱构建体。例如,用本文的生长因子陷阱构建体治疗的小鼠,例如通过局部注射蛋白质,可以观察到关节炎症状的减轻,包括爪肿胀、红斑和强直。还

可以观察到滑膜血管生成和滑膜炎症的减少。

[1188] 本文提供的多特异性包括双特异性生长因子陷阱构建体、编码核酸分子和药物组合物可用于治疗HER (ErbB) 相关疾病或HER受体介导的疾病,这些疾病是其中HER受体和/或配体参与其病因学、病理学或疾病发生的某些方面的任何疾病、病况或病症。治疗的HER相关疾病包括癌症,例如神经胶质瘤或胰腺癌、胃癌、头颈癌、宫颈癌、肺癌、结直肠癌、子宫内膜癌、前列腺癌、食道癌、卵巢癌、子宫癌、膀胱癌、肾癌或乳腺癌。可以治疗的其它疾病包括非癌症增殖性疾病,例如那些涉及平滑肌细胞增殖和/或迁移的疾病、炎症或自身免疫性疾病、皮肤病症和眼部病症。治疗的疾病和病症包括例如类风湿性关节炎、糖尿病性视网膜病、前眼疾病、银屑病、再狭窄、狭窄、动脉粥样硬化、血管增厚引起的高血压、膀胱、心脏或其它肌肉的肌肉增厚,膀胱疾病、子宫内膜异位症和阻塞性气道疾病,以及与暴露于一种或多种神经调节蛋白 (NRG) 配体如NRG1 (包括I、II和III型)、NRG2、NRG3和/或NRG4或其它HER家族配体相关(例如引起或加重)的疾病或病症。NRG相关疾病以及与其它HER家族配体相关的疾病的实例包括神经系统或神经肌肉疾病,包括精神分裂症、帕金森病和阿尔茨海默病、心肌病、先兆子痫、神经系统疾病和心力衰竭。

[1189] 可以治疗的癌症的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤,例如鳞状细胞癌(例如,上皮鳞状细胞癌)、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠道癌)、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、食道癌、神经胶质瘤、结直肠癌、子宫内膜癌、子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、肝癌,以及头颈癌。

[1190] 与单一靶向抗HER疗法如曲妥珠单抗、西妥昔单抗和本文所述或已知的其它抗体以及小分子酪氨酸激酶抑制剂如吉非替尼、厄洛替尼和拉帕替尼相比,本文提供的多特异性生长因子陷阱构建体在施用时通常可导致治疗功效增加和耐药性降低。如本文所述,对单一靶向抗HER疗法的抗性与其它HER家族成员的共表达和/或上调及其配体的过表达相关。本文提供的HER-配体结合构建体充当受体诱饵并隔离多个HER家族配体,防止配体依赖性受体激活并下调异常HER家族活性,导致同时抑制多个配体诱导的HER家族成员。这提高了治疗效果并减少了产生耐药性的机会。

[1191] 5. 联合治疗

[1192] 可以使用联合治疗。联合治疗包括施用本文提供的多特异性(包括双特异性)生长因子陷阱构建体、核酸分子和药物组合物,与另一种药剂或疗法(包括放射和手术)组合。可以与本文提供的治疗同时、之前、之后或间歇地施用另外的药剂或疗法。它们可以在单独的组合物中或在复合制剂中。

[1193] 本文提供的多特异性例如双特异性异源多聚体生长因子陷阱构建体、核酸分子和药物组合物可以在以下一种或多种其它治疗方案或药剂之前、之后、间歇地或同时施用,包括但不限于TNF拮抗剂/阻滞剂、化学治疗剂、单靶点抗HER疗法(包括抗体和酪氨酸激酶抑制剂)、抗血管生成剂、抗体、细胞毒剂、抗炎剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素药、心脏保护剂、类固醇、免疫刺激剂、免疫抑制剂、生物或非生物改善病情抗风湿药(DMARD)、感染性疾病治疗药物(包括抗体)或其它治疗药物。特别地,将生长因子陷阱构建体与本文提供的TNFR1/TNFR2轴构建体一起施用。它们也可以与其它抗TNF疗法一起施用,包括上文部分中

描述的或本领域技术人员已知的任何疗法。

[1194] TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、多特异性构建体、核酸和本文提供的其它构建体可以与其它抗TNF疗法一起以方案施用。可用于本文联合治疗的示例抗TNF治疗剂包括例如常规合成的DMARD,例如甲氨蝶呤(MTX)、羟氯喹(HCQ; Plaquenil®)、柳氮磺胺吡啶(Azulfidine®),和来氟米特(Arava®);生物DMARD,例如阿巴西普(Orencia®)、阿那白滞素(Kineret®)、利妥昔单抗(Rituxan®、Truxima®、MabThera®)、托西珠单抗(托珠单抗、Actemra®、RoActemra®)、皮质类固醇(例如地塞米松、甲基泼尼松龙、泼尼松龙、泼尼松或曲安西龙)、托法替尼(Xeljanz®),和TNF抑制剂/抗TNF剂,例如聚乙二醇赛妥珠单抗(Cimzia®)、英夫利昔单抗(Remicade®)、阿达木单抗(Humira®)、戈利木单抗(Simponi®)和依那西普(Enbrel®)。联合治疗还可以包括免疫治疗药物,例如环孢菌素、甲氨蝶呤、阿霉素或顺铂,以及免疫毒素。

[1195] 在特定的实例中,本文提供的生长因子陷阱构建体与本文提供的任何TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体或多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体一起施用,用于治疗本文所述的任何慢性炎症、自身免疫和/或神经退行性/脱髓鞘疾病和病症,特别是类风湿性关节炎(RA)。

[1196] 在一些实例中,本文提供的生长因子陷阱构建体与一种或多种抗血管生成剂一起施用。例如,抗血管生成因子可以是结合参与促进血管生成的生长因子或生长因子受体的小分子或蛋白质(例如,抗体、Fc融合体或细胞因子)。抗血管生成剂的实例包括但不限于结合血管内皮生长因子(VEGF)或结合VEGF-R的抗体、降低VEGF或VEGF-R表达水平的基于RNA的治疗剂、VEGF-毒素融合体、Regeneron的VEGF-TRAP、血管生成抑制素(纤溶酶原片段)、抗凝血酶III、angiozyme、ABT-627、Bay 12-9566、BeneFin、贝伐单抗、双膦酸盐、BMS-275291、软骨衍生的抑制剂(CDI)、CAI、CD59补体片段、CEP-7055、Col 3、康普瑞汀(Combretastatin)A-4、内皮抑素(胶原XVIII片段)、法尼基转移酶抑制剂、纤连蛋白片段、GRO- β 、卤夫酮(halofuginone)、肝素酶、肝素六糖片段、HMV833、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、IM-862、干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 γ 、干扰素诱导蛋白10(IP-10)、白细胞介素12、kringle 5(纤溶酶原片段)、马立马司他(marimastat)、金属蛋白酶抑制剂(例如TIMP)、2-甲氧基雌二醇、MMI 270(CGS 27023A)、纤溶酶原激活物抑制物(PAI)、血小板因子4(PF4)、普马司他(prinomastat)、催乳素16kDa片段、增殖素相关蛋白(PRP)、PTK 787/ZK 222594、类视黄醇、索利司他(solimastat)、角鲨胺、SS3304、SU5416、SU6668、SU11248、四氢皮质醇-S、四硫钼酸盐、沙利度胺(thalidomide)、血小板反应蛋白-1(TSP-1)、TNP470、转化生长因子 β (TGF- β)、血管抑素、血管抑制因子(钙网蛋白片段)、ZS6126和ZD6474。

[1197] 在一些实例中,本文提供的生长因子陷阱构建体与一种或多种酪氨酸激酶抑制剂以及任选本文提供的TNFR1/TNFR2轴构建体一起施用。酪氨酸激酶抑制剂的实例包括但不限于喹唑啉,例如PD 153035、4-(3-氯苯胺基)喹唑啉;吡啶并嘧啶;嘧啶并嘧啶;吡咯并嘧啶,例如CGP 59326、CGP 60261和CGP 62706;吡唑并嘧啶;4-(苯基氨基)-7H-吡咯并(2,3-d)嘧啶;姜黄素(双阿魏酰甲烷,4,5-双(4-氟苯胺基)邻苯二甲酰亚胺);含有硝基噻吩部分的酪氨酸蛋白酶;PD-0183805(Warner-Lambert);反义分子(例如,那些与ErbB编码核酸结合);喹啉类(见例如美国专利号5,804,396);酪氨酸磷酸化抑制剂(Tyrphostins)

(见例如美国专利号5,804,396);ZD6474(Astra Zeneca);PTK-787(Novartis/Schering A G);pan-ErbB抑制剂如C1-1033(Pfizer);Affinitac(ISIS 3521;Isis/Lilly);Imatinib mesylate(STI571, **Gleevec®**;Novartis);PKI 166(Novartis);GW2016(Glaxo SmithKline);C1-1033(Pfizer);EKB-569(Wyeth);Semaxinib(Sugen);ZD6474(AstraZeneca);PTK-787(Novartis/Schering A G);INC-1C11(ImClone);吉非替尼(**Iressa®**,ZD1839,AstraZeneca);和OSI-774(以商标**Tarceva®**销售,OSI Pharmaceuticals/Genentech),或任何以下专利出版物中描述的:美国专利WO 99/09016、WO 98/43960、WO 97/38983、WO 99/06378、WO 99/06396、WO 96/30347、WO 96/33978、WO 96/33979、和WO 96/33980。

[1198] 可用于联合治疗的其它化合物包括类固醇,例如血管生成抑制性4,9(11)-类固醇和C21-氧化类固醇、血管生成抑制素、内皮抑素、血管抑素、血管能抑素(canstatin)和乳腺丝抑蛋白(Maspin)、血管生成素、细菌多糖CM101和抗体LM609(见例如美国专利号5,753,230)、血小板反应蛋白(TSP-1)、血小板因子4(PF4)、干扰素、金属蛋白酶抑制剂、药物,包括AGM-1470/TNP-470、沙利度胺和羧胺三唑(CAI),可的松,例如存在肝素或肝素片段、抗侵袭因子、视黄酸和紫杉醇、鲨鱼软骨提取物、阴离子聚酰胺或聚脲低聚物、羟吡啶衍生物、雌二醇衍生物和噻唑并嘧啶衍生物。

[1199] 可与本文提供的生长因子陷阱构建体共同施用的抗癌抗体的实例包括但不限于抗17-1A细胞表面抗原抗体,例如依决洛单抗(以商标**Panorex®**销售);抗4-1BB抗体;抗4Dc抗体;抗A33抗体,例如A33和CDP-833;抗 α 1整合蛋白抗体,如那他珠单抗;抗 α 4 β 7整合蛋白抗体,如LDP-02;抗 α V β 1整合蛋白抗体,如F-200、M-200、SJ-749;抗 α V β 3整联蛋白抗体,例如阿昔单抗、CNT0-95、Mab-17E6和Medi-523(以商品名Vitaxin销售);抗补体因子5(C5)抗体,例如5G1.1;抗CA125抗体,例如奥戈伏单抗(以商标**OvaRex®**销售);抗CD3抗体,例如维西珠单抗(**Nuvion®**)和Rexomab;抗CD4抗体,例如IDEC-151、MDX-CD4和OKT4A;抗CD6抗体,例如溶瘤素B和溶瘤素CD6;抗CD7抗体,如HB2;抗CD19抗体,如B43、MT-103和溶瘤素B;抗CD20抗体,例如2H7、2H7.v16、2H7.v114、2H7.v115、托西莫单抗(**Bexxar®**)、利妥昔单抗(**Rituxan®**)和替伊莫单抗(**Zevalin®**);抗CD22抗体,例如依帕珠单抗(**Lymphocide®**);抗CD23抗体,如IDEC-152;抗CD25抗体,例如巴利昔单抗和**Zenapax®**(达珠单抗);抗CD30抗体,例如AC10、MDX-060和SGN-30;抗CD33抗体,例如吉妥珠单抗奥唑米星(**Mylotarg®**)、溶瘤素M和Smart MI 95;抗CD38抗体;抗CD40抗体,例如SGN-40和托拉珠单抗;抗CD40L抗体,例如5c8、卢利珠单抗(Antova)和IDEC-131;抗CD44抗体,例如比伐珠单抗;抗CD46抗体;抗CD52抗体,例如**Campath®**(阿仑单抗);抗CD55抗体,如SC-1;抗CD56抗体,如huN901-DM1;抗CD64抗体,例如MDX-33;抗CD66e抗体,例如XR-303;抗CD74抗体,如IMMU-110;抗CD80抗体,例如加利昔单抗和IDEC-114;抗CD89抗体,例如MDX-214;抗CD123抗体;抗CD138抗体,例如B-B4-DM1;抗CD146抗体,例如AA-98;抗CD148抗体;抗CEA抗体,例如cT84.66、拉贝珠单抗和**Pentacea®**;抗CTLA-4抗体,如MDX-101;抗CXCR4抗体;抗EGFR抗体,例如ABX-EGF、**Erbix®**(西妥昔单抗)、帕尼单抗、IMC-C225和Merck Mab 425;抗EpCAM抗体,例如Cruce11的抗EpCAM、ING-1和IS-IL-2;抗肝配蛋白B2/EphB4抗体;抗HER2抗体,例如**Herceptin®**(曲妥珠单抗)、帕妥珠单抗和MDX-210;抗FAP(成纤维细胞活化蛋白)抗体,例如西罗珠单抗;抗铁蛋白抗体,例如

NXT-211;抗FGF-1抗体;抗FGF-3抗体;抗FGF-8抗体;抗FGFR抗体;抗纤维蛋白抗体;抗G250抗体,例如WX-G250和吉妥昔单抗(**Rencarex®**);抗GD2神经节苷脂抗体,如EMD-273063和TriGem;抗GD3神经节苷脂抗体,如BEC2、KW-2871和米妥莫单抗;抗gpIIb/IIIa抗体,如ReoPro;抗肝素酶抗体;抗HLA抗体,如Oncolym和Smart 1D10;抗HM1.24抗体;抗ICAM抗体,如ICM3;抗IgA受体抗体;抗IGF-1抗体,如CP-751871和EM-164;抗IGF-1R抗体,如IMC-A12;抗IL-6抗体,例如CNT0-328和艾西莫单抗;抗IL-15抗体,例如**HuMax®**-IL15抗体;抗KDR抗体;抗层粘连蛋白5抗体;抗Lewis Y抗原抗体,如Hu3S193和IGN-311;抗MCAM抗体;抗Muc1抗体,如BravaRex和TriAb;抗NCAM抗体,如ERIC-1和ICRT;抗PEM抗原抗体,例如Theragyn和Therex;抗PSA抗体;抗PSCA抗体,例如IG8;抗Ptk抗体;抗PTN抗体;抗RANKL抗体,如AMG-162;抗RLIP76抗体;抗SK-1抗原抗体,如Monopharm C;抗STEAP抗体;抗TAG72抗体,例如CC49-SCA和MDX-220;抗TGF- β 抗体,例如CAT-152;抗TNF- α 抗体,例如CDP571、CDP870、D2E7、阿达木单抗(**Humira®**)和英夫利昔单抗(**Remicade®**);抗TRAIL-R1和TRAIL-R2抗体;抗VE-钙粘蛋白-2抗体;和抗VLA-4抗体,例如**Antegren®**抗体。可以使用抗独特型抗体,包括但不限于GD3表位抗体BEC2和gp72表位抗体105AD7。也可以使用双特异性抗体,包括但不限于抗CD3/CD20抗体Bi20。

[1200] 可与本文提供的生长因子陷阱构建体共同施用的可治疗自身免疫或炎症疾病、移植排斥和/或GvHD的抗体的实例包括但不限于抗 α 4 β 7整联蛋白抗体,例如LDP-02;抗 β 2整合蛋白抗体,例如LDP-01;抗补体(C5)抗体,例如5G1.1;抗CD2抗体,例如BTI-322和MEDI-507;抗CD3抗体,例如OKT3和SMART抗CD3;抗CD4抗体,例如IDEC-151、MDX-CD4和OKT4A;抗CD11a抗体;抗CD14抗体,如IC14;抗CD18抗体;抗CD23抗体,如IDEC-152;抗CD25抗体,例如Zenapax;抗CD40L抗体,例如5c8、Antova和IDEC-131;抗CD64抗体,例如MDX-33;抗CD80抗体,如IDEC-114;抗CD147抗体,例如ABX-CBL;抗E-选择素抗体,例如CDP850;抗gpIIb/IIIa抗体,例如**ReoPro®**/Abcixima;抗ICAM-3抗体,例如ICM3;抗ICE抗体,如VX-740;抗Fc γ R1抗体,例如MDX-33;抗IgE抗体,例如rhuMAb-E25;抗IL-4抗体,例如SB-240683;抗IL-5抗体,例如SB-240563和SCH55700;抗IL-8抗体,例如ABX-IL8;抗干扰素 γ 抗体;抗TNF α 抗体,例如CDP571、CDP870、D2E7、阿达木单抗、英夫利昔单抗和MAK-195F;和抗VLA-4抗体,例如Antegren。可以共同施用以治疗自身免疫或炎症疾病、移植排斥和GvHD的其它含Fc分子的实例包括但不限于TNFR1受体/Fc融合**Enbrel®**(依那西普)和Regeneron的IL-1TRAP。

[1201] 可以共同施用以治疗感染性疾病的抗体的实例包括但不限于抗炭疽抗体,例如ABthrax;抗CMV抗体,例如CytoGam和司韦单抗;抗隐孢子虫抗体,例如CryptoGAM和Sporidin-G;抗幽门螺杆菌抗体,如Pyloran;抗乙型肝炎抗体,例如HepeX-B和Nabi-HB;抗HIV抗体,例如HRG-214;抗RSV抗体,例如泛维珠单抗、HNK-20、帕利珠单抗和RespiGam;和抗葡萄球菌抗体,如Aurexis、Aurograb、BSYX-A110和SE-Mab。

[1202] 在一些实例中,本文所述的生长因子陷阱构建体与一种或多种化疗剂一起施用。化学治疗剂的实例包括但不限于烷化剂,例如噻替派和环磷酰胺(**CYTOXAN®**);烷基磺酸盐,例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);雄激素,例如卡普睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、硫雄甾醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)和睾内酯(testolactone);抗肾上腺药,如氨鲁米

特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)和曲洛司坦(trilostane);抗雄激素药,如氟他胺(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)和戈舍瑞林(goserelin);抗生素,例如阿克拉霉素(aclacinomycins)、放线菌素(actinomycin)、蒽霉素(anthracycline)、重氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素(cactinomycin)、加利车霉素(calicheamicin)、卡柔比星(carubicin)、胭脂红霉素(carminomycin)、嗜癌素(carzinophilin)、染色霉素(chromomycins)、更生霉素(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依柔比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycin)、麦考酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培普霉素(peplomycin)、泊非霉素(porfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、克拉霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、津诺他汀(zinostatin)和佐柔比星(zorubicin);抗雌激素,包括例如他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、抑制4(5)-咪唑的芳香酶、4-羟基他莫昔芬、三苯氧胺(trioxifene)、酮昔芬(keoxifene)、LY 117018、奥那司酮(onapristone)和托瑞米芬(toremifene, Fareston);抗代谢物,如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如去甲蝶呤(denopterin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、蝶呤(pterapterin)和三甲蝶呤(trimetrexate);氮杂环丙烷类,例如苯并多巴(benzodepa)、卡博醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredepa);乙烯亚胺和甲基三聚氰胺,包括六甲蜜胺、三乙烯三聚氰胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺和三羟甲基三聚氰胺;叶酸补充剂,例如亚叶酸(folinic acid);氮芥类,例如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、氯萘嗪(chlorophosphamide)、氯磷酰胺(chlorophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、盐酸氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新比星(novembichin)、苯内酯(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷酰胺(trofosfamide)和尿嘧啶芥(uracil mustard);亚硝基脲类,例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲佐菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷尼莫司汀(ranimustine);铂类似物,例如顺铂和卡铂;长春碱;铂;蛋白质,例如精氨酸脱亚氨酶和天冬酰胺酶;嘌呤类似物,例如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)和硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,例如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮杂尿苷(azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、多西氟尿苷(doxifluridine)、依西他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)和5-FU;紫杉烷(taxanes),例如紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)和多西紫杉醇(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France);拓扑异构酶抑制剂,如RFS 2000;胸苷酸合成酶抑制剂,例如Tomudex;另外的化疗剂,包括乙酰丙酮(aceglatone);醛磷酰胺苷(aldophosphamide glycoside);氨基戊酮酸(aminolevulinic acid);安吡啶(amsacrine);阿莫司汀(bestrabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatrexate);去环磷酰胺

(defosfamide);去甲秋水仙(demecolcine);地吡醌(diaziquone);二氟甲基鸟氨酸(DMFO);依氟鸟氨酸(eflornithine);依利醋铵(elliptinium acetate);依托糖(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖(lentinan);洛尼达明(lonidamine);米妥瓜酮(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫匹达莫(mopidamol);硝克林(nitracrine);喷司他丁(pentostatin);蛋氨酸芥(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基酰肼(ethylhydrazide);丙卡巴肼(procarbazine);PSK®;雷佐生(razoxane);西唑仑(sizofiran);螺锗(spirogermanium);细交链孢菌酮酸;三亚醌(triaziquone);2,2',2"三氯三乙胺;氨基甲酸乙酯;长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露莫司汀(mannomustine);米托布罗糖醇(mitobronitol);米托内醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);gacytosine;阿糖胞苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替哌;苯丁酸氮芥(chlorambucil);吉西他滨(gemcitabine);6-硫鸟嘌呤;巯嘌呤(mercaptopurine);甲氨蝶呤(methotrexate);依托泊苷(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺(ifosfamide);丝裂霉素C;米托蒽醌(mitoxantrone);长春新碱(vincristine);长春瑞滨(vinorelbine);诺维宾(Navelbine);诺凡酮(Novantrone);替尼泊苷(teniposide);道诺霉素(daunomycin);氨蝶呤(aminopterin);希罗达(Xeloda);伊班膦酸盐(ibandronate);CPT-11;视黄酸;埃斯培霉素(esperamycins);卡培他滨(capecitabine);拓扑异构酶抑制剂,如伊立替康(irinotecan)。也可以使用任何上述的药理学上可接受的盐、酸或衍生物。

[1203] 化疗剂可以作为前药施用。可与本文所述的生长因子陷阱构建体一起施用的前药的实例包括但不限于含磷酸盐的前药、含硫代磷酸盐的前药、含硫酸盐的前药、含肽的前药、D-氨基酸修饰的前药、糖基化前药、含β-内酰胺的前药、任选取代的含苯氧基乙酰胺的前药或任选取代的含苯乙酰胺的前药,以及5-氟胞嘧啶和其它5-氟尿苷前药,它们可以转化为活性更高的无细胞毒性药物。

[1204] 在一些实例中,本文所述的多特异性生长因子陷阱构建体与一种或多种免疫调节剂一起施用。此类制剂可以增加或减少一种或多种细胞因子的产生,上调或下调自身抗原呈递,掩蔽MHC抗原,或促进一种或多种免疫细胞的增殖、分化、迁移或激活。免疫调节剂的实例包括但不限于非甾体抗炎药(NSAID),例如阿司匹林、布洛芬、塞来昔布(celecoxib)、双氯芬酸(diclofenac)、依托度酸(etodolac)、非诺洛芬(fenoprofen)、吲哚美辛(indomethacin)、酮咯酸(ketorolac)、奥沙普秦(oxaprozin)、萘丁美酮(nabumetone)、舒林酸(sulindac)、托美汀(tolmetin)、罗非考昔(rofecoxib)、萘普生(naproxen)、酮洛芬(ketoprofen)和萘丁美酮(nabumetone);类固醇,例如糖皮质激素、地塞米松、可的松、羟基可的松、甲基泼尼松龙、泼尼松、泼尼松龙和曲安奈德triamcinolone;类花生酸,例如前列腺素、凝血恶烷和白三烯;外用类固醇,如地蒽酚(anthralin)、卡泊三醇(calcipotriene)、氯倍他索(clobetasol)和他扎罗汀(tazarotene);细胞因子,例如TGFβ、IFNα、IFNβ、IFNγ、IL-2、IL-4、IL-10;细胞因子、趋化因子或受体拮抗剂,包括针对以下的抗体、可溶性受体和受体-Fc融合物:BAFF、B7、CCR2、CCR5、CD2、CD3、CD4、CD6、CD7、CD8、CD11、CD14、CD15、CD17、CD18、CD20、CD23、CD28、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD52、CD64、CD80、CD86、CD147、CD152、补体因子(C5,D)CTLA-4、嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)、Fas、ICAM、ICOS、IFNα、IFNβ、IFNγ、IFNAR、IgE、IL-1、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-5R、IL-6、IL-8、IL-9、IL-12、IL-13、IL-13R1、IL-15、IL-18R、IL-23、整合蛋白、LFA-1、LFA-3、MHC、选择素、TGFβ、TNFα、TNFβ、TNFR1、TNFR2、以及T

细胞受体,包括依那西普(Enbrel®)、阿达木单抗(Humira®)和英夫利昔单抗(Remicade®);异源抗淋巴细胞球蛋白;和其它免疫调节分子,例如2-氨基-6-芳基-5取代的嘧啶、MHC结合肽和MHC片段的抗独特型抗体、硫唑嘌呤(azathioprine)、布喹那(brequinar)、溴隐亭(Bromocryptine)、环磷酰胺、环孢菌素A、D-青霉胺、脱氧精胍菌素(deoxyspergualin)、FK506,戊二醛、金、羟氯喹、来氟米特、丙二腈酰胺(例如,来氟米特)、甲氨蝶呤、米诺环素、咪唑立宾(mizoribine)、霉酚酸酯(mycophenolate mofetil)、雷帕霉素和柳氮磺胺吡啶。

[1205] 在一些实例中,将本文所述的多特异性生长因子陷阱构建体与一种或多种细胞因子一起施用。细胞因子的实例包括但不限于淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。细胞因子中包括干扰素,例如干扰素- α 、- β 和- γ ;集落刺激因子(CSF),例如巨噬细胞-CSF(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF)和粒细胞-CSF(G-CSF);白介素(IL),例如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12和IL-15;肿瘤坏死因子,例如TNF- α 或TNF- β ;和其它多肽因子,包括LIF和kit配体(KL)。

[1206] 在一些实例中,本文所述的多特异性生长因子陷阱构建体与一种或多种细胞因子或刺激免疫系统细胞并增强所需效应子功能的其它制剂一起施用。例如,刺激自然杀伤(NK)细胞的制剂,包括但不限于IL-2,可以与本文所述的多特异性生长因子陷阱构建体一起施用。在另一个实施方案中,刺激巨噬细胞的制剂试剂包括但不限于C5a和甲酰胺,例如N-甲酰基-甲硫氨酰基-亮氨酰基-苯丙氨酸(见例如Beigier-Bompadre et al. (2003) Scand. J. Immunol. 57:221-228),可以与本文所述的多特异性生长因子陷阱构建体一起施用。刺激嗜中性粒细胞的制剂,包括但不限于G-CSF和GM-CSF,也可以与本文所述的多特异性生长因子陷阱构建体一起施用。促进此类免疫刺激性细胞因子迁移的制剂可以与本文所述的多特异性生长因子陷阱构建体一起施用。其它制剂包括但不限于干扰素 γ 、IL-3和IL-7,它们可以促进一种或多种效应子功能。在一些实例中,本文所述的多特异性生长因子陷阱构建体与一种或多种细胞因子或抑制效应细胞功能的其它制剂一起施用。

[1207] 在一些实例中,本文所述的多特异性生长因子陷阱构建体与一种或多种抗生素一起施用,所述抗生素包括但不限于:氨基糖苷类抗生素(例如,安普霉素(apramycin)、阿贝卡星(arbekacin)、班博霉素(bambermycins)、布替罗星(butirosin)、地贝卡星(dibekacin)、庆大霉素(gentamicin)、卡那霉素(kanamycin)、新霉素(neomycin)、奈替米星(netilmicin)、巴龙霉素(paromomycin)、核糖霉素(ribostamycin)、西索米(sisomicin)和大观霉素(spectinomycin));氨基环醇类(例如大观霉素(spectinomycin)), 氨酚类抗生素(例如叠氮氯霉素(azidamfenicol)、氯霉素(chloramphenicol)、氟苯尼考(flurfenicol)和甲砒霉素(thiamphenicol)), 安沙霉素类抗生素(例如利福米特(rifamide)和利福平(rifampin)), 碳青霉烯类(例如亚胺培南(imipenem)、美罗培南(meropenem)和帕尼培南(panipenem)); 头孢菌素类(例如,头孢克洛(cefaclor)、头孢羟氨苄(cefadroxil)、头孢孟多(cefamandole)、头孢曲嗪(cefatrizine)、头孢西酮(cefazedone)、头孢唑仑(cefazopran)、头孢匹咪唑(cefipimizole)、头孢匹胺(cefpiramide)、头孢匹罗(cefpirome)、头孢丙烯(cefprozil)、头孢呋辛(cefuroxime)、头孢克肟(cefixime)、头孢氨苄(cephalexin)和头孢拉定(cephradine)); 头霉素类(例如头孢布哌酮(cefbuperazone)、头孢西丁(cefodoxitin)、头孢美诺(cefminox)、头孢美唑(cefmetazole)和头孢替坦(cefotetan)); 林可酰胺类(例如,克林霉素(clindamycin)和林

可霉素(lincomycin));大环内酯类(例如阿奇霉素(azithromycin)、布雷菲德菌素(brefeldin)A、克拉霉素(clarithromycin)、红霉素(erythromycin)、罗红霉素(roxithromycin)和妥布霉素(tobramycin));单环内酯类(例如氨曲南(aztreonam)、卡鲁莫南(carumonam)和替格莫南(tigemonam));莫匹罗星(mupirocin);氧头孢烯类(例如,floxacef、拉氧头孢(latamoxef)和拉氧头孢(moxalactam));青霉素类(例如,氨苄青霉素(amdinocillin)、匹美西林(aminocillin pivoxil)、阿莫西林(amoxicillin)、巴卡西林(bacampicillin)、苄青霉素酸(benzylpenicillinic acid)、苄青霉素钠(benzylpenicillin sodium)、依匹西林(epicillin)、芬贝西林(fenbenicillin)、氟唑西林(floxacillin)、培那西林(penamecillin)、氢碘酸喷沙西林(penethamate hydriodide)、邻苯乙胺青霉素(penicillin o-benethamine)、青霉素O、青霉素V、青霉素V苯甲酸盐、海巴青霉素V(penicillin V hydrabamine)、青派环素(penimepicycline)和非奈西林钾(phenethicillin potassium));多肽(例如,杆菌肽(bacitracin)、粘菌素(colistin)、多粘菌素(polymixin)B、替考拉宁(teicoplanin)和万古霉素(vancomycin));喹诺酮类(例如阿米沙星(amifloxacin)、契诺沙星(cinoxacin)、环丙沙星(ciprofloxacin)、依诺沙星(enoxacin)、恩诺沙星(enrofloxacin)、氟罗沙星(fleroxacin)、氟甲喹(flumequine)、加替沙星(gatifloxacin)、吉米沙星(gemifloxacin)、格雷帕沙星(grepafloxacin)、洛美沙星(lomefloxacin)、莫西沙星(moxifloxacin)、萘啶酸(nalidixic acid)、诺氟沙星(norfloxacin)、氧氟沙星(ofloxacin)、氧合酸(oxolinic acid)、培氟沙星(pefloxacin)、吡哌酸(pipemidic acid)、罗沙星(rosoxacin)、鲁氟沙星(rufloxacin)、司帕沙星(sparfloxacin)、替马洛星(temafloxacin)、托苏沙星(tosufloxacin)和曲伐沙星(trovafloxacin));利福平;链阳菌素(例如奎奴普汀(quinupristin)和达福普汀(dalfopristin));磺胺类药物(例如磺胺和磺胺甲恶唑);和四环素类(例如,金霉素(chlortetracycline)、去甲金霉素盐酸盐(demeclocycline hydrochloride)、去甲基金霉素(demethylchlortetracycline)、多西环素(doxycycline)、耐久霉素(Duramycin)、米诺环素(minocycline)、新霉素(neomycin)、土霉素(oxytetracycline)、链霉素(streptomycin)、四环素(tetracycline)和万古霉素(vancomycin))。

[1208] 在一些实例中,本文提供的多特异性生长因子陷阱构建体与一种或多种抗真菌剂一起施用,包括但不限于两性霉素B、环吡酮(ciclopirox)、克霉唑、益康唑、氟康唑、氟胞嘧啶、伊曲康唑、酮康唑、咪康唑、制霉菌素、特比萘芬(terbinafine)、特康唑和噻康唑。

[1209] 在一些实例中,本文所述的多特异性生长因子陷阱构建体与一种或多种抗病毒剂一起施用,包括但不限于蛋白酶抑制剂、逆转录酶抑制剂等,包括I型干扰素、病毒融合抑制剂、神经氨酸酶抑制剂,阿昔洛韦,阿德福韦(adefovir),金刚烷胺,安普那韦(amprenavir),克拉夫定(clevudine),恩夫韦肽(enfuvirtide),恩替卡韦(entecavir),膦甲酸(foscarnet),更昔洛韦(ganciclovir),伊多尿苷(idoxuridine),茚地那韦(indinavir),洛匹那韦(lopinavir),普可那利(pleconaril),利巴韦林(ribavirin),金刚乙胺(rimantadine),利托那韦(ritonavir),沙奎那韦(saquinavir),曲氟尿苷(trifluridine),阿糖腺苷(vidarabine)和齐多夫定(zidovudine)。

[1210] 本文提供的多特异性生长因子陷阱构建体可以与其它治疗方案组合。例如,在一

个实施方案中,待用本文提供的多特异性生长因子陷阱构建体治疗的患者可以接受放射治疗。可以根据本领域常用的和技术人员已知的方案进行放射治疗。此类疗法包括但不限于铯、铈、碘或钴辐射。放射治疗可以是全身照射,或者可以局部地定向到体内或体表的特定部位或组织,例如肺、膀胱或前列腺。放射疗法也可包括用同位素标记的分子如抗体进行治疗。放射免疫治疗剂的例子包括以商标 Zevalin® (Y-90标记的抗-CD20)、LymphoCide® (Y-90标记的抗-CD22) 和 Bexxar® (I-131标记的抗-CD20) 销售的那些制剂。

[1211] 通常,放射疗法在约1至2周的时间段内以脉冲形式施用。然而,可以在更长的时间段内进行放射治疗。例如,可对患有头颈癌的患者施用放射疗法约6至约7周。任选地,放射疗法可以单一剂量或多个连续剂量施用。熟练的医疗从业者可以凭经验确定可用于本文的合适放射治疗剂量。在一些实例中,多特异性生长因子陷阱构建体和任选的一种或多种其它抗癌疗法被用于离体治疗癌细胞。预期这种离体治疗可用于骨髓移植,特别是自体骨髓移植。例如,用多特异性生长因子陷阱构建体和一种或多种抗癌疗法处理含有癌细胞的细胞或组织,如本文所述,可用于在受体患者移植前消除或基本上消除癌细胞。

[1212] 此外,预期本文提供的多特异性生长因子陷阱构建体可与其它治疗技术如手术或光疗相结合施用于患者或受试者。

[1213] 例如,本文提供的是通过联合施用本文提供的任何多特异性生长因子陷阱构建体、核酸分子或药物组合物以及另一种抗癌剂来治疗癌症的方法。所述抗癌剂可包括放射和/或化学治疗剂。例如,抗癌剂可以是酪氨酸激酶抑制剂或抗体。示例的抗癌剂包括喹唑啉激酶抑制剂、反义或siRNA或其它双链RNA分子、与HER家族受体相互作用的抗体和与放射性核素或细胞毒素偶联的抗体。其它示例的抗癌剂包括吉非替尼、拉帕替尼、埃罗替尼、帕尼单抗、西妥昔单抗、曲妥珠单抗、伊马替尼、铂络合物或核苷类似物。细胞毒性剂或化学治疗剂的实例包括,例如,紫杉烷类(例如紫杉醇和多西紫杉醇)和蒽环类抗生素、多柔比星/阿霉素、胭脂红霉素、柔红霉素、氨基蝶呤、甲氨蝶呤、甲蝶呤、二氯甲氨蝶呤、丝裂霉素C、吡喃霉素、5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、阿糖胞苷、鬼臼毒素或鬼臼毒素衍生物,例如依托泊苷或磷酸依托泊苷、美法仑、长春碱、长春新碱、异长春碱、长春地辛、异长春碱、美登醇、埃博霉素A或B、泰索帝、紫杉醇、雌莫司汀、顺铂、康普瑞汀(combretastatin)和类似物及环磷酸胺。本文别处描述的或本领域已知的任何其它抗癌抗体和化学治疗剂也被考虑用于与本文提供的多特异性生长因子陷阱构建体、核酸分子或药物组合物组合治疗癌症。

[1214] 在另一个实例中,本文提供了一种治疗类风湿性关节炎(RA)的方法,其通过施用本文提供的任何多特异性生长因子陷阱构建体、核酸分子或药物组合物与另一种抗风湿药例如一种抗TNF疗法组合。可与本文提供的多特异性生长因子陷阱构建体、核酸分子或药物组合物组合使用的抗TNF疗法的示例包括常规合成的DMARD,例如甲氨蝶呤(MTX)、羟氯喹(HCQ; Plaquenil®)、柳氮磺胺吡啶(Azulfidine®)和来氟米特(Arava®);生物DMARD,例如阿巴西普(Orencia®)、阿那白滞素(Kineret®)、利妥昔单抗(Rituxan®、Truxima®、MabThera®)、托西珠单抗(托珠单抗、Actemra®、RoActemra®)、皮质类固醇(例如地塞米松、甲基泼尼松龙、泼尼松龙、泼尼松或曲安西龙)、托法替尼(Xeljanz®),和TNF抑制剂/抗TNF剂,例如聚乙二醇赛妥珠单抗(Cimzia®)、英夫利昔单抗(Remicade®)、阿达木单抗(Humira®)、戈利木单抗(Simponi®)和依那西普(Enbrel®)。联合疗法还可以包括免疫治疗药物,例如环孢菌

素、甲氨蝶呤、阿霉素或顺铂,以及免疫毒素。

[1215] 本文还提供了一种治疗如本文别处所述的慢性炎症、自身免疫、神经退行性和/或脱髓鞘疾病的方法,特别是RA,通过施用本文所述的任何多特异性生长因子陷阱构建体和本文提供的任何TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂或双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体。任选地,还可以施用额外的抗TNF疗法,例如甲氨蝶呤,或任何上文或本文其它地方描述的或本领域已知的疗法,可以是任何其它疗法,可用于治疗慢性炎症、自身免疫、神经退行性变和/或脱髓鞘疾病,例如免疫抑制剂、抗血管生成剂、心脏保护剂、抗体、细胞毒剂、抗炎剂、细胞因子、生长抑制剂、化疗剂、生物或非生物改善病情抗风湿药(DMARD)、感染性疾病治疗剂(包括抗体)或本文描述的或本领域已知的其它合适的治疗剂。

[1216] 血管生成在RA关节翳的形成和维持中起着关键作用。本文提供的多特异性生长因子陷阱构建体可以与其它治疗组合使用以调节血管生成。例如,血管生成抑制剂可以与本文提供的多特异性生长因子陷阱构建体组合使用以治疗RA。示例性血管生成抑制剂包括但不限于血管生成抑制素、抗血管生成抗凝血酶III、血管能抑素、软骨衍生的抑制剂、纤连蛋白片段、IL-12、血管抑制素和本领域已知和本文别处描述的其它制剂。

[1217] 在一些实施方案中,本文提供的生长因子陷阱构建体与TNF阻滞剂和/或其它DMARD例如甲氨蝶呤联合使用,并与标准RA疗法进行比较。例如,本文提供的生长因子陷阱构建体可以与依那西普和/或甲氨蝶呤组合,例如次优剂量的依那西普和/或甲氨蝶呤。为评估有效性,所述组合可以是依那西普和/或甲氨蝶呤单独治疗,包括依那西普和/或甲氨蝶呤的最佳和次优剂量。所述生长因子陷阱构建体允许较低剂量的其它治疗,从而减少不利或不希望的副作用。在其它实施方案中,本文提供的生长因子陷阱构建体可以与其它抗TNF疗法组合,例如阿达木单抗或英夫利昔单抗(包括其次优剂量),有或没有甲氨蝶呤(包括次优剂量的甲氨蝶呤),并且将治疗功效是与使用或不使用甲氨蝶呤的单独抗TNF疗法相比。在又一个实施方案中,本文提供的生长因子陷阱构建体可与本文提供的任何TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂或多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体组合,并与标准RA疗法相比较,所述标准RA疗法例如是如有或没有甲氨蝶呤的依那西普、阿达木单抗或英夫利昔单抗治疗。

[1218] H. 评估TNFR1拮抗剂和TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体活性和效力

[1219] 如果或必要时,可以使用本领域技术人员已知的体内和/或体外任何测定评估本文提供的构建体的活性和功效,以评估所述构建体的性质和/或治疗特定疾病、病症或病况的适应性。这些测定法也可用于监测治疗和/或预测治疗反应或选择治疗对象。示例性测定在以下部分中描述。

[1220] 一般而言,本文的拮抗剂构建体是非竞争性的;它们通常是将受体锁定在非活性构象中的构建体,如上所述,这意味着选择高亲和力不如选择拮抗剂活性重要。

[1221] 1. 疾病活性评分(DAS28)

[1222] 28个关节计数的疾病活动评分(DAS28;或28个关节的疾病活动评分)是衡量类风湿性关节炎(RA)疾病活动的测量指标,是对原始DAS评分的简化,后者需要计数44个关节。计数的28个关节包括近端指间关节(10个关节)、掌指关节(10个关节)、腕关节(2个)、肘关节(2个)、肩关节(2个)和膝关节(2个)。DAS28指示RA疾病活动和对治疗的反应,因此用于评估RA治疗剂的临床试验。DAS28基于28个肿胀和压痛关节的计数,评分范围为0-10,数值越

高表明疾病活动度越高。除了计数肿胀和压痛关节(共28个)的数量外,DAS28还包括测量红细胞沉降率(ESR)或C反应蛋白(CRP),它们是炎症的急性期反应物/血液标志物,以及一般健康(GH)评估,代表患者对疾病活动的自我评估,在100mm视觉模拟量表(VAS)上评分,0表示“无活动”,100表示“最高活动可能。”DAS28通常与其它疾病严重程度测量相结合,例如疼痛和握力,并使用健康评估问卷(HAQ)评估身体功能。

[1223] 为了使用ESR或CRP水平计算DAS28值,分别使用以下公式:

[1224] $DAS28(ESR) = 0.56x \sqrt{(TJC28)} + 0.28x \sqrt{(SJC28)} + 0.014x GH + 0.70x \ln(ESR)$;

[1225] $DAS28(CRP) = 0.56x \sqrt{(TJC28)} + 0.28x \sqrt{(SJC28)} + 0.014x GH + 0.36x \ln(CRP+1) + 0.96$;

[1226] 其中TJC=压痛关节计数,SJC=肿胀关节计数。

[1227] 值<2.6表示缓解,≤3.2(>2.6但≤3.2)表示低疾病活动度,>3.2但≤5.1表示中疾病活动度,大于5.1表示高疾病活动度(即,活动性疾病)。>1.2的改善(即DAS28分数/值的降低)表示良好的反应/改善;>0.6至≤1.2的改善表示中等反应;DAS28下降≤0.6表示没有改善(见例如Prevoo et al. (1995) *Arthritis&Rheumatism* 38(1):44-48;Wells et al. (2009) *Ann. Rheum. Dis.* 68:954-960)。

[1228] 本文提供的选择性TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂和/或含有其组合的双特异性构建体的治疗功效可以通过计算治疗前、治疗期间和治疗后的DAS28(ESR)或DAS28(CRP)来评估。

[1229] 2. **SOMAscan®**蛋白质组学分析和其它用于定量分析物的蛋白质组学工具

[1230] **SOMAscan®**蛋白质组学测定(SomaLogic, Inc.; Boulder, CO.)是一种基于适体的多重、灵敏、定量和可重复的蛋白质组学工具,可以同时测量样品中超过5,000种蛋白质分析物的数量,所述样本例如是体积小如150μL的血清、血浆或脑脊液。也可以使用其它生物基质,例如细胞培养上清液、细胞和组织裂解物、滑液以及支气管肺泡和鼻腔灌洗液。由于能够同时量化广泛的蛋白质靶标,因此**SOMAscan®**测定法针对蛋白质生物标志物的发现进行了优化,并已用于鉴定与多种疾病相关的生物标志物特征,所述疾病例如非小细胞肺癌、阿尔茨海默病、心血管疾病和炎症性肠病。通过分析用本文提供的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂和双特异性构建体治疗开始前后采集的样本,**SOMAscan®**测定法可用于确定例如RA患者的蛋白质特征。以这种方式,可以在治疗的早期时间点和整个治疗过程中监测患者的反应。

[1231] **SOMAscan®**测定法采用蛋白质捕获试剂,称为慢解离率修饰适配体(以**SOMAmer®**适体形式销售)试剂,其是短的、基于单链DNA的蛋白质亲和试剂,由模拟氨基酸链的化学修饰的核苷酸构建,具有缓慢的解离速率,并允许与蛋白质靶标特异性、高亲和力结合。该测定法测量天然折叠构象(即三级结构)中的蛋白质,并且不检测未折叠和变性(即非活性)蛋白质。对于**SOMAscan®**测定,**SOMAmer®**-蛋白质结合步骤之后是一系列分配和洗涤步骤,由此通过将每个单独的蛋白质浓度转化为相应的**SOMAmer®**试剂浓度(基于**SOMAmer®** DNA信号),然后通过标准DNA检测技术(例如微阵列或qPCR)对其进行量化。该测定利用了**SOMAmer**试剂的双重性质,即具有确定的三维结构的蛋白质亲和结合试剂,以及含有可被特定DNA杂交探针识别的独特核苷酸序列。

[1232] **SOMAmer®**试剂配备三个标签,并含有一个通过光裂解接头连接于生物素的荧光

团。简而言之,对于测定,将感兴趣的生物样品稀释,然后与预固定在链霉亲和素(SA)包被的珠上的相应SOMAmer®试剂混合物一起温育。SOMAmer®试剂与生物样品中的蛋白质结合,然后洗涤珠以去除未结合的蛋白质。形成的任何非特异性复合物都具有快速解离率。使用NHS-生物素试剂标记仍与其同源SOMAmer®试剂结合的蛋白质,并添加聚阴离子竞争溶液以分解任何非特异性复合物。Protein-SOMAmer®复合物和未结合(游离)的SOMAmer®试剂通过使用紫外线切割光可切割接头从链霉亲和素珠中释放出来。然后将含有所有SOMAmer®试剂(一些与生物素标记的蛋白质结合,一些是游离的)的光裂解洗脱液与结合生物素化蛋白质和生物素化蛋白质-SOMAmer®复合物的第二个链霉亲和素包被的珠温育,并将未结合的物质通过随后的洗涤步骤去除。在最后的洗脱步骤中,蛋白质结合的SOMAmer®试剂在变性条件下从其同源蛋白质中释放出来,SOMAmer®试剂通过标准DNA定量技术进行定量,例如通过与定制DNA微阵列杂交和荧光团标签的测量。在标准化和校准后,数据以相对荧光单位(RFU)报告,并且测量的SOMAmer®试剂信号与生物样品中发现的蛋白质水平相关(见例如Gold et al. (2010) PLoS ONE 5(12):e15004;Candia et al. (2017) Sci.Reports 7:14248;Tanaka et al. (2018) Aging Cell.17:e12799)。

[1233] 3. 转录组分析以预测对治疗的反应性并选择可能从治疗中受益的受试者

[1234] 传统的抗TNF疗法,即TNF阻滞剂,如依那西普、英夫利昔单抗等,在RA患者中会遇到约30%的无反应。然而,有一些临床标志物可以预测这些抗TNF疗法的疗效。已经对使用依那西普进行抗TNF治疗后差异表达的基因进行了分析,使用全局转录组分析来确定外周血单核细胞(PBMC)中的RNA表达特征。可以进行类似的转录组分析以评估本文的TNFR1拮抗剂和TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体的功效,和/或评估患者对它们的反应性。

[1235] 在示例的方案中,在治疗前后从患者获得血液样本,并使用Ficoll密度梯度分离PBMC,之后使用流式细胞术评估CD3⁺、CD14⁺、CD19⁺和CD56⁺细胞群。然后提取总RNA,例如使用Qiagen RNeasy®试剂盒,并使用微阵列分析(例如,使用Affymetric®微阵列技术)来分析PBMC中数万个已知基因的表达谱,以鉴定应答者/无应答者的表达谱。可以在治疗的早期确定基因表达谱,以快速鉴定那些无应答者。例如,通过使用这种方法来鉴定可靠生物标志物以预测依那西普在RA患者中的治疗效果,鉴定了预测准确度>89%的基因对和预测准确度>95%的基因三联体。这些包括例如通过NF-κB通路参与TNF信号传导的基因、参与NF-κB非依赖性信号传导的基因,以及参与调节细胞和氧化应激反应的基因。例如,已鉴定的基因三联体包括TNFAIP3,其编码TNFα诱导的蛋白3,这是一种锌指蛋白,示出抑制NF-κB激活;PDE4B,其编码参与NF-κB非依赖性信号传导的(cAMP)特异性环核苷酸磷酸二酯酶;和RAPGEF1,其编码Rap鸟嘌呤核苷酸交换因子1,这是一种RAS信号传导的激活剂。与无应答者相比,在给予依那西普3天后,所有这三种基因的表达在应答者中均下调。评估的其它基因包括CCL4、CXCR4、CCL3、PIGO、FSD1、RUNX1、LGALS13、PTPRD、IL1B、ADAM12和HCG4P6(见例如Koczan et al. (2008) Arthritis Research&Therapy 10:R50)。

[1236] 可以使用预先设计的引物和探针通过定量实时PCR(RT-PCR)测量感兴趣基因子集的表达水平,以验证通过微阵列分析获得的结果。为了计算选定基因的基因表达变化,可以使用ΔΔCT方法,由此将样品中特异性mRNA表达的阈值循环(CT)值标准化为样品中GAPDH mRNA的CT值,并且基因表达变化(ΔΔCT)由治疗前后CT值的差异定义(见例如Koczan et al. (2008) Arthritis Research&Therapy 10:R50)。

[1237] 4.L929细胞毒性测定

[1238] 可以确定TNFR1介导的过程和细胞反应,例如通过使用L929细胞毒性测定评估TNF诱导的细胞死亡,由此TNFR1拮抗剂抑制TNF诱导的细胞毒性。简而言之,将L929小鼠成纤维细胞铺板在微量滴定板上,并与TNFR1拮抗剂、100pg/ml TNF和1mg/ml放线菌素D一起温育过夜。在与3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑鎓(MTS)温育后通过读取在490nm的吸光度来测量细胞存活力。与仅使用TNF的对照相比,TNFR1拮抗剂降低了TNF介导的细胞毒性,导致吸光度增加。

[1239] 5.HeLa IL-8测定

[1240] TNFR1拮抗剂的活性可以使用HeLa IL-8测定来确定,其中评估了拮抗剂中和HeLa细胞中TNF诱导的IL-8分泌的能力。简而言之,在不同浓度的TNFR1拮抗剂和300pg/ml TNF存在下,将HeLa细胞铺板在微量滴定板上过夜。然后吸出上清液,并使用夹心ELISA测量IL-8的浓度。与仅施用TNF的对照相比,TNFR1拮抗剂活性减少了IL-8分泌到上清液中。

[1241] 6.HUVEC测定

[1242] 人脐带静脉内皮细胞(HUVEC)测定法可用于确定本文的TNFR1拮抗剂的活性。用TNF处理HUVEC导致细胞上VCAM-1表达的上调,这可以通过例如ELISA来确定。由于TNFR1拮抗剂抑制TNF的作用,因此在拮抗剂存在的情况下,HUVEC中的VCAM-1表达减少。然后通过绘制所述拮抗剂的浓度相对于VCAM-1表达的抑制百分比的图来确定TNFR1拮抗剂对TNF诱导的VCAM-1表达的抑制水平。

[1243] 根据这个测定的方案,将HUVEC培养过夜,然后与TNFR1拮抗剂一起温育1小时,然后用TNF(1ng/mL)刺激23小时。仅用培养基温育的细胞用作阴性对照,仅用TNF温育的细胞用作阳性对照。然后吸出细胞培养上清液,将细胞用冰冷的PBS洗涤3次,并通过加入冰冷的Tris-甘油裂解缓冲液(40mM Tris,274mM NaCl,2% Triton-X-100,20%甘油,50mM NaF,1mM Na₃VO₄,每10mL 1x蛋白酶抑制剂片),然后在冰上温育15分钟。然后将细胞裂解物用于VCAM-1夹心ELISA。为了计算TNF诱导的VCAM-1表达的抑制,最大VCAM-1表达的抑制百分比(即在阳性对照中测量的) =

[1244] $\{100 - [(拮抗剂浓度的OD值) / (阳性对照的OD值)]\} \times 100$ 。

[1245] 然后通过绘制拮抗剂浓度相对于抑制百分比的图来确定EC₅₀值,例如使用可用的软件如GraphPad Prism软件。

[1246] 7.Treg细胞活性的量化和评估

[1247] 为了确定TNFR1拮抗剂和TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体对Treg的影响,可以在治疗前后以及治疗期间通过从血液样本中分离外周血单核细胞(PBMC)对Treg的数量进行量化,例如通过使用Ficoll-Paque方法,然后使用单克隆抗体(mAb)和顺磁珠,或本领域已知的其它类似方法,来分离CD4⁺CD25⁺Treg以及CD4⁺CD25⁻非调节性T细胞。使用流式细胞术和针对CD4和CD25(对于Treg)或CD4和CTLA-4(对于非调节性T细胞)的mAb免疫染色,可以量化每种细胞类型的数量(见例如Vigna-Pérez et al. (2005) Clin.Exp.Immunol.141(2): 372-380)。

[1248] CD4⁺CD25⁺Treg抑制CD4⁺CD25⁻T细胞的增殖。为了测试接受治疗的患者的Treg活性,可以使用细胞增殖测定,其中将Treg和T细胞与植物凝集素(PHA,以刺激T细胞)一起培养48小时。在培养的最后12小时添加3H-TdR(氘化胸苷),然后收获细胞,并使用液体闪烁计

数器测定增殖情况。单独培养的CD4⁺CD25⁻T细胞作为对照,结果以细胞增殖刺激指数(SI)表示,计算公式为:

[1249] $SI = (\text{含PHA的细胞的cpm}) \div (\text{仅用培养基培养的细胞的cpm})$,其中cpm是每分钟计数,由计数的放射性决定(见例如Vigna-Pérez et al. (2005) Clin. Exp. Immunol. 141 (2): 372-380)。

[1250] 为了测试针对结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)的免疫应答性,将PBMC在存在细菌的全蛋白提取物下在完全培养基中培养72小时。在培养的最后12小时添加3H-TdR(氚化胸苷),然后收获细胞,并使用液体闪烁计数器测定增殖情况。如上所述,结果以刺激指数表示。对于针对结核分枝杆菌的体内反应性,可以使用标准PPD(纯化蛋白衍生物)皮肤试验(见例如Vigna-Pérez et al. (2005) Clin. Exp. Immunol. 141 (2): 372-380)。

[1251] 8. TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体的结合性质评估

[1252] 抗体或抗体片段或多特异性构建体如本文提供的构建体与TNFR1和/或TNFR2例如人TNFR1和/或TNFR2的特异性结合可以通过多种已知方法中的任一种来评估。亲和力可以通过各种指标定量表示,包括在体外实现TNFR1和/或TNFR2信号传导的半数最大增强(EC₅₀)需要的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂或多特异性构建体的浓度,以及拮抗剂-TNFR1和/或激动剂-TNFR2复合物解离的平衡常数(KD)。平衡常数KD描述了TNFR1或TNFR2与结合剂如本文提供的构建体(结合剂)的相互作用,其是TNFR1-结合剂构建体复合物或TNFR2-结合剂复合物解离反应为溶剂分离的TNFR1或TNFR2和彼此不相互作用的结合剂分子的化学平衡常数。

[1253] TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂和多特异性构建体也可以通过各种体外结合测定进行鉴定。可用于确定KD或EC₅₀的试验示例包括例如表面等离子共振(SPR,例如BIAcore™分析)、等温滴定量热法、荧光各向异性和基于ELISA的测定等。ELISA是分析抗体活性的一种特别有用的方法,因为这种测定通常需要最低浓度的抗体。在典型的ELISA测定中分析的一个常见信号是发光,这通常是过氧化物酶与特异性结合一抗(例如本文提供的TNFR1拮抗剂或TNFR1激动剂/TNFR2激动剂双特异性构建体)偶联的二抗活性的结果。

[1254] TNFR1拮抗剂与TNFR1或TNFR2激动剂与TNFR2的缔合和解离动力学可以定量鉴定,例如根据既定程序通过监测抗体-抗原复合物形成的速率。例如,可以使用表面等离子共振(SPR)来确定拮抗剂-TNFR1或激动剂-TNFR2复合物的形成(k_{on})和解离(k_{off})的速率常数。可以根据这些数据确定平衡常数(KD),因为这种单分子解离的平衡常数可以表示为k_{off}与k_{on}值的比率。SPR是一种有利于确定受体-抗体(或其它结合剂)相互作用的动力学和热力学参数的技术,因为所述试验不需要通过附加化学标签来修饰一个组件。相反,受体通常被固定在固体金属表面上,该表面用增加浓度的抗体或结合剂(即,TNFR1拮抗剂或TNFR2激动剂,或其双特异性构建体)的溶液进行脉冲处理。抗体-受体结合导致入射光在金属表面的反射角变形,并且当抗体被引入系统时折射率随时间的变化可以与本领域已知的已建立的回归模型相匹配,以便计算抗体-受体相互作用的结合和解离速率常数。

[1255] 9. 抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)测定

[1256] 抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)测定可用于评估本文提供的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂和含有Fc单体或二聚体的多特异性构建体的免疫效应子功能/细胞毒性。一般而言,修饰Fc部分以消除或显著降低(以消除不良副作用或将不良副作用降低至可耐受水平)ADCC或ADCC和CDC效应子功能。这种测定是本领域熟知的(见例如

Ying et al. (2014) *mAbs* 6(5):1201-1210)。例如,对于示例的ADCC测定,将间皮素阴性A431或间皮素阳性H9细胞与TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂或本文提供的多特异性构建体一起温育30分钟,然后将靶细胞添加到含有效应细胞(例如PBMC)的孔中,效应细胞与靶细胞的比例为50:1。温育24小时后,根据制造商的方案,使用CytoTox-ONE均质膜完整性测定(Promega)测量靶细胞的裂解。

[1257] 对于示例的CDC测定,将A431和H9细胞在无血清RPMI中洗涤,并在无血清RPMI中将密度调整为1百万/mL。然后将50 μ L的细胞悬浮液与50 μ L在RPMI中TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂或多特异性构建体稀释液一起温育。阴性对照含有50 μ L的细胞悬浮液和50 μ L的RPMI,阳性对照含有用1% Triton X-100裂解的靶细胞,最终体积为150 μ L。将新鲜人血浆在PBS(1:4)中稀释并离心澄清,然后将50 μ L稀释的血浆添加到每个细胞/构建体混合物中,并在96孔板中于37 $^{\circ}$ C下温育,以允许补体介导细胞裂解。温育3小时后,将100 μ L上清液转移到白板上,并添加100 μ L来自CytoTox-ONE均质膜完整性检测试剂盒(Promega)的底物。然后将板在室温下温育10分钟,并使用荧光计读取荧光信号,激发波长为530nm,发射波长为590nm。靶细胞的CDC以试验样本与阳性对照的百分比表示。

[1258] 10. 疾病模型

[1259] 可以在本领域技术人员已知的任何临床相关疾病模型中评估本文提供的选择性TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂和多特异性构建体,以确定它们对自身免疫和炎症以及TNF介导或参与其病因学的其它疾病或病症的影响。示例的疾病模型包括但不限于胶原诱导性关节炎(CIA)、类风湿性关节炎滑膜单核细胞培养物、Tg197关节炎小鼠模型、 Δ ARE关节炎/IBD小鼠模型、小鼠葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的IBD模型,以及针对多发性硬化症的实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型。其它模型是本领域技术人员已知的。见例如Malaviya et al. (2017) *Pharmacol Ther.* 180:90-98,它提供了许多模型来测试治疗炎症性肺病的构建体;Feldmann et al. (2020) *Lancet* 395:1407-1409,针对COVID-19的抗TNF疗法、模型和疗法的使用;Shi et al. (2013) *Crit. Care* 17(6):R301,使用抗TNF疗法治疗H1N1,以及病毒感染模型;以及Orti-Casan et al. (2019) *Front. Neurosci.* 13:49,其描述了激活TNFR2用于治疗阿尔茨海默病是有利的,证明了本文的方法抑制TNFR1和TNFR2的TNF阻滞剂是有问题的。以下是对可用本文提供的构建体治疗的疾病、病症和病况的非详尽讨论,以及每种疾病的示例模型。这些均是示例性的;技术人员可以为特定构建体和靶向疾病、病症或病况选择合适的模型。由于本文提供的抗TNFR1和TNFR2拮抗剂/激动剂构建体旨在用于靶向人TNFR1/TNFR2,因此预计它们在与来自非人类、特别是非灵长类动物的TNFR1/TNFR2反应/相互作用方面效果不佳。为了测试,在非人模型中,例如啮齿动物模型,该模型例如小鼠模型是人TNFR1和人TNFR2的转基因模型。它们可以在小鼠TNFR1/2敲除小鼠的背景下用作炎症和自身免疫性疾病的体内模型。或者,移植了人CD34⁺干细胞的严重免疫功能低下小鼠(例如NOD/NSG小鼠)可用于此目的。或者,可以将人类类风湿性关节炎滑膜细胞移植到免疫缺陷小鼠体内,导致RA样炎症(见例如Schinnerling et al. (2019) *Front Immunol.* 10:203关于这种模型描述)。

[1260] a. 胶原蛋白诱导的关节炎(CIA)

[1261] 可在小鼠中诱导II型胶原诱导的关节炎(CIA),作为组织学上与RA相似的自身免疫性炎症性关节病模型,其特征在于炎症性滑膜炎、关节翳形成以及软骨和骨的侵蚀。为了

诱导CIA,在存在完全弗氏佐剂的情况下,将牛II型胶原蛋白(B-CII)皮内注射到尾根部。21天后,可以使用相同的方案对小鼠进行再免疫。为了检验本文提供的选择性TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂和多特异性构建体的作用,在用B-CII初始攻击后3周,或在出现关节炎迹象时,可以每周两次腹膜内施用选择性TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂或多特异性构建体或对照物,持续3周。初次免疫后7周处死小鼠用于组织学分析。

[1262] 为评估所述构建体对确立疾病的治疗效果,可在一条或多条肢体出现临床关节炎后每天施用,共计10天。最初受影响的关节的肿胀程度可以通过使用卡尺测量爪子厚度来监测。从小鼠中抽取血清用于测量促炎细胞因子和趋化因子,例如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素-10(IL-10)、IL-1 β 、IL-6、IL-8、RANTES(CCL5)和单核细胞趋化蛋白1(MCP-1;也称为CCL2)。

[1263] 在另一个实例中,灵长类动物模型可用于RA治疗。可以在用重组治疗性TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂或双特异性构建体治疗的受试者和对照中监测压痛和肿胀关节的反应(例如,通过临床关节炎评分测量),以评估疗效和治疗。

[1264] b. 类风湿性关节炎滑膜单核细胞培养

[1265] 表达TNFR1和TNFR2的人类类风湿性关节炎(RA)滑膜单核细胞(MNC)也可用于测试本文提供的构建体的治疗功效。RA滑膜MNC可以从接受关节置换手术的RA患者中获得,并在体外培养以评估RA滑膜细胞细胞因子的产生和调节。在没有外源性刺激的情况下,RA滑膜MNC培养物自发产生炎症细胞因子和趋化因子;在这些培养物中抗体介导的TNF中和和TNFR1的选择性阻断(例如通过本文提供的构建体)抑制促炎细胞因子和趋化因子,例如GM-CSF、IL-10、IL-1 β 、IL-6、IL-8、RANTES(CCL5)和MCP-1(CCL2)。

[1266] 在示例的测定中,为了制备RA滑膜MNC,将RA滑膜组织切成小块,在37 $^{\circ}$ C下与在RPMI 1640中的5mg/ml胶原酶A和0.15mg/ml DNase温育1小时,之后将消化的组织通过170 μ m过滤器并用含有100单位/ml链霉素、100 μ g青霉素和10% FCS的RPMI 1640洗涤3次。然后使用未过滤通过的异质RA滑膜MNC。对于离体细胞培养,将RA滑膜MNC的单细胞悬浮液在96孔平底板(2 \times 10⁵个细胞/孔)中的RPMI 1640培养基中与5% FCS在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂下培养2-5天,存在或不存在所述TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂或双特异性构建体或对照。然后收集上清液并立即使用,或储存在-20 $^{\circ}$ C,用于细胞因子和趋化因子ELISA分析(见例如Schmidt et al. (2013) *Arthritis&Rheumatism* 65(9):2262-2273)。或者,培养上清液中的细胞因子可以通过细胞因子珠阵列分析进行量化。

[1267] c. Tg197小鼠关节炎模型

[1268] Tg197转基因小鼠品系是一种侵蚀性关节炎小鼠模型,是一种成熟的RA动物模型。Tg197小鼠是人TNF转基因C57BL/6小鼠,其过表达人TNF并发展出对称性多关节炎,伴有关节翳形成、骨破坏和软骨损伤,这是人RA的特征。除了显示慢性破坏性关节疾病的特征外,这个模型还表现出其它炎症性疾病(如脊柱关节炎)的特征,例如附着点炎或双侧骶髂关节炎(Blüml et al. (2010) *Arthritis&Rheumatism* 62(6):1608-1619)。Tg197小鼠发展为具有100%外显率的关节炎,并提供了一种快速体内模型,用于评估靶向RA的人用治疗剂。例如,Tg197小鼠模型被用于评估英夫利昔单抗(最初以Remicade®销售)的疗效,这是第一个成功应用于临床的抗TNF治疗药物,并被FDA推荐用于筛选潜在的抗RA治疗药物。

[1269] Tg197小鼠携带人TNF基因构建体的五个拷贝,其中含有3' -非翻译序列和3' -侧翼

序列的3'-区域与人 β -珠蛋白基因的3'-区域交换。这个基因构建体被显微注射到小鼠受精卵中,创建了失调的TNF基因表达的体内模型,因为在TNF mRNA的3'-非翻译区的一组高度保守的富含UA的序列对于mRNA稳定性和翻译的调节至关重要(见例如Keffer et al. (1991)EMBO J.10(13):4025-4031)。

[1270] d. Δ ARE小鼠关节炎/IBD模型

[1271] 在TNF mRNA的3'富含AU元件(ARE)缺失的小鼠(Tnf Δ ARE)在4-8周龄时过度产生TNF并发展出在组织病理学类似于克罗恩病的炎症性肠病。这些小鼠也出现了RA的临床症状。本文提供的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂和双特异性构建体的功效可以通过评估腹膜内注射后对Tnf Δ ARE小鼠中克罗恩病样病理学和关节炎的抑制作用来评估(参见例如美国专利号9,028,822)。

[1272] e. 人源化TNF/TNFR2小鼠

[1273] 开发靶向TNF/TNFR2信号传导途径的治疗剂的一个局限性是缺乏临床前动物模型,因为许多人抗TNF治疗剂不与鼠TNF或TNFR2相互作用,而人TNF可以结合并占用鼠TNFR1,但不是TNFR2。携带功能性人TNF-TNFR2(hTNF-hTNFR2)信号化模块的人源化TNF/TNFR2小鼠可用于在各种自身免疫模型中评估治疗剂,例如人TNF或人TNFR2的激动性和拮抗性抗体构建体。这种TNF/TNFR2双人源化小鼠可用于例如评估本文提供的TNFR2激动剂构建体。

[1274] 人源化TNF/TNFR2小鼠可以如Atretkhany et al. (2018) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.115(51):13051-13056所述产生。简而言之,使用标准基因工程技术产生人TNFR2敲入(hTNFR2KI)和人TNF敲入(hTNFKI)小鼠。然后将其中人TNF基因取代小鼠TNF基因的hTNFKI小鼠与含有人源化TNFR2配体结合部分的hTNFR2KI小鼠杂交,然后互交以产生双人源化双纯合子hTNFKI x hTNFR2KI小鼠。为了评估TNFR2信号传导在特定细胞例如Treg中的作用,在hTNFR2基因座内插入两个LoxP位点,以允许条件性Cre介导的TNFR2胞外部分消除。对于TNFR2的Treg特异性缺失,将这些小鼠与FoxP3-Cre转基因小鼠杂交(见例如Atretkhany et al. (2018) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.115(51):13051-13056)。

[1275] I. 产生编码TNFR1拮抗剂构建体和TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体的核酸的方法

[1276] 本文提供的TNFR1拮抗剂多肽、TNFR2激动剂多肽和TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂多肽构建体是多肽,其可以通过本领域熟知的蛋白质纯化和重组蛋白质表达以及重组抗体制备的方法获得。本文提供的构建体包括其部分例如接头不是多肽,可以通过适当的化学缀合方法来制备。所述多肽部分可以通过标准重组技术产生,例如通过在合适的宿主中表达(如果不需要糖基化,则在细菌中表达;如果需要糖基化形式,则在真核细胞中表达,例如HEK293和CHO细胞)。活性抗体和抗体片段已在大肠杆菌中产生,但由于折叠不当,这些抗体和抗体片段通常会出现聚集和溶解性问题,这可以通过进一步诱变编码序列来解决(见例如Kunz et al. (2018) Sci Rep.8(1):7934)。

[1277] 多肽也可以化学合成。融合多肽可以通过重组产生的标准方法合成。上面讨论的各种构建体的组分可以单独合成,并使用标准方法组合以产生构建体。

[1278] 可以从核酸制备编码多肽构建体或其多肽部分、包括修饰的或变体、包括截短形

式的核酸。可以使用标准重组DNA方法从编码野生型多肽的核酸工程改造修饰的或变体多肽。例如,选择性结合TNFR1或TNFR2和/或选择性拮抗TNFR1或选择性激动TNFR2的修饰的TNF多肽,例如TNF突变蛋白,可以从野生型TNF进行工程改造,例如通过定点诱变编码DNA进行。可以使用本领域技术人员已知的任何方法。以下实施例中的讨论和描述是示例性的。

[1279] 1. 编码TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂多肽的核酸的分离或制备

[1280] 可以使用本领域已知的用于克隆和分离核酸分子的任何可用方法来克隆或分离编码TNFR1拮抗剂多肽、TNFR2激动剂多肽和TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂多肽构建体的核酸。此类方法包括核酸的聚合酶链反应(PCR)扩增和文库筛选,包括核酸杂交筛选、基于抗体的筛选和基于活性的筛选。例如,当通过重组方式产生多肽时,可以使用本领域技术人员已知的用于鉴定编码所需多肽的核酸的任何方法。

[1281] 编码本文多肽的核酸分子可以合成产生,或者可以根据需要容易地分离和测序,使用常规程序进行(例如,通过使用能够特异性结合编码抗体片段的重链和/或轻链的基因的寡核苷酸探针,所述抗体片段是例如单域抗体(dAb)、scFv片段和Fab抗体片段)。例如,任何已知产生或表达TNFR1拮抗剂或TNFR2激动剂抗体或其片段的细胞来源都可以用作此类DNA的来源。在另一个实例中,一旦确定了编码TNFR1拮抗剂或TNFR2激动剂抗体或其片段的DNA序列,就可以使用基因合成技术构建核酸序列。

[1282] 核酸扩增方法可用于分离编码所需多肽的核酸分子,包括例如聚合酶链式反应(PCR)方法。此类方法的示例包括使用Perkin-Elmer Cetus热循环仪和Taq聚合酶(Gene Amp)。含核酸材料可用作起始材料,可从中分离所需的多肽编码核酸分子。例如,DNA和mRNA制品、细胞提取物、组织提取物、液体样品(例如,血液、血清和唾液)以及来自健康和/或患病受试者的样品可用于扩增方法。所述来源通常来自人类来源,如果合适的话,可以来自任何真核物种,包括但不限于脊椎动物、哺乳动物、人、猪、牛、猫科动物、鸟类、马科动物、犬科动物和其它灵长类动物来源。核酸文库也可用作起始材料的来源。可以设计引物以扩增所需的多肽。例如,可以基于产生所需多肽的表达序列设计引物。可以基于多肽氨基酸序列的回译来设计引物。如果需要,可使用简并引物进行扩增。与所需序列的3'和5'末端序列杂交的寡核苷酸引物可用作通过PCR从核酸样品中扩增序列的引物。引物可用于扩增整个全长多肽或其截短序列,例如编码本文提供的任何TNFR1拮抗剂和TNFR1激动剂多肽以及TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂多肽构建体的核酸。可以对通过扩增产生的核酸分子进行测序并确认其编码所需的多肽或构建体。

[1283] 诱变技术可用于产生进一步修饰形式的TNFR1拮抗剂或TNFR2激动剂抗体或其片段,并产生修饰形式的活性调节剂,例如Fc和铰链区,以及接头部分。DNA也可以被修饰。例如,基因合成和常规分子生物学技术可用于实现核苷酸的插入、缺失、添加或置换/取代。额外的核苷酸序列可以与多肽编码核酸分子连接,包括含有限制性核酸内切酶位点的接头序列,目的是将合成基因克隆到载体例如蛋白质表达载体中或设计用于扩增核心多肽编码DNA序列的载体。指定功能性DNA元件例如启动子、增强子和IRES序列的额外核苷酸序列,可以可操作地连接于多肽编码核酸分子。此类序列的实例包括但不限于设计用于促进细胞内蛋白质表达的启动子序列和设计用于促进蛋白质分泌的分泌序列,例如异源信号序列。这种序列是本领域技术人员已知的。额外的核苷酸序列,例如指定蛋白质结合区的序列,也可以连接多肽编码核酸分子。这种区域包括但不限于促进多肽摄取到特定靶细胞中的序列,

或者以其它方式改变或增强合成基因产物的药代动力学的序列。

[1284] 可以添加标签和/或其它部分,例如以有助于多肽的检测或亲和纯化。例如,额外的核苷酸序列,例如指定表位标签或其它可检测标记的碱基序列,也可以与多肽编码核酸分子连接。此类序列的示例包括编码SUMO标签或His标签或Flag标签的核酸序列。

[1285] 应当理解,本文提供的任何氨基酸序列都可以使用本领域技术人员常用的标准方法进行反向翻译(也称为回译),以生成相应的编码核酸序列,可以将其克隆到载体中并表达以产生本文提供的构建体,包括多肽、抗体和抗体片段。例如,有几种在线工具可用于将蛋白质序列转换为编码DNA序列,例如**bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html**; **biophp.org/minitools/protein_to_dna/demo.php**; **vivo.colostate.edu/molkit/rtranslate/**; **ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/**; **molbiol.ru/eng/scripts/01_19.html**; 和 **geneinfinity.org/sms/sms_backtranslation.html**。可以将这种反向翻译的序列插入本文提供的任何表达载体中以表达和产生所提供的抗体或片段。抗-TFR1和抗-TNFR2抗体,例如TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂构建体,可以表达为全长蛋白质或短于全长的蛋白质。例如,可以表达抗体片段,例如但不限于单域抗体(dAb)、scFv片段和Fab片段。

[1286] 然后将鉴定和分离的核酸插入合适的克隆载体中。可以使用本领域已知的大量载体-宿主系统。可能的载体包括但不限于质粒或修饰的病毒,但载体系统必须与所用的宿主细胞相容。此类载体包括但不限于噬菌体如 λ 衍生物,或质粒如pCMV4、pBR322或pUC质粒衍生物或pBluescript载体(Stratagene, La Jolla, CA)。插入到克隆载体中可以例如通过将DNA片段连接于具有互补粘端的克隆载体中来实现。可以使用TOPO克隆载体(Invitrogen, Carlsbad, CA)实现插入。

[1287] 如果用于片段化DNA的互补限制性位点不存在于克隆载体中,则DNA分子的末端可以被酶促修饰。或者,可以通过将核苷酸序列(接头)连接于DNA末端来产生任何所需位点;这些连接的接头可以含有编码限制性核酸内切酶识别序列的特定化学合成寡核苷酸。在另一种方法中,切割的载体和多肽基因可以通过同聚加尾进行修饰。

[1288] 重组分子可以通过例如转化、转染、感染、电穿孔和超声穿孔引入宿主细胞,从而产生基因序列的许多拷贝。在特定的实施方案中,用掺入分离的多肽基因、cDNA或合成的DNA序列的重组DNA分子转化宿主细胞能够产生基因的多个拷贝。因此,可以通过培养转化体、从转化体中分离重组DNA分子以及必要时从分离的重组DNA中挽回插入的基因来大量获得所述基因。

[1289] 对于抗体及其片段的表达,通常将编码抗体重链的核酸分子克隆到载体中,及将编码抗体轻链的核酸分子克隆到载体中。产生抗体及其部分的方法是熟知的(见例如美国专利号4,816,567、6,331,415和7,923,221,以及许多其它开创性专利)。可以将基因克隆到单一载体中用于其双重表达,或克隆到单独的载体中。如果需要,所述载体还可以含有编码额外恒定区或铰链区的进一步序列以产生其它抗体形式。载体可以在宿主细胞中转染和表达。表达可以在本领域技术人员已知的任何细胞表达系统中进行。例如,宿主细胞包括不另外产生免疫球蛋白的细胞,以在重组宿主细胞中获得抗体的合成。例如,宿主细胞包括但不限于猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,例如CHO-DG44(DHFR-)和FreeStyle™CHO-S细胞(Invitrogen)、293FS细胞、HEK293细胞、NS0细胞或其它骨髓瘤细胞。本文描述了其它表达载体和宿主细胞。

[1290] 本文提供的构建体,包括TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂和TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体,可以作为全长或短于全长的构建体产生或表达,包括但不限于抗原结合片段,例如单域抗体(dAb)、Fab、Fab'、Fab铰链、F(ab')₂、单链Fv(scFv)、scFv串联、Fv、dsFv、scFv铰链、scFv铰链(Δ E)、双抗体、Fd和Fd'片段。有多种技术可用于产生抗体片段。例如,片段可以通过完整抗体的蛋白水解消化得到(见例如Morimoto and In ouye(1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117;Brennan et al.(1985) Science 229:81-83)。片段也可以直接由重组宿主细胞产生。例如,dAb、Fab、Fv和scFv抗体片段都可以在宿主细胞(如大肠杆菌、CHO细胞或HEK293细胞)中表达和分泌,从而促进大量产生这些片段。F(ab')₂片段可以通过化学偶联Fab'-SH片段来产生(见例如Carter et al.(1992) Bio/Technology, 10:163-167),或者它们可以直接分离自重组宿主细胞培养物。在一些实例中,TNFR1拮抗剂构建体包括单域抗体(dAb;描述于例如国际申请公开号WO 2004/058820、WO 2004/081026、WO 2005/035572、WO 2006/038027、WO 2007/049017、WO 2008/149144、WO 2008/149148、WO 2010/094720、WO 2011/006914、WO 2011/051217、WO 2012/172070、WO 2012/104322、和WO 2015/104322;Enever et al.,(2015) Protein Engineering, Design&Selection 28(3):59-66);美国申请公开号2006/0083747、2010/0034831和2012/0107330;及美国专利号9,028,817和9,028,822),单链Fv片段(scFv)(见例如国际申请公开号WO 2017/174586和WO 2008/113515;也见Richter,F.Thesis,entitled "Evolution of the Antagonistic Tumor Necrosis Factor Receptor One-Specific Antibody ATROSAB," Universität Stuttgart,2015;可得自pdfs.semanticscholar.org/d8e7/8b87d76dce36225c1d497939ef37445cfa8a.pdf),或Fab片段(见例如国际申请公开号WO 2017/174586和WO 2008/113515;也见Richter,F.Thesis,entitled "Evolution of the Antagonistic Tumor Necrosis Factor Receptor One-Specific Antibody ATROSAB," Universität Stuttgart,2015;可得自pdfs.semanticscholar.org/d8e7/8b87d76dce36225c1d497939ef37445cfa8a.pdf)。dAb、Fv和scFv片段具有完整的结合位点,但缺乏恒定区;因此,它们适用于在体内使用期间减少非特异性结合。可以构建dAb和scFv融合蛋白以在dAb或scFv的氨基或羧基末端连接效应蛋白(例如IgG Fc)。抗体片段也可以是线性抗体(见例如美国专利号5,641,870)。此类线性抗体片段可以是单特异性或双特异性的。用于产生抗体片段的其它技术是本领域技术人员已知的。

[1291] 表达后,抗体重链和轻链或其片段通过链间二硫键配对形成全长抗体或其片段。例如,对于全长Ig的表达,可以将编码VH-CH1-铰链-CH2-CH3的序列克隆到第一表达载体中,并且可以将编码VL-CL结构域的序列克隆到第二表达载体中。共表达后,全长重链和轻链通过二硫键相互连接,生成全长抗体。在另一个实例中,为了产生Fab,可以将编码包含VH和CH1区的片段的序列克隆到第一表达载体中,及可以将编码VL-CL结构域的序列克隆到第二表达载体中。共表达后,重链与轻链配对生成Fab单体。各种IgG亚型的CH1、铰链、CH2和/或CH3区的序列是本领域技术人员已知的(参见例如美国公开号2008/0248028;也见SEQ ID NO:9、11、13和15所示)。同样,CL、lambda或kappa的序列也是已知的(见例如美国公开号2008/0248028;也见SEQ ID NO:17-22所示)。

[1292] 除重组生产外,本文提供的TNFR1拮抗剂多肽、TNFR2激动剂多肽和TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂多肽构建体可以使用熟知的固相技术通过直接肽合成技术产生。可以使用人

工技术或通过自动化进行体外蛋白质合成。可以根据制造商提供的说明,例如使用Applied Biosystems 431A肽合成仪(Perkin Elmer;Foster City,CA)实现自动化合成。可以使用化学方法分别化学合成和组合多肽的各种片段。

[1293] 2. 突变或修饰核酸和编码多肽的产生

[1294] 本文提供的修饰可以通过标准的重组DNA技术进行,例如本领域技术人员的常规技术。可以采用本领域已知的任何方法来实现靶蛋白或多肽中任一个或多个氨基酸的突变。方法包括编码核酸分子的标准定点诱变(使用例如试剂盒,例如可从Stratagene获得的QuikChange试剂盒),或固相多肽合成方法。

[1295] 3. 载体和细胞

[1296] 为了重组表达一种或多种所需的多肽,例如本文所述的任何TNFR1拮抗剂或TNFR2激动剂多肽、或TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂多肽构建体,可以将含有包含编码该多肽的全部或部分核苷酸序列的核酸分子插入合适的表达载体,即含有转录和翻译插入的多肽编码序列所必需的元件的载体。还提供了含有编码所述多肽的核酸分子的载体。插入核酸分子后,所述载体通常用于转化宿主细胞,例如以扩增核酸用于其复制和/或表达。在这种实例中,使用适合于高水平表达的载体。在其它情况下,选择与表达的多肽在细胞表面上的展示相容的载体。载体的选择可取决于所需的应用。许多表达载体是可用的并且为本领域技术人员所知,用于表达抗-TNFR1和抗-TNFR2抗体或其部分,例如抗原结合片段。这种选择完全在本领域技术人员的技能水平之内。通常,表达载体可以包括转录启动子和任选的增强子、翻译信号以及转录和翻译终止信号。用于稳定转化的表达载体通常具有选择标记,其允许选择和维持转化的细胞。在某些情况下,高拷贝数的复制起点可用于扩增细胞中载体的拷贝数。载体通常还可以含有可操作地连接于连接的核酸分子的额外核苷酸序列(例如,His标签、Flag标签)。对于抗体的应用,载体通常包括编码恒定区的序列。因此,抗体或其部分也可以表达为蛋白质融合物。例如,可以产生融合蛋白以向多肽添加额外的功能。融合蛋白的实例包括但不限于融合信号序列、表位标签例如用于定位,例如His6标签或myc标签,或用于纯化的标签,例如GST标签,和/或指导蛋白质分泌和/或膜结合的序列。本文的融合蛋白还包括TNFR1拮抗剂和/或TNFR2激动剂与修饰的Fc区、IgG的铰链区和/或肽接头如GS接头的融合。

[1297] 多种宿主-载体系统可用于表达蛋白质编码序列。这些包括但不限于感染病毒(例如牛痘病毒、腺病毒和其它病毒)的哺乳动物细胞系统;感染病毒(例如杆状病毒)的昆虫细胞系统;含有酵母载体的微生物,例如酵母;以及用噬菌体、DNA、质粒DNA或粘粒DNA转化的细菌。真核表达系统和细菌系统之间的选择取决于所需的翻译后修饰,例如糖基化。载体的表达元件的强度和特异性各不相同。根据所使用的宿主载体系统,可以使用多种合适的转录和翻译元件中的任何一种。

[1298] 本领域技术人员已知的用于将DNA片段插入载体的任何方法都可用于构建含有编码多肽的核酸分子以及适当的转录/翻译控制信号的表达载体,所述多肽例如是本文提供的抗体片段或TNFR1拮抗剂或TNFR2激动剂。这些方法可以包括体外重组DNA和合成技术,以及体内重组技术(基因重组)。插入到克隆载体中可以例如通过将DNA片段连接于具有互补粘端的克隆载体中来实现。如果用于片段化DNA的互补限制位点不存在于克隆载体中,则DNA分子的末端可以被酶促修饰。或者,可以通过将核苷酸序列(接头)连接于DNA末端来产

生任何所需位点;这些连接的接头可以含有编码限制性核酸内切酶识别序列的特定化学合成核酸。

[1299] 例如,本文的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂和TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体的多肽构建体的表达可由本领域已知的任何启动子/增强子控制。合适的细菌启动子是本领域熟知的并且在下文中描述。其它适用于哺乳动物细胞、酵母细胞和昆虫细胞的启动子是本领域熟知的,一些在下面举例说明。用于指导异源核酸表达的启动子的选择取决于具体应用。可以使用的启动子包括但不限于:含有SV40早期启动子的真核表达载体(见例如Benoist and Chambon(1981)Nature 290:304-310),含有在Rous肉瘤病毒3'长末端重复序列中的启动子(见例如Yamamoto et al. (1980)Cell 22:787-797),疱疹胸苷激酶启动子(见例如Wagner et al. (1981)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:1441-1445),金属硫蛋白基因的调节序列(见例如Brinster et al. (1982)Nature 296:39-42)和巨细胞病毒(CMV)启动子;原核表达载体,例如 β -内酰胺酶启动子(见例如Jay et al. (1981)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:5543),或tac启动子(见例如DeBoer et al. (1983)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.80:21-25);另见“Useful Proteins from Recombinant Bacteria”:in Scientific American242:79-94(1980);含有胭脂氨酸合成酶启动子的植物表达载体(见例如Herrera-Estrella et al. (1984)Nature 303:209-213),花椰菜花叶病毒35S RNA启动子(见例如Gardner et al. (1981)Nucleic Acids Res.9(12):2871-2888),以及光合成酶核酮糖二磷酸羧化酶的启动子(见例如Herrera-Estrella et al. (1984)Nature 310:115-120);来自酵母和其它真菌的启动子元件,例如Gal4启动子,乙醇脱氢酶启动子,磷酸甘油激酶启动子,碱性磷酸酶启动子,以及以下具有组织特异性并已用于转基因动物的动物转录控制区:弹性蛋白酶I基因控制区,其在胰腺腺泡细胞中有活性(见例如Swift et al. (1984)Cell 38:639-646;Ornitz et al. (1986)Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.50:399-409;MacDonald(1987)Hepatology 7:425-515),胰岛素基因控制区,其在胰岛 β 细胞中有活性(见例如Hanahan et al. (1985)Nature 315:115-122),免疫球蛋白基因控制区,其在淋巴样细胞中有活性(见例如Grosschedl et al. (1984)Cell 38:647-658;Adams et al. (1985)Nature 318:533-538;Alexander et al. (1987)Mol.Cell Biol.7:1436-1444),小鼠乳腺肿瘤病毒控制区,其在睾丸、乳腺、淋巴细胞和肥大细胞中有活性(见例如Leder et al. (1986)Cell 45:485-495),白蛋白基因控制区,其在肝脏中有活性(见例如Pincert et al. (1987)Genes and Devel.1:268-276),甲胎蛋白基因控制区,其在肝脏中有活性(见例如Krumlauf et al. (1985)Mol.Cell.Biol.5:1639-1648;Hammer et al. (1987)Science 235:53-58), α -1抗胰蛋白酶基因控制区,其在肝脏中有活性(见例如Kelsey et al. (1987)Genes and Devel.1:161-171), β 珠蛋白基因控制区,其在骨髓细胞中有活性(见例如Magram et al. (1985)Nature 315:338-340;Kollias et al. (1986)Cell 46:89-94),髓磷脂碱性蛋白基因控制区,其在大脑的少突胶质细胞中有活性(见例如Readhead et al. (1987)Cell 48:703-712),肌蛋白轻链2基因控制区,其在骨骼肌中有活性(见例如Shani(1985)Nature 314:283-286),以及促性腺激素释放激素基因控制区,其在下丘脑的促性腺激素细胞中有活性(见例如Mason et al. (1986)Science 234:1372-1378)。

[1300] 表达载体通常含有转录单位或表达盒,其含有所述构建体或其部分在宿主细胞中

表达所需的所有额外元件。典型的表达盒含有可操作地连接于编码构建体的核酸的启动子,所述构建体例如抗体片段、结构域、其衍生物或同源物或本文所述的其它多肽(例如, TNF突变蛋白和融合蛋白),以及转录物的有效聚腺苷酸化、核糖体结合位点和翻译终止所需的信号。表达盒的其它元件可以包括增强子。此外,所述表达盒通常含有结构基因下游的转录终止区以提供有效终止。所述终止区可以得自与启动子序列相同的基因,也可以得自不同的基因。例如,载体包括可操作地连接于编码所需多肽或其结构域、片段、衍生物或同源物的核酸的启动子,一个或多个复制起点,以及任选一个或多个选择标记(例如抗生素抗性基因)。

[1301] 表达系统可以具有提供基因扩增的标记,例如胸苷激酶和二氢叶酸还原酶。不涉及基因扩增的表达系统也是合适的,例如在昆虫细胞中使用杆状病毒载体,其具有在多角体启动子或其它强杆状病毒启动子的指导下编码多肽的核酸序列。

[1302] 出于本文的目的,提供的载体含有编码IgG抗体Fc区的核苷酸序列,通常是修饰的Fc,其可操作地连接于编码TNFR1拮抗剂或TNFR2激动剂多肽的核酸,所述核酸还编码其间的接头,例如IgG铰链序列和/或短肽接头,例如GS接头,包括富含甘氨酸的柔性接头,例如(Gly4Ser)_n,其中n是正整数,例如1-5或更大的整数,以及其它如本文所述或本领域技术人员已知的接头。载体可以包括C_H1、C_H2、铰链、C_H3或C_H4和/或C_L中的一个或所有的序列。通常,例如为了表达Fab,所述载体含有C_H1或C_L(kappa或lambda轻链)的序列。例如,可以将V_H-C_H1和V_L-C_L序列插入合适的表达载体以表达Fab分子。恒定区或铰链区的序列是本领域技术人员已知的(参见例如美国公开号2008/0248028)。此类序列的示例在本文中提供。

[1303] 通常,载体可以是质粒、病毒载体或本领域已知的其它载体,用于在体内或体外表达多肽。例如,本文提供的构建体,此类编码TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂多肽构建体的核酸,在哺乳动物细胞中表达,包括例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[1304] 示例的真核载体包括例如熟知的容易获得的载体,例如pCMV(Agilent Technologies)、pCDNA3.1(Invitrogen(Thermo Fisher Scientific))、pCBL(来自Creative BioLabs,见例如图1)。其它真核载体,例如任何含有来自真核病毒的调节元件的载体,可用作真核表达载体。这些包括例如SV40载体、乳头瘤病毒载体和源自Epstein-Bar病毒的载体。示例的真核载体包括例如pMSG、pAV009/A+、pMT010/A+、pMAMneo-5、杆状病毒pDSCE,以及允许在CMV启动子、SV40早期启动子、SV40晚期启动子金属硫蛋白启动子、鼠乳腺肿瘤病毒启动子、Rous肉瘤病毒启动子、多角体启动子或显示在真核生物中有效表达的其它启动子的指导下表达蛋白质的任何其它载体。

[1305] 可以使用病毒载体,例如腺病毒、逆转录病毒或痘苗病毒载体。在一些实例中,载体是有缺陷的或减毒的逆转录病毒或其它病毒载体(见例如美国专利号4,980,286)。例如,可以使用逆转录病毒载体(见例如Miller et al. (1993)Meth.Enzymol.217:581-599)。这些逆转录病毒载体已被修饰以缺失病毒基因组包装和整合到宿主细胞DNA中不需要的逆转录病毒序列。在一些实例中,装备有编码本文多肽的核酸的病毒可以促进它们在靶组织内的复制和传播。病毒也可以是裂解病毒或非裂解病毒,其中病毒在组织特异性启动子下选择性复制。随着病毒的复制,多肽与病毒基因的共表达将促进病毒在体内的传播。

[1306] 对于细菌表达,载体包括熟知和广泛传播的载体pBR322、pUC、pSKF、pET23D和融合载体,例如MBP(Sigma-Aldrich)、GST(Sigma-Aldrich)和含有LacZ的载体。用于转化大肠杆

菌细胞的示例质粒载体包括例如pQE表达载体(可得自Qiagen®, Valencia, CA; 也参见由Qiagen®发表的描述该系统的文献)。pQE载体有一个噬菌体T5启动子(由大肠杆菌RNA聚合酶识别)和一个双lac操纵子抑制模块,可在大肠杆菌中提供重组蛋白的严格调控、高水平表达,一个合成核糖体结合位点(RBS II),用于高效翻译,6XHis标签编码序列,t0和T1转录终止子、ColE1复制起点和用于赋予氨苄青霉素抗性的β-内酰胺酶基因。pQE载体允许在重组蛋白的N末端或C末端放置一个6xHis标签。此类质粒包括pQE 32、pQE 30和pQE 31,它们为所有三个阅读框提供多个克隆位点,并提供N末端6xHis标记蛋白的表达。用于转化大肠杆菌细胞的其它示例质粒载体包括例如pET表达载体(见例如美国专利号4,952,496;可得自NOVAGEN, Madison, WI; 也参见NOVAGEN发表的描述该系统的文献)。此类质粒包括pET 11a,它含有T7lac启动子、T7终止子、可诱导的大肠杆菌lac操纵子和lac阻遏基因;pET 12a-c,其含有T7启动子、T7终止子和大肠杆菌ompT分泌信号;pET 15b和pET19b(NOVA GEN, Madison, WI),其含有用于使用His柱进行纯化的His-Tag™前导序列,以及允许在柱上纯化后进行切割的凝血酶切割位点,T7-lac启动子区域和T7终止子。

[1307] 还提供了含有载体的细胞。通常,任何可以被工程化以表达异源DNA并具有分泌途径的细胞类型都是合适的。细胞包括真核细胞和原核细胞,并且载体是适用于其中的任何载体。通常,细胞是能够实现所编码蛋白质的糖基化的细胞。提供了含有载体的原核和真核细胞。这样的细胞包括细菌细胞、酵母细胞、真菌细胞、古细菌细胞、植物细胞、昆虫细胞和动物细胞,特别是哺乳动物细胞。所述细胞用于产生多肽,通过在编码的多肽由细胞表达的条件下培养上述细胞并回收表达的多肽而生产。出于本文的目的,例如,所述多肽可以分泌到培养基中。

[1308] 可以根据宿主细胞品系调节插入序列的表达或以所需方式加工表达的蛋白质的能力来选择宿主细胞品系。多肽的此类修饰包括但不限于乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化和酰化。翻译后加工可以影响多肽的折叠和/或功能。不同的宿主细胞,例如但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞如DG44、FreeStyle™CHO-S细胞(Invitrogen)、DXB11、CHO-K1)、HeLa、MCDK、HEK293和WI38细胞,具有用于这种翻译后活性的特定细胞机制和特征机制,并且可以被选择以确保引入的蛋白质的正确修饰和加工。通常,细胞的选择是能够将N-连接的糖基化引入所表达的多肽中的细胞。因此,提供了含有载体的真核细胞。真核细胞的示例是哺乳动物中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。例如,二氢叶酸还原酶(DHFR⁻)缺陷的CHO细胞,如DG44细胞,用于生产本文提供的多肽。

[1309] 4. 表达

[1310] 本文提供的多肽构建体,包括TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂多特异性构建体及其部分,可以通过本领域技术人员已知的用于蛋白质生产的任何方法产生,包括体内和体外方法、重组和合成以及化学方法。所需的蛋白质可以在任何适合产生所需量和形式的蛋白质的生物体中表达,例如为施用和治疗所需的蛋白质的量和形式。表达宿主包括原核和真核生物,例如大肠杆菌、酵母、植物、昆虫细胞、哺乳动物细胞,包括人细胞系和转基因动物。表达宿主的蛋白质生产水平以及表达蛋白质上存在的翻译后修饰类型可能不同。表达宿主的选择可以基于本领域技术人员已知的这些和其它因素;这些包括监管和安全方面的考虑、生产成本以及纯化的需要和方法。纯化方法和组件组装方法是本领域技术人员熟知的。

[1311] 在真核宿主中的表达可包括在酵母如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、昆虫细胞如果蝇细胞和鳞翅目细胞、植物和植物细胞如烟草、玉米、水稻、藻类和浮萍中的表达。用于表达的真核细胞还包括哺乳动物细胞系,例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、人胚肾 (HEK293) 细胞或幼仓鼠肾 (BHK) 细胞。真核表达宿主还包括在转基因动物中的生产,例如包括在血清、乳汁和卵中的生产。

[1312] 许多表达载体是可用的并且是本领域技术人员已知的并且可以用于蛋白质的表达。表达载体的选择将受到宿主表达系统选择的影响。通常,表达载体可以包括转录启动子和任意的增强子、翻译信号以及转录和翻译终止信号。用于稳定转化的表达载体通常具有可选择标记,其允许选择和维持转化的细胞。在某些情况下,复制起点可用于放大细胞中载体的拷贝数。

[1313] 本文中的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂和双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体也可以表达为蛋白质融合体。例如,可以产生融合蛋白以向多肽添加额外的功能。融合蛋白的实例包括但不限于信号序列的融合,例如用于定位的标签,例如his6标签或myc标签,或用于纯化的标签,例如GST融合,以及用于指导蛋白质分泌和/或膜结合的序列。融合蛋白还包括与IgG的Fc区和接头融合,所述接头例如是IgG的铰链序列和/或甘氨酸-丝氨酸(GS)肽接头。或者,在一些实施方案中,本文的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂和双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体也可以与血清白蛋白融合。

[1314] 对于重组蛋白的长期、高产量生产,需要稳定的表达。例如,可以使用含有病毒复制起点或内源表达元件和选择标记基因的表达载体转化稳定表达多肽的细胞系。引入载体后,可以使细胞在富集培养基中生长1-2天,然后再转换为选择性培养基。选择标记的目的是赋予选择抗性,它的存在允许成功表达引入序列的细胞生长和回收。可以使用适合细胞类型的组织培养技术来增殖稳定转化细胞的抗性细胞。

[1315] 可以使用任意数量的选择系统来回收转化的细胞系。这些包括但不限于单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)(见例如Wigler et al., (1977)Cell 11:223-232)和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(APRT)(见例如Lowy, I. et al., (1980)Cell, 22:817-23)基因,其可分别用于TK-或APRT-细胞。此外,抗代谢物、抗生素或除草剂抗性可用作选择的基础。例如,可以使用赋予甲氨蝶呤抗性的二氢叶酸还原酶(DHFR)(见例如Wigler et al. (1980)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.77:3567-70);npt,其赋予对氨基糖苷类新霉素和G-418抗性(见例如Colbere-Garapin et al. (1981)J.Mol.Biol.150:1-14);和als或pat,其分别赋予对氯磺隆和草丁膦乙酰转移酶的抗性。已经描述了额外的可选择基因,例如trpB,其允许细胞利用吡啶代替色氨酸,或hisD,其它允许细胞利用组氨酸代替组氨酸(见例如Hartman, S.C.and R.C.Mulligan(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:8047-8051)。可见标记,例如但不限于花色素苷、 β -葡萄糖醛酸酶及其底物、GUS和萤光素酶及其底物萤光素,也可用于鉴定转化体以及量化可归因于特定载体系统的瞬时或稳定蛋白表达的量(见例如Rhodes et al. (1995)Methods Mol.Biol.55:121-131)。

[1316] a. 原核细胞

[1317] 原核生物,尤其是大肠杆菌,提供了产生大量蛋白质的系统。原核表达系统通常用于生产非糖基化的产物。大肠杆菌的转化方案为本领域技术人员所熟知。大肠杆菌的表达载体可以含有诱导型启动子;此类启动子可用于诱导高水平的蛋白质表达和表达对宿主细

胞表现出一定毒性的蛋白质。诱导型启动子的实例包括例如lac启动子、trp启动子、杂合tac启动子、T7和SP6 RNA启动子,以及温度调节的λPL启动子。

[1318] 本文提供的多肽和融合蛋白构建体,例如本文提供的任何多肽和融合蛋白构建体,可以在大肠杆菌的胞质环境中表达。所述胞质是还原环境,对于某些分子,这会导致形成不溶的包涵体。还原剂,如二硫苏糖醇和β-巯基乙醇,以及变性剂,如盐酸胍和尿素,可用于重新溶解所述蛋白质。另一种方法是在细菌的周质空间中表达蛋白质,它提供氧化环境和伴侣蛋白样和二硫化物异构酶,并可导致可溶蛋白质的产生。通常,前导序列与待表达的蛋白质融合,引导蛋白质进入周质。然后,前导序列被周质内的信号肽酶去除。将表达的蛋白质易位到周质中的示例途径是Sec途径、SRP途径和TAT途径。靶向周质的前导序列的实例包括来自果胶裂解酶基因的pe1B前导序列、StII前导序列和DsbA前导序列,以及来自碱性磷酸酶基因的前导序列。在某些情况下,周质表达允许表达的蛋白质渗漏到培养基中。蛋白质的分泌允许从培养物上清液中快速简单地纯化。不是分泌的蛋白质可以通过渗透裂解从周质中获得。与胞质表达类似,在某些情况下,蛋白质会变得不溶,可以使用变性剂和还原剂促进溶解和重折叠。诱导和生长的温度也会影响表达水平和溶解度;通常使用25°C和37°C之间的温度。通常,细菌会产生去糖基化蛋白质。因此,如果蛋白质的功能需要糖基化,则可以在从宿主细胞纯化后在体外添加糖基化。

[1319] b. 酵母细胞

[1320] 酵母,如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)和巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*),是熟知的表达宿主,可用于生产蛋白质,如本文所述的任何蛋白质。可以用附加型复制载体或通过同源重组稳定染色体整合来转化酵母。通常,诱导型启动子用于调节基因表达。此类启动子的实例包括GAL1、GAL7和GAL5,以及金属硫蛋白启动子,例如CUP1、AOX1或其它毕赤酵母或其它酵母启动子。表达载体通常包括选择标记,例如LEU2、TRP1、HIS3和URA3,用于选择和维持转化的DNA。酵母中表达的蛋白质通常是可溶的。与伴侣蛋白共表达,例如Bip和蛋白质二硫键异构酶,可以提高表达水平和溶解度。此外,可以使用分泌信号肽融合体来指导在酵母中表达的蛋白质分泌,例如来自酿酒酵母的酵母交配型α因子分泌信号,以及与酵母细胞表面蛋白的融合体,例如Aga2p交配粘附受体,或腺嘌呤阿氏酵母菌(*Arxula adenivorans*)葡糖淀粉酶。可以工程化蛋白酶切割位点,例如用于Kex-2蛋白酶的切割位点,以在其离开分泌途径时从表达的多肽中去除融合序列。酵母还能够在Asn-X-Ser/Thr基序进行糖基化。

[1321] c. 昆虫和昆虫细胞

[1322] 昆虫细胞,特别是使用杆状病毒表达,可用于表达多肽,包括抗体或其片段。昆虫细胞表达高水平的蛋白质,并且能够进行高等真核生物使用的大部分翻译后修饰。杆状病毒具有限制性宿主范围,这提高了安全性并减少了真核表达的监管问题。通常,表达载体使用用于高水平表达的启动子,例如杆状病毒的多角体蛋白启动子和p10启动子。杆状病毒系统包括杆状病毒,例如苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)和家蚕核型多角体病毒(BmNPV),以及昆虫细胞系,例如源自草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)的Sf9、源自粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)的TN、源自美洲粘虫(*Pseudaletia unipuncta*)的A7S和源自黑脉金斑蝶(*Danaus plexippus*)的DpN1。对于高水平表达,将待表达分子的核苷酸序列直接

融合在病毒多角体起始密码子的下游。为了产生能够表达人抗体的杆状病毒重组体,可以使用双表达转移,例如pAcUW51 (PharMingen)。哺乳动物分泌信号在昆虫细胞中得到准确处理,可用于将表达的蛋白质分泌到培养基中。细胞系美洲粘虫(*Pseudaletia unipuncta*) (A7S) 和黑脉金斑蝶(*Danaus plexippus*) (DpN1) 产生的蛋白质具有与哺乳动物细胞系统相似的糖基化模式。示例的昆虫细胞是那些经过改造以降低免疫原性的细胞,包括那些带有“哺乳动物化”杆状病毒表达载体的细胞和那些缺乏FT3酶的细胞。

[1323] 昆虫细胞中的另一种表达系统是使用稳定转化的细胞。细胞系,如Schneider 2 (S2) 和Kc细胞(黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)) 和C7细胞(白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)), 可用于表达。果蝇金属硫蛋白启动子可用于在存在镉或铜重金属诱导的情况下诱导高水平表达。杆状病毒立即早期基因启动子IE1可用于诱导一致的表达水平。典型的表达载体包括pIE1-3和pI31-4转移载体(Novagen)。表达载体通常通过使用选择标记来维持,例如新霉素和潮霉素。

[1324] d. 哺乳动物表达细胞

[1325] 哺乳动物表达系统可用于表达多肽,包括本文的构建体,包括本文提供的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂、双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体及其融合物。可以通过病毒感染(例如用腺病毒)或通过直接DNA转移(例如通过使用脂质体、磷酸钙和DEAE-葡聚糖)以及通过物理方法(例如电穿孔和显微注射),将表达构建体转移至哺乳动物细胞。用于哺乳动物细胞的表达载体通常包括一个mRNA帽位点、一个TATA盒、一个翻译起始序列(Kozak共有序列)和聚腺苷酸化元件。也可以添加内部核糖体进入位点(IRES)元件,以允许与另一个基因(例如选择标记)进行双顺反子表达。此类载体通常包括用于高水平表达的转录启动子-增强子,例如SV40启动子-增强子、人巨细胞病毒(CMV)启动子和Rous肉瘤病毒(RSV)的长末端重复序列。这些启动子-增强子在许多细胞类型中都有活性。组织和细胞类型的启动子和增强子区域也可用于表达。示例的启动子/增强子区域包括但不限于来自基因例如弹性蛋白酶I、胰岛素、免疫球蛋白、小鼠乳腺肿瘤病毒、白蛋白、甲胎蛋白、 α -1抗胰蛋白酶、 β -珠蛋白、髓鞘碱性蛋白、肌球蛋白轻链2和促性腺激素释放激素控制基因的那些启动子和增强子区域。

[1326] 选择标记可用于选择和维持具有表达构建体的细胞。选择标记基因的实例包括但不限于潮霉素B磷酸转移酶、腺苷脱氨酶、黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶、氨基糖苷磷酸转移酶、二氢叶酸还原酶(DHFR)和胸苷激酶(TK)。例如,可以在甲氨蝶呤存在下进行表达以选择那些仅表达DHFR基因的细胞。可以产生修饰的抗-TNFR抗体及其抗原结合片段,例如使用NEOR/G418系统、二氢叶酸还原酶(DHFR)系统或谷氨酰胺合成酶(GS)系统。GS系统使用联合表达载体,如pEE12/pEE6,以表达重链和轻链二者。与细胞表面信号传导分子(如TCR- ζ 和Fc ϵ RI- γ)融合可以指导细胞表面处于活性状态的蛋白质表达。

[1327] 许多细胞系可用于哺乳动物表达,包括小鼠、大鼠、人、猴、鸡和仓鼠细胞。示例的细胞系包括但不限于BHK(例如BHK-21细胞)、293-F、CHO、CHO Express(CHOX;ExcellGene)、Balb/3T3、HeLa、MT2、小鼠NS0(非分泌型)和其它骨髓瘤细胞系、杂交瘤和异种杂交瘤细胞系、淋巴细胞、成纤维细胞、Sp2/0、COS、NIH3T3、HEK293、293S、2B8和HKB细胞。适用于无血清培养基的细胞系也可获得,其有助于从细胞培养基中纯化分泌的蛋白质。示例包括CHO-S细胞(Invitrogen®, Carlsbad, CA, cat#11619-012)和无血清EBNA-1细胞系(见例如Pham et

al. (2003) *Biotechnol. Bioeng.* 84:332-342)。也可获得适合在进行优化以最大化表达的特殊培养基中生长的细胞系。例如, DG44 CHO细胞适用于在化学成分确定、不含动物产品的培养基中悬浮培养。

[1328] e. 植物

[1329] 转基因植物细胞和植物可用于表达多肽和蛋白质, 例如本文所述的任何多肽和蛋白质。通常使用直接DNA转移将表达构建体转移至植物, 例如通过微粒轰击和PEG介导的原生质体转移, 以及农杆菌介导的转化。表达载体可包括启动子和增强子序列、转录终止元件和翻译控制元件。表达载体和转化技术通常在双子叶植物宿主如拟南芥和烟草以及单子叶植物宿主如玉米和水稻之间有所不同。用于表达的植物启动子的实例包括例如花椰菜花叶病毒启动子 (CaMV 35S)、胭脂氨酸合酶启动子、核糖二磷酸羧化酶启动子和泛素 (例如, 玉米泛素-1 (ubi-1)) 和UBQ3启动子。选择标记, 如潮霉素、磷酸甘露糖异构酶和新霉素磷酸转移酶, 通常用于促进转化的细胞的选择和维持。转化的植物细胞可以作为细胞、聚集体 (愈伤组织) 在培养物中维持或再生为整株植物。转基因植物细胞还可以包括经过工程化以产生多肽的藻类。由于植物具有与哺乳动物细胞不同的糖基化模式, 这会影响这些宿主产生的蛋白质的选择。

[1330] 5. 纯化

[1331] 用本文提供的编码多肽构建体的核酸转化的宿主细胞可以在适合表达和从细胞培养物中回收编码的蛋白质的条件下培养。重组细胞产生的蛋白质通常是分泌型的, 但也可以包含在细胞内, 这取决于使用的序列和/或载体。如本领域技术人员所理解的, 含有编码本文提供的多肽的核酸分子的表达载体可以被设计具有促进表达的多肽通过原核或真核细胞膜直接分泌的信号序列。

[1332] 从宿主细胞中纯化多肽的方法取决于所选的宿主细胞和表达系统。对于分泌的分子, 通常在去除细胞后从培养基中纯化蛋白质。对于细胞内表达, 可裂解细胞, 并可从提取物中纯化蛋白质。当转基因生物例如转基因植物和动物用于表达时, 组织或器官可以用作起始材料来制备裂解的细胞提取物。此外, 转基因动物生产可包括在可收集的奶或蛋中生产多肽, 如果需要, 可使用本领域的标准方法提取和进一步纯化蛋白质。

[1333] 可以使用本领域技术人员已知的蛋白质纯化技术纯化多肽, 例如本文提供的TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂双特异性构建体和其它构建体及其组分。这些包括但不限于SDS-PAGE、大小分级分离和大小排阻色谱、硫酸铵沉淀、螯合色谱、柱色谱、HPLC、透析和离子交换色谱, 例如阴离子交换, 及其组合。也可以使用亲和纯化技术。可以使用为纯化抗体和抗体片段而开发的方法来纯化本文的构建体。纯化抗体和抗体片段的方法的示例是包括柱色谱的方法, 其中固体支持柱材料与蛋白G连接, 蛋白G是一种来自链球菌的细胞表面相关蛋白, 它以高亲和力结合免疫球蛋白。抗体和抗体片段也可以通过包括蛋白A色谱在内的方法进行纯化, 其中蛋白A (一种来自金黄色葡萄球菌的细胞表面相关蛋白, 以高亲和力结合免疫球蛋白, 例如IgG) 与固体支持柱结合。其它可用于纯化抗体和抗体片段的免疫球蛋白结合细菌蛋白, 包括蛋白A/G, 这是一种组合了蛋白A和蛋白G的IgG结合域的重组融合蛋白; 和蛋白L, 这是一种来自消化链球菌属 (*Peptostreptococcus*) 的表面蛋白 (见例如Bjorck (1988) *J. Immunol.* 140 (4) :1194-1197; Kastern et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (18) :12820-12825; Eliasson et al. (1988)

J. Biol. Chem. 263:4323-4327)。所述构建体基本上是纯的,其通常是至少或至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%纯度。纯度可以通过标准方法评估,例如通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色。

[1334] 当抗体及其片段和相关多肽被转化细菌大量表达时,通常在启动子诱导后,虽然表达可以是组成型的,但多肽可以形成不溶性聚集体。多肽包涵体的纯化方案是本领域技术人员已知的。例如,在一种方法中,将细胞悬浮液离心以沉淀包涵体,并将含有包涵体的沉淀重新悬浮在缓冲液中,例如20mM Tris-HCL (pH 7.2)、1mM EDTA、150mM NaCl和2% Triton-X 100,这是一种非离子洗涤剂,不会损害包涵体,但会溶解污染物。可以重复洗涤步骤以尽可能多地去除细胞碎片。将剩余的包涵体沉淀重新悬浮在适当的缓冲液中,例如20mM磷酸钠pH 6.8、150mM NaCl。其它合适的缓冲液以及可供选择的纯化方案是已知的或可由本领域技术人员开发。

[1335] 可以使用或开发用于纯化抗体及其片段和本文提供的构建体的其它方法。它们可以从细菌周质中纯化。对于输出到产生该多肽的细菌的周质中的多肽,除本领域技术人员已知的其它方法外,还可以通过冷渗透休克分离细菌的周质部分。例如,在一种方法中,为了从周质中分离重组多肽,将细菌细胞离心以形成沉淀。将沉淀重新悬浮在含有20%蔗糖的缓冲液中。为了裂解细胞,将细菌离心,将沉淀物重新悬浮在冰冷的5mM MgSO₄中,并在冰浴中放置约10分钟。离心细胞悬液,倒出上清液并保存。存在于上清液中的重组多肽可以通过本领域技术人员熟知的标准分离技术与宿主蛋白分离。这些方法包括但不限于以下步骤:溶解度分级分离、大小差异过滤和柱色谱。

[1336] 表达构建体也可以被工程化以包括编码亲和标签的核酸,例如用于检测或纯化表达的产物,所述产物在表达时可操作地连接编码的多肽。亲和标签包括例如小分子泛素样修饰蛋白(SUMO)标签、myc表位、GST融合或His6,分别用于与SUMO、myc抗体、谷胱甘肽树脂和Ni树脂进行亲和纯化。编码此类标签的核酸可以与编码本文提供的多肽构建体的核酸连接。所述标签可以促进可溶性蛋白质的纯化和/或检测。例如,TNFR1拮抗剂多肽构建体或其部分可以表达为重组蛋白,其中添加了一个或多个额外的多肽结构域以促进蛋白纯化。纯化促进结构域包括但不限于金属螯合肽,例如允许在固定的金属上进行纯化的组氨酸-色氨酸模块、允许在固定的免疫球蛋白上进行纯化的蛋白A结构域,以及用于FLAGS延伸/亲和纯化系统的结构域(Immunex Corp., Seattle, WA)。在纯化结构域和编码的表达多肽之间,包含编码可裂解接头序列的核酸,例如因子Xa可裂解识别位点(Ile-Glu-Gly-Arg,经工程化以包括Nru I限制位点,见例如EP 92115607A)或肠激酶(Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), San Diego, CA),促进纯化。示例的表达载体编码含有TNFR1拮抗剂和/或TNFR2激动剂多肽和肠激酶切割位点的融合蛋白的表达。小分子泛素样修饰蛋白(SUMO)标签促进在固定的金属离子亲和色谱(IMIAC)上纯化,肠激酶切割位点为从融合蛋白中纯化多肽提供了切割位点。

[1337] 纯度可以通过本领域已知的任何方法评估,包括凝胶电泳、正交HPLC方法、染色和分光光度技术。可以使用本领域技术人员已知的任何测定法或方法,例如本文所述的任何测定法或方法,分析表达和纯化的多肽。这些包括基于多肽的物理和/或功能性质的测定,包括但不限于凝胶电泳分析、免疫测定、结合测定和TNF介导的TNFR1和/或TNFR2活性的测定。

[1338] 6. 其它修饰

[1339] 如上所述,提供的修饰的TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体和其它构建体及其组分包括改变药理学性质(包括药代动力学和药效学性质)的组分(活性调节剂)。所述构建体的部分,例如TNFR1抑制剂多肽和小分子,以及TNFR2激动剂多肽和小分子,可以缀合到聚合物或聚合物部分,例如但不限于聚乙二醇(PEG)部分或葡聚糖,或人血清白蛋白(HSA),或可被唾液酸化以降低免疫原性和/或增加血清和其它体液中的半衰期。多肽也可以连接于纯化标签,例如His标签或SUMO序列。其它修饰包括例如糖基化、羧化、羟基化、磷酸化或其它已知修饰。糖基化可以在体内并入,使用适当的表达系统例如哺乳动物表达系统,在体外并入,或通过体内和体外方法的组合,其中例如使多肽在原核细胞中表达,并进一步使用酶促转糖基作用在体外进行修饰。其它修饰可以在体外进行,或者例如通过在产生此类修饰的合适宿主中产生修饰的多肽。

[1340] 实施和选择这些修饰或活性调节剂和修饰,使得修饰的多肽并入修饰的功能并且与非融合或未修饰多肽相比保留至少一部分、通常至少50%、60%、70%、80%、90%或95%的活性,包括与非融合或未修饰多肽相比96%、97%、98%、99%或更高的活性。例如,TNFR1拮抗剂构建体保留了通过TNFR1抑制TNF介导的信号传导的能力。

[1341] 多肽例如TNFR1拮抗剂或TNFR2激动剂与另一种多肽的连接可直接或间接通过接头实现。在一个实例中,连接可以通过化学连接,例如通过异双功能制剂、或硫醇连接、或其它此类连接。融合也可以通过重组表达来实现。多肽例如TNFR1拮抗剂或TNFR2激动剂与另一种多肽的融合可以在TNFR1拮抗剂或TNFR2激动剂多肽的N-或C-末端进行。可用于具有本文提供的TNFR1拮抗剂或TNFR2激动剂多肽的融合蛋白的多肽的非限制性实例包括例如GST(谷胱甘肽S-转移酶)多肽、免疫球蛋白G的Fc结构域、白蛋白、异源信号序列及其组合。

[1342] 编码的构建体可以通过标准重组技术产生。例如,编码不同多肽部分的DNA片段可以按照常规技术符合读框地连接在一起,例如,通过使用平末端或交错末端进行连接、限制性内切酶消化以提供合适的末端、适当填充粘端,碱性磷酸酶处理以避免不希望的连接和酶促连接。融合基因可以通过常规技术合成,包括自动DNA合成仪。或者,可以使用锚定引物进行基因片段的PCR扩增,锚定引物在两个连续的基因片段之间产生互补突出,随后可以将其退火并重新扩增以产生嵌合基因。许多表达载体是可商购的,其已经编码融合部分(例如,GST多肽)。可以将编码多肽的核酸克隆到这样的表达载体中,使得融合部分符合读框地连接于本文提供的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂和多特异性例如双特异性构建体。

[1343] a. 聚乙二醇化

[1344] 聚乙二醇(PEG)用于生物材料、生物技术和医药中;它是一种生物相容性、无毒、水溶性聚合物,通常不具有免疫原性。在药物递送领域,PEG衍生物用于与蛋白质共价连接(即“聚乙二醇化”),以降低免疫原性、蛋白水解和肾脏清除率,并增加血清半衰期和增强溶解度(见例如Zalipsky (1995) Adv. Drug Del. Rev. 16:157-182)。PEG已连接于低分子量、相对疏水的药物上,以提高溶解度、降低毒性和改变生物分布。与线性或支链PEG部分的缀合增加了多肽的分子量和流体动力学半径,并降低了肾脏的肾小球滤过率。通常,聚乙二醇化药物作为溶液施用,例如通过注射施用。在本文的构建体中,聚乙二醇化部分和其它此类聚合物可以是所述构建体的接头部分的一部分。

[1345] 一个相关的应用是合成用于药物递送的交联可降解PEG网络或制剂,因为用于设

计可降解、可溶性药物载体的许多相同化学也可用于设计可降解凝胶(见例如Sawhney et al. (1993) *Macromolecules* 26:581-587)。可以通过混合两种互补聚合物的溶液来形成大分子间复合物。这种复合物通过所涉及的聚合物之间的静电相互作用(聚阴离子-聚阳离子)和/或氢键(聚酸-聚碱)和/或通过介质中聚合物之间的疏水相互作用来稳定(见例如Krupers et al. (1996) *Eur. Polym. J.* 32:785-790)。例如,在适当条件下混合聚丙烯酸(PAAc)和聚氧化乙烯(PEO)溶液导致主要基于氢键的复合物形成。这些复合物在生理条件下的解离已用于递送游离(即非聚乙二醇化)药物。互补聚合物的复合物已由均聚物和共聚物形成。

[1346] 许多聚乙二醇化试剂是已知的,聚乙二醇化的治疗性蛋白质也已知。此类试剂包括但不限于N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化的PEG、琥珀酰亚胺mPEG、mPEG2-N-羟基琥珀酰亚胺、mPEG琥珀酰亚胺 α -甲基丁酸酯、mPEG琥珀酰亚胺丙酸酯、mPEG琥珀酰亚胺丁酸酯、mPEG羧甲基3-羟基丁酸琥珀酰亚胺酯、同双功能PEG-琥珀酰亚胺丙酸酯、同双功能PEG丙醛、同双功能PEG丁醛、PEG马来酰亚胺、PEG酰肼、对硝基苯基碳酸酯PEG、mPEG-苯并三唑碳酸酯、丙醛PEG、mPEG丁醛、支链mPEG2丁醛、mPEG乙酰基、mPEG哌啶酮、mPEG甲基酮、mPEG“无接头”马来酰亚胺、mPEG乙烯基砜、mPEG硫醇、mPEG邻吡啶基硫酯、mPEG邻吡啶基二硫化物、Fmoc-PEG-NHS、Boc-PEG-NHS、乙烯基砜PEG-NHS、丙烯酸酯PEG-NHS、荧光素PEG-NHS和生物素PEG-NHS(见例如Veronese et al. (1997) *J. Bioactive Compatible Polymers* 12:197-207;以及众多的美国和世界专利)。在一个实例中,聚乙二醇的分子量范围为约3kDa至约50kDa,通常为约5kDa至约30kDa。PEG与药物的共价连接(称为“聚乙二醇化”)可以通过已知的化学合成技术实现。例如,蛋白质的聚乙二醇化可以通过在合适的反应条件下使NHS活化的PEG与蛋白质反应来完成。

[1347] 虽然已经描述了许多聚乙二醇化反应,但最普遍适用于蛋白质的那些反应赋予方向性、使用温和的反应条件,并且不需要大量的下游加工来去除毒性催化剂或副产物。例如,单甲氧基PEG(mPEG)只有一个反应性末端羟基,因此,它的使用限制了所得PEG-蛋白质产物混合物的一些异质性。通常需要激活与末端甲氧基相反的聚合物末端的羟基以实现有效的蛋白质聚乙二醇化,目的是使衍生化的PEG更容易受到亲核攻击。攻击性亲核试剂通常是赖氨酸残基的 ϵ -氨基,但如果局部条件有利,其它胺也可以反应(例如,N-末端 α -胺或组氨酸的环胺)。在含有单个赖氨酸或半胱氨酸的蛋白质中,更直接的连接是可能的。PEG-马来酰亚胺可以靶向后者残基进行硫醇特异性修饰。或者,PEG酰肼可与高碘酸盐氧化的蛋白质反应并在NaCNBH₃存在下还原。更具体地,聚乙二醇化的CMP糖可以在合适的糖基转移酶存在下与蛋白质反应。一种技术是“聚乙二醇化”技术,其中许多聚合分子与所讨论的多肽偶联。使用这种技术时,免疫系统难以识别多肽表面负责形成抗体的表位,从而降低免疫应答。对于直接引入人体循环系统以产生特定生理作用的多肽(即药物),典型的潜在免疫应答是IgG和/或IgM应答,而通过呼吸系统吸入的多肽(即,工业多肽)可能会引起IgE应答(即过敏反应)。解释免疫应答降低的理论之一是聚合物分子屏蔽多肽表面的表位,该表位负责导致抗体形成的免疫应答。另一种理论或至少是部分因素是结合物越重,则免疫应答就越低。

[1348] 例如,聚乙二醇化本文提供的多肽构建体和多肽组分,将PEG部分通过共价连接与所述多肽缀合。PEG化技术包括但不限于使用专门的接头和偶联化学(见例如Harris(2002))

Adv. Drug Deliv. Rev. 54:459-476), 将多个PEG部分连接于单个缀合位点(例如通过使用支链PEG; 见例如Veronese et al., (2002) Bioorg. Med. Chem. Lett. 12:177-180), 位点特异性聚乙二醇化和/或单聚乙二醇化(见例如Chapman et al., (1999) Nature Biotech. 17:780-783), 以及定点酶促聚乙二醇化(见例如Sato (2002) Adv. Drug Deliv. Rev. 54:487-504)。本领域描述的方法和技术可以产生具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10个PEG或PEG衍生物连接于单个蛋白质分子的蛋白质(见例如美国专利公开号2006/0104968)。

[1349] b. 白蛋白化

[1350] 本文提供的多肽, 例如TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体和多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体, 可以融合到用于人体治疗的白蛋白(即, “白蛋白化”), 融合到人血清白蛋白(HSA), 以增加多肽的半衰期、稳定性、生物利用度和分布, 和/或改善药理学性质, 例如药代动力学。许多与人血清白蛋白(HSA)相关的产品被批准用作治疗剂, 包括用作癌症治疗剂和用于治疗2型糖尿病(见例如AlQahtani et al. (2019) Biomed and Pharmacotherapy 113:108750; Roscoe et al. (2018) Mol. Pharmaceutics 151:15046-5047; Strohl, W.R. (2015) BioDrugs 4:215-239)。在一些实例中, 缺乏信号序列和激活序列的成熟HSA蛋白与感兴趣的蛋白质融合。在一些实例中, 血清白蛋白例如人血清白蛋白(HSA)与多肽缀合。示例的HSA蛋白如SEQ ID NO:35所示。

[1351] 本文提供了具有HSA的融合体。这些包括HSA融合到TNFR1拮抗剂(例如, dAb、scFv、Fab或其它抗原结合片段, 如本文提供)或TNFR2激动剂(例如, TNF突变蛋白)的N-或C-末端, 通常通过短肽接头, 例如但不限于甘氨酸-丝氨酸(GS)接头, 例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n, 其中n=1-5或6。示例的TNFR1拮抗剂-HSA融合体如SEQ ID NO:709、713、717、721和725所示。

[1352] c. 纯化标签

[1353] 在一些实例中, 本文提供的TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体和融合蛋白可以含有用于纯化产物的标签。用于纯化的示例标签在本文别处描述。例如, 本文的示例多肽可以含有用于纯化的SUMO或His序列。通常, 所述标签是可切割的标签。

[1354] 本文提供的多肽构建体(包括融合蛋白)可包括His纯化标签, 例如6xHis标签。His标签的多肽任选地可以含有融合配偶体和/或用于表达和分泌的信号。例如, 示例的His-多肽融合蛋白可以含有一种或多种人免疫球蛋白轻链kappa(κ)前导信号肽序列(SEQ ID NO:835)、6xHis标签(SEQ ID NO:836)、SUMO序列(SEQ ID NO:837)和HSA(SEQ ID NO:35)。在另一个实例中, 示例的His标签的多肽融合蛋白可以含有人免疫球蛋白轻链kappa(κ)前导信号肽序列(SEQ ID NO:835)、6xHis标签(SEQ ID NO:836)、SUMO序列(SEQ ID NO:837)和IgG Fc(见例如SEQ ID NO:10、12、14、16、27和30)。

[1355] 在一些实施方案中, 本文提供的多肽和融合蛋白可以包括在包涵体中积累的His标签和/或SUMO序列。例如, SEQ ID NO:838中列出的His-SUMO序列可以与本文提供的任何多肽或融合蛋白连接。His-SUMO标签的多肽任选地可以含有融合配偶体和/或用于表达和分泌的信号。例如, His-SUMO-多肽融合蛋白可以含有人免疫球蛋白轻链kappa(κ)前导信号肽序列(SEQ ID NO:835)、6xHis标签(SEQ ID NO:836)、SUMO序列(SEQ ID NO:837)和HSA(SEQ ID NO:35)。在另一个实例中, 示例的His-SUMO-多肽融合蛋白可以含有人免疫球蛋白轻链kappa(κ)前导信号肽序列(SEQ ID NO:835)、6xHis标签(SEQ ID NO:836)、SUMO序列

(SEQ ID NO:837),和IgG Fc(见例如SEQ ID NO:10、12、14、16、27和30)。

[1356] 7. 核酸分子和基因治疗

[1357] 编码作为本文提供的融合蛋白的多肽构建体的核酸分子可用于基因治疗,例如用于在基因治疗载体中表达或用于作为DNA或RNA构建体施用。其中,本文提供的一些TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂和双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体作为融合蛋白提供。本文提供了编码这些构建体以及载体和其它递送载体的核酸分子。核酸分子可以编码与本文提供的任何多肽或构建体具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列相同性的多肽。在另一个实施方案中,核酸分子可包括具有编码本文提供的任何多肽或构建体的简并密码子序列的那些核酸分子。

[1358] 根据需要,用于基因治疗的核酸分子可操作地连接于核酸的调节序列。这些序列包括启动子、增强子、信号序列和其它运输序列,以及本领域技术人员熟知的其它此类调节序列。对于具有特定组织嗜性的载体,所述调节序列可以对此类组织具有特异性,例如用于长期基因表达的肝脏,或用于任何眼科应用的眼睛。示例性启动子包括用于在哺乳动物细胞中表达的诱导型和组成型启动子。此类启动子是在真核生物例如哺乳动物受试者中识别的启动子,包括但不限于CMV和SV40启动子;腺病毒启动子,例如E2基因启动子,其应答于E7癌蛋白;PV启动子,例如应答于PV E2蛋白的BPV p89启动子;和其它合适的启动子。

[1359] 本文提供的多肽也可以在基因转移载体中递送至细胞。所述转移载体还可以编码额外的其它治疗剂,用于治疗疾病或病症,例如类风湿性关节炎,或如本文所述或本领域已知的通过施用所述多肽治疗的任何其它慢性炎症、自身免疫、神经退行性或脱髓鞘疾病或病症。编码本文提供的多肽的转移载体可通过将核酸分子施用于受试者而全身使用。例如,转移载体可以是病毒载体,例如腺病毒载体。编码本文多肽或构建体的载体也可掺入干细胞中,并且可将此类干细胞施用于受试者,例如通过在治疗部位移植或植入干细胞。例如,间充质干细胞(MSC)可以被工程化以表达治疗性多肽,并且此类MSC可以植入到移植部位用于治疗。

[1360] 不同于递送蛋白质,核酸可以体内施用例如全身施用,或通过任何其它途径施用,或离体施用,例如通过去除细胞、包括淋巴细胞,将所述核酸引入其中,并重新引入宿主或相容的受体。

[1361] 可以通过核酸分子的表达将多肽递送至细胞和组织。多肽可以作为编码多肽的核酸分子施用,包括离体技术和直接体内表达。可以通过本领域技术人员已知的任何方法将核酸递送至细胞和组织。可以将分离的核酸序列掺入载体中用于进一步操作。通过表达编码核酸分子来施用多肽的方法包括施用重组载体。所述载体可以例如通过包含复制起点被设计成保持附加型,或者可以被设计成整合到细胞中的染色体中。编码本文提供的多肽的核酸分子也可用于使用非病毒载体的离体基因表达疗法中。例如,细胞可以被工程化以表达多肽,所述多肽可操作地连接于调节序列,或者使其置于可操作地连接于调节序列的基因组位置中。然后可将此类细胞局部或全身施用于受试者,例如需要治疗的患者。

[1362] 基因治疗载体可以保持附加型,或可以整合到接受治疗的受试者的染色体中。多肽可以由病毒表达,将所述病毒施用于需要治疗的受试者。适用于基因治疗的病毒载体包括腺病毒、腺相关病毒(AAV)、逆转录病毒、慢病毒、痘苗病毒和其它上述病毒。可以使用病毒载体,包括例如腺病毒、腺相关病毒(AAV)、痘病毒、疱疹病毒、逆转录病毒和设计用于基

因治疗的其它病毒。可以使用具有改变的趋向性如肝细胞向性的AAV载体。AAV载体由赋予向性的衣壳和编码两侧为ITR的多肽的核酸组成。

[1363] 例如,腺病毒表达技术是本领域熟知的,腺病毒的生产 and 施用方法也是熟知的。腺病毒血清型可从例如美国典型培养物保藏中心(ATCC, Rockville, MD)获得。腺病毒载体可离体使用,例如从需要治疗的患者分离细胞,并用表达多肽的腺病毒载体转导。在合适的培养期后,将转导的细胞局部和/或全身施用给受试者。或者,分离多肽腺病毒颗粒并将其在药理学上可接受的载体中配制以递送治疗有效量以预防、治疗或改善受试者的疾病或病症。通常,腺病毒颗粒以每千克受试者体重1至 10^{14} 个颗粒、通常为每千克受试者体重 10^6 或 10^8 个颗粒至 10^{12} 个颗粒的剂量递送。在一些情况下,期望提供具有靶向细胞的制剂的核酸源,例如特异于细胞表面膜蛋白或靶细胞的抗体,或靶细胞上受体的配体。本文提供的多肽或构建体也可以被靶向以递送到特定细胞类型中。例如,编码本文提供的多肽或构建体的腺病毒载体可用于在非分裂细胞如肝细胞中稳定表达(见例如Margaritis et al. (2004) J. Clin. Invest. 113:1025-1031)。在另一个实例中,可以将编码本文多肽或构建体的病毒或非病毒载体转导到分离的细胞中用于后续递送。用于表达和递送的其它细胞类型包括但不限于成纤维细胞和内皮细胞。

[1364] 可以将核酸分子引入人工染色体和其它非病毒载体中。人工染色体,例如ACES(见Lindenbaum et al., (2004) Nucleic Acids Res. 32(21):e172),可以被工程化为编码和表达同种型。简而言之,哺乳动物人工染色体(MAC)提供了一种将大量遗传信息有效载荷以自主复制、非整合形式引入细胞的方法。在MAC中,基于哺乳动物卫星DNA的人工染色体表达(ACE)是独一无二的,它可以在不同物种的细胞系中从头重复生成,并且很容易从宿主细胞的染色体中纯化出来。然后可以将纯化的哺乳动物ACE重新引入各种受体细胞系,在这些受体细胞系中,其在没有选择压力的情况下使用ACE系统稳定维持很长时间。使用这种方法,已经在LMTK(-)和CHO细胞中实现了一个或两个基因靶标的特定加载。

[1365] 另一种引入编码多肽的核酸的方法是在酵母中采用两步基因置换技术,起于从克隆在酵母人工染色体(YAC)中的完整腺病毒基因组(Ad2; Ketner et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:6186-6190)和含有靶向YAC克隆中的特定区域的腺病毒序列、感兴趣基因的表达盒及阳性和阴性选择标记的质粒。YAC特别令人感兴趣,因为其允许掺入更大的基因。这种方法可用于构建基于腺病毒的载体,其带有编码本文所述的任何多肽或构建体的核酸,用于将基因转移至哺乳动物细胞或整个动物。

[1366] 核酸可封装在载体如脂质体中,或引入细胞如细菌细胞、特别是减毒细菌,或引入病毒载体中。例如,当使用脂质体时,结合与内吞作用相关的细胞表面膜蛋白的蛋白质可用于靶向和/或促进摄取,例如衣壳蛋白或其片段对特定细胞类型具有嗜性,抗体对在循环中内化的蛋白质具有嗜性,以及靶向细胞内定位并增强细胞内半衰期的蛋白质。

[1367] 对于离体和体内方法,将编码本文的多肽或构建体的核酸分子引入来自合适的供体或待治疗的受试者的细胞中。为了治疗的目的可以将核酸引入其中的细胞包括例如适用于待治疗的疾病或病症的任何所需的可用细胞类型,包括但不限于上皮细胞;内皮细胞;角质形成细胞;成纤维细胞;肌肉细胞;肝细胞;血细胞,如T淋巴细胞、B淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨核细胞和粒细胞;以及各种干细胞或祖细胞,特别是造血干细胞或祖细胞,例如从骨髓、脐带血、外周血、胎肝和其它来源获得的干细胞。

[1368] 对于离体治疗,来自与待治疗受试者相容的供体的细胞或来自待治疗受试者的细胞被移除,将核酸引入这些分离的细胞中,并将修饰的细胞施用于受试者。治疗包括直接施用,例如将其封装在植入患者体内的多孔膜中(参见例如美国专利号4,892,538和5,283,187,所述专利均通过引用整体并入本文)。适用于在体外将核酸转移到哺乳动物细胞中的技术包括使用脂质体和阳离子脂质(例如DOTMA、DOPE和DC-Chol)电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE-葡聚糖和磷酸钙沉淀法。DNA递送方法可用于在体内表达本文提供的多肽或构建体。此类方法包括核酸的脂质体递送和裸DNA递送,包括局部和全身递送,例如使用电穿孔、超声和磷酸钙递送。其它技术包括显微注射、细胞融合、染色体介导的基因转移、微细胞介导的基因转移和原生质球融合。

[1369] 本文多肽或构建体的体内表达可与其它分子的表达相关联。例如,多肽的表达可以与细胞毒性产物的表达相关联,例如在工程化病毒中或在细胞毒性病毒中表达。此类病毒可以靶向作为治疗效果靶标的特定细胞类型。

[1370] 本文提供的多肽或构建体的体内表达可包括将多肽编码核酸分子可操作地连接于特定调节序列,例如细胞特异性或组织特异性启动子。多肽也可以从特异性感染靶细胞类型和/或组织和/或在其中复制的载体至表达。诱导型启动子可用于选择性调节多肽或构建表达。

[1371] 核酸分子,例如裸核酸,或载体、人工染色体、脂质体和其它载体可以通过全身施用、局部施用、病灶施用和其它施用途径给予受试者。当全身和体内施用时,核酸分子或含有核酸分子的载体可以靶向于细胞。施用可以包括静脉内施用和直接注射到组织中,例如直接注射到肝脏中,包括直接注射到区室化器官如肝脏或其一部分中的方法(参见例如美国专利号9,821,114)。

[1372] 施用也可以是直接的,例如通过施用通常靶向细胞或组织的载体或细胞。用于本文多肽或构建体的体内表达的细胞还包括患者自体细胞。此类细胞可从患者体内取出,引入表达多肽的核酸,然后施用于患者,例如通过注射或植入施用。

[1373] J. 组合物、配制和剂量

[1374] 提供的是药物组合物,其含有在药学上可接受的载体中的本文提供的任何多肽和构建体,包括TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体和多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体、包括融合蛋白,或编码多肽或构建体的核酸分子。此类组合物含有一定量的多肽、构建体或核酸,其可被稀释为治疗有效量,或被配制用于不经稀释直接施用。构建体或核酸的特定浓度取决于技术人员技能范围内的各种参数,包括例如治疗的适应症、构建体或核酸、施用途径和方案。施用途径包括全身和局部途径、口服、经直肠、静脉内、肌肉内、皮下、粘膜、腹膜施用和技术人员已知的任何合适的途径。

[1375] 选定的量,例如治疗有效量,如上所述取决于本文提供的构建体的各种参数,包括TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体和多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体、包括融合蛋白,或编码该构建体的核酸分子,将所述量配制在合适的载体中用于施用。所述药物组合物可以任何常规方式配制,通过将选定量的构建体或其混合物与一种或多种生理上可接受的载体或赋形剂或赋形剂混合进行配制。所述药物组合物可用于治疗、预防和/或诊断应用。活性化合物(即所述构建体或核酸)在组合物中的浓度取决于多种因素,包括上述因素,以及所述活性化合物的吸收、失活和排泄率、施用方案和施用量、受试

者的年龄和体型以及本领域技术人员已知的其它因素。

[1376] 适用于施用本文提供的化合物的药物载体或运载体包括本领域技术人员已知的适用于特定施用方式的任何此类载体。包含治疗有效量的本文所述的构建体或核酸分子的药物组合物也可以作为冻干粉末提供,其在施用前立即用例如无菌水重建。

[1377] 1. 配制

[1378] 含有本文提供的任何构建体和核酸的药物组合物可以任何常规方式配制,通过将选定量的活性化合物与一种或多种生理上可接受的载体或赋形剂混合而配制。载体或赋形剂的选择在专业人员的技能范围内,并且可以取决于许多参数。这些参数包括例如施用方式(即全身、口服、经鼻、肺、局部、病灶或任何其它方式)和治疗的病症。通常,药物组合物包括不显著损害构建体或核酸或编码的多肽的生物学性质或增强或改善其药理学性质的组分。所述配制剂也可以是与用于联合治疗的其它活性剂的复合制剂。

[1379] 本文提供的药物组合物可以是多种形式,例如但不限于固体、半固体、液体、乳液、粉末、水性和冻干形式。本文提供的药物组合物可以配制用于单剂量(直接)施用,或用于稀释,或其它方案。对于在稀释后或与另一种组合物混合后、或对于直接施用、施用后递送对预期治疗有效的量,所述制剂中化合物的浓度是有效的。所述组合物可以配制为单剂量或多剂量直接施用的量。所述化合物可以微粉化或其它合适的形式悬浮,或者可以衍生化以产生更易溶解的活性产物。所得混合物的形式取决于许多因素,包括预期的施用方式和化合物在所选载体或媒介物中的溶解度。所得混合物是溶液、悬浮液、乳液和其它此类混合物,并且可以配制成非水性或水性混合物、乳膏、凝胶、软膏、乳液、溶液、酞剂、洗剂、悬浮液、酞剂、糊剂、泡沫、气雾剂、灌注剂、喷雾剂、栓剂、绷带或任何其它适合全身、病灶或局部施用的制剂。对于局部内部施用,例如肌肉内、肠胃外或关节内施用,可以将所述构建体和核酸配制成在水基介质例如等渗缓冲盐水中的溶液悬浮液,或与生物相容性支持物或生物粘附剂组合进行内部施用。有效浓度是足以改善靶向病症并且可以凭经验确定的浓度。为了配制组合物,将重量分数的化合物以有效浓度溶解、悬浮、分散或以其它方式混合在选定的运载体中,使得靶向病症得到缓解或改善。

[1380] 通常,药学上可接受的组合物是根据监管机构或其它机构的批准而制备的,和/或根据公认的药典制备用于动物和人类。药物组合物可以包括与多肽一起施用的载体,例如稀释剂、佐剂、赋形剂或赋形剂。这样的药物载体可以是无菌液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、豆油、矿物油和芝麻油。当静脉内施用药物组合物时,水是典型的载体。盐水溶液和水性葡萄糖和甘油溶液也可用作液体载体,特别是用于可注射溶液。组合物可以含有活性成分以及稀释剂,例如乳糖、蔗糖、磷酸二钙和羧甲基纤维素;润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸钙和滑石粉;和结合剂,例如淀粉、天然树胶例如阿拉伯树胶、明胶、葡萄糖、糖蜜、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素及其衍生物、聚维酮、交联聚维酮和本领域技术人员已知的其它此类结合剂。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水和乙醇。如果需要,组合物还可以包含少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸钠、环糊精衍生物、失水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺乙酸钠、三乙醇胺油酸盐和其它此类制剂。这些组合物可以采用溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂和缓释制剂的形式。用于吸入器或吹入器的例如明胶的胶囊和药筒可以配制为

含有治疗化合物和合适的粉末基质例如乳糖或淀粉的粉末混合物。组合物可以配制成栓剂,具有传统的结合剂和载体,例如甘油三酯。口服制剂可包括标准载体,例如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁和其它此类制剂。用于口服施用的制剂也可以适当地与蛋白酶抑制剂一起配制,例如Bowman-Birk抑制剂、缀合的Bowman-Birk抑制剂、抑肽酶和卡莫司他。合适的药物载体的实例在E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中有所描述。这样的组合物将含有治疗有效量的化合物,通常为纯化形式,以及合适量的载体,以便提供适合给予受试者或患者的形式的化合物。

[1381] 本文提供的药物组合物可以包含其它添加剂,包括例如抗氧化剂、防腐剂、抗微生物剂、镇痛剂、结合剂、崩解剂、着色剂、稀释剂、赋形剂、增量剂、助流剂、增溶剂、稳定剂、张力剂、赋形剂、粘度剂、调味剂、乳液,如水包油或油包水乳液、乳化剂和悬浮剂,如阿拉伯胶、琼脂、海藻酸、海藻酸钠、膨润土、卡波姆、角叉菜胶、羧甲基纤维素、纤维素、胆固醇、明胶、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、辛基酚聚醚-9、油醇、聚维酮、单硬脂酸丙二醇酯、月桂基硫酸钠、失水山梨糖醇酯、硬脂醇、黄芪胶、黄原胶及其衍生物、溶剂及其它成分,如结晶纤维素、微晶纤维素、柠檬酸、糊精、葡萄糖、液体葡萄糖、乳酸、乳糖、氯化镁、偏磷酸钾和淀粉等(一般参见Alfonso R.Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins. 这样的载体和/或添加剂可以通过常规方法配制并且可以以合适的剂量施用于受试者。稳定剂,例如脂质、核酸酶抑制剂、聚合物和螯合剂,可以防止组合物在体内降解。

[1382] 所述配制剂应适合施用方式。例如,可以将活性化合物配制成用于通过注射进行肠胃外施用(例如,通过推注或连续输注)。可注射组合物可以采用诸如在油性或水性载体中的悬浮液、溶液或乳液的形式。无菌可注射制剂也可以是无菌可注射溶液,或在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的悬浮液,例如在1,4-丁二醇中的溶液。无菌的不挥发性油通常用作溶剂或悬浮介质。为此,可以使用任何温和的不挥发性油,包括但不限于合成的甘油单酯或甘油二酯、脂肪酸(包括油酸)、天然存在的植物油,例如芝麻油、椰子油、花生油、棉籽油和其它油,或合成脂肪载体,如油酸乙酯。根据需要可以掺入缓冲剂、防腐剂、抗氧化剂和合适的成分,或者可以包含在制剂中。

[1383] 活性化合物,例如本文提供的构建体和核酸,可以配制为组合物中的唯一药物活性成分,或者可以与其它活性成分组合。活性化合物可以被靶向用于递送,例如通过与靶向剂例如抗体缀合。脂质体悬浮液,包括靶向组织的脂质体,也适合作为药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法制备。例如,脂质体制剂可以通过本领域技术人员熟知的方法制备,例如美国专利号4,522,811中描述的那些。脂质体递送还可以包括缓释制剂,包括药物基质,例如胶原凝胶和用纤连蛋白修饰的脂质体(见例如Weiner et al. (1985) J. Pharm. Sci. 74 (9): 922-925)。本文提供的组合物还可含有一种或多种促进递送的佐剂,例如但不限于惰性载体或胶体分散系统。此类惰性载体的代表性和非限制性实例可选自水、异丙醇、气态碳氟化合物、乙醇、聚乙烯吡咯烷酮、丙二醇、凝胶产生材料、硬脂醇、硬脂酸、鲸蜡、失水山梨糖醇单油酸酯、甲基纤维素,以及其中两种或多种的合适组合。

[1384] 所述活性化合物包含在药学上可接受的载体中,其量足以在对所治疗的受试者没有不良副作用的情况下发挥治疗有用的作用。治疗有效浓度可以通过在已知的体外和体内

系统中测试化合物凭经验确定,例如本文所述的测定法。治疗有效量的确定在本领域技术人员的能力范围内。治疗有效剂量可通过使用本文所述的体外和体内方法来确定。因此,当在药物制剂中时,本文提供的活性化合物或其混合物可以以用于施用的单位剂量形式存在。

[1385] 2. TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、多特异性如双特异性构建体和核酸的施用

[1386] 活性化合物,包括本文提供的构建体、包括TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体和多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体、包括融合蛋白、以及编码该构建体的核酸分子,可以通过任何合适的途径施用。这些途径包括在体外、离体或体内,通过使混合物如体液或其它组织样品与本文提供的活性化合物接触而施用。例如,当离体施用化合物时,可以将受试者的体液例如玻璃体液或组织样品与包被在管或滤器例如旁路集中的管或滤器上的多肽接触。当在体内施用时,活性化合物可以通过任何合适的途径施用,例如口服、经鼻、肺、肠胃外、静脉内、皮内、玻璃体内、视网膜内、视网膜下、眼周、皮下、关节内、脑池内、眼内、心室内、鞘内、肌肉内、腹膜内、气管内、直肠或局部施用,或通过直接注射到器官中,以及通过其中任两种或更多种的任何组合途径,以液体、半液体或固体形式施用,并且以适合每种施用途径的方式配制。

[1387] 施用途径与已知方法一致,例如通过静脉内、腹膜内、脑内、肌肉内、皮下、眼内、动脉内、鞘内、吸入或病灶内途径、局部或通过缓释系统注射或输注。抗体或其片段通常通过输注或推注连续施用。如上所述,本文提供的活性化合物可以与药学上可接受的载体混合制备。化合物的配制和施用技术是本领域技术人员已知的。这种治疗组合物可以静脉内或通过鼻或肺部施用,例如作为液体或粉末气雾剂(冻干)施用。所述组合物也可以根据需要进行肠胃外或皮下施用。当全身施用时,所述治疗组合物应该是无菌的、无热原的,并且在适当考虑pH、等渗性和稳定性以及本领域技术人员已知的其它条件的肠胃外可接受的溶液中。

[1388] 治疗配制剂可以以许多常规剂型施用。通过将具有所需纯度的化合物与生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合来制备本文提供的活性化合物的剂型以储存或施用。这种材料在使用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且可以包括缓冲液,例如TRIS HCl、磷酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐和其它有机酸盐缓冲液;抗氧化剂,如抗坏血酸;低分子量(小于约十个残基)肽,例如聚精氨酸;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸或精氨酸;单糖、双糖和其它碳水化合物,包括纤维素或其衍生物、葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖醇,例如甘露醇或山梨糖醇;抗衡离子,例如钠和/或非离子表面活性剂,例如以商标TWEEN和PLURONICS销售的那些,以及聚乙二醇(PEG)。

[1389] 药物组合物可以含有稳定剂。所述稳定剂可以是氨基酸、氨基酸衍生物、胺、糖、多元醇、盐或表面活性剂。在一些实例中,稳定复合制剂包含单一稳定剂。在其它实例中,稳定复合制剂含有2、3、4、5或6种不同的稳定剂。例如,所述稳定剂可以是糖或多元醇,例如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇、肌醇、蔗糖或海藻糖。在具体实例中,所述稳定剂是蔗糖。在其它实例中,所述稳定剂是海藻糖。所述糖或多元醇的浓度为约100mM至500mM、100mM至400mM、100mM至300mM、100mM至200mM、200mM至500mM、200mM至400mM、200mM至300mM、250mM至

500mM、250mM至400mM、250mM至300mM、300mM至500mM、300mM至400mM或400mM至500mM,包括端点。

[1390] 在实例中,所述稳定剂可以是表面活性剂,其是聚丙二醇、聚乙二醇、甘油、山梨糖醇、泊洛沙姆(poloxamer)和聚山梨醇酯。例如,表面活性剂可以是聚丙二醇、聚乙二醇、甘油、山梨糖醇、泊洛沙姆或聚山梨醇酯,例如泊洛沙姆188、聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80。在特定实例中,所述稳定剂是聚山梨醇酯80。表面活性剂的浓度以所述配制中质量浓度(w/v)的百分比计,介于或大约介于0.005%至1.0%、0.01%至0.5%、0.01%至0.1%、0.01%至0.05%或0.01%至0.02%之间,包括端点。

[1391] 对于体内施用,所述配制剂应该是无菌的。这很容易完成,例如在冻干和重建之前或之后通过灭菌过滤膜过滤。所述配制剂可以冻干形式或溶液形式储存。可以使用其它载体,例如天然存在的植物油,例如芝麻油、花生油或棉籽油,或合成脂肪载体,例如油酸乙酯等。可以根据公认的制药实践掺入缓冲剂、防腐剂、抗氧化剂等。

[1392] 剂量的确定在医师的技能范围内,并且可以取决于特定病症、施用途径和受试者。示例的剂量包括例如0.1至100mg/kg,例如1至10mg/kg,或基于治疗的受试者体重的适当量;以人受试者的平均体重约为70-75kg计算。所述多肽可以施用一次或多次,例如两次、三次、四次或实现治疗效果所需的任何次数。多次施用可以通过任何途径或组合途径来实现,并且可以每小时、每2小时、每3小时、每4小时或更长时间施用一次。

[1393] 所述活性化合物可以在组合物中以例如从或从约0.1至10mg/mL的浓度提供,例如至少或至少约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10mg/mL,或更高。溶液的体积可为或约0.1至100mL或更多,例如至少或约至少或0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100mL或更多。在一些实例中,活性化合物在磷酸盐缓冲盐水中提供。例如,所述组合物可以在含有100mg多肽或融合蛋白的50mL小瓶或其它容器中提供,浓度为在磷酸盐缓冲盐水中2mg/mL。

[1394] 本文提供的活性化合物可以冻干储存并在使用前在合适的载体中重建。这个该技术已被证明对常规免疫球蛋白和蛋白质制剂有效,并且可以使用本领域已知的冻干和重建技术。

[1395] 本文提供的活性化合物可以作为控释或缓释组合物提供。本领域已知用于配制可实现受控或持续释放的丸剂和胶囊剂的聚合物材料(见例如Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball(eds.), Wiley, New York(1984);也见Levy et al. (1985) Science 228:190; During et al. (1989) Ann. Neurol. 25:351; Howard et al. (1989) J. Neurosurg. 71:105; 美国专利号5,679,377、5,916,597、5,912,015、5,989,463和5,128,326;及国际专利申请公开号W0 99/015154和W0 99/020253)。缓释制剂中使用的聚合物实例包括但不限于聚(2-羟基甲基丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共聚-乙酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酞、聚(N-乙基吡咯烷酮)、聚(乙醇醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚丙交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA),以及聚原酸酯。通常,缓释制剂中使用的聚合物是惰性的,不含可浸出的杂质,储存稳定,无菌且可生物降解。可以使用本领域已知的用于生产缓释制剂的任何技术来生产缓释制剂。

[1396] 可以将所述构建体和核酸及其生理上可接受的盐和溶剂化物形式配制为通过吸入(通过口或鼻)或其它施用途径施用,包括例如口服、透皮、肺部、胃肠外或直肠施用。对于吸入施用,活性化合物可以通过使用合适的推进剂例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体,以气溶胶喷雾形式从加压包装或喷雾器中递送。在加压气溶胶的情况下,剂量单位可以通过提供阀门来确定以递送计量的量。例如用于吸入器或吹入器的明胶胶囊和药筒可以配制为含有治疗化合物和合适的粉末基质如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[1397] 对于肺部施用,可以使用合适的推进剂从喷雾器、涡轮喷雾器或微处理器控制的定量口服吸入器以气溶胶喷雾形式递送构建体。通常,气溶胶的粒径较小,例如在0.5至5微米的范围内。在配制用于肺部施用的药物组合物的情况下,通常不使用清洁剂表面活性剂。肺部药物递送是一种很有前途的全身施用的非侵入性方法。肺代表了一种有吸引力的药物递送途径,主要是由于吸收表面积大、肺泡上皮薄、血管广泛、免疫肝脏首过代谢以及代谢活性相对较低。

[1398] 对于口服施用,药物组合物可以采用例如片剂、丸剂、液体悬浮剂或胶囊剂的形式,通过常规方法与药学上可接受的赋形剂例如结合剂(例如,预胶化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石粉或二氧化硅);崩解剂(例如,马铃薯淀粉或羟基乙酸淀粉钠);或润湿剂(例如十二烷基硫酸钠)一起制备。可以通过本领域熟知的方法对片剂进行包衣。用于口服施用的液体制剂可以采用例如溶液、糖浆或混悬液的形式,或者可以将其以干燥产物呈现,在使用前用水或其它合适的载体重建。这种液体制剂可以通过常规方法与药学上可接受的添加剂一起制备,例如悬浮剂(例如,山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪);乳化剂(例如卵磷脂或阿拉伯胶);非水性载体(例如杏仁油、油性酯、乙醇或分馏植物油);和防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯,或山梨酸)。如果合适,所述制剂还可含有缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。

[1399] 可以配制口服施用的制剂以控制活性化合物的释放。对于口腔施用,组合物可以采取以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。活性化合物可以配制成长效制剂。此类长效制剂可通过植入(例如皮下或肌内)或通过肌内注射施用。因此,例如,治疗化合物可以与合适的聚合材料或疏水材料(例如,在可接受的油中的乳液)或离子交换树脂一起配制,或者是难溶的衍生物,例如难微溶的盐。

[1400] 可以将活性化合物配制成用于通过注射经肠胃外施用(例如,通过推注或连续输注)。注射用制剂可以以添加防腐剂的单位剂型(例如在安瓿瓶或多剂量容器中)形式提供。所述组合物可以采用诸如在油性或水性载体中的悬浮液、溶液或乳液的形式,并且可以含有配制剂,例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,活性成分可以是粉末冻干形式,在使用前用合适的载体例如无菌无热原水重建。

[1401] 药物组合物可以凝胶、乳膏和洗液形式用于配制成局部或外用,例如局部应用于皮肤(透皮)和粘膜(例如眼部),以及用于眼部应用或用于脑池内或脊柱内应用。这种溶液、特别是那些旨在眼部使用的溶液,可以用适当的盐配制为0.01%至10%的等渗溶液和pH值约为5-7。可以将化合物配制成气雾剂用于局部施用,例如通过吸入(参见例如美国专利号4,044,126、4,414,209和4,364,923,其描述了用于递送可用于治疗炎症疾病、特别是哮喘

的类固醇的气雾剂)。

[1402] 药物组合中活性化合物的浓度取决于所述活性化合物的吸收、失活和排泄速率、施用方案和施用量以及本领域技术人员已知的其它因素。如本文进一步描述的,可以比较性质和活性而根据经验确定剂量。例如,可以与传统的抗TNF疗法(例如阿达木单抗)比较本文提供的构建体通过TNFR1对TNF介导的炎症信号传导的抑制作用。

[1403] 如果需要,所述组合物可以存在于包装、试剂盒或分配器装置中,其可以含有一个或多个含有活性成分的单位剂型。在一些实例中,可以将组合物涂覆在装置上,例如旁路机中的管或过滤器上。所述包装例如含有金属或塑料箔,例如泡罩包装。包装或分配器装置可附有施用说明。含有活性剂的组合物可以包装成含有包装材料、本文提供的药剂和指示提供的药剂所针对的病症的标签的生产制品。药物组合物可以单位剂量包装,其含有用于单剂量或多剂量施用的一定量的药物组合物。所述包装的组合物可以含有药物组合物的冻干粉末,所述药物组合物含有本文提供的构建体,包括TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体和多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体、包括融合蛋白和编码本文提供的构建体的核酸分子,所述药物组合物可以在施用前重建(例如,用水或盐水重建)。

[1404] 本文提供的生产制品含有包装材料。用于包装药物产品的包装材料是本领域技术人员熟知的(见例如美国专利号5,323,907、5,052,558和5,033,252)。药物包装材料的实例包括但不限于泡罩包装、瓶、管、吸入器(例如加压定量吸入器(MDI)、干粉吸入器(DPI)、雾化器(例如喷射或超声雾化器)和其它单次呼吸液体系统)、泵、袋、小瓶、容器、注射器、瓶和任何适于所选配制剂和预期施用和治疗模式的包装材料。

[1405] 活性化合物、包括本文提供的构建体,包括TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体和多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体,包括融合蛋白,以及编码该构建体的核酸分子、药物组合物以及活性剂和其它组合物(包括其它治疗剂)的组合,可以作为试剂盒提供。试剂盒可以任选包括一种或多种成分,例如使用说明、装置、附加试剂(例如用于稀释组合物和/或重建冻干蛋白的无菌水或盐水溶液),以及组件例如管、容器和注射器,用于实施所述方法。示例的试剂盒可以包括本文提供的构建体和编码核酸,并且任选可以包括使用说明、用于将化合物施用给受试者的装置、用于检测受试者体内的化合物的装置、用于检测得自受试者的样品中所述化合物或其代谢物的一个或多个装置,以及用于向受试者施用另外的治疗剂的装置。任选地,试剂盒可以包括使用说明。说明书通常包括描述活性化合物及任选包括在试剂盒中的其它组分以及施用方法、包括确定受试者的适当状态、适当剂量、施用方案和施用方法的有形表述。说明书还可以包括在治疗期间监测受试者的指导。

[1406] 试剂盒还可以包括本文所述的药物组合物和用于诊断的物品。例如,这样的试剂盒可以包括用于测量受试者中施用的活性化合物的浓度、量或活性的项目。本文提供的试剂盒还可包括用于施用化合物的装置。本领域已知的用于向受试者施用药物的多种装置中的任一种都可以包括在本文提供的试剂盒中。示例性装置包括但不限于皮下注射针、静脉注射针和导管。通常,用于施用的装置与期望的活性剂施用方法相容。

[1407] 3. 编码多肽的核酸的施用(基因治疗)

[1408] 药物组合物包括那些含有编码本文提供的多肽构建体的核酸分子的药物组合物。不是递送蛋白质,核酸分子可以在体内施用,例如全身或通过其它途径或离体施用,例如通

过去除细胞包括淋巴细胞,将核酸分子引入其中,并重新引入宿主或兼容的受体而施用。

[1409] 本文提供的多肽构建体,包括TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体和多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体,包括融合蛋白,可以通过核酸表达递送至细胞和组织。可以通过本领域技术人员已知的任何方法将核酸递送至细胞和组织。可以将分离的核酸掺入载体中以进行进一步操作。如上所述,通过表达编码核酸分子施用多肽的方法包括施用重组载体。所述载体可以被设计成保持附加型,例如通过包含复制起点,或者可以被设计成整合到细胞中的染色体中。所述多肽也可用于使用非病毒载体的离体基因表达疗法。合适的基因治疗载体和递送方法是本领域技术人员已知的,并且在上文部分中进行了讨论。

[1410] K. 治疗用途和治疗方法

[1411] 制备例如上述那些药物组合物并施用于患有疾病、病症或病况的受试者,所述疾病、病症或病况适合用分别抑制和/或激动TNFR1和TNFR2的构建体进行治疗。剂量取决于所治疗的特定病症、疾病或病况,以及特定受试者。典型剂量类似于已知的TNF阻滞剂,例如依那西普(Etanercept)。对于受试者,包括人和其它动物,示例的剂量范围为约或0.1mg/kg至100mg/kg,例如1mg/kg至约30mg/kg,例如5mg/kg至25mg/kg。剂量可以根据人平均体重约为75kg的假设来确定。可以针对儿童、婴儿和较小的成人调整剂量。

[1412] 本文提供的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂、双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体和融合蛋白可用于本领域技术人员已知的使用此类分子的任何目的,包括用于治疗本文所述任何疾病、病症和病症况。例如,本文提供的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂、多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体和融合蛋白可用于一种或多种的治疗、诊断、工业和/或研究目的。本文提供的治疗方法包括本文提供的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂、多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体和融合蛋白的治疗用途的方法。例如,本文所述的TNFR1拮抗剂可用于拮抗TNFR1,和/或抑制TNF与TNFR1的结合,和/或抑制TNF介导的通过TNFR1的促炎信号传导。TNFR2激动剂可用于激动TNFR2,以诱导保护性/抗炎症TNFR2信号传导,和/或诱导免疫抑制性TNFR2⁺调节性T细胞(Treg)的扩增、增殖和激活。在一些实施方案中,如本文所述,TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂的组合,或使用本文提供的双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体,提供了选择性抑制促炎TNFR1活性,同时维持或增加TNFR2相关的保护性信号和Treg免疫抑制活性,这有利于治疗慢性炎症和自身免疫性疾病,以及治疗神经退行性变和脱髓鞘疾病和病症。

[1413] 本文提供的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂、多特异性如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体和融合蛋白可以单独或与其它药剂组合具有治疗活性。本文提供的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂、双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体和融合蛋白以及编码核酸分子可用于治疗应用了抗TNF疗法(例如阿达木单抗、英夫利昔单抗、依那西普和本文所述和/或本领域已知的其它制剂)或其它改善病情的抗风湿药(DMARD;例如甲氨蝶呤、羟氯喹、柳氮磺胺吡啶、来氟米特(leflunomide)、阿巴西普(abatacept)、阿那白滞素(anakinra)、利妥昔单抗、托珠单抗、阿达木单抗、英夫利昔、依那西普和本文描述的和/或本领域已知的其它制剂)的任何病症,包括但不限于慢性炎症和自身免疫性疾病和病症,以及神经退行性变和脱髓鞘疾病和病症。例如,施用本文提供的治疗分子的受试者表现出关节、皮肤、肺和/或肠道的急性或慢性炎症,和/或患有自身免疫性疾病、类风湿性关节炎(RA)、银屑病、银屑

病性关节炎、幼年特发性关节炎 (JIA)、脊柱关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、炎症性肠病 (IBD)、葡萄膜炎、纤维化疾病、子宫内膜异位症、狼疮、多发性硬化症、充血性心力衰竭、心血管疾病、心肌梗塞 (MI)、动脉粥样硬化、代谢性疾病、细胞因子释放综合征、败血症休克、败血症、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、严重急性呼吸综合征 (SARS)、COVID-19、流感、急性和慢性神经退行性疾病、脱髓鞘疾病和病症、卒中、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、白塞氏病、Dupuytren's 病、肿瘤坏死因子受体相关周期性综合征 (TRAPS)、胰腺炎、I 型糖尿病、慢性阻塞性肺病 (COPD)、慢性支气管炎、肺气肿、移植物排斥、移植物抗宿主病 (GvHD)、呼吸系统疾病、肺部炎症、肺部疾病和病症、哮喘、囊性纤维化、特发性肺纤维化、急性暴发性病毒或细菌感染、肺炎、以 TNF/TNFR1 为致病病理介质的遗传性疾病、周期性发热综合征和癌症。

[1414] 与施用抗 TNF 疗法后可观察到的副作用相比,本文提供的构建体在施用时通常可导致受试者表现出减少或减轻的副作用。用本文提供的多肽,例如 TNFR1 拮抗剂、TNFR2 激动剂及其双特异性构建体和融合蛋白治疗疾病和病症,可以通过任何合适的施用途径,使用本文所述的合适制剂来实现,包括但不限于输注、皮下注射和吸入,或肌肉、皮内、口服、局部和透皮施用途径。

[1415] 如本文别处所讨论的,现有的抗 TNF 疗法,例如阿达木单抗,由于通过 TNFR1 和 TNFR2 阻断 TNF 信号传导而具有免疫抑制作用,并且与不良副作用的风险相关,包括例如增加的败血症和严重感染风险,如李斯特菌病、结核病复发、乙型/丙型肝炎复发、带状疱疹复发以及侵袭性真菌和其它机会性感染。抗 TNF 药物还可导致严重的充血性心力衰竭恶化,并可导致药物性狼疮、肝损伤、银屑病、结节病和脱髓鞘中枢神经系统 (CNS) 疾病,并增加发生其它自身免疫性疾病以及淋巴瘤和实体恶性肿瘤如非黑色素瘤皮肤癌的易感性。根据抗 TNF 药物的不同,大约 3-33% 的接受治疗的患者对治疗没有应答,高达 46% 的患者停止应答,导致停药或剂量增加。抗 TNF 疗法未能治疗神经退行性疾病和中枢神经系统疾病,例如阿尔茨海默病、帕金森病、卒中和多发性硬化症 (MS),这些疾病与 TNF 的过表达有关。由于与使用抗 TNF 药物相关的不良反应,一些患者无反应,有初始反应的患者缺乏持续反应,以及治疗失败和/或神经退行性疾病如 MS 恶化,则需要其它疗法。此类疗法在本文中提供。

[1416] 如本文所述, TNFR1 的选择性抑制保留了 TNFR2 信号传导的强力抗炎和保护活性,导致较少的机会性感染和癌症,并保留了 TNF 诱导的 Treg 功能。先前的选择性 TNFR1 拮抗剂具有免疫原性,包括抗药物抗体 (ADA) 的形成、药代动力学和药效学差,包括例如血清半衰期短、肾清除率快和/或结合亲和力和效力差。本文提供的疗法克服了与现有选择性 TNFR1 拮抗剂相关的局限性。使用本文提供的多肽例如 TNFR1 拮抗剂的治疗改进的实例包括但不限于更低剂量、更少和/或更低频率的施用、减少的副作用和增加的治疗效果。

[1417] 因此,本文提供的选择性 TNFR1 拮抗剂、TNFR2 激动剂和多特异性例如双特异性 TNFR1 拮抗剂/TNFR2 激动剂构建体和融合蛋白与副作用减少相关,必要时可在更高剂量方案下施用,并且可以提高疗效和安全性。与通过现有抗 TNF 疗法例如阿达木单抗和本文描述的和/或本领域已知的其它疗法观察到的副作用相比,可以减少、减轻或消除的副作用包括本文描述的或本领域已知的任何不期望的非治疗作用,例如但不限于败血症、严重感染、充血性心力衰竭/心脏毒性、抗体的产生以及癌症、自身免疫性疾病和/或脱髓鞘中枢神经系统 (CNS) 疾病的发展或恶化。在一些实例中,与由施用现有抗 TNF 疗法例如阿达木单抗引起

的副作用相比,施用本文提供的TNFR1拮抗剂、双特异性构建体或融合蛋白使一种或多种副作用的严重程度相对于抗TNF疗法的一种或多种副作用的严重程度降低至少或约99%,至少或约95%,至少或约90%,至少或约85%,至少或约80%,至少或约75%,至少或约70%,至少或约65%,至少或约60%,至少或约55%,至少或约50%,至少或约45%,至少或约40%,至少或约35%,至少或约30%、至少或约25%、至少或约20%、至少或约15%、或至少或约10%。

[1418] 剂量水平和方案可以基于已知的剂量和方案来确定,并且如果需要可以根据本文提供的多肽和构建体的性质的变化进行外推,和/或可以根据多种因素凭经验确定。这些因素包括例如个体的体重以及其一般健康状况、年龄、性别和饮食,以及所用特定化合物的活性、施用时间、排泄速率、药物组合、疾病的严重程度和病程,以及患者患病倾向和主治医师的判断。所述活性成分通常与药学上有效的载体组合。可与载体材料组合以产生单一剂量形式或多剂量形式的活性成分的量可根据所治疗的宿主和特定施用方式而变化。

[1419] 患者病情改善后,必要时可给予维持剂量的化合物或组合物;并且可以修改剂量、剂型或施用频率或其组合。在一些情况下,受试者可能需要根据疾病症状的任何复发情况或根据预定剂量方案进行长期间歇治疗。

[1420] 本节提供构建体、包括本文提供的多肽和编码核酸分子的示例性用途和施用方法。这些描述的疗法仅是示例性的并且不限制本文提供的分子/构建体的应用。鉴定可使用本文提供的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂、双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体和融合蛋白以及编码核酸分子治疗的疾病或病症在主治医师的技能范围内。

[1421] 1. 慢性炎症/自身免疫性疾病和病症的治疗

[1422] 如本文所述,TNF的升高水平或不受控制的表达以及TNF信号传导失调可导致慢性炎症,可导致自身免疫性疾病和组织损伤的发生。通过TNFR1的TNF信号传导主要是促炎的,并推动慢性炎症和自身免疫性疾病和病症的发展。例如,TNFR1信号传导与关节炎、炎症性肠病(IBD)和呼吸系统疾病等的发展及导致局部骨质破坏的破骨细胞的产生以及TNF诱导的心力衰竭和心肌梗塞模型中的心脏毒性作用有关。因此,TNFR1的选择性阻断可用于治疗慢性炎症和自身免疫性疾病和病症。通过主要具有抗炎作用的TNFR2进行的TNF信号传导与神经、心脏、肠道和骨保护作用有关。TNFR2信号传导的抗炎和保护作用已在例如实验性结肠炎、心力衰竭/心脏病、心肌梗塞、炎症性关节炎、感染性疾病、胰腺再生、干细胞增殖、自身反应性T细胞破坏、及调节破骨细胞生成以维持骨量、防止关节炎和侵蚀性破坏中得到证实。TNFR2激动作用还会导致免疫抑制性TNFR2⁺Treg的增殖和扩增,并促进Treg细胞抑制活性,从而消除自身反应性/效应T细胞,防止组织破坏,并抑制炎症和自身免疫性疾病和病症。因此,TNFR2激动作用也可用于治疗或减轻慢性炎症和自身免疫性疾病和病症的症状。

[1423] 本文提供的TNFR1拮抗剂、TNFR2激动剂、多特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体、融合蛋白和编码核酸可用于治疗或减轻与升高的TNF水平和失调的TNF信号传导相关的自身免疫/炎症疾病和病症的症状。本文提供的构建体、融合蛋白和核酸可用于治疗疾病、病症和病况,包括但不限于例如关节炎(例如类风湿性关节炎、银屑病关节炎、幼年特发性关节炎、脊柱关节炎)、炎症性肠病(例如,克罗恩病和溃疡性结肠炎)、葡萄膜炎、纤维化疾病(例如,Dupuytren病)、白塞氏病、子宫内膜异位症、狼疮、强直性脊柱炎、银屑病、肿瘤坏死因子受体相关周期性综合征(TRAPS)、心血管疾病、充血性心力衰竭、心肌梗塞(MI)、动脉

粥样硬化、呼吸系统疾病、哮喘、囊性纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、胰腺炎、I型糖尿病、代谢疾病、细胞因子释放综合征、感染性休克、败血症、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、严重急性呼吸系统综合征(SARS)、COVID-19、流感、慢性支气管炎、肺气肿、肺部炎症、特发性肺纤维化、移植物排斥、移植物抗宿主病(GvHD)、急性暴发性病毒或细菌感染、肺炎、以TNF/TNFR1作为致病病理介质的遗传性疾病和周期性发热综合征等。

[1424] TNF阻断还可以减少在某些病毒感染中观察到的细胞因子风暴,例如SARS病毒和COVID-19感染。这可以防止严重急性呼吸系统综合征(SARS)患者的呼吸机依赖、多器官损伤和死亡,例如由SARS-CoV-2和其它SARS病毒/冠状病毒引起的患者。TNF诱导的病毒综合征(TIVS)是由TNF驱动力的细胞因子风暴引起的,它不仅涉及肺部损伤,还涉及多器官衰竭。TIVS类似于SIRS(严重炎症性呼吸综合征)、SARS(严重急性呼吸综合征)和败血症(由细菌引起)。这些情况会影响肺功能,也会影响许多其它器官。严重急性呼吸综合征冠状病毒-2(SARS-CoV-2,可引起COVID-19)通过血管紧张素转换酶进入宿主细胞,该酶在肺部分泌II型表面活性剂的肺泡细胞中表达。严重的COVID-19与大量中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞和免疫介质的主要免疫炎症应答有关。COVID-19的死亡主要是由于弥漫性肺泡损伤伴肺水肿、透明膜形成和与早期成人呼吸窘迫综合征(ARDS)共存的间质单核细胞炎症浸润。TNF存在于COVID-19患者的血液和疾病组织中;TNF参与几乎所有的急性炎症反应,充当炎症放大器。因此,提供了用本文的构建体进行的治疗。

[1425] 2. 神经退行性和脱髓鞘疾病和病症的治疗

[1426] 如本文别处所讨论的,一些神经退行性变和脱髓鞘疾病和病症与中枢神经系统(CNS)中长期升高的TNF水平有关。升高的TNF水平和通过TNFR1的TNF信号传导与引发和维持神经炎症以及促进神经元细胞死亡、脱髓鞘和认知能力下降有关。例如,在阿尔茨海默病(AD)患者中,TNF促进小胶质细胞激活、突触功能障碍、神经元细胞死亡以及神经纤维斑块和缠结的积累,并且TNF水平升高会抑制AD患者大脑中淀粉样蛋白(AB)的吞噬作用,这阻碍了小胶质细胞有效去除斑块。在患有帕金森病(PD)的患者中,TNF水平升高会导致神经炎症和多巴胺能神经元毒性。TNF水平升高以及编码TNFR1的基因多态性与脱髓鞘和脱髓鞘疾病(如多发性硬化症(MS))的发展有关。因此,通过TNFR1选择性阻断TNF信号传导可用于治疗或缓解神经退行性和脱髓鞘疾病和病症,以及CNS的其它病症。

[1427] 通过TNFR2的TNF信号传导与抗炎和神经保护作用相关。例如,TNF激活TNFR2可抑制癫痫发作,减轻脑损伤后的认知功能障碍,并促进髓鞘再生以及神经元的存活。在TNFR2激动后,免疫抑制性Treg的增殖、扩增和激活也具有神经保护作用。例如,TNFR2信号传导在实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)中促进Treg细胞扩增和抑制活性,EAE是一种炎症性中枢神经系统脱髓鞘疾病(如多发性硬化症)的动物模型。因此,TNFR2激动剂也可用于治疗或缓解神经退行性变和脱髓鞘疾病和病症,以及CNS的其它病症。

[1428] 本文提供的TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体、融合蛋白和核酸可用于治疗或改善神经退行性变和脱髓鞘疾病的症状,及其它中枢神经系统疾病和病症,包括但不限于阿尔茨海默病、帕金森病、多发性硬化症和卒中。

[1429] 3. 癌症和其它免疫抑制疾病、病症和病况的治疗

[1430] 如本文所述,肿瘤被大量免疫抑制性TNFR2⁺Treg浸润,这会阻止肿瘤杀伤CD8⁺细胞

毒性T淋巴细胞(CTL)(也称为效应子T细胞(Teff))的增殖,从而允许肿瘤生长。TNFR2对肿瘤微环境(TME)中淋巴细胞的拮抗作用通过消除Treg恢复两种类型T细胞之间的平衡,并允许效应子T细胞的激活和扩增,从而导致肿瘤细胞裂解(见例如Vanamee et al. (2017) Trends in Molecular Medicine 23(11):P1037-P1046)。

[1431] TNFR2在许多类型的人癌细胞表面大量表达,包括例如肾细胞癌、结肠癌、霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、皮肤非霍奇金淋巴瘤和卵巢癌。癌症中的TNFR2突变与基因复制和组成型激活有关。小鼠骨髓来源的抑制细胞(MDSC)也表达TNFR2,其抑制已被证明可以控制小鼠肝癌模型中的转移。此外,免疫检查点抑制剂会导致TNFR2对肿瘤浸润性Treg的上调,从而导致肿瘤免疫逃逸和耐药性。并非所有患者都对免疫检查点抑制剂治疗有反应,患者可能会复发,并且在检查点抑制剂治疗中观察到严重的自身免疫副作用(见例如Vanamee et al. (2017) Trends in Molecular Medicine 23(11):P1037-P1046)。因此,TNFR2的阻断可用于治疗某些类型的癌症,通过直接杀死肿瘤细胞进行治疗,即通过抑制免疫抑制性Treg,这使得效应子T细胞增殖,以及通过抑制MDSC进行治疗,这可以防止转移的形成。因为TNFR2也在正常组织(尤其是巨噬细胞;见例如proteinatlas.org/ensg00000028137-tnfrsf1b/tissue)上表达,因此TNFR2拮抗剂不具有ADCC活性,但具有FcRn活性(或增强的FcRn活性)。施用是个性化的,因为如本文所述,为了获得治疗资格,患者肿瘤的TNFR2水平必须明显高于邻近的正常组织。为此,TNFR2拮抗剂将与其它疗法一起使用,尤其是免疫调节疗法,否则会导致调节性T细胞在肿瘤中积聚。

[1432] 因此,本文提供的TNFR2激动剂、双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体和融合蛋白也可用于治疗实体瘤、血液恶性肿瘤和其它过度增殖性疾病和病症,包括但不限于例如肾细胞癌、结肠癌、霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、皮肤非霍奇金淋巴瘤和卵巢癌。

[1433] 4. 联合治疗

[1434] 联合治疗包括施用本文提供的TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体、融合蛋白和核酸,与另一种药剂或治疗(包括放疗和手术)组合。可以与本文提供的治疗同时、之前、之后或间歇地施用另外的药剂或疗法。它们可以存在于单独的组合物中,也可以存在于共制剂中。

[1435] 本文提供的TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、多特异性如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体、融合蛋白和核酸可以在施用一种或多种其它治疗方案或制剂之前、之后、间歇或同时施用,包括但不限于TNF拮抗剂/阻滞剂、抗体、细胞毒性剂、抗炎剂、细胞因子、生长因子、生长抑制剂、心脏保护剂、免疫抑制剂、化学治疗剂、生物或非生物改善病情抗风湿药物(DMARD)、感染性疾病治疗药物(包括抗体)或其它治疗剂。本文提供的TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、多特异性如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体和核酸可作为一线治疗或二线治疗施用于抗TNF治疗无效的患者,无论是急性治疗还是慢性治疗。可用于本文联合治疗的示例的抗TNF治疗包括例如常规合成的DMARD,例如(通用名和示例商标):甲氨蝶呤(MTX)、羟氯喹(HCQ; Plaquenil®)、柳氮磺吡啶(Azulfidine®),和来氟米特(Arava®);生物DMARD,例如阿巴西普(Orencia®)、阿那白滞素(Kineret®)、利妥昔单抗(Rituxan®、Truxima®、MabThera®)、托珠单抗(atlizumab、Actemra®、RoActemra®)、皮质类固醇(例如地塞米松、甲基泼尼松龙、泼尼松龙、泼尼松或曲安奈德(triamcinolone))、托法替尼(Xeljanz®)和TNF抑制剂/抗TNF剂,例如聚乙二醇赛妥珠单抗

(Cimzia®)、英夫利昔单抗 (Remicade®)、阿达木单抗 (Humira®)、戈利木单抗 (Simponi®) 和依那西普 (Enbrel®)。联合疗法还可以包括免疫治疗药物,例如环孢菌素、甲氨蝶呤、阿霉素或顺铂,以及免疫毒素。

[1436] 可用于联合治疗的抗炎药和制剂的实例包括非甾体抗炎药 (NSAID),包括水杨酸盐,例如阿司匹林,传统的NSAID,例如布洛芬、萘普生、酮洛芬、萘丁美酮、吡罗昔康、双氯芬酸或吲哚美辛,和Cox-2选择性抑制剂,例如塞来昔布(以商标Celebrex®销售)或Rotecoxin(以商标Vioxx®销售)。其它可用于联合治疗的化合物包括抗代谢物,例如甲氨蝶呤和来氟米特;皮质类固醇或其它类固醇,如可的松、地塞米松或泼尼松;镇痛药,例如对乙酰氨基酚;氨基水杨酸盐,例如美沙拉嗪;和细胞毒剂,例如硫唑嘌呤(以商标Imuran®销售)、环磷酰胺(以商标Cytoxan®销售)和环孢菌素A。

[1437] 可用于联合治疗的其它制剂包括生物应答调节剂,包括例如抗炎细胞因子,如IL-10;B细胞靶向剂,如抗CD20抗体(如利妥昔单抗);靶向T抗原的化合物;粘附分子阻滞剂;趋化因子受体拮抗剂;激酶抑制剂,例如有丝分裂原活化蛋白(MAP)激酶、c-Jun N-末端激酶(JNK)或NFκB的抑制剂;和过氧化物酶体增殖物激活受体-γ (PPAR-γ)配体。可用于联合治疗的其它制剂包括免疫抑制剂。免疫抑制剂可包括例如他克莫司或FK-506;麦考酚酸;钙调磷酸酶抑制剂(CNI);CsA;和西罗莫司,或其它已知抑制免疫系统的制剂。

[1438] 本文提供的多肽和构建体还可以与被施用以治疗心血管疾病和/或在治疗心血管疾病期间施用的药剂例如抗凝血剂组合使用。示例的抗凝血剂包括但不限于肝素、华法林、醋硝香豆素、苯茛二酮、EDTA、柠檬酸盐、草酸盐,和直接凝血酶抑制剂,例如阿加曲班(argatroban)、来匹卢定(lepirudin)、比伐卢定(bivalirudin)和希美加群(ximelagatran)。

[1439] 本文提供的多肽和构建体可以与抗体一起施用,用于治疗自身免疫性疾病或炎症疾病、移植排斥或GvHD。此类抗体的实例包括但不限于抗α4β7整合蛋白抗体,例如LDP-02;抗β2整合蛋白抗体,例如LDP-01;抗补体(C5)抗体,例如5G1.1;抗CD2抗体,例如BTI-322和MEDI-507;抗CD3抗体,例如OKT3和SMART抗CD3;抗CD4抗体,如IDEC-151、MDX-CD4和OKT4A;抗CD11a抗体;抗CD14抗体,如IC14;抗CD18抗体;抗CD23抗体,例如IDEC 152;抗CD25抗体,例如达珠单抗;抗CD40L抗体,例如5c8、卢利珠单抗和IDEC-131;抗CD64抗体,例如MDX-33;抗CD80抗体,如IDEC-114;抗CD147抗体,例如ABX-CBL;抗E-选择素抗体,例如CDP850;抗gpIIb/IIIa抗体,例如ReoPro®/Abcixima;抗ICAM-3抗体,例如ICM3;抗ICE抗体,如VX-740;抗FcγR1抗体,例如MDX-33;抗IgE抗体,例如rhuMAb-E25;抗IL-4抗体,例如SB-240683;抗IL-5抗体,例如SB-240563和SCH55700;抗IL-8抗体,例如ABX-IL8;抗干扰素γ抗体;抗TNFα抗体,例如CDP571、CDP870、D2E7、英夫利昔单抗和MAK-195F;和抗VLA-4抗体,例如Antegren®。可以共同施用以治疗自身免疫或炎症疾病、移植排斥和GvHD的其它含Fc分子的实例包括但不限于TNFR2-Fc融合蛋白Enbrel®(依那西普)和Regeneron的IL-1TRAP。

[1440] 可以共同施用以治疗感染性疾病的抗体的实例包括但不限于抗炭疽抗体,例如ABthrax;抗CMV抗体,例如CytoGam和司韦单抗(sevirumab);抗隐孢子虫抗体,例如CryptoGAM和Sporidin-G;抗幽门螺杆菌抗体,如Pyloran;抗乙型肝炎抗体,例如HepeX-B和Nabi-HB;抗HIV抗体,例如HRG-214;抗RSV抗体,例如泛维珠单抗(felvizumab)、HNK-20、帕

利珠单抗(palivizumab)和RespiGam;和抗葡萄球菌抗体,如Aurexis、Aurograb、BSYX-A110和SE-Mab。

[1441] 在一些实例中,本文提供的TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体、融合蛋白和核酸与一种或多种化疗剂一起施用。化学治疗剂的实例包括但不限于烷化剂,例如噻替派和环磷酰胺(CYTOXAN®);烷基磺酸盐,例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);雄激素,例如卡普睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、硫雄甾醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiothane)和睾内酯(testolactone);抗肾上腺药,如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)和曲洛司坦(trilostane);抗雄激素药,如氟他胺(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)和戈舍瑞林(goserelin);抗生素,例如阿克拉霉素(aclacinomycins)、放线菌素(actinomycin)、蒽霉素(anthracycline)、重氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素(cactinomycin)、加利车霉素(calicheamicin)、卡柔比星(carubicin)、胭脂红霉素(carminomycin)、嗜癌素(carzinophilin)、染色霉素(chromomycins)、更生霉素(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依柔比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycin)、麦考酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培普霉素(peplomycin)、泊非霉素(porfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、克拉霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、津诺他汀(zinostatin)和佐柔比星(zorubicin);抗雌激素,包括例如他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、抑制4(5)-咪唑的芳香酶、4-羟基他莫昔芬、三苯氧胺(trioxifene)、酮昔芬(keoxifene)、LY 117018、奥那司酮(onapristone)和托瑞米芬(toremifene, Fareston);抗代谢物,如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如去甲蝶呤(denopterin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、蝶呤(pteropterin)和三甲蝶呤(trimetrexate);氮杂环丙烷类,例如苯并多巴(benzodepa)、卡博醌(carboquone)、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替派(uredepa);乙烯亚胺和甲基三聚氰胺,包括六甲蜜胺、三乙烯三聚氰胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺和三羟甲基三聚氰胺;叶酸补充剂,例如亚叶酸(folinic acid);氮芥类,例如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、氯萘嗪(chloronaphazine)、氯磷酰胺(chlorophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、盐酸氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新比星(novembichin)、苯内酯(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷酰胺(trofosfamide)和尿嘧啶芥(uracil mustard);亚硝基脲类,例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲佐菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷尼莫司汀(ranimustine);铂类似物,例如顺铂和卡铂;长春碱;铂;蛋白质,例如精氨酸脱亚氨酶和天冬酰胺酶;嘌呤类似物,例如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)和硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,例如安西他滨(ancitabine)、阿扎

胞苷 (azacitidine)、6-氮杂尿苷 (azauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、多西氟尿苷 (doxifluridine)、依西他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine) 和 5-FU; 紫杉烷 (taxanes), 例如紫杉醇 (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 和多西紫杉醇 (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 拓扑异构酶抑制剂, 如 RFS 2000; 胸苷酸合成酶抑制剂, 例如 Tomudex; 另外的化疗剂, 包括乙酰丙酮 (aceglatone); 醛磷酰胺苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基戊酮酸 (aminolevulinic acid); 安吡啶 (amsacrine); 阿莫司汀 (bestrabucil); 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatrexate); 去环磷酰胺 (defosfamide); 去甲秋水仙 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 依氟鸟氨酸 (eflornithine); 依利醋铵 (elliptinium acetate); 依托糖 (etoglucid); 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖 (lentinan); 洛尼达明 (lonidamine); 米妥瓜酮 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫匹达莫 (mopidamol); 硝克林 (nitracrine); 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 鬼臼酸 (podophyllinic acid); 2-乙基酰肼 (ethylhydrazide); 丙卡巴肼 (procarbazine); 多糖 K (PSK, Krestin); 雷佐生 (razoxane); 西唑仑 (sizofiran); 螺锗 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸; 三亚醌 (triaziquone); 2, 2', 2''-三氯三乙胺; 氨基甲酸乙酯; 长春地辛 (vindesine); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露莫司汀 (mannomustine); 米托布罗糖醇 (mitobronitol); 米托内醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 ("Ara-C"); 环磷酰胺; 噻替哌; 苯丁酸氮芥 (chlorambucil); 吉西他滨 (gemcitabine); 6-硫鸟嘌呤; 巯嘌呤 (mercaptopurine); 甲氨蝶呤 (methotrexate); 依托泊苷 (etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 丝裂霉素 C; 米托蒽醌 (mitoxantrone); 长春新碱 (vincristine); 长春瑞滨 (vinorelbine); 诺维宾 (Navelbine); 诺凡酮 (Novantrone); 替尼泊苷 (teniposide); 道诺霉素 (daunomycin); 氨蝶呤 (aminopterin); 希罗达 (Xeloda); 伊班膦酸盐 (ibandronate); CPT-11; 视黄酸; 埃斯培霉素 (esperamycins); 卡培他滨 (capecitabine); 拓扑异构酶抑制剂, 如伊立替康 (irinotecan)。也可以使用任何上述的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[1442] 化疗剂可以作为前药施用。可与本文提供的 TNFR1 拮抗剂构建体、TNFR2 激动剂构建体、多特异性如双特异性 TNFR1 拮抗剂/TNFR2 激动剂构建体、融合蛋白和核酸一起施用的前药的实例包括但不限于例如含磷酸盐的前药、含硫代磷酸盐的前药、含硫酸盐的前药、含肽的前药、D-氨基酸修饰的前药、糖基化的前药、含 β -内酰胺的前药、任选取代的含苯氧基乙酰胺的前药, 或任选取代的含有苯乙酰胺的前药, 以及 5-氟胞嘧啶和其它 5-氟尿苷前药, 它们可以转化为更具活性的无细胞毒性药物。TNFR1 拮抗剂构建体、TNFR2 激动剂构建体、多特异性如双特异性 TNFR1 拮抗剂/TNFR2 激动剂构建体可以作为前药提供, 例如通过将它们连接于靶向剂, 其靶向疾病的特定组织或部位, 具有体内可切割的接头, 从而释放活性形式构建体。

[1443] 在一些实例中, 本文提供的 TNFR1 拮抗剂构建体、TNFR2 激动剂构建体、多特异性如双特异性 TNFR1 拮抗剂/TNFR2 激动剂构建体、融合蛋白和核酸与一种或多种抗生素一起施用, 所述抗生素包括但不限于仅限于: 氨基糖苷类抗生素 (例如, 安普霉素 (apramycin)、阿贝卡星 (arbekacin)、班博霉素 (bambermycins)、布替罗星 (butirosin)、地贝卡星

(dibekacin)、庆大霉素(gentamicin)、卡那霉素(kanamycin)、新霉素(neomycin)、奈替米星(netilmicin)、巴龙霉素(paromomycin)、核糖霉素(ribostamycin)、西索米(sisomicin)和大观霉素(spectinomycin),氨基环醇类(例如大观霉素(spectinomycin)),氨基酚类抗生素(例如叠氮氯霉素(azidamfenicol)、氯霉素(chloramphenicol)、氟苯尼考(flurfenicol)和甲砒霉素(thiamphenicol)),安沙霉素类抗生素(例如利福米特(rifamide)和利福平(rifampin)),碳青霉烯类(例如亚胺培南(imipenem)、美罗培南(meropenem)和帕尼培南(panipenem));头孢菌素类(例如,头孢克洛(cefaclor)、头孢羟氨苄(cefadroxil)、头孢孟多(cefamandole)、头孢曲唑(cefatrizine)、头孢西酮(cefazedone)、头孢唑仑(cefazopran)、头孢匹咪唑(cefpimizole)、头孢匹胺(cefpiramide)、头孢匹罗(cefpirome)、头孢丙烯(cefprozil)、头孢呋辛(cefuroxime)、头孢克肟(cefixime)、头孢氨苄(cephalexin)和头孢拉定(cephradine)),头霉素类(例如头孢布哌酮(cefbuperazone)、头孢西丁(cefodoxitin)、头孢美诺(cefminox)、头孢美唑(cefmetazole)和头孢替坦(cefotetan));林可酰胺类(例如,克林霉素(clindamycin)和林可霉素(lincomycin));大环内酯类(例如阿奇霉素(azithromycin)、布雷菲德菌素(brefeldin)A、克拉霉素(clarithromycin)、红霉素(erythromycin)、罗红霉素(roxithromycin)和妥布霉素(tobramycin));单环内酯类(例如氨曲南(aztreonam)、卡鲁莫南(carumonam)和替格莫南(tigemonam));莫匹罗星(mupirocin);氧头孢烯类(例如, floxacef、拉氧头孢(latamoxef)和拉氧头孢(moxalactam));青霉素类(例如,氨苄青霉素(aminocillin)、匹美西林(aminocillin pivoxil)、阿莫西林(amoxicillin)、巴卡西林(bacampicillin)、苄青霉素酸(benzylpenicillinic acid)、苄青霉素钠(benzylpenicillin sodium)、依匹西林(epicillin)、芬贝西林(fenbenicillin)、氟唑西林(floxacillin)、培那西林(penamecillin)、氢碘酸喷沙西林(penethamate hydriodide)、邻苯乙胺青霉素(penicillin o-benethamine)、青霉素O、青霉素V、青霉素V苯甲酸盐、海巴青霉素V(penicillin V hydrabamine)、青环素(penimepicycline)和非奈西林钾(phenethicillin potassium));多肽(例如,杆菌肽(bacitracin)、粘菌素(colistin)、多粘菌素(polymixin)B、替考拉宁(teicoplanin)和万古霉素(vancomycin));喹诺酮类(例如阿米沙星(amifloxacin)、契诺沙星(cinoxacin)、环丙沙星(ciprofloxacin)、依诺沙星(enoxacin)、恩诺沙星(enrofloxacin)、氟罗沙星(fleroxacin)、氟甲喹(flumequine)、加替沙星(gatifloxacin)、吉米沙星(gemifloxacin)、格雷帕沙星(grepafloxacin)、洛美沙星(lomefloxacin)、莫西沙星(moxifloxacin)、萘啶酸(nalidixic acid)、诺氟沙星(norfloxacin)、氧氟沙星(ofloxacin)、氧合酸(oxolinic acid)、培氟沙星(pefloxacin)、吡哌酸(pipemidic acid)、罗沙星(rosoxacin)、鲁氟沙星(rufloxacin)、司帕沙星(sparfloxacin)、替马洛星(temafloxacin)、托苏沙星(tosufloxacin)和曲伐沙星(trovafloxacin));利福平;链阳菌素(例如奎奴普汀(quinupristin)和达福普汀(dalfopristin));磺胺类药物(例如磺胺和磺胺甲恶唑);和四环素类(例如,金霉素(chlortetracycline)、去甲金霉素盐酸盐(demeclocycline hydrochloride)、去甲基金霉素(demethylchlortetracycline)、多西环素(doxycycline)、耐久霉素(Duramycin)、米诺环素(minocycline)、新霉素(neomycin)、土霉素(oxytetracycline)、链霉素(streptomycin)、四环素(tetracycline)和万古霉素

(vancomycin)。

[1444] 在一些实例中,本文提供的TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体、融合蛋白和核酸可以与一种或多种抗真菌剂一起施用,所述抗真菌剂包括但不限于两性霉素(amphotericin)B、环吡酮(ciclopirox)、克霉唑(clotrimazole)、益康唑(econazole)、氟康唑(fluconazole)、氟胞嘧啶(flucytosine)、伊曲康唑(itraconazole)、酮康唑(ketoconazole)、咪康唑(miconazole)、制霉菌素(nystatin)、特比萘芬(terbinafine)、特康唑(terconazole)和噻康唑(tioconazole)。在一些实例中,本文提供的TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体和核酸与一种或多种抗病毒剂一起施用,包括但不限于蛋白酶抑制剂、逆转录酶抑制剂等,包括I型干扰素、病毒融合抑制剂、神经氨酸酶抑制剂、阿昔洛韦(acyclovir)、阿德福韦(adefovirovir)、金刚烷胺(amantadine)、安普那韦(amprenavir)、克拉夫定(clevudine)、恩夫韦地(enfuvirtide)、恩替卡韦(entecavir)、膦甲酸(foscarnet)、更昔洛韦(ganciclovir)、碘苷(idoxuridine)、茛地那韦(indinavir)、洛匹那韦(lopinavir)、普可那利(pleconaril)、利巴韦林(ribavirin)、金刚乙胺(rimantadine)、利托那韦(ritonavir)、沙奎那韦(saquinavir)、曲氟尿苷(trifluridine)、阿糖腺苷(vidarabine)和齐多夫定(zidovudine)。

[1445] 本文提供的TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体、融合蛋白和核酸可以与下文描述的生长因子陷阱构建体组合施用,以及还与下文所述的任何治疗性抗TNF剂和治疗组合施用,用于与生长因子陷阱构建体的联合治疗。所述联合疗法还可以包括本文提供的生长因子陷阱构建体。

[1446] 含有本文提供的TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体、融合蛋白和核酸的药物组合物可用于治疗本文所述或本领域技术人员已知的任何疾病、病症和病况。所述疾病、病症和病况包括一种或多种慢性炎症、自身免疫、神经退行性变或脱髓鞘疾病或病症。还提供了本文提供的多肽和构建体与另一种治疗或化合物的组合,用于治疗慢性炎症、自身免疫性、神经退行性或脱髓鞘疾病或病症。本文提供的TNFR1拮抗剂构建体、TNFR2激动剂构建体、多特异性例如双特异性TNFR1拮抗剂/TNFR2激动剂构建体、融合蛋白和核酸,以及额外的药剂可以包装为单独的组合物用于一起、或相继或间歇施用。或者,它们可以作为单一组合物施用,或作为单一组合物施用的两种组合物。所述组合可以包装成试剂盒,任选与额外的试剂、使用说明、小瓶和其它容器、注射器和其它用于治疗的物品一起包装。

[1447] L. 实施例

[1448] 包括以下实施例仅用于示例说明目的,并不旨在限制本发明的范围。

[1449] 实施例1

[1450] 候选单价TNFR1拮抗剂分子的表达和评价

[1451] 抗TNFR1分子的表达和纯化

[1452] 将候选单价TNFR1拮抗剂分子在CMV启动子控制下在哺乳动物细胞中表达,使用图1中描述的表达质粒(其中TE19080L是插入的片段)。对于蛋白质治疗剂例如本文的构建体的表达,哺乳动物细胞例如中国仓鼠卵巢(CHO)或人胚肾293(HEK293)细胞用于提供翻译后

修饰,包括糖基化,这对于正确的蛋白质结构、功能和活性可能是重要的。在细菌、酵母或昆虫细胞中的表达导致无糖基化(对于细菌细胞),或者与在哺乳动物细胞中的表达相比导致不同的糖基化模式(对于酵母或昆虫细胞)。在细菌中的表达也会导致蛋白质治疗剂被细菌内毒素污染,这会激活先天免疫细胞,使基于细胞的分析复杂化,并导致体内施用时的热原效应。

[1453] 使用如Vazquez-Lombardi et al. (2018) Nat. Protoc. 13(1):99-117描述的方法进行表达质粒构建以及瞬时和稳定细胞系表达。产生了五个示例的TNFR1拮抗剂分子用于初始评估。TNFR1拮抗剂分子包括H398衍生的scFv (SEQ ID NO:678),含有H398的一个V_L和一个V_H结构域,通过(GGGGS)₃肽接头连接在一起;TNFR1拮抗剂域抗体(dAb) DOM1h-574-16 (SEQ ID NO:57);TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-549 (SEQ ID NO:58);融合蛋白 (SEQ ID NO:704),含有来自DMS5541 (本文别处描述)的TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-208 (SEQ ID NO:54),通过(GGGGS)₃肽接头与DMS5541的抗血清白蛋白dAb (albudAb) (DOM7h-11-3; SEQ ID NO:52)融合;及融合蛋白 (SEQ ID NO:705),含有称作DOM1h-131-206 (SEQ ID NO:59)的抗TNFR1 dAb,通过(GGGGS)₃肽接头与DMS5541的抗血清白蛋白dAb (albudAb或DOM7h-11-3; SEQ ID NO:52)融合。在H398scFv和DOM1h-574-208及DOM1h-131-206融合蛋白中插入(GGGGS)₃接头,分别在V_H和V_L结构域以及两个dAb之间提供更大的柔性,并增加分子的稳定性和变性抗性,改进了生产工艺。下表12中提供了这些TNFR1拮抗剂分子每个的序列,其中一些具有不同的接头序列(另见Enever et al., (2015) Protein Engineering, Design & Selection 28(3):59-66,其描述了dAb及其修饰,可用于进一步修饰和添加接头和修饰剂)。

[1454] 表12

TNFR1 拮抗剂分子	序列	SEQ ID NO.
H398-衍生的 scFv	QVQLQESGAELARPGASVKLSCASGYTFTDFYINWVKQR TGQGLEWIGEIYPYSGHAYYNEKFKAKATLTADKSSSTAFM QLNSLTSEDSAVYFCVRWDFLDYWGQGTTLTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIVMTQSPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLLSN GNTYLHWYVQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGV PDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPYTFGGGTKEIKR	678
DOM1h-574-16	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYSMGWVRQA PGKGPEWVSQISNTGDRTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWEPFDYWGQGLVTVSS	57
DOM1h-549	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVDYEMHWVRQA PGKGLEWVSSISESGTTTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKRRFSASTFDYWGQGLVTVSS	58
DOM1h-574-208- albudAb 融合蛋白	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFDKYSMGWVRQA PGKGLEWVSQISDTADRTY YAHAVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWVPFEYWGQGLVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRPI GTTLSWYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR	704
DOM1h-131-206 dAb - albudAb 融合 蛋白	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFAHETMVWVRQA PGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYHCALLPKRGPWFYWGQGLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASR PIGTTLSWYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR	705

[1455] 还提供了纳米抗体和含有纳米抗体的构建体,其包含两条重链,选自SEQ ID NO:53-83和503-671任一所示序列,例如SEQ ID NO:57-59,及其具有至少95%、96%、97%、

98%、99%序列相同性的变体。提供包含相同重链的构建体。这些示例是称作DOM1h-131-206的TNFR1 dAb。还提供了含有任何这些dAb的构建体,例如直接连接或更一般地通过接头例如GS接头连接于人血清白蛋白或作为Fc融合体提供的那些构建体,或本文所述任何其它构建体。

[1457] 这些和其它此类dAb和TNFR1结合分子可以被修饰以通过消除对TNFR2的任何拮抗活性来增加对TNFR1的特异性,和/或以增加或加入TNFR2激动剂活性,和/或可以被修饰以减少或消除免疫原性表位,和/或可以连接于活性调节剂,例如Fc单元和修饰的Fc单元/修饰的Fc二聚体,和/或血清半衰期延长部分。

[1458] HEK293细胞系用于瞬时表达,并且在对表达的拮抗剂进行体外评估并鉴定具有所需特性的分子后,例如对TNFR1具有高亲和力(例如 $K_d < 50\text{nM}$,或 $< 10\text{nM}$,或 $< 5\text{nM}$),以及对TNFR1信号传导的有效抑制(例如 $IC_{50} < 50\text{nM}$,或 $< 10\text{nM}$,或 $< 5\text{nM}$),在CHO细胞的衍生物中制备稳定细胞系。通常,其是皮摩尔(pM)亲和力,例如约19pM亲和力或20pM、15pM、10pM、5pM、2pM或1pM亲和力。

[1459] 在CHO DG44细胞(例如CHO-DG44(DHFR⁻)和FreeStyleTMCHO-S细胞,Invitrogen)中优化瞬时表达,从而产生转染库,对其进行筛选以鉴定或选择高表达克隆。使用非聚组氨酸或其它纯化标签。相反,用于筛选的蛋白质是通过HPLC组合其它熟知方法从无血清培养基中纯化的。用于HPLC的基质是AmsphereTMA3蛋白A层析树脂(JSR Life Sciences),或遵循制造商协议的其它类似树脂。如果通过尺寸排阻HPLC判断蛋白质不是至少95%纯的,则进行进一步纯化(例如离子交换或疏水层析)。

[1460] 去除内毒素(见例如Vazquez-Lombardi et al. (2018)的示例方案)。蛋白质纯化后,使用检测试剂盒例如QCL-1000Endpoint Chromogenic LAL Assay Kit(Lonza)确定内毒素水平。对于去除内毒素,使用序列分析工具(例如ExPASy ProtParam)确定纯化的蛋白质的理论pI,并将pH低-内毒素PBS缓冲液调整至pH低于但接近纯化的蛋白质的理论pI。然后将蛋白质样品在4℃用至少30体积的pH值调整的PBS透析至少2小时。过夜进行额外的透析步骤,然后在第二天再次进行至少2小时透析。然后使用阴离子交换亲和层析纯化样品,重新测试以确定内毒素水平,重复所述过程直到达到可接受的内毒素水平。蛋白质产物的大小和纯度通过SDS-PAGE分析或其它合适的方法确定。或者,可以使用其它方法,例如Proteus Endotoxin Removal Kit和随附的制造商手册(BIORAD,参见bio-rad-antibodies.com/static/uploads/ifu/pur030.pdf)。可以重复这个步骤直到内毒素达到所需水平,通常 > 0.5 内毒素单位/ml(小于或等于0.5内毒素单位/ml)。

[1461] 纯化蛋白质的筛选

[1462] 筛选纯化的TNFR1拮抗剂分子候选物以测量对TNFR1胞外结构域的结合亲和力,使用上文详述中描述的方法,或本领域已知的方法,例如免疫测定法(例如ELISA)、表面等离子共振(SPR)、等温滴定量热法(ITC)或本领域已知的其它动力学相互作用测定。可以使用多种可商购平台进行SPR,例如BIAcore系统(GE Healthcare Life Sciences)。例如,在Lang et al. (2015) J. Biol Chem 291:5022-5037中描述了示例性测定,其中描述并比较了评估结合亲和力的各种测定法。选择的候选物包括具有 K_d 值 $< 5\text{nM}$ 的那些。

[1463] 还筛选TNFR1拮抗剂以确定与TNFR1的结合相对于TNF是竞争性的还是非竞争性的,使用本领域已知的方法例如SPR进行。如果抑制剂与受体(例如TNFR1)结合并阻断配体

(例如TNF)的结合,例如通过附着于活性位点,这就是竞争性抑制,因为所述抑制剂与底物“竞争”酶;也就是说,在给定时刻只有所述抑制剂或底物可以被结合。在非竞争性抑制中,抑制剂不阻断配体与受体上的配体结合位点结合。相反,其附着在另一位点并阻断受体应答结合的配体。这种抑制被称为“非竞争性”,因为所述抑制剂和底物可以同时被结合。因此,如果配体以饱和浓度添加到受体结合测定中,并且其不抑制抗体的结合,那么这两个分子是独立且非竞争性的。反之亦然。如果两者具有竞争性,则增加抗体浓度将阻止TNF与受体结合。无论是对细胞还是在表面上结合受体或配体进行结合测定,这都是有效的。对于示例性测定,见例如Frey et al. (2001) *Current Protocols in Neuroscience*, “Receptor Binding Techniques”, 可得自doi.org/10.1002/0471142301.ns0104s00。

[1464] 例如,首先确定TNF结合在BIAcore芯片上包被的人TNFR1的能力。然后将TNFR1表面用TNFR1拮抗剂分子饱和,随后注射TNF,并重新评估TNF与TNFR1的结合。如果所述结合是非竞争性的,则其都与TNFR1结合;如果是竞争性的,则其会互相干扰。如果TNF的结合不受影响,或仅轻微降低,则拮抗剂与TNFR1的结合相对于TNF是非竞争性的,如果TNF的结合被废除或显著降低,则认为拮抗剂的结合相对于TNF是竞争性的。出于本文的目的,选择了竞争性结合剂。

[1465] 使用本领域已知的方法,例如McFarlane et al. (2002) *FEBS Lett.* 515 (1-3): 119-126描述的方法,进一步筛选TNFR1拮抗剂分子以确定其在细胞上存在TNF的情况下抑制TNFR1信号转导的能力,所述方法导致NF κ B-荧光素酶表达的激活(即报告基因测定)。这些实验中使用的细胞不表达TNFR1或TNFR2(例如骨髓瘤细胞系AM01、U266和L363;见例如Rauert et al. (2011) *Cell Death Dis.* 2 (8):e194),除非用表达TNFR1或TNFR2的质粒转染。或者,可以使用人细胞系,其中TNFR1和/或TNFR2基因通过使用CRISPR载体、反义RNA表达或本领域已知的其它方法被失活或敲除。也可以使用得自商业来源(例如Genway和Synthego)的TNFR1⁻和/或TNFR2⁻细胞系。然后可以用TNFR1和/或TNFR2表达盒特异性转染这些细胞系。例如,表达TNFR1、TNFR2或TNFR1和TNFR2的细胞可用于评估拮抗剂对TNFR1的选择性,并确定通过TNFR1抑制TNF信号转导的效力。

[1466] 为了确定TNFR1拮抗剂对TNFR1信号转导的抑制,使用Lipofectamine将表达人TNFR1的细胞用NF- κ B-荧光素酶报告构建体瞬时转染,并在转染后48小时测量受体刺激的荧光素酶转录。将稳定表达TNFR1和NF- κ B-荧光素酶的细胞以 1×10^5 个细胞/ml培养基的密度接种到24孔板中,并温育直至达到80%汇合(约24小时)。然后将细胞与50ng/ml TNF和不同浓度的TNFR1拮抗剂一起温育6小时。通过用冰冷的PBS洗涤细胞两次,加入200 μ l冰冷的裂解缓冲液(25mM Tris-磷酸盐pH 7.8, 8mM MgCl₂, 1mM DTT, 1% Triton X-100, 15%甘油),并在冰上温育5分钟,由此检测NF- κ B刺激的荧光素酶活性。然后将细胞提取物刮入1.5ml Eppendorf管中,离心以沉淀细胞碎片,并将100 μ l上清液用于使用发光计测量荧光素酶诱导。然后通过绘制相对发光单位(RLU)与TNFR1拮抗剂浓度的关系,并使用曲线拟合软件例如GraphPad Prism计算IC₅₀。用于评估TNFR1信号转导抑制的其它类似测定包括测量磷酸化-I κ B α 的诱导的测定,这表明在用TNF处理的表达TNFR1的细胞中经典NF- κ B途径的激活(见例如Rauert et al. (2011) *Cell Death Dis.* 2 (8):e194)。

[1467] 选择表现出如上述确定的至少80%的TNFR1信号抑制和IC₅₀值大约等于K_d(即< 5nM)的TNFR1拮抗剂候选物用于进一步优化。

[1468] 实施例2

[1469] 选择的候选单价TNFR1拮抗剂分子的优化

[1470] 对TNFR1的亲合力和TNFR1信号传导抑制的效力的优化

[1471] 对满足上述选择标准(即对TNFR1的高亲合力和对TNFR1信号传导的有效抑制, K_d 和 IC_{50} 值 $<5nM$)的候选TNFR1拮抗剂分子进行优化以增加对TNFR1的亲合力和TNFR1信号传导抑制的效力。这是通过包括随机诱变、定点诱变、分子建模和/或易错PCR中的一种或多种方法实现的,以实现 K_d 和 IC_{50} 值低至 $<1nM$,通常至少等于或 $<100nM$ 、 $<50 nM$ 、 $<10 nM$ 、 $<5 nM$ 。例如,这可以通过以下方法实现(参见Tiller et al. (2017)Frontiers Immunol.8:986),其中对结合最关键的氨基酸是保守的,而 V_H 结构域的其余氨基酸则受到诱变,并制备噬菌体文库,筛选选择的对TNFR1的高亲和力结合变体。根据这种方法,产生了用于选择此类变体的噬菌体展示文库。在第一步中,计算与试验性丙氨酸扫描诱变鉴定了互补决定区(CDR)中允许诱变同时保持抗原结合的位点。接下来,基于天然抗体多样性,使用简并密码子对最容许的CDR位置进行突变,以编码野生型残基和每个CDR位置的少量最常出现的残基。这种诱变方法导致抗体文库具有大量CDR突变的变体,包括具有单个突变的抗体结构域,以及具有数十个突变的其它抗体结构域。在最后一步中,对酵母表面展示的文库(约1000万个变体)进行淘选,以鉴定亲和力增加最多的CDR突变。

[1472] 半衰期延长

[1473] 然后将优化的分子连接至半衰期延长部分,例如通过与IgG Fc结构域融合,特别是修饰的Fc结构域,或人血清白蛋白(HSA),或通过聚乙二醇化,如上文详细描述中所述,以实现在SCID小鼠中的体内血清半衰期为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多天,例如10-12天。然后在上述体外测定中重新测试修饰的分子,以确保保留与TNFR1的高亲和力结合和对TNFR1信号传导的有效抑制。成功候选物的生产被放大以用于进一步的体外和体内测定。

[1474] 体外测定

[1475] 吞噬作用测定

[1476] 如详细描述中所讨论和描述的,抑制TNFR1活性的现有TNF阻断剂也抑制TNFR2。TNF阻滞剂有两个来自监管机构的黑框警告。第一个是抗TNF(TNF阻滞剂)治疗的患者对感染的易感性。由于细菌、分枝杆菌(例如结核病)、真菌(例如组织胞浆菌病、曲霉菌病、念珠菌病、球孢子菌病、芽生菌病和肺孢子菌病)、病毒(例如乙型肝炎)和其它机会致病菌(通常在健康人不会引起疾病,但当人的免疫系统(抵抗力)减弱时会导致严重疾病的生物体)所致,这些感染可能涉及各种器官系统和部位。另一个发布的黑框警告与儿童恶性肿瘤有关(见例如online.epocrates.com/u/10b3301/Hum-ira/Black+Box+Warnings)。正如详细描述中所讨论的,这种弱点是由于当其配体TNF被阻断时,TNFR1和TNFR2的信号传导完全阻断所致。这种对TNF的先天免疫作用的抑制由TNFR2介导(见例如Ahmad et al. (2018)Front. Immunol.9:2572),并且主要由优先激活TNFR2的跨膜形式的TNF介导(见例如Miller et al. (2015)Journal of Immunology 195(6):2633-2647)。

[1477] 已经表明,抗TNF疗法,如阿达木单抗(adalimumab)、英夫利昔单抗(infliximab)和依那西普(etanercept),对佛波醇豆蔻酸醋酸酯分化的人THP-1细胞中 $IFN-\gamma$ 诱导的吞噬体成熟具有抑制作用。在存在或不 $IFN-\gamma$ 的情况下,阿达木单抗和英夫利昔单抗而非依那西普抑制原代人外周血单核细胞来源的巨噬细胞中的吞噬体成熟(见例如Harris

et al. (2008) *J. Infect. Dis.* 198:1842-1850)。鉴于上述情况,特定TNFR1抑制剂构建体的优势在于保留了TNFR2功能,因此也保留了巨噬细胞功能;巨噬细胞对于清除生物体的机会性感染很重要。机会致病菌包括引起结核病的分枝杆菌(见例如Fraga et al. (2018) *Curr. Issues Mol. Biol.* 25:169-198)。在接受TNF阻滞剂治疗的患者的自身免疫性疾病中,巨噬细胞功能受到破坏。TNFR1特异性拮抗剂仅抑制TNFR1功能,从而避免破坏正常巨噬细胞功能所需的TNFR2功能。这些TNFR1特异性拮抗剂可通过测定抗TNF对巨噬细胞吞噬作用的影响来鉴定。在已鉴定的TNFR1特异性拮抗剂中,有一些也刺激TNFR2功能,从而增强巨噬细胞活性(TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂)。

[1478] 确定TNFR1拮抗剂对巨噬细胞应答结核分枝杆菌感染的影响的测定

[1479] TNF在介导炎症宿主应答各种病原体(包括结核分枝杆菌)中起重要作用;TNF还在结核病(TB)的免疫病理学中发挥作用。分枝杆菌感染诱导巨噬细胞分泌TNF。TNF增强巨噬细胞吞噬和杀死分枝杆菌的能力。TNF还刺激巨噬细胞凋亡,导致树突状细胞对分枝杆菌抗原的杀伤和呈递增加。肉芽肿的形成和维持也需要TNF;在长期结核分枝杆菌感染的小鼠中,TNF的中和会破坏肉芽肿的完整性,使感染恶化并增加死亡率。TNF阻滞剂,如阿达木单抗和英夫利昔单抗,通过抑制人巨噬细胞中含有分枝杆菌的吞噬体成熟,增加了对包括结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)在内的各种病原体感染的易感性,并增加了潜伏性结核病再激活的风险。吞噬体成熟(即吞噬体酸化和与溶酶体融合)对于将分枝杆菌抗原呈递给T细胞和启动适应性免疫反应至关重要(见例如Harris et al. (2008) *J. Infect. Dis.* 198:1842-1850)。

[1480] 为了鉴定和/或表征TNFR1拮抗剂,评估了本文提供的TNFR1拮抗剂对巨噬细胞应答结核分枝杆菌感染的影响。分析了人巨噬细胞中含有分枝杆菌的吞噬体成熟,并与TNF阻滞剂如阿达木单抗中的吞噬体成熟进行比较,使用Harris et al. (2008) *J. Infect. Dis.* 198:1842-1850描述的方法。与已知的TNF阻滞剂如阿达木单抗相比,不增加感染易感性的TNFR1拮抗剂很受关注。

[1481] THP-1细胞和单核细胞衍生的巨噬细胞(MDM)的制备

[1482] 将人THP-1细胞在含有10%胎牛血清(FBS;Gibco)的RPMI 1640(Invitrogen)中培养。通过用100nmol/L佛波醇豆蔻酸醋酸酯(PMA)处理24小时,将细胞分化成巨噬细胞样细胞,然后在正常培养基中培养3天。为了制备人单核细胞衍生的巨噬细胞(MDM),在Histopaque®-1077(Sigma)上使用密度梯度离心从健康供体的血液中分离外周血单核细胞(PBMC)。通过粘附在明胶包被的培养皿上分离单核细胞,并在含有5%人AB血清(Sigma)的RPMI 1640中培养过夜。将贴壁细胞用在PBS中的10mmol/L EDTA移除,并在12孔板的盖玻片上生长10天。将THP-1细胞和MDM以 2×10^5 个细胞/孔的浓度在盖玻片上生长。

[1483] 分枝杆菌的制备

[1484] 将绿色荧光蛋白(GFP)标记的牛分枝杆菌卡介苗(GFP-BCG)和减毒的结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)菌株H37Ra及其毒性对应物H37Rv在含有0.5% Tween、0.2%甘油和10%白蛋白-葡萄糖-过氧化氢酶补充剂(BD)的Middlebrook 7H9肉汤中生长。使所述分枝杆菌在使用前生长至对数期,并在感染前重悬于含有10% FBS的RPMI 1640中。根据制造商方案,将所述结核分枝杆菌菌株H37Ra用PKH67(Sigma)荧光标记,并将菌株H37Rv用异硫氰酸荧光素(FITC,1mg/mL;Sigma)标记。

[1485] 吞噬体成熟的测定

[1486] 分枝杆菌可以抑制吞噬体与溶酶体的融合,阻止溶酶体水解酶的酸化和募集。这种对吞噬体成熟的阻断可以通过用IFN- γ 预处理巨噬细胞来克服。用TNF (5ng/mL)处理感染分枝杆菌的细胞也增强吞噬体酸化。为了确定TNFR1拮抗剂和TNF阻滞剂对分枝杆菌吞噬体与巨噬细胞中溶酶体融合的影响,将PMA分化的THP-1细胞或人外周血MDM感染GFP-BCG或PKH67标记的结核分枝杆菌菌株H37Ra或FITC标记的结核分枝杆菌菌株H37Rv,在存在TNFR1拮抗剂或TNF阻滞剂的情况下,使用或不使用IFN- γ 处理,以及通过共聚焦显微镜分析吞噬体-溶酶体融合,使用LysoTracker® Red (LT)作为酸化吞噬体的标记物,CD63和组织蛋白酶D作为吞噬溶酶体标记物。IFN- γ 诱导的吞噬体成熟/酸化的抑制通过LysoTracker® Red、CD63或组织蛋白酶D标记的分枝杆菌的共定位来确定。例如,与对照相比,LT、CD63或组织蛋白酶D标记的分枝杆菌的共定位百分比降低表示抑制了IFN- γ 诱导的吞噬体酸化。

[1487] 在感染之前,将TNFR1拮抗剂或TNF阻滞剂(例如阿达木单抗、英夫利昔单抗、依那西普或其它;10 μ g/mL),含或不含IFN- γ (200U/mL),加入THP-1细胞或MDM中24小时。作为对照,将细胞仅用培养基处理,或用来自产生IgG1的骨髓瘤患者的10 μ g/mL人IgG1 (Calbiochem)处理。然后用牛分枝杆菌GFP-BCG、PKH67标记的结核分枝杆菌H37Ra或FITC标记的结核分枝杆菌H37Rv感染细胞15分钟,用PBS洗涤3次以去除未结合的分枝杆菌,并温育2小时。在通过抗酸细菌染色法感染巨噬细胞后15分钟,用显微镜记录感染复数(MOI)。大约70%的细胞以MOI为1-5个杆菌被感染。

[1488] 温育2小时后,将细胞在2%多聚甲醛中在室温(RT)固定20分钟;对于菌株H37Rv,将细胞在4%多聚甲醛中固定过夜。然后用在PBS中的0.1% Triton X-100透化细胞,并用在PBS中的1%牛血清白蛋白和1%山羊血清在RT封闭30分钟。将细胞与一抗(针对CD63的1 μ g/mL小鼠单克隆抗体(LAMP-3; Santa Cruz Biotechnology);或针对组织蛋白酶D (Calbiochem)的10 μ g/mL小鼠单克隆抗体)在RT温育1小时,然后与二抗抗体(4 μ g/mL Alexa Fluor 488或568标记的山羊抗小鼠IgG; Invitrogen)在RT温育1小时。或者,在固定之前,将细胞与LysoTracker® Red DND-99 (100nmol/L; Invitrogen)一起温育,最后与分枝杆菌一起温育60分钟。LysoTracker® Red DND-99是一种红色荧光染料,用于标记和追踪活细胞中的酸性细胞器(如酸化吞噬体)。

[1489] 将盖玻片用荧光封片剂(Dako)安装在载玻片上,记录激光扫描共聚焦显微镜的图像,例如Olympus FluoView™1000和Zeiss LSM 510激光扫描共聚焦显微镜。使用适当的软件和Adobe Photoshop分析和制备图像。

[1490] TNF的测量

[1491] 将THP-1细胞如上所述制备并感染BCG或结核分枝杆菌H37Ra,有或没有IFN- γ 预处理。根据制造商的说明,使用商业ELISA试剂盒(R&D systems)测量上清液中免疫反应性TNF的水平(应答分枝杆菌感染而分泌)。

[1492] 区分TNF阻断(如阿达木单抗、英夫利昔单抗或依那西普治疗)和特异性TNFR1抑制的调节性T细胞(Treg细胞)测定和细胞因子测定

[1493] 1. FoxP3表达的保存

[1494] 将TNF阻断(使用阿达木单抗、利妥昔单抗或依那西普)与作为功能调节性T细胞的

替代标记的FoxP3启动子甲基化的特异性TNFR1抑制进行比较。组成型表达人TNFR1 (HuTNFR1)的转基因小鼠用于评估TNF阻断与特异性TNFR1抑制对FoxP3启动子甲基化的不同影响。转基因小鼠通过标准方法制备,可通过承包商服务或任何方法制备,例如通过Cyagen、Genoway或Polygene。

[1495] 在患有胶原蛋白诱导的关节炎(CIA)的转基因小鼠中评估了这种效果,CIA是一种广泛使用的RA模型。具有C57/BL6N.Q;H-2q/HuTNFR1/Hunt背景的小鼠由Genoway或Taconic Labs制备。如Tseng et al. ((2019) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 116:21666-21672)所述,将小鼠将用在完全弗氏佐剂(CFA)中乳化的牛II型胶原蛋白免疫。FoxP3甲基化的测定也如Tseng et al. ((2019) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 116:21666-21672)所述进行。来自TNF阻断处理的小鼠的调节性T细胞表达的FoxP3水平低于具有特定TNFR1阻断的调节性T细胞,如通过中值荧光强度(MFI)和FoxP3在CD4+CD25+细胞中的直方图所确定。

[1496] 2. TNFR1与TNF阻滞剂备用调节性T细胞的特异性抑制

[1497] 使用McCann et al. ((2014) Arthritis&Rheumatology 66(10):2728-2738)描述的方法,在用TNF阻滞剂和TNFR1特异性抑制剂处理转基因(C57/BL6N.Q;H-2q/HuTNFR1/Hunt)CIA小鼠后,比较淋巴结和脾脏中调节性T细胞的数量。

[1498] 3. 在胶原蛋白诱导的关节炎中炎症细胞因子在TNF阻断与特异性TNFR1抑制中上调

[1499] 将具有胶原蛋白诱导性关节炎(CIA)的转基因小鼠(C57/BL6N.Q;H-2q/HuTNFR1/Hunt)(见例如McCann et al. (2014) Arthritis&Rheumatology 66(10):2728-2738)用TNF阻滞剂和TNFR1特异性拮抗剂治疗。评估血清炎症细胞因子(IFN- γ 、IL-12p70、IL-10、RANTES(CCL5);见例如McCann et al. (2014) Arthritis&Rheumatology 66(10):2728-2738)。特异性阻断TNFR1的拮抗剂诱导显著减少的IFN- γ 、IL-12p70、IL-10或RANTES(CCL5)中的一种或多种。这是由于脾和淋巴结中的备用TNFR2功能和调节性T细胞功能所致。

[1500] 体内测定

[1501] 使用人源化(HuTNFR1/HuTNF)转基因小鼠进行研究。评估了TNFR1拮抗剂分子在多种自身免疫性疾病模型中的疗效。这些模型包括上述模型,其表达TNFR1和TNF的人转基因。自身免疫性疾病的替代模型是已知的。例如,Schinnerling et al. ((2019) Front. Immunol 10:203)详细描述了包括RA模型在内的模型。为了确定功效,将特异性TNFR1拮抗剂构建体以及本文提供的其它构建体在不止一种模型中进行了测试。所述模型中至少包括类风湿性关节炎(RA)、克罗恩病和多发性硬化症(实验性自身免疫性脑炎)模型(在详细描述中讨论)。

[1502] 炎症性肠病(IBD,包括溃疡性结肠炎和克罗恩病)是TNF阻滞剂的第一个获批适应症。这些疾病的许多小鼠模型可获得并且已经由Mueller((2002) Immunology 105(1):1-8)描述。正如详细描述中所讨论的,自身免疫性神经退行性疾病,包括多发性硬化症(MS)和阿尔茨海默氏病,是重要的疾病靶标。阿尔茨海默病(AD)是全世界痴呆症的主要原因,也是老年人最严重的健康问题之一。据估计,有540万美国人患有AD,如果没有医学上的突破来终止、预防或减缓这种疾病,到2050年这一数字预计将成为三倍(见例如Chang et al. (2017) J. Cent. Nerv. Syst. Dis. 9:1179573517709278)。证据表明TNFR1拮抗剂构建体和本文提供

的其它构建体是治疗候选者,因为经历过TNF阻断剂长期治疗的受试者不太可能患上这种疾病(见例如Chou et al. (2016) *CNS Drugs* 30:1111)。数据表明,上调的TNF表达与不同的神经退行性疾病和病症相关,例如阿尔茨海默病、帕金森病、卒中和多发性硬化症(见例如McCoy et al. (2008) *J. Neuroinflammation* 5(1):45)。然而,现有的TNF阻滞剂似乎不能有效治疗、改善、预防或减缓疾病进展(见例如Tortarolo et al. (2015) *J. Neurochem.* 135:109-124)。如本文所述,各种证据表明TNF阻滞剂由于TNFR1和TNFR2的共同抑制而在此类适应症中不起作用;TNFR2具有通过TNF阻滞剂治疗而丧失的神经保护性质。其它人试图用各种形式的“TNFR1抑制剂”或“TNFR2激动剂”来解决这个问题。这些研究都没有包括交叉反应性以确定TNFR1或TNFR2是否被选择性靶向,而不是作为体内许多可以靶向的表位之一。

[1503] 在此解决了这个问题。首先,生成了一个抗TNFR1拮抗剂家族,并在上述模型中进行了测试,表明它们的作用与预期一致。然后,使用免疫化学证明它们是选择性的。一些合同研究实验室提供这种服务(例如Sino Biological, Inc. 和LSBio)。

[1504] 如详细描述中所讨论的,其它自身免疫和慢性炎症性疾病状态与TNF的存在相关。这些包括II型糖尿病和子宫内膜异位症。这些疾病的小鼠模型是已知的,并且这些小鼠的HuTNFR1/HuTNF转基因版本用于证明本文提供的特异性抗TNFR1拮抗剂的功效。

[1505] 急性呼吸窘迫综合征

[1506] 呼吸道病毒病原体(例如流感、SARS病毒/冠状病毒)感染呼吸道上皮细胞,而组织驻留的肺泡巨噬细胞是肺部病毒感染的第一反应者。它们通过调理病毒颗粒或受感染的凋亡细胞的吞噬作用以及释放过多的炎性细胞因子和趋化因子以启动免疫应答来实现清除(见例如Herold et al. (2015) *Eur. Resp. J.* 45:1463-1478)。TNF阻滞剂已被证明可以延长感染流感的小鼠的存活期(见例如Shi et al. (2013) *Crit. Care* 17:R301)。TNF阻断剂已用于治疗SARS-Cov 2(见例如Feldmann et al. (2020) *Lancet* 395:1407-1409)。如详细描述中所述,TNF阻断剂的已知作用是减少调节性T细胞(Treg),这是有问题的,因为Treg是炎症的天然抑制剂。因此,如本文描述和提供,不与TNFR2相互作用或激动TNFR2的TNFR1特异性抑制剂对于所述目的是优越的。为了测试本文提供的构建体,将小鼠工程化为缺乏内源性TNFR1,并表达HuTNFR1/HuTNF。这些小鼠在感染流感后会表现出由HuTNF/HuTNFR1诱导的急性呼吸窘迫综合征(如Shi et al. (2013) *Crit. Care* 17:R301所述)。施用不拮抗TNFR2的TNFR1特异性拮抗剂构建体。功效由以下几个标准确定:

[1507] 1. 相对于TNF阻滞剂显著减少的循环炎性细胞因子(例如IFN- γ 、IL-1 α 、IL1- β 和IL-17);

[1508] 2. 与TNF阻滞剂相比,通过体重增加测量的明显更快的恢复(见例如Shi et al. (2013) *Crit. Care* 17:R301);和

[1509] 3. 与TNF阻断剂相比,显著增加的存活率(见例如Shi et al. (2013) *Crit. Care* 17:R301)。

[1510] 用于疾病模型的表达人TNFR1和人TNFR2的转基因小鼠是通过本领域已知的标准基因工程方法产生的,例如Atretkhany et al. (2018) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115(51):13051-13056描述的方法。各种疾病和病症的特定体内测定如下。例如,人源化RA小鼠模型例如RA的胶原蛋白诱导性关节炎(CIA)模型、或本领域已知和/或本文描述的任何其它RA动物模型,用于评估本文提供的TNFR1拮抗剂分子的治疗效果,并将其与抗TNF疗法如依

那西普或阿达木单抗的治疗效果进行比较。在一个或多个肢体出现临床关节炎后,每天向动物施用本文提供的TNFR1拮抗剂分子或抗TNF疗法,例如依那西普或阿达木单抗,持续总共10天。最初受影响的关节的肿胀程度通过使用卡尺测量爪厚度来监测。自小鼠取血清,用于测量促炎细胞因子和趋化因子,例如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素-10(IL-10)、IL-1 β 、IL-6、IL-8、RANTES(CCL5)和单核细胞趋化蛋白1(MCP-1;也称为CCL2)。然后比较施用TNFR1拮抗剂分子的小鼠与施用依那西普或阿达木单抗的小鼠的小鼠模型中RA的消退情况。

[1511] 本文提供的TNFR1拮抗剂分子还在严重急性呼吸系统综合症(SARS)和病毒诱导的细胞因子风暴的人源化小鼠模型中进行了测试。例如,SARS小鼠模型是通过用不同剂量例如 10^2 、 10^3 、 10^4 和 10^5 个斑块形成单位(PFU)的SARS-CoV感染人源化hTNFR1(或hTNFR1/hTNFR2)敲入(knock-in)小鼠来生成的。将TNFR1拮抗剂分子施用于受感染的小鼠,评估存活率,并与施用抗TNF疗法例如阿达木单抗的小鼠的存活率进行比较。

[1512] 病毒诱导的细胞因子风暴小鼠模型包括例如淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)诱导的细胞因子风暴综合征(CSS)模型。LCMV诱导的CSS小鼠模型是通过将 2×10^5 PFU的LCMV-Armstrong经腹膜内施用至8-12周龄穿孔素缺陷($Prf^{-/-}$)或 Prf - $Tmem178$ 双敲除小鼠而产生的。为了耗竭单核细胞/巨噬细胞,在LCMV感染前两天以及感染48和96小时后,将100 μ l氯膦酸盐脂质体静脉注射到 $Prf^{-/-}$ 小鼠中。或者,在感染前2天施用1mg中和抗CSF1抗体(克隆5A1,BioXCell),并在48和96小时后施用0.5mg抗体。在感染后第3天和第8天通过下颌下静脉穿刺对动物取血以测量血清细胞因子(见例如Mahajan et al. (2019) J.Autoimmun.100:62-74)。

[1513] 实施例3

[1514] 免疫原性序列的鉴定和去除

[1515] 如本文所述,蛋白质治疗剂中的免疫原性序列,例如B细胞和/或T细胞表位,可以负面影响治疗剂的活性、功效和体内半衰期,例如通过形成中和治疗剂和/或加速其从体内清除的抗-药物抗体(ADA)而影响。免疫原性序列也不利于蛋白质疗法的安全性和耐受性,因为它们可以诱发不良的免疫应答,从而导致临床并发症,例如延迟输注样过敏反应、变态反应以及在某些情况下还会导致危及生命的自身免疫。因此,根据免疫原性筛选候选蛋白质治疗剂,并且例如通过诱变去除/置换已鉴定的免疫原性序列,以改善所述治疗剂的体内功效和安全性,并确保其从临床前研究成功转化进入临床。

[1516] 使用例如在详细描述中描述的方法、或本领域技术人员已知的方法,包括使用计算机免疫原性预测工具和体外免疫原性测试等方法鉴定免疫原性序列。例如,如本文别处所述,使用例如ABCpred、APCPred、BCPREDS、BepiPred、LBtope、BcePred、EPMLR、BEST、COBEpro和SVMTriP或本文描述的和/或本领域技术人员已知的任何其它可用的计算机线性B细胞表位预测工具,预测线性B细胞表位。使用例如CEP、DiscoTope、BEpro、ElliPro、SEPPA、CBTOPE、EPITOPIA、EPCES、EPSVR、EPMeta、PEASE、EpiPred、3DEX、PEPOP、PEPOP 2.0和EpiSearch或本文所述和/或本领域技术人员已知的任何其它可利用的计算机构象B细胞表位工具,预测构象B细胞表位。使用例如EpiMatrix、JanusMatrix、IEDB、SYFPEITHI、MHC Thread、MHCpred、MHCpred 2.0、EpiJen、NetMHC、NetCTL、nHLAPred、SVMHC、ProPred、MMBPred、Protean 3D和Bimas或本文所述和/或本领域已知的任何其它可利用的计算机T细

胞表位预测工具,预测T细胞表位。以下是针对免疫原性线性B细胞表位的人TNFR1拮抗剂DMS5541序列(SEQ ID NO:38)的示例性分析。

[1517] 免疫原性线性B细胞表位的DMS5541分析

[1518] 使用SVMTriP算法分析人TNFR1拮抗剂DMS5541(SEQ ID NO:38)的序列的潜在免疫原性以检测所述分子内的线性B细胞表位。所述算法在DMS5541的序列中鉴定了三个可能的表位,如下表13所示。结果表明,具有对应于SEQ ID NO:38的残基63-82的序列AVKGRFTISRDN SKNTLYLQ的表位具有高免疫原性概率。然后在体外B细胞测定中测试鉴定的三个表位的免疫原性。对免疫原性呈阳性的任何序列进行丙氨酸扫描。通过用丙氨酸残基逐个取代序列中的每个氨基酸来修饰阳性氨基酸/序列,直到免疫原性表位被破坏。这样产生了更安全和更有效的TNFR1拮抗剂。

[1519] 作为阳性对照,SVMTriP算法也用于预测阿达木单抗已知的高免疫原性;施用不含甲氨蝶呤的阿达木单抗在大约50%的患者中具有免疫原性(见例如Ducourau et al. (2020) RMD Open 6:e001047)。SVMTriP算法鉴定了阿达木单抗重链中至少十个可能的表位,其中四个概率高,因此与临床数据具有良好的相关性,并验证了这个程序用于预测免疫原性的用途。

[1520] 表13:通过SVMTriP算法预测的DMS5541序列中的B细胞表位

排序	表位	位置 (SEQ ID NO:38)	评分
[1521] 1	AVKGRFTISRDN SKNTLYLQ	63-82	1.000
2	LRAEDTAVYYCAIYTGRWVP	86-105	0.784
3	SPSSLSASVGD RVTITCRAS	129-148	0.660

[1522] DMS5541的SVMTriP分析结果得到第二种算法ABCPred的支持,所述算法用于预测DMS5541序列内的免疫原性。SVMTriP预测的所有三个B细胞表位也包括在ABCPred的表位预测结果中。例如,如下表14所示,表位AVKGRFTISRDN SKNT、TGRWVPFEYWGQGLTV和STDIQMTQSPSSLSAS(参见下表中每个表位在SEQ ID NO:38中的残基位置)均含有与SVMTriP鉴定的三个表位重叠的序列。

[1523] 表14:通过ABCPred预测服务器预测的DMS5541序列中的B细胞表位

排序	表位	起始位置 (SEQ ID NO:38)	评分
1	AQAGTHPTTFGQGTKV	211	0.92
2	SGSGTDFTLTISSLQP	187	0.90
3	AVKGRFTISRDN SKNT	63	0.89
3	RVTITCRASRPIGTTL	140	0.89
4	SASVGD RVTITCRASR	134	0.86
[1524] 5	GWVRQAPGKGLEWVSQ	35	0.85
6	ASRPIGTTL SWYQQKP	147	0.84
7	LTVSSASTDIQMTQS	114	0.83
8	SGFTFDKY SMGWVRQA	25	0.82
8	LQPEDFATYYCAQAGT	200	0.82
9	QISDTADR TYAHAVK	50	0.81
9	STDIQMTQSPSSLSAS	121	0.81
10	NSKNTLYLQMNSLRAE	74	0.80
10	TGRWVPFEYWGQGLTV	100	0.80

[1525] 实施例4

[1526] 含有人TNFR1拮抗剂抗体片段(dAb、scFv、Fab)的示例TNFR1拮抗剂构建体

[1527] 本文提供了选择性抑制TNFR1而不抑制TNFR2的TNFR1拮抗剂构建体。为了避免使TNFR1激动的TNFR1受体簇集,所述TNFR1拮抗剂是单体和单价的。TNFR1拮抗剂含有特异于TNFR1的人单域抗体(dAb)。dAb含有可变区重链(V_H)或可变区轻链(V_L)结构域。例如,dAb含有其氨基酸序列如SEQ ID NO:54-672任一所示的任何dAb,或与SEQ ID NO:54-672任一所示dAb具有至少或至少约90%或95%序列相同性的dAb,其保留对TNFR1的结合亲和力。或者,TNFR1拮抗剂含有scFv、Fab或其它抗原结合片段,例如源自人TNFR1拮抗剂抗体的那些,例如H398或ATROSAB。例如,TNFR1拮抗剂含有SEQ ID NO:677或678所示的H398衍生的scFv;或SEQ ID NO:673-676任一所示ATROSAB衍生的scFv;或分别SEQ ID NO:679和680(FabATR)或分别SEQ ID NO:681或682(Fab 13.7)所示的ATROSAB衍生的Fab片段轻链和重链;或scFv或Fab片段,其与SEQ ID NO:673-678任何所示scFv、或SEQ ID NO:679和680(FabATR)分别所示或SEQ ID NO:681或682(Fab 13.7)分别所示的Fab轻链和重链具有至少或至少约90%或95%序列同性,并且保留对TNFR1的亲和力。

[1528] 将TNFR1拮抗剂与血清半衰期延长剂例如IgG Fc特别是经过修饰的Fc融合以消除或减少ADCC、ADCP和/或CDC,人血清白蛋白(HSA)和/或聚(乙)二醇(PEG)分子。例如,将人抗TNFR1 dAb、scFv、Fab或其它抗原结合片段的C末端通过接头与人IgG1或IgG4抗体Fc区的N末端融合。使用IgG1 Fc区,例如源自曲妥珠单抗的IgG1 Fc(见SEQ ID NO:27),或IgG4 Fc区,例如源自纳武单抗的IgG4 Fc(见SEQ ID NO:30)。当Fc源自曲妥珠单抗时,所述接头包括曲妥珠单抗的铰链序列的一部分,含有氨基酸残基SCDKTH的序列(对应于SEQ ID NO:26的残基222-227),或当Fc源自纳武单抗时,可含有纳武单抗铰链序列,含有氨基酸残基ESKYGPPCPPCP序列(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223),或其提供柔性或其它结构性质的部分。为了赋予蛋白酶抗性并增加融合蛋白的柔性,将SCDKTH或ESKYGPPCPPCP铰链序列用短甘氨酸-丝氨酸(GS)肽接头置换,例如(GSGS)或(GGGGS)_n(见例如分别为SEQ ID NO:707的残基199-202和116-120),其中n=1-5或1-6,或Gly和Ser残基的其它组合,例如GGGSGGGSGGGGS(例如残基116-130或SEQ ID NO:707)。在其它实施方案中,将人抗-TNFR1 dAb、scFv、Fab或其它抗原结合片段的C-末端连接至GS接头,并且将GS接头连接至曲妥珠单抗或纳武单抗铰链序列的全部或足以提供柔性的部分,其连接于相应Fc区的N末端。在一些实施方案中,第二个Fc亚单位与第一个Fc亚单位连接,以增加所述分子的血清半衰期和稳定性。因为有两个Fc区,因此任何所得构建体都不是融合蛋白,因为它包含一个不连续的Fc区。在一些实施方案中,将人TNFR1拮抗性dAb、scFv、Fab或其它抗原结合片段的N末端通过接头融合于血清半衰期延长剂的C末端,如上所述。

[1529] 本文还提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有通过短肽接头与人血清白蛋白(HSA)融合的抗TNFR1 dAb、scFv、Fab或其它抗原结合片段,所述短肽接头例如是(GSGS)_n或(GGGGS)_n,其中n=1-5或6,例如GGGSGGGSGGGGS。

[1530] 本文还提供了TNFR1拮抗剂分子,其含有抗TNFR1 dAb、scFv、Fab或其它抗原结合片段,连接至大小至少为30kDa的PEG分子。

[1531] 如本文所述,可修饰这些构建体以降低或消除免疫原性。通过计算机、体外和/或体内方法分析TNFR1拮抗剂dAb、scFv、Fab或其它抗原结合片段,以预测或鉴定免疫原性序列。基于免疫原性序列的鉴定,例如B细胞和/或T细胞表位,通过诱变修饰鉴定的序列,例如

通过如本文别处所述的丙氨酸扫描,以使所述表位去免疫/去除或置换所述免疫原性序列。

[1532] 以下是本文描述和提供的TNFR1拮抗剂融合蛋白的示例性构建体。在包括曲妥珠单抗的Fc或纳武单抗的Fc的所有实施方案中,所述Fc区任选被修饰以减少或消除免疫效应子功能,包括ADCC、ADCP和CDC,并且还任选被修饰以增强与FcRn的结合,增加融合蛋白的血清半衰期,以及任选置换或以其它方式修饰或去除免疫原性序列。

[1533] 减少或消除免疫效应子功能的Fc修饰总结在上表9中,增强FcRn结合的Fc修饰总结在上表7中。本文提供的融合蛋白的Fc区中包括此类修饰的任何一种或组合。本文提供的所有示例性构建体也在融合蛋白的C末端而不是N末端用TNFR1拮抗剂制备。

[1534] 1a)H398 scFv-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1535] 本文提供了人TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有源自人TNFR1拮抗剂抗体H398的scFv。所述scFv含有H398的V_L和V_H结构域,通过(GGGGS)₃肽接头连接在一起。将H398 scFv (SEQ ID NO:678)的C-末端融合于曲妥珠单抗铰链序列的一部分,其含有至少氨基酸残基SCDKTH的序列(对应于SEQ ID NO:26的残基222-227),将其融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;也参见SEQ ID NO:27)。H398 scFv-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:706):QVQLQESGAELARPGASVKLSCKASGYTFTDFYI
NWVKQRTGQGLEWIGEIYPYSGHAYYNEKFKAKATLTADKSSSTAFMQLNSLTSEDSAVYFCVRWDFLDYWGQGTTL
TVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLLSNGNTYLHWYVQKPGQSPKLLIYTVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIKRSCDKTHAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1536] 或者,将SCDKTH铰链序列用曲妥珠单抗铰链区的完整序列取代,其含有或具有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233),或其至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基。

[1537] 1b)H398 scFv-GGGSGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc

[1538] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有源自人TNFR1拮抗剂抗体H398的scFv。所述scFv含有H398的V_L和V_H结构域,通过(GGGGS)₃肽接头连接在一起。将H398 scFv (SEQ ID NO:678)的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;也参见SEQ ID NO:27)。H398 scFv-GGGSGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:707):QVQLQESGAELARPGASVKLSCKASGYT
FTDFYINWVKQRTGQGLEWIGEIYPYSGHAYYNEKFKAKATLTADKSSSTAFMQLNSLTSEDSAVYFCVRWDFLDYW
GQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLLSNGNTYLHWYVQKPGQSPKLL
IYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIKRGGGSGGGSGGGGSA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1539] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头被Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1540] 1c)H398 scFv-GGGSGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1541] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有源自人TNFR1拮抗剂抗体H398的scFv。所述scFv含有H398的V_L和V_H结构域,通过(GGGGS)₃肽接头连接在一起。将H398 scFv(SEQ ID NO:678)的C末端与GGGGSGGGSGGGGS肽接头融合,后者与包括至少氨基酸残基SCDKTH序列(对应于SEQ ID NO:26残基222-227)的曲妥珠单抗铰链序列的一部分融合,其融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:6的残基234-450;也参见SEQ ID NO:27)。H398 scFv-GGGSGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:708):

[1542] QVQLQESGAELARPGASVKLSCKASGYTFTDFYINWVKQRTGQGLEWIGEIYPYSGH
 [1543] AYYNEKFKAKATLTADKSSSTAFMQLNSLTSEDSAVYFCVRWDFLDYWGQGTTLTV
 [1544] SSGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSLLSHNGNTYLHW
 [1545] YVQKPGQSPKLLIYTVSNRFSQVDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVFYFCSQSTH
 [1546] VPYTFGGGTKLEIKRGGGSGGGSGGGSSCDKTHAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 [1547] MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
 [1548] VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 [1549] LTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 [1550] VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1551] 或者,将GGGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头置换,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,SCDKTH铰链序列直至被曲妥珠单抗铰链区的完整序列替代,其含有序列EPKSCDKTHTCPPCP的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233)。

[1552] 1d)H398 scFv-GGGSGGGSGGGGS-HSA

[1553] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有源自人TNFR1拮抗剂抗体H398的scFv。所述scFv含有H398的V_L和V_H结构域,通过(GGGGS)₃肽接头连接在一起。将H398 scFv(SEQ ID NO:678)的C末端融合于GGGGSGGGSGGGGS肽接头,所述接头融合于没有信号肽的人血清白蛋白(HSA)的N末端(对应于SEQ ID NO:35的残基19-609)。H398 scFv-GGGSGGGSGGGGS-HSA融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:709):

[1554] QVQLQESGAELARPGASVKLSCKASGYTFTDFYINWVKQRTGQGLEWIGEIYPYSGH
 [1555] AYYNEKFKAKATLTADKSSSTAFMQLNSLTSEDSAVYFCVRWDFLDYWGQGTTLTV
 [1556] SSGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSLLSHNGNTYLHW
 [1557] YVQKPGQSPKLLIYTVSNRFSQVDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVFYFCSQSTH
 [1558] VPYTFGGGTKLEIKRGGGSGGGSGGGSSRGVFRRAHKSEVAHRFKDLGEENFK
 [1559] ALVLIIFAQYLQQCFEDHVKLVEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFLGDKLCTV
 [1560] ATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLPRVLRPEVDVMCTAFHDNEET
 [1561] FLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGK
 [1562] ASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECC
 [1563] HGDLLCADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVNDEM PADLPS
 [1564] LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCK
 [1565] CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQ
 [1566] VSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRV

[1567] TKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL

[1568] VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

[1569] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1570] 1e)H398 scFv-GGGSGGGSGGGGS-PEG_{30kDa}

[1571] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有源自人TNFR1拮抗剂抗体H398的scFv。所述scFv含有H398的V_L和V_H结构域,通过(GGGGS)₃肽接头连接在一起。将H398 scFv(SEQ ID NO:678)的C末端与GGGSGGGSGGGGS肽接头融合,所述接头与大小为30kDa的PEG分子共价连接。

[1572] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述的或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,PEG分子可具有等于约30kDa或大于30kDa例如35kDa、40kDa、45kDa或50kDa的分子量。

[1573] 1f)DOM1h-574-16-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1574] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-16(SEQ ID NO:57)。将DOM1h-574-16的C末端融合于至少含有氨基酸残基序列SCDKTH(对应于SEQ ID NO:26的残基222-227)的曲妥珠单抗铰链序列的一部分,将其融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;也参见SEQ ID NO:27)。DOM1h-574-16-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:710):EVQLLESGLVQPGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGP EWVSQISNTGDRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFDYWGGTLVTVSSSCDKTHAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1575] 或者,SCDKTH铰链序列直至被曲妥珠单抗铰链区的完整序列取代,其含有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233),或其至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基。

[1576] 1g)DOM1h-574-16-GGGSGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc

[1577] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-16(SEQ ID NO:57)。经DOM1h-574-16的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;也参见SEQ ID NO:27)。DOM1h-574-16-GGGSGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:711):

[1578] EVQLLESGLVQPGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGP EWVSQISNTGD

[1579] RTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFDYWGG

[1580] TLTVSSGGGSGGGSGGGGSAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV

[1581] SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

[1582] KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

[1583] EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNH

[1584] YTQKSLSLSPGK

[1585] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其

中 $n=1,2,3,4$ 或 5 ,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1586] 1h) DOM1h-574-16-GGGGSGGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1587] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-16(SEQ ID NO:57)。将DOM1h-574-16的C末端融合于GGGGSGGGGSGGGGS肽接头,所述接头融合于含有至少残基序列SCDKTH(对应于SEQ ID NO:26的残基222-227)的曲妥珠单抗的铰链序列的一部分,将其融合于曲妥珠单抗Fc区的N-末端(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;也参见SEQ ID NO:27)。DOM1h-574-16-GGGGSGGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:712):EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAIYTRWEPFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSSCDKTHAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVS SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1588] 或者,GGGGSGGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中 $n=1,2,3,4$ 或 5 ,或本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,SCDKTH铰链序列被直至曲妥珠单抗铰链区的完整序列替代,其含有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233),或其至少 $5,6,7,8,9,10$ 或 11 个连续残基。

[1589] 1i) DOM1h-574-16-GGGGSGGGGSGGGGS-HSA

[1590] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-16(SEQ ID NO:57)。将DOM1h-574-16的C末端与GGGGSGGGGSGGGGS肽接头融合,后者与不含信号肽的人血清白蛋白(HSA)的N末端融合(对应于SEQ ID NO:35的残基19-609)。DOM1h-574-16-GGGGSGGGGSGGGGS-HSA融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:713):EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAIYTRWEPFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSRGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA CLLPKLDL RDEG KASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLR LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQNC ELFELG EYKFQ NALLVRYTKKVPQVST PTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD ETVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCF AEEGK LVAASQAALGL

[1591] 或者,GGGGSGGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中 $n=1,2,3,4$ 或 5 ,或本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1592] 1j) DOM1h-574-16-GGGGSGGGGSGGGGS-PEG_{30kDa}

[1593] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-16(SEQ ID NO:57)。将DOM1h-574-16的C末端与GGGGSGGGGSGGGGS肽接头融合,后者共价连接于大小为 $30kDa$ 的PEG分子。

[1594] 或者,GGGGSGGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中 $n=1,2,3,4$ 或 5 ,或如本文描述的或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另

外,PEG分子可具有大于30kDa的分子量,例如35kDa、40kDa、45kDa或50kDa。

[1595] 1k)DOM1h-549-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1596] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-549(SEQ ID NO:58)。将DOM1h-549的C末端融合于至少含有残基序列SCDKTH(对应于SEQ ID NO:26的残基222-227)曲妥珠单抗较链序列的一部分,将其融合于曲妥珠单抗Fc区的N-末端(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;也参见SEQ ID NO:27)。DOM1h-549-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:714):EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVDYEMHWVRQAPGKGLEWVSSISESGTTTTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRFSASTFDYWGQGT LVTVSSCDKTHAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1597] 或者,SCDKTH较链序列被曲妥珠单抗较链区的完整序列取代,其含有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233),或其至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基。

[1598] 1l)DOM1h-549-GGGGSGGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc

[1599] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-549(SEQ ID NO:58)。将DOM1h-549的C末端与GGGGSGGGGSGGGGS肽接头融合,所述接头与曲妥珠单抗Fc区的N末端融合(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;另见SEQ ID NO:27)。DOM1h-549-GGGGSGGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:715):EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVDYEMHWVRQAPGKGLEWVSSISESGTTTTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRFSASTFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1600] 或者,GGGGSGGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述的或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1601] 1m)DOM1h-549-GGGGSGGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1602] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-549(SEQ ID NO:58)。将DOM1h-549的C末端与GGGGSGGGGSGGGGS肽接头融合,后者与至少含有残基序列SCDKTH(对应于SEQ ID NO:26的残基222-227)的曲妥珠单抗较链序列的一部分融合,将其融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;另见SEQ ID NO:27)。DOM1h-549-GGGGSGGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:716):

[1603] EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVDYEMHWVRQAPGKGLEWVSSISESGTT

[1604] TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRFSASTFDYWGQGT

[1605] LVTVSSGGGGSGGGGSSCDKTHAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC

[1606] VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN

[1607] GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY

[1608] PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHE

[1609] ALHNHYTQKSLSLSPGK

[1610] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,SCDKTH铰链序列被含有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233)的曲妥珠单抗铰链区的含有至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的部分直至完整序列替代。

[1611] 1n)DOM1h-549-GGGSGGGSGGGGS-HSA

[1612] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-549(SEQ ID NO:58)。将DOM1h-549的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于不含信号肽的人血清白蛋白(HSA)的N末端(对应于SEQ ID NO:35的残基19-609)。DOM1h-549-GGGSGGGSGGGGS-HSA融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:717):

[1613] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVDYEMHWVRQAPGKGLEWVSSISESGTT

[1614] TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRFSASTFDYWGQGT

[1615] LVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGRGVFRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAAQ

[1616] YLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE

[1617] MADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK KYLYEI

[1618] ARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDLDEGKASSAKQRL

[1619] KCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECA

[1620] DDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVES

[1621] KDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHE

[1622] CYAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVE

[1623] VSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESL

[1624] VNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKA

[1625] TKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGL

[1626] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1627] 1o)DOM1h-549-GGGSGGGSGGGGS-PEG_{30kDa}

[1628] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-549(SEQ ID NO:58)。将DOM1h-549的C末端与GGGSGGGSGGGGS肽接头融合,所述接头共价连接于大小为30kDa的PEG分子。

[1629] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或本文处描述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,PEG分子可具有大于30kDa的分子量,例如35kDa、40kDa、45kDa或50kDa。

[1630] 1p)DOM1h-574-208-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1631] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-208(SEQ ID NO:54)。将DOM1h-574-208的C末端融合于至少含有残基序列SCDKTH(对应于SEQ ID NO:26的残基222-227)的曲妥珠单抗铰链序列的一部分,将其融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;另见SEQ ID NO:27)。DOM1h-574-208-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:718):EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVP

FEYWGQGLVTVSSCDKTHAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

[1632] 或者,SCDKTH铰链序列被含有曲妥珠单抗铰链区的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的部分直至完整区域置换,含有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233)。

[1633] 1q)DOM1h-574-208-GGGGSGGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc

[1634] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,包含人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-208(SEQ ID NO:54)。将DOM1h-574-208的C末端融合于GGGGSGGGGSGGGGS肽接头,后者融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;另见SEQ ID NO:27)。DOM1h-574-208-GGGGSGGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:719):

[1635] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISDTAD

[1636] RTYYAHAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVVPFEYWGQ

[1637] GTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD

[1638] VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

[1639] CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA

[1640] VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN

[1641] HYTQKSLSLSPGK

[1642] 或者,GGGGSGGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1643] 1r)DOM1h-574-208-GGGGSGGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1644] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-208(SEQ ID NO:54)。将DOM1h-574-208的C末端与GGGGSGGGGSGGGGS肽接头融合,后者与至少含有残基序列SCDKTH(对应于SEQ ID NO:26的残基222-227)的曲妥珠单抗的铰链序列的一部分融合,将其与曲妥珠单抗Fc区的N末端融合(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;另见SEQ ID NO:27)。DOM1h-574-208-GGGGSGGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:720):EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISDTADRTYYAHAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVVPFEYWGQGLVTVTVSSGGGSGGGGSGGGSSCDKTHAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1645] 或者,GGGGSGGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述的或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,SCDKTH铰链序列被含有曲妥珠单抗铰链区的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的部分直至完整序列置换,其含有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233)。

[1646] 1s)DOM1h-574-208-GGGGSGGGGSGGGGS-HSA

[1647] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-208(SEQ ID NO:54)。将DOM1h-574-208的C末端融合于GGGGSGGGGSGGGGS肽接头,后者融合于不

含信号肽的人血清白蛋白 (HSA) 的N末端 (对应于SEQ ID NO:35的残基19-609)。DOM1h-574-208-GGGSGGGSGGGGS-HSA融合蛋白具有以下序列 (SEQ ID NO:721): EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGSWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAIYTGRWVPEFYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGRGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYL QQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDD NPNLPRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAK YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHP DYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVP QVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEV DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGL

[1648] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1649] 1t) DOM1h-574-208-GGGSGGGSGGGGS-PEG_{30kDa}

[1650] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-208 (SEQ ID NO:54)。将DOM1h-574-208的C末端与GGGSGGGSGGGGS肽接头融合,后者共价连接至大小为30kDa的PEG分子。

[1651] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述的或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,PEG分子可具有至少或大于30kDa的分子量,例如35kDa、40kDa、45kDa或50kDa。

[1652] 1u) DOM1h-131-206-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1653] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-131-206 (SEQ ID NO:59)。将DOM1h-131-206的C末端融合于至少含有残基序列SCDKTH (对应于SEQ ID NO:26的残基222-227)的曲妥珠单抗较链序列的一部分,将其融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端 (对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;另见SEQ ID NO:27)。DOM1h-131-206-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列 (SEQ ID NO:722): EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVVWRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWF DYWGQGLTVTVSSSCDKTHAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP E VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSL SLSPGK

[1654] 或者,SCDKTH较链序列被含有曲妥珠单抗较链区至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的部分直至完整序列置换,其含有序列EPKSCDKTHTCPPCP (对应于SEQ ID NO:26的残基219-233)。

[1655] 1v) DOM1h-131-206-GGGSGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc

[1656] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-131-206 (SEQ ID NO:59)。将DOM1h-131-206的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端 (对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;SEQ ID NO:27)。DOM1h-131-

206-GGGSGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:723)：

[1657] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQ
 [1658] DPFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGGQ
 [1659] TLVTVSSGGGSGGGGSGGGSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 [1660] SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 [1661] KVSNAKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 [1662] EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNH
 [1663] YTKSLSLSPGK

[1664] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述的或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1665] 1w)DOM1h-131-206-GGGSGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1666] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-131-206 (SEQ ID NO:59)。将DOM1h-131-206的C末端与GGGSGGGSGGGGS肽接头融合,后者与至少含有残基序列SCDKTH(对应于SEQ ID NO:26的残基222-227)的曲妥珠单抗的铰链序列的一部分融合,将其与曲妥珠单抗Fc区的N末端融合(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;另见SEQ ID NO:27)。DOM1h-131-206-GGGSGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:724)：

[1667] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQ
 [1668] DPFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGGQ
 [1669] TLVTVSSGGGSGGGGSGGGSSCDKTHAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 [1670] CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 [1671] GKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHHTQKLSLSLSPGK

[1672] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头被另一个Gly-Ser(GS)接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,SCDKTH铰链序列被含有曲妥珠单抗铰链区的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的部分或直至完整序列置换,其含有序列EPKSCDKHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233)。

[1673] 1z)H398 scFv-ESKYPPCPPCP-纳武单抗Fc

[1674] 本文提供了人TNFR1拮抗剂融合蛋白,其包含源自人TNFR1拮抗剂抗体H398的scFv。所述scFv含有H398的V_L和V_H结构域,通过(GGGGS)₃肽接头连接在一起。将H398 scFv (SEQ ID NO:678)的C末端融合于含有序列ESKYPPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的纳武单抗的铰链序列,其融合于纳武单抗Fc区的N-末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;也参见SEQ ID NO:30)。H398 scFv-ESKYPPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:726)：QVQLQESGAELARPGASVKLSCKASGYTFTDFYINWVKQRTGQGLEWIGEIYPYSGHAYYNEKFKAKATLTADKSSSTAFMQLNSLTSEDSAVYFCVRWDFLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSLLSNGNTYLHWYVQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPYTFGGGKLEIKRESKYPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIK

KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

[1675] 或者,使用含有ESKYGPPCPPCP铰链序列(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的纳武单抗铰链序列的全部或部分。

[1676] 1aa)H398 scFv-GGGGSGGGGSGGGGS-纳武单抗Fc

[1677] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有源自人TNFR1拮抗剂抗体H398的scFv。所述scFv含有H398的V_L和V_H结构域,通过(GGGGS)₃肽接头连接在一起。将H398 scFv(SEQ ID NO:678)的C末端融合于GGGGSGGGGSGGGGS肽接头,后者融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。H398 scFv-GGGGSGGGGSGGGGS-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:727):QVQLQESGAELARPGASVKLSCKASGYTFTDFYIINWVKQRTGQGLEWIGEIYPYSGHAYYNEKFKAKATLTADKSSSTAFMQLNSLTSEDSAVYFCVRWDFLDYWGQGTTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLLSHNGNTYLHWYVQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSAPEFLGPPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

[1678] 或者,GGGGSGGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述的或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1679] 1ab)H398 scFv-GGGGSGGGGSGGGGS-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc

[1680] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有源自人TNFR1拮抗剂抗体H398的scFv。所述scFv含有H398的V_L和V_H结构域,通过(GGGGS)₃肽接头连接在一起。将H398 scFv(SEQ ID NO:678)的C末端与GGGGSGGGGSGGGGS肽接头融合,后者与含有序列ESKYGPPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的纳武单抗的铰链序列融合,其融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;也参见SEQ ID NO:30)。H398 scFv-GGGGSGGGGSGGGGS-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:728):

[1681] QVQLQESGAELARPGASVKLSCKASGYTFTDFYINWVKQRTGQGLEWIGEIYPYSGH

[1682] AYYNEKFKAKATLTADKSSSTAFMQLNSLTSEDSAVYFCVRWDFLDYWGQGTTLTV

[1683] SGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLLSHNGNTYLHW

[1684] YVQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTH

[1685] VPYTFGGGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSESKYGPPCPPCPAPEFLGPPSVFLFPPK

[1686] PKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV

[1687] VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT

[1688] KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR

[1689] WQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

[1690] 或者,GGGGSGGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述的或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,使用含有ESKYGPPCPPCP铰链序列(对应于SEQ ID NO的残基212-223:29)的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的纳武单抗铰链序列的全部或一部分。

[1691] 1ac)DOM1h-574-16-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc

[1692] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-16 (SEQ ID NO:57)。将DOM1h-574-16的C末端融合于纳武单抗的铰链序列,含有序列ESKYGPPCPPCP (对应于SEQ ID NO:29的残基212-223),将其融合于纳武单抗Fc的N末端区(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;也参见SEQ ID NO:30)。DOM1h-574-16-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:729):EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISNTGDRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFDYWGQGLTVTVSS ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

[1693] 或者,使用含有ESKYGPPCPPCP铰链序列(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的纳武单抗铰链序列的全部或一部分。

[1694] 1ad) DOM1h-574-16-GGGGSGGGSGGGGS-纳武单抗Fc

[1695] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-16 (SEQ ID NO:57)。将DOM1h-574-16的C末端融合于GGGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。DOM1h-574-16-GGGGSGGGSGGGGS-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:730):EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISNTGDRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

[1696] 或者,GGGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述的或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1697] 1ae) DOM1h-574-16-GGGGSGGGSGGGGS-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc

[1698] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-16 (SEQ ID NO:57)。将DOM1h-574-16的C末端融合于GGGGSGGGSGGGGS肽接头,所述接头融合于含有序列ESKYGPPCPPCP (对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的纳武单抗的铰链序列,将其融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;也参见SEQ ID NO:30)。DOM1h-574-16-GGGGSGGGSGGGGS-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:731):EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISNTGDRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

[1699] 或者,GGGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述的或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,包括至少一部分纳武单抗铰链序列(含有ESKYGPPCPPCP铰链序列(对应于残基包括SEQ ID NO:29的212-223))的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基直至完整序列。

[1700] 1af) DOM1h-549-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc

[1701] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-549(SEQ ID NO:58)。将DOM1h-549的C末端融合于含有序列ESKYGPPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的纳武单抗的铰链序列,将其融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。DOM1h-549-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:732):EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVDYEMHWVRQAPGKLEWVSSISESGTTTTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRFSASTFDYWGQGLVTVSSSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

[1702] 或者,包括纳武单抗铰链序列的全部或一部分,其含有ESKYGPPCPPCP铰链序列的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)。

[1703] 1ag) DOM1h-549-GGGGSGGGGSGGGGS-纳武单抗Fc

[1704] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-549(SEQ ID NO:58)。将DOM1h-549的C末端融合于GGGGSGGGGSGGGGS肽接头,后者融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。DOM1h-549-GGGGSGGGGSGGGGS-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:733):EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVDYEMHWVRQAPGKLEWVSSISESGTTTTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRFSASTFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

[1705] 或者,GGGGSGGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述的或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1706] 1ah) DOM1h-549-GGGGSGGGGSGGGGS-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc

[1707] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-549(SEQ ID NO:58)。将DOM1h-549的C末端融合于GGGGSGGGGSGGGGS肽接头,后者融合于含有序列ESKYGPPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的纳武单抗的铰链序列,将其融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。DOM1h-549-GGGGSGGGGSGGGGS-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:734):EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVDYEMHWVRQAPGKLEWVSSISESGTTTTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRFSASTFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

[1708] 在一些实施方案中,GGGGSGGGGSGGGGS接头由GS接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,包括纳武单抗铰链序列的全部或一部分,其含有ESKYGPPCPPCP铰链序列(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基。

[1709] 1ai) DOM1h-574-208-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc

[1710] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-208 (SEQ ID NO:54)。将DOM1h-574-208的C末端融合于含有序列ESKYGPPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的纳武单抗的铰链序列,将其融合于纳武单抗Fc的N末端区(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;也参见SEQ ID NO:30)。DOM1h-574-208-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:735):

[1711] EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTAD

[1712] RTYYAHAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVWPFYEWGQ

[1713] GTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSQE

[1714] DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVNS

[1715] NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE

[1716] SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ

[1717] KSLSLSLGK

[1718] 或者,包括纳武单抗铰链序列的全部或一部分,其含有ESKYGPPCPPCP铰链序列(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基。

[1719] 1aj) DOM1h-574-208-GGGSGGGSGGGGS-纳武单抗Fc

[1720] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-208 (SEQ ID NO:54)。将DOM1h-574-208的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。DOM1h-574-208-GGGSGGGSGGGGS-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:736):

[1721] EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTAD

[1722] RTYYAHAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVWPFYEWGQ

[1723] GTLVTVSSGGGSGGGSGGGGSAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD

[1724] VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

[1725] CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

[1726] EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNH

[1727] YTQKSLSLSLGK

[1728] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1729] 1ak) DOM1h-574-208-GGGSGGGSGGGGS-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc

[1730] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-574-208 (SEQ ID NO:54)。将DOM1h-574-208的C末端与GGGSGGGSGGGGS肽接头融合,后者与含有序列ESKYGPPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的纳武利尤单抗的铰链序列融合,将其融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;也参见SEQ ID NO:30)。DOM1h-574-208-GGGSGGGSGGGGS-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:737):EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTAD RTYYAHAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVWPFYEWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGG SESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[1731] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头由(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头替代,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或如本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,包括纳武单抗铰链序列的全部或一部分,其含有ESKYGPCPPCP铰链序列的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)。

[1732] 1a1)DOM1h-131-206-ESKYGPCPPCP-纳武单抗Fc

[1733] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-131-206 (SEQ ID NO:59)。将DOM1h-131-206的C末端融合于含有序列ESKYGPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的纳武单抗的铰链序列,将其融合于纳武单抗Fc的N末端区(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;也参见SEQ ID NO:30)。DOM1h-131-206-ESKYGPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:738):

[1734] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQ

[1735] DPFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQG

[1736] TLVTVSSESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQED

[1737] PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN

[1738] KGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES

[1739] NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK

[1740] SLSLSLGK

[1741] 或者,包括纳武单抗铰链序列的全部或一部分,其含有ESKYGPCPPCP铰链序列的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)。

[1742] 1am)DOM1h-131-206-GGGSGGGSGGGGS-纳武单抗Fc

[1743] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-131-206 (SEQ ID NO:59)。将DOM1h-131-206的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。DOM1h-131-206-GGGSGGGSGGGGS-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:739):

[1744] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQ

[1745] DPFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQG

[1746] TLVTVSSGGGSGGGSGGGGSAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV

[1747] SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

[1748] KVSNGKLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

[1749] WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHY

[1750] TQKLSLSLGK

[1751] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头由(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头替代,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1752] 1an)DOM1h-131-206-GGGSGGGSGGGGS-ESKYGPCPPCP-纳武单抗Fc

[1753] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有人TNFR1拮抗剂dAb DOM1h-131-206 (SEQ ID NO:59)。将DOM1h-131-206的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,所述接头融合于含有序列ESKYGPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的纳武单抗的铰链序列,将其融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;也参见SEQ ID NO:30)。DOM1h-131-206-GGGSGGGSGGGGS-ESKYGPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下

序列 (SEQ ID NO:740):EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVVWRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFWDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSESKEYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[1754] 或者,GGGGSGGGSGGGGS接头由(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头替代,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,包括纳武单抗铰链序列的全部或一部分,其含有ESKYGPPCPPCP铰链序列(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基。

[1755] 还合成了连接于HSA的Vhh(纳米抗体),特别是其单链形式,其包含dAb,例如DOM1h-131-206。针对TNFR1的结合和抑制评估了示例的Vhh构建体。这些评估在下文实施例中描述。

[1756] 实施例5

[1757] 含有人TNFR1拮抗剂TNF突变蛋白的示例TNFR1拮抗剂构建体

[1758] 本文提供了选择性抑制TNFR1而不抑制TNFR2的TNFR1拮抗剂。为了避免激动TNFR1的TNFR1受体簇集,所述TNFR1拮抗剂是单价的。TNFR1拮抗剂可含有信号传导无能的显性阴性TNF抑制剂(DN-TNF),也称为TNF突变蛋白,其是TNF的工程化变体,具有消除通过TNFR1的信号传导的一个或多个突变。例如,TNF突变蛋白可以含有一个或多个突变,这些突变赋予对TNFR1而不是TNFR2的选择性。TNFR1选择性TNF突变包括以下任一或多个突变:L29S,L29G,L29Y,R31E,R31N,R32Y,R32W,S86T,L29S/R32W,L29S/S86T,R32W/S86T,L29S/R32W/S86T,R31N/R32T,R31E/S86T,R31N/R32T/S86T,E146R,V1M,R31C,C69V,Y87H,C101A,A145R,V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R,I97T,I97T/A145R,A84S,V85T,Q88N,T89Q,和A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q及其组合,参考可溶TNF(so1TNF)的序列,如SEQ ID NO:2所示。

[1759] 例如,TNFR1拮抗剂可含有具有突变R32W/S86T(SEQ ID NO:685)、V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R(SEQ ID NO:701;如XPro1595中)、A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q(SEQ ID NO:703;如R1antTNF中)或I97T/A145R(SEQ ID NO:702;如XENP345中)的TNF突变蛋白。

[1760] 将TNFR1拮抗剂与血清半衰期延长剂例如IgG Fc融合。例如,将人TNFR1拮抗性TNF突变蛋白的C末端通过接头与人IgG1或IgG4抗体Fc区的N末端融合。使用IgG1 Fc区,例如源自曲妥珠单抗的IgG1 Fc(参见SEQ ID NO:27),或IgG4 Fc区,例如源自纳武单抗的IgG4(参见SEQ ID NO:30)。当Fc来源于曲妥珠单抗时,所述接头可含有曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列,含有至少残基SCDKTH(对应于SEQ ID NO:26的残基222-227),或当Fc源自纳武单抗时,可含有纳武单抗铰链序列ESKYGPPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)或其一部分。为赋予蛋白酶抗性并增加融合蛋白的柔性,将SCDKTH或ESKYGPPCPPCP铰链序列或其一部分用短甘氨酸-丝氨酸(GS)肽接头置换,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n,其中n=1-5,例如GGGGSGGGSGGGGS。在一个备选实施方案中,将人抗-TNFR1 TNF突变蛋白的C-末端连接于GS接头,并且将GS接头连接于曲妥珠单抗或纳武单抗铰链序列的足以提供柔性的全部或部分,它连接于相应Fc区的N末端。在一些实施方案中,第二个Fc亚单位连接于第一个Fc区,这可以增加分子的血清半衰期和稳定性。所得构建体不是融合蛋白。

[1761] 以下是TNFR1拮抗剂融合蛋白的示例性构建体,含有TNFR1选择性拮抗性TNF突变蛋白,如本文所述和提供的。在含有曲妥珠单抗的Fc或纳武单抗的Fc的所有实施方案中,Fc区任选被修饰以减少或消除免疫效应子功能,包括ADCC、ADCP和CDC,并且还任选被修饰以增强与FcRn的结合,增加融合蛋白的血清半衰期。减少或消除免疫效应子功能的Fc修饰总结在表9中,增强FcRn结合的Fc修饰总结在表7中。此类修饰的任何一种或组合包括在本文提供的融合蛋白的Fc区中。

[1762] 2a) TNF (R32W/S86T) -SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1763] 本文提供了一种人TNFR1拮抗剂融合蛋白,含有具有突变R32W/S86T的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (R32W/S86T) 突变蛋白 (SEQ ID NO:685) 的C末端与至少含有残基SCDKTH (对应于SEQ ID NO:26的残基222-227) 的曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列融合,其与曲妥珠单抗Fc区的N末端融合 (对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;参见SEQ ID NO:27)。TNF (R32W/S86T) -SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列 (SEQ ID NO:741):

VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNWRWANALLA
 NGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVTYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWY
 EPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI IALSCDKTHAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1764] 或者,将SCDKTH铰链序列用含有序列EPKSCDKTHTCPPCP (对应于SEQ ID NO:26的残基219-233) 的曲妥珠单抗铰链区的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基直至完整序列置换。

[1765] 2b) TNF (R32W/S86T) -GGGSGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc

[1766] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变R32W/S86T的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (R32W/S86T) 突变蛋白 (SEQ ID NO:685) 的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端 (对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;另见SEQ ID NO:27)。TNF (R32W/S86T) -GGGSGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列 (SEQ ID NO:742):

[1767] VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNWRWANALLANGVELRDNQLVVPSEGL

[1768] YLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVTYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPW

[1769] YEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI IALGGGSGGGSGGGGS

[1770] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

[1771] KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPR

[1772] EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD

[1773] GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1774] 或者,将GGGSGGGSGGGGS接头用Gly-Ser接头替代,例如 (GSGS)_n 或 (GGGS)_n 接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述的或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1775] 2c) TNF (R32W/S86T) -GGGSGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1776] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变R32W/S86T的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (R32W/S86T) 突变蛋白 (SEQ ID NO:685) 的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于曲妥珠单抗铰链序

列的一部分,至少含有残基SCDKTH(对应残基SEQ ID NO:26的222-227),其融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;也参见SEQ ID NO:27)。TNF(R32W/S86T)-GGGGSGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:743):

[1777] VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNWANALLANGVELRDNQLVVPSEGL

[1778] YLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVTYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPW

[1779] YEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI IALGGGGSGGGSGGGGS

[1780] SCDKTHAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

[1781] VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

[1782] KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT

[1783] PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1784] 或者,将GGGGSGGGSGGGGS接头用Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知任何其它合适的短肽接头。或者或另外,将SCDKTH铰链序列由曲妥珠单抗铰链区的完整序列替代,含有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233),或其含有至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的一部分。

[1785] 2d) TNF(V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R)-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1786] 本发明提供了人TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变V1M、R31C、C69V、Y87H、C101A和A145R的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参照可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF(V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R)突变蛋白(SEQ ID NO:701)的C末端融合于曲妥珠单抗铰链序列的一部分,至少含有残基SCDKTH(对应于SEQ ID NO:26残基222-227),其与曲妥珠单抗Fc区的N-末端融合(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;也参见SEQ ID NO:27)。TNF(V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R)-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:744):

[1787] MRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNCRANALLANGVELRDNQLVVPSEGL

[1788] YLIYSQVLFKGGQVPSTHVLLTHTISRIAVSHQTKVNLLSAIKSPAQRETPEGAEAKPW

[1789] YEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFFRESGQVYFGI IALSCDKTHAPELLGGPSV

[1790] FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

[1791] NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP

[1792] SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLT

[1793] VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1794] 或者,将SCDKTH铰链序列由曲妥珠单抗铰链区的完整序列替代,含有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233),或其含有至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的部分。

[1795] 2e) TNF(V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R)-GGGGSGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc

[1796] 本发明提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变V1M、R31C、C69V、Y87H、C101A和A145R的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF(V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R)突变蛋白(SEQ ID NO:701)的C末端与GGGGSGGGSGGGGS肽接头融合,后者与曲妥珠单抗Fc区的N末端融合(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;也参见SEQ ID NO:27)。TNF(V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R)-GGGGSGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:745):

[1797] MRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNCRANALLANGVELRDNQLVVPSEGL

[1798] YLIYSQVLFKGGQVPSTHVLLTHTISRIAVSHQTKVNLLSAIKSPAQRETPEGAEAKPW

[1799] YEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDLFRESGQVYFGI IALGGGGSGGGGSGGGGS

[1800] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

[1801] KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR

[1802] EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD

[1803] GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1804] 或者,将GGGGSGGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文描述的或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1805] 2f) TNF (V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R) -GGGGSGGGGSGGGGS-SC DKTH-曲妥珠单抗Fc

[1806] 本发明提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变V1M、R31C、C69V、Y87H、C101A和A145R的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R) 突变蛋白 (SEQ ID NO:701) 的C末端与GGGGSGGGGSGGGGS肽接头融合,后者与曲妥珠单抗的铰链序列的一部分融合,含有至少残基SCDKTH(对应于SEQ ID NO:26的残基222-227),其融合于曲妥珠单抗Fc区的N-末端(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;也参见SEQ ID NO:27)。TNF (V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R) -GGGGSGGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列 (SEQ ID NO:746):

[1807] MRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNCRANALLANGVELRDNQLVVPSEGL

[1808] YLIYSQVLFKGGQVPSTHVLLTHTISRIAVSHQTKVNLLSAIKSPAQRETPEGAEAKPW

[1809] YEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDLFRESGQVYFGI IALGGGGSGGGGSGGGGS

[1810] SCDKTHAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

[1811] VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

[1812] KAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT

[1813] PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1814] 或者,将GGGGSGGGGSGGGGS接头用Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,将SCDKTH铰链序列由含有曲妥珠单抗铰链区(含有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233))的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基直至完整序列的一部分替代。

[1815] 2g) TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) -SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1816] 本发明提供了人TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变A84S、V85T、S86T、Y87H、Q88N和T89Q的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) 突变蛋白 (SEQ ID NO:703) 的C末端融合于曲妥珠单抗铰链序列的一部分,至少含有残基SCDKTH(对应于SEQ ID NO:26的残基222-227),其与曲妥珠单抗Fc区的N末端融合(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;也参见SEQ ID NO:27)。TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) -SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列 (SEQ ID NO:747):VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLI

YSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRISTTHNQKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYIYLGGVFQLEKGDRLSAE
INRPDYLDFAESGQVYFGI IALSCDKTHAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

[1817] 或者,将SCDKTH铰链序列用含有曲妥珠单抗铰链区(含有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233))至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基直至完整序列的部分置换。

[1818] 2h) TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) -GGGSGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc

[1819] 本发明提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变A84S、V85T、S86T、Y87H、Q88N和T89Q的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) 突变蛋白 (SEQ ID NO:703) 的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;也参见SEQ ID NO:27)。TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) -GGGSGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:748):

[1820] VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLY

[1821] LIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRISTTHNQKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWY

[1822] EPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI IALGGGSGGGSGGGGSA

[1823] PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGEVHNAK

[1824] TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE

[1825] PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG

[1826] SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALNHYTQKSLSLSPGK

[1827] 或者,将GGGSGGGSGGGGS接头用Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知任何其它合适的短肽接头。

[1828] 2i) TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) -GGGSGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1829] 本发明提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变A84S、V85T、S86T、Y87H、Q88N和T89Q的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) 突变蛋白 (SEQ ID NO:703) 的C末端与GGGSGGGSGGGGS肽接头融合,后者与曲妥珠单抗的铰链序列的一部分融合,含有至少残基SCDKTH(对应于SEQ ID NO:26的残基222-227),其融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;也参见SEQ ID NO:27)。TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) -GGGSGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:749):

[1830] VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLY

[1831] LIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRISTTHNQKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWY

[1832] EPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI IALGGGSGGGSGGGGSS

[1833] CDKTHAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV

[1834] EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK

[1835] AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP

[1836] PVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1837] 或者,将GGGSGGGSGGGGS接头用Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知任何其它合适的短肽接头。或者或另外,SCDKTH铰链序列被曲妥珠单抗铰链区的完整序列替代,其含有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233),或其含有至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的一部分。

[1838] 2j) TNF (I97T/A145R) -SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1839] 本文提供了了人TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变I97T/A145R的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (I97T/A145R) 突变蛋白 (SEQ ID NO:702) 的C末端融合于曲妥珠单抗的全部或部分铰链序列,至少含有残基SCDKTH(对应于SEQ ID NO:26的残基222-227),其与曲妥珠单抗Fc区的N末端融合(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;另见SEQ ID NO:27)。TNF (I97T/A145R) -SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列 (SEQ ID NO:750): VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSATKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFRESGQVYFGI IALSCDKTHAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1840] 或者,SCDKTH铰链序列被曲妥珠单抗铰链区的完整序列替代,其含有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233),或其含有至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的一部分。

[1841] 2k) TNF (I97T/A145R) -GGGSGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc

[1842] 本发明提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变I97T/A145R的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (I97T/A145R) 突变蛋白 (SEQ ID NO:702) 的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;另见SEQ ID NO:27)。TNF (I97T/A145R) -GGGSGGGSGGGGS-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列 (SEQ ID NO:751):

[1843] VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLY

[1844] LIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSATKSPCQRETPEGAEAKPW

[1845] YEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFRESGQVYFGI IALGGGSGGGSGGGGS

[1846] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

[1847] KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR

[1848] EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD

[1849] GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1850] 或者,将GGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1851] 2l) TNF (I97T/A145R) -GGGSGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc

[1852] 本发明提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变I97T/A145R的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。TNF (I97T/A145R) 突变蛋白 (SEQ ID NO:702) 的C末端与GGGSGGGSGGGGS肽接头融合,后者与曲妥珠单抗铰链序列的

一部分融合,至少含有残基SCDKTH(对应残基SEQ ID NO:26的222-227),其融合于曲妥珠单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:26的残基234-450;也参见SEQ ID NO:27)。TNF(I97T/A145R)-GGGSGGGSGGGGS-SCDKTH-曲妥珠单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:752):

[1853] VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLY

[1854] LIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSATKSPCQRETPEGAEAKPW

[1855] YEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI IALGGGSGGGSGGGGS

[1856] SCDKTHAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

[1857] VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

[1858] KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT

[1859] PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1860] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,SCDKTH铰链序列被曲妥珠单抗铰链区的完整序列替代,其含有序列EPKSCDKTHTCPPCP(对应于SEQ ID NO:26的残基219-233),或其含有至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的一部分。

[1861] 2m) TNF(R32W/S86T)-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc

[1862] 本文提供了人TNFR1拮抗剂融合蛋白构建体,其含有具有突变R32W/S86T的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF(R32W/S86T)突变蛋白(SEQ ID NO:685)的C末端融合于纳武单抗的铰链序列,含有残基ESKYGPPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223),将其融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;也参见SEQ ID NO:30)。TNF(R32W/S86T)-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:753):VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRWANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVTYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEP IYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI IALESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

[1863] 或者,包括纳武单抗铰链序列的全部或部分,含有ESKYGPPCPPCP铰链序列(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基。

[1864] 2n) TNF(R32W/S86T)-GGGSGGGSGGGGS-纳武单抗Fc

[1865] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变R32W/S86T的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF(R32W/S86T)突变蛋白(SEQ ID NO:685)的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。TNF(R32W/S86T)-GGGSGGGSGGGGS-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:754):VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRWANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVTYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEP IYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI IALGGGSGGGSGGGGSAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[1866] 或者,将GGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1867] 2o) TNF (R32W/S86T) -GGGSGGGSGGGGS-ESKYGPCPPCP-纳武单抗Fc

[1868] 本文提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有突变为R32W/S86T的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。TNF (R32W/S86T)突变蛋白(SEQ ID NO:685)的C末端与GGGSGGGSGGGGS肽接头融合,后者与纳武单抗的铰链序列融合,含有序列ESKYGPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29残基212-223),其融合于纳武单抗Fc区的N-末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。TNF (R32W/S86T) -GGGSGGGSGGGGS-ESKYGPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:755):V
RSSSRTPSDKPVAVHVPANQAEGQLQWLNWRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLTH
TISRIVTYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGII
ALGGGSGGGSGGGGSESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSLGK

[1869] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,包括纳武单抗铰链序列的一部分,含有ESKYGPCPPCP铰链序列(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基。

[1870] 2p) TNF (V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R) -ESKYGPCPPCP-纳武单抗Fc

[1871] 本发明提供了人TNFR1拮抗剂融合蛋白,含有突变为V1M、R31C、C69V、Y87H、C101A和A145R的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参照可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R)突变蛋白(SEQ ID NO:701)的C末端融合于纳武单抗的铰链序列,其含有序列ESKYGPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223),其融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。TNF (V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R) -ESKYGPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:756):MRSSSRTPSDKPVAVHVPANQAEGQLQWLNCRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYS
QVLFKGGQVPSHVLTHISRIVSHQTKVNLLSAIKSPAQRETPEGAEAKPWYEPYIYLGGVFQLEKGDRLSAEIN
RPDYLDVFRESGQVYFGIIALESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYITLP
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSLGK

[1872] 或者,包括纳武单抗铰链序列的全部或部分,含有ESKYGPCPPCP铰链序列(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基。

[1873] 2q) TNF (V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R) -GGGSGGGSGGGGS-纳武单抗Fc

[1874] 本发明提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变V1M、R31C、C69V、Y87H、C101A和A145R的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R)突变蛋白(SEQ ID NO:701)的C末端融合于

GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。TNF (V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R) - GGGSGGGSGGGGS-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:757):

[1875] MRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNCRANALLANGVELRDNQLVVPSEGL

[1876] YLIYSQVLFKGGQVPSTHVLLTHTISRIAVSHQTKVNLLSAIKSPAQRETPEGAEAKPW

[1877] YEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFRESGQVYFGIIALGGGSGGGSGGGGS

[1878] APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA

[1879] KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR

[1880] EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD

[1881] GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[1882] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头由Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1883] 2r) TNF (V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R) -GGGSGGGSGGGGS-ES KYGPPCPPCP-纳武单抗Fc

[1884] 本发明提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变V1M、R31C、C69V、Y87H、C101A和A145R的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R) 突变蛋白(SEQ ID NO:701)的C末端与GGGSGGGSGGGGS肽接头融合,后者与纳武单抗的铰链序列融合,含有序列ESKYGPPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223),其融合于纳武单抗Fc区的N-末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;也参见SEQ ID NO:30)。TNF (V1M/R31C/C69V/Y87H/C101A/A145R) - GGGSGGGSGGGGS-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:758):MRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNCRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQVPSTHVLLTHTISRIAVSHQTKVNLLSAIKSPAQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFRESGQVYFGIIALGGGSGGGSGGGGSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[1885] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头被Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域的已知任何其它合适的短肽接头。或者或另外,包括含有ESKYGPPCPPCP铰链序列(对应于SEQ ID NO的残基212-223:29)的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的纳武单抗铰链序列的全部或一部分。

[1886] 2s) TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) -ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc

[1887] 本发明提供了人TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变A84S、V85T、S86T、Y87H、Q88N和T89Q的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) 突变蛋白(SEQ ID NO:703)的C末端融合于纳武单抗的铰链序列,其含有序列ESKYGPPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223),其融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) -ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:759):VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYS

QVLFKGGCPSTHVLLTHTISRISTTHNQKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYIYLGGVFQLEKGDRLSAEIN
RPDYLDFAESGQVYFGIIALESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF
NWXVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYITLP
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLGLGK

[1888] 或者,包括含有ESKYGPPCPPCP铰链序列(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的纳武单抗铰链序列的全部或一部分。

[1889] 2t) TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) -GGGSGGGSGGGGS-纳武单抗Fc

[1890] 本发明提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变A84S、V85T、S86T、Y87H、Q88N和T89Q的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) 突变蛋白(SEQ ID NO:703)的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于纳武单抗Fc区的N末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) -GGGSGGGSGGGGS-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:760):VRSSRTPSDKPVAVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGCPSTHVLLTHTISRISTTHNQKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIALGGGSGGGSGGGGSAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

[1891] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头被Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1892] 2u) TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) -GGGSGGGSGGGGS-ESK YGPPCPPCP-纳武单抗Fc

[1893] 本发明提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变A84S、V85T、S86T、Y87H、Q88N和T89Q的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) 突变蛋白(SEQ ID NO:703)的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于纳武单抗的铰链序列,含有序列ESKYGPPCPPCP(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223),其融合于纳武单抗Fc区的N-末端(对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;也参见SEQ ID NO:30)。TNF (A84S/V85T/S86T/Y87H/Q88N/T89Q) -GGGSGGGSGGGGS-ESKYGPPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列(SEQ ID NO:761):VRSSRTPSDKPVAVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGCPSTHVLLTHTISRISTTHNQKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIALGGGSGGGSGGGGSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

[1894] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头被Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,包括含有ESKYGPPCPPCP铰链序列(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的至少5、6、7、8、9、

10或11个连续残基的纳武单抗铰链序列的全部或一部分。

[1895] 2v) TNF (I97T/A145R) -ESKYPPCPPCP-纳武单抗Fc

[1896] 本文提供了人TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变I97T/A145R的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (I97T/A145R) 突变蛋白 (SEQ ID NO:702) 的C末端融合于纳武单抗的铰链序列,含有序列ESKYPPCPPCP (对应于SEQ ID NO:29的残基212-223),将其融合于纳武单抗Fc区的N末端 (对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。TNF (I97T/A145R) -ESKYPPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列 (SEQ ID NO:762): VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQGPCSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSATKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDLFRESGQVYFGI IALESKYPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

[1897] 或者,包括含有ESKYPPCPPCP铰链序列 (对应于SEQ ID NO:29的残基212-223) 的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的纳武单抗铰链序列的全部或一部分。

[1898] 2w) TNF (I97T/A145R) -GGGSGGGSGGGGS-纳武单抗Fc

[1899] 本发明提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变I97T/A145R的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (I97T/A145R) 突变蛋白 (SEQ ID NO:702) 的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于纳武单抗Fc区的N末端 (对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。TNF (I97T/A145R) -GGGSGGGSGGGGS-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列 (SEQ ID NO:763):

[1900] VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLY

[1901] LIYSQVLFKGGQGPCSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSATKSPCQRETPEGAEAKPW

[1902] YEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDLFRESGQVYFGI IALGGGSGGGSGGGGS

[1903] APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA

[1904] KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR

[1905] EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD

[1906] GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

[1907] 或者,GGGSGGGSGGGGS接头被Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。

[1908] 2x) TNF (I97T/A145R) -GGGSGGGSGGGGS-ESKYPPCPPCP-纳武单抗Fc

[1909] 本发明提供了TNFR1拮抗剂融合蛋白,其含有具有突变I97T/A145R的TNFR1选择性拮抗剂TNF突变蛋白,参考可溶TNF的序列,如SEQ ID NO:2所示。将TNF (I97T/A145R) 突变蛋白 (SEQ ID NO:702) 的C末端融合于GGGSGGGSGGGGS肽接头,后者融合于纳武单抗的铰链序列,含有序列ESKYPPCPPCP (对应于SEQ ID NO:29残基212-223),其融合于纳武单抗Fc区的N-末端 (对应于SEQ ID NO:29的残基224-440;另见SEQ ID NO:30)。TNF (I97T/A145R) -GGGSGGGSGGGGS-ESKYPPCPPCP-纳武单抗Fc融合蛋白具有以下序列 (SEQ ID NO:764):

[1910] VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLY

[1911] LIYSQVLFKGGQGPCSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSATKSPCQRETPEGAEAKPW

[1912] YEPIYLGGVVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDLFRESGQVYFGI IALGGGGSGGGGSGGGGS

[1913] ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFN

[1914] WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI

[1915] EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[1916] 或者,GGGGSGGGGSGGGGS接头被Gly-Ser接头替代,例如(GSGS)_n或(GGGGS)_n接头,其中n=1、2、3、4或5,或如本文所述或本领域已知的任何其它合适的短肽接头。或者或另外,包括含有ESKYGPPCPPCP铰链序列(对应于SEQ ID NO:29的残基212-223)的至少5、6、7、8、9、10或11个连续残基的纳武单抗铰链序列的全部或一部分。

[1917] 实施例6

[1918] 在抗体背景下的呈递在抑制靶受体的背景下存在困难。二价抗体诱导靶受体的二聚化,这可能导致其激活。虽然在某些情况下这是可取的,但对于TNFR1抑制剂来说却非常不希望。即使是TNFR1的短暂激活也会引起细胞因子风暴和显著的毒性。因此,需要单价抑制剂。为了实现这一点,本文提供了单价构建体(参见全文的描述和上文的实施例5)。这个实施例举例说明了示例构建体的活性和性质,其是单链dAb与人血清白蛋白的N末端融合蛋白。

[1919] 这个实施例提供了示例的纳米抗体。纳米抗体是含有Vhh结构域的蛋白质,仅包括重链,不需要轻链的协同作用,就像人和小鼠的情况一样(Harmsen and De Haard, Appl Microbiol Biotechnol. 77:13-22(2007))。因为它们是单链,所以必须以融合蛋白的形式呈现,例如抗体形式的移植CDR,因为其自身作为小蛋白(~13-15KDa)的半衰期短。

[1920] 使用Sabir et al.((2014)Comptes Rendus Biologies 337:244-249)描述的方法制备噬菌体文库。回收与肿瘤坏死因子受体-1(TNFR1)具有高亲和力结合的噬菌体并测试了它们结合TNFR1的能力,以及与人肿瘤坏死因子- α (TNF- α)竞争结合TNFR1的能力,如美国公开申请号US20140112929所述。

[1921] 编码每个含有单链的Vhh抗体的核酸在CHO细胞中表达(见Sokolowska-Wedzina et al. (2014)Protein Expression and Purification 99:50-57针对表达载体的描述),并且均通过HPLC色谱法纯化。样品1是对照抗TNFR1抗体(来自ThermoFisher的H398),Vhh1-4是含有dAb的Vhh抗体。序列(见SEQ ID NO:54、1478、58和59)如下:

[1922] Vhh-1:

[1923] EVQLLES^{GGGLV}QPGGSLRLS^{CAASGFT}FDKYS^{MGWVR}QAPGK^{GLEWVSQ}ISDTADRTYYAHAVKGRFT
ISRDN^{SKNTLYLQ}MNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQ^{GLVTVSS}

[1924] Vhh-2:

[1925] EVQLLES^{GGGLV}QPGGSLRLS^{CAASGFT}FSQYRMH^{WVR}QAPGK^{SLEWSS}IDTRGSSTYYADPVKGRFT
ISRDN^{SKNTLYLQ}MNSLRAEDTAVYYCAKAVTMFSPFFDYWGQ^{GLTV}

[1926] Vhh-3:

[1927] EVQLLES^{GGGLV}QPGGSLRLS^{CAASGFT}FVDYEMH^{WVR}QAPGK^{GLEWSS}ISESGTTTTYYADSVKGRFT
ISRDN^{SKNTLYLQ}MNSLRAEDTAVYYCAKRRFSASTFDYWGQ^{GLVTVSS}

[1928] Vhh-4:EVQLLES^{GGGLV}QPGGSLRLS^{CAASGFT}FAHETM^{VWVR}QAPGK^{GLEWVSH}IPPDGQDPFYAD
SVKGRFTISRDN^{SKNTLYLQ}MNSLRAEDTAVYHC^{ALLPKRGP}WFDYWGQ^{GLVTVSS}

[1929] Vhh-4中突出显示和下划线的半胱氨酸(C)与其它Vhh链中相应的半胱氨酸形成环,由此Vhh是受约束的多肽。第14位氨基酸残基的脯氨酸可被丙氨酸置换。

[1930] 制备并表达编码Vhh域抗体片段的表达盒,并通过HPLC色谱法纯化。下表显示了每个测试Vhh抗体的表达水平。有两个分子需要His标签以进行纯化。结果如下表所示:

[1931] 表15:Vhh 1-4的表达和产量结果

[1932]

项目	描述	标签	收获	产量
样品1	抗人TNFRSF1A治疗性抗体scFv片段(H398)*	His	146µg	Abt.1g/L
Vhh-1	重组人抗-TNFRSF1A单域抗体	无	500µg	30mg/L
Vhh-2	重组人抗-TNFRSF1A单域抗体	His	1000µg	49.4mg/L
Vhh-3	串联scFV双特异性抗体	无	500µg	42mg/L
Vhh-4	串联scFV双特异性抗体(见SEQ ID NO:1475)	无	500µg	51mg/L

[1933] *TNF受体超家族成员1A抗体H398(ThermoFisher;H398包含SEQ ID NO:678)。

[1934] 随后使用表面等离子体共振 (SPR) 方法 (Sciences GL.Biacore Assay Handbook.General Electric Company (2012);以及Richter et al. (2019)MAbs 11:166-177) 在结合研究中测试了Vhh 1-4中的每一个。如Richter et al. (2019)所述也进行了Vhh抑制TNF-a与TNFR1胞外结构域结合的竞争测定。如Lin et al., (2015)J Biomed Sci 22:53和Sonnier et al. (2010)Journal of Gastrointestinal Surgery 14:1592-1599所述分别进行TNF诱导的VCAM或IL8表达的抑制,其是可比较的测定。

[1935] 结果总结如下表所示。结果表明,Vhh-4对TNFR-1的胞外结构域具有非常高的亲和力($6.6 \times 10^{-13}M$);它对TNF与TNFR1的结合具有100%的竞争性($IC_{50} \sim 1nM$),并且是4个候选物中最有效抑制TNF诱导的VCAM-1合成(0.3nM)。在测试的这些Vhh dAb抗体中,Vhh-4表现最好,并制备了含有Vhh-4和HSA的构建体。

[1936] 以下序列代表含有Vhh-4的构建体(SEQ ID NO:1475):dAb部分是SEQ ID NO:1475的残基20-138,通过Gly-Ser接头(SEQ ID NO:1475的残基139-147)连接到人血清白蛋白(HSA;SEQ ID NO:1475的残基148-732)。

[1937] EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGLTVTVSS...HSA...

[1938] 表:比较结合和竞争测定(对照抗体的结果未示出*)

[1939]

样品	Kd (Molar by SPR)	TNF 竞争(最大值)	TNF 依赖性生物测定(IC50)
Vhh-1	4.3×10^{-10}	部分(33%)	IL-8 (500 nM)
Vhh-2	1.0×10^{-6}	非竞争性	VCAM (3 nM)
Vhh-3	5.7×10^{-14}	部分(34%)	IL-8 (1 nM)
Vhh-4	6.6×10^{-13}	竞争性(100%)	VCAM (0.3 nM)

[1940] *回收的抗体量微乎其微

[1941] 含有与HSA连接的Vhh-4抗体的构建体示出具有作为TNFR1拮抗剂的活性。它阻断了TNFR1,如LPS刺激的THP1细胞中IL-6和IL-8基因表达显著降低所示。将 3×10^5 THP1细胞用5µg和20µg以及作为对照的0µg的所述构建体处理30分钟,然后用LPS(10ng/ml)刺激4小时。收集RNA样本,并使用管家基因次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)作为内部对照进行qPCR分析以分析IL-6和IL-8基因表达。结果表明,这两个剂量均显著降低了IL-6和

IL-8表达 ($n=3$, 平均值 \pm SEM; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)。

[1942] 由于修改对本领域技术人员来说是显而易见的, 因此本发明旨在仅受所附权利要求的范围限制。

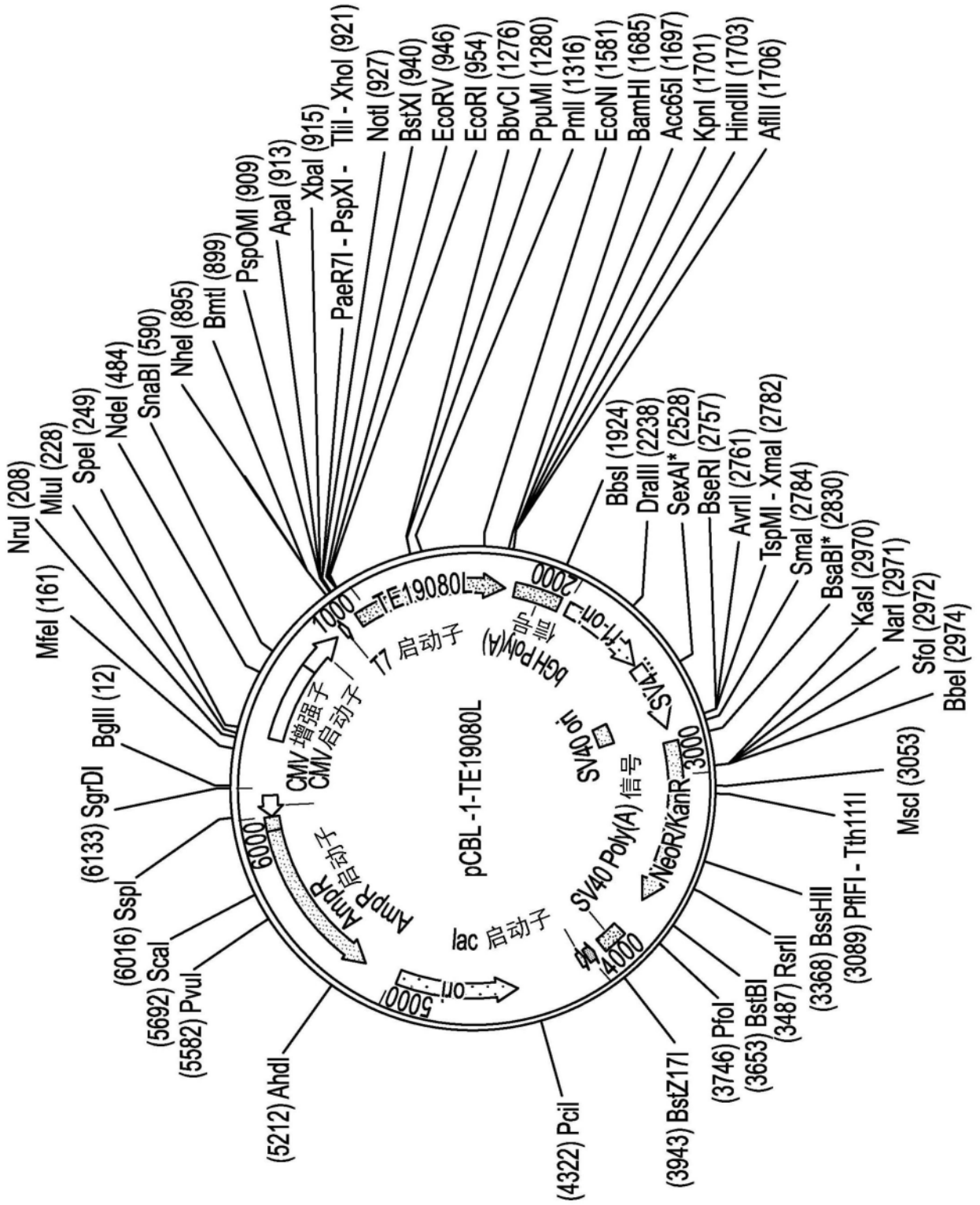


图1

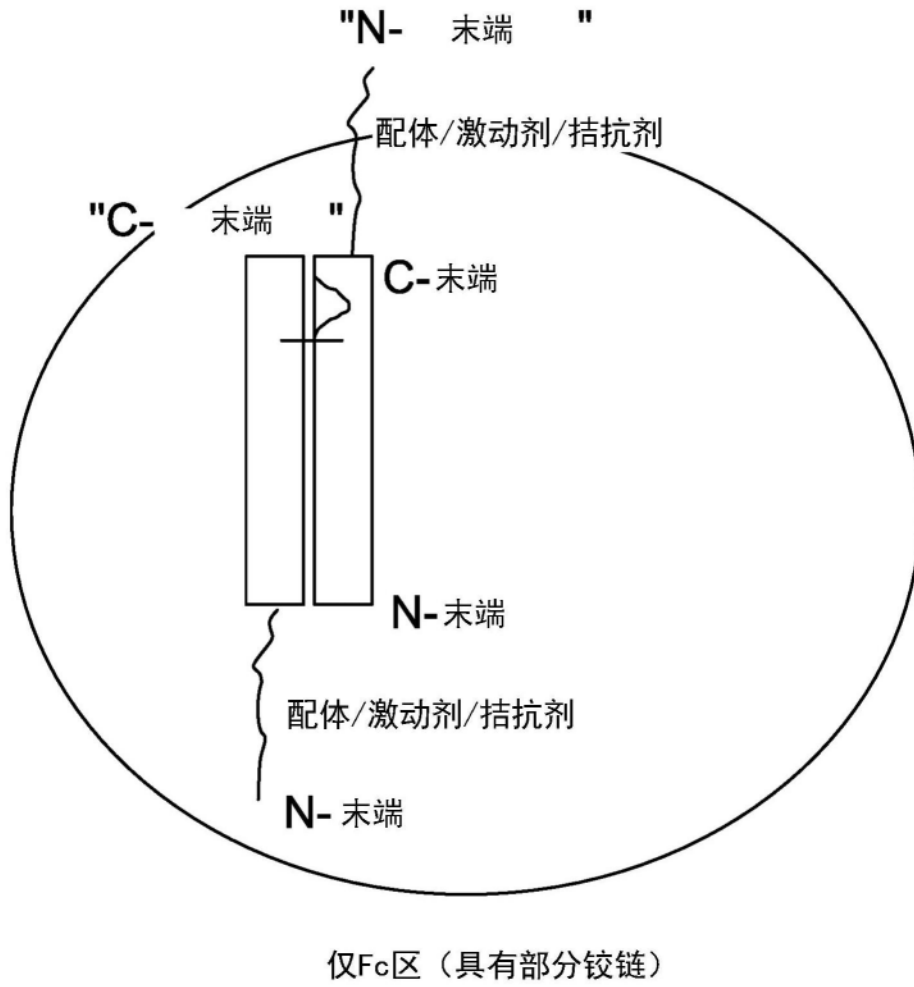
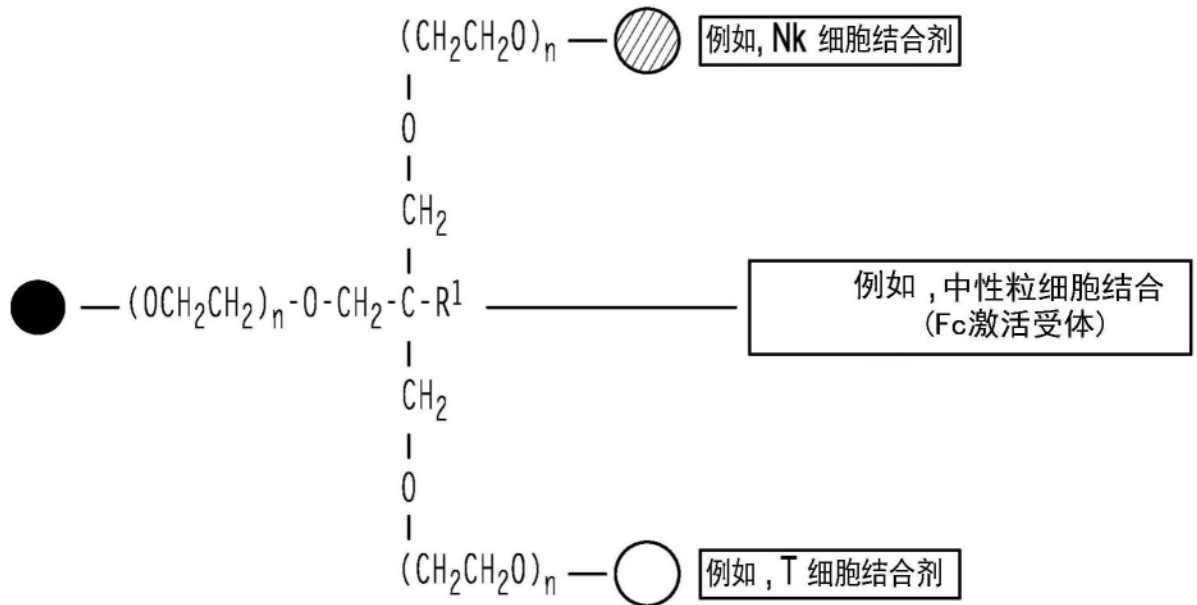


图2



R¹是H或低级烷基 (C1-C5), 如CH₃

⊙ 说明书中描述

○ 说明书中描述

n=1-5

图3B

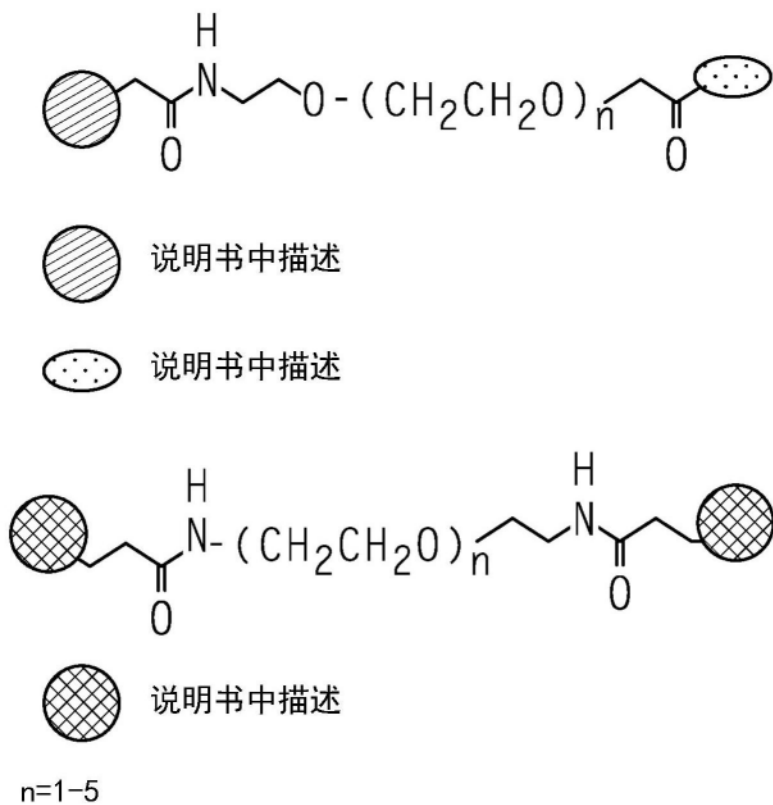


图3C

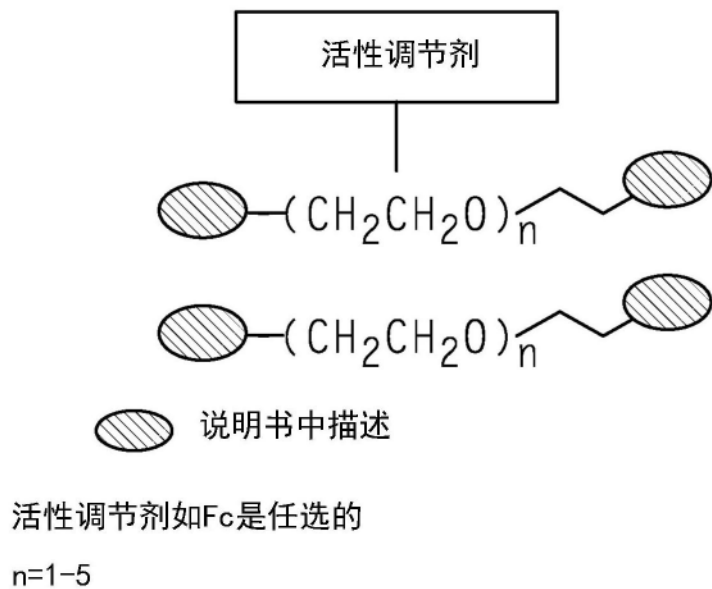
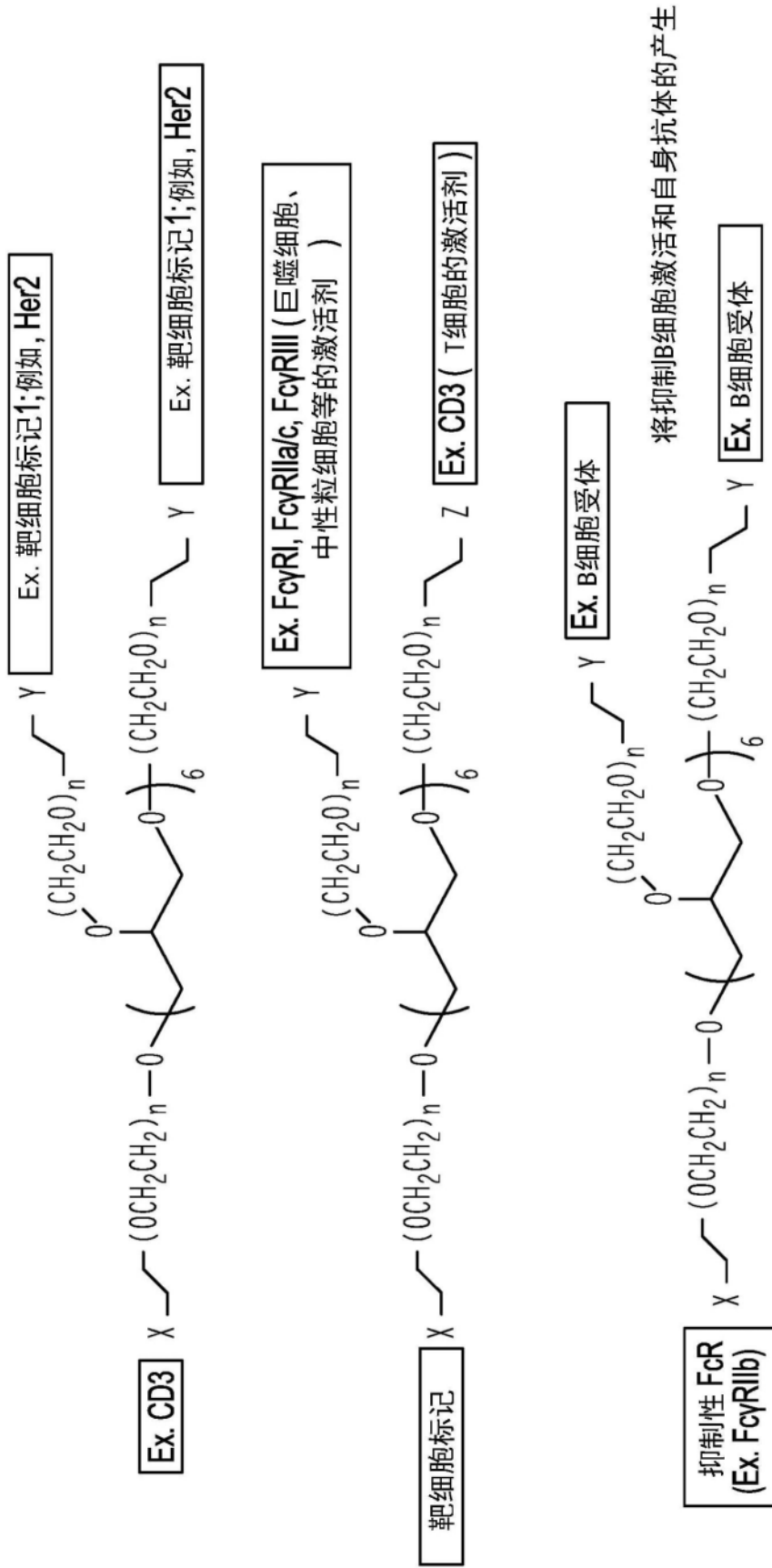


图3D



可以增加具有相同或不同反应性的臂的数目以多样化可以递送的物质

图4

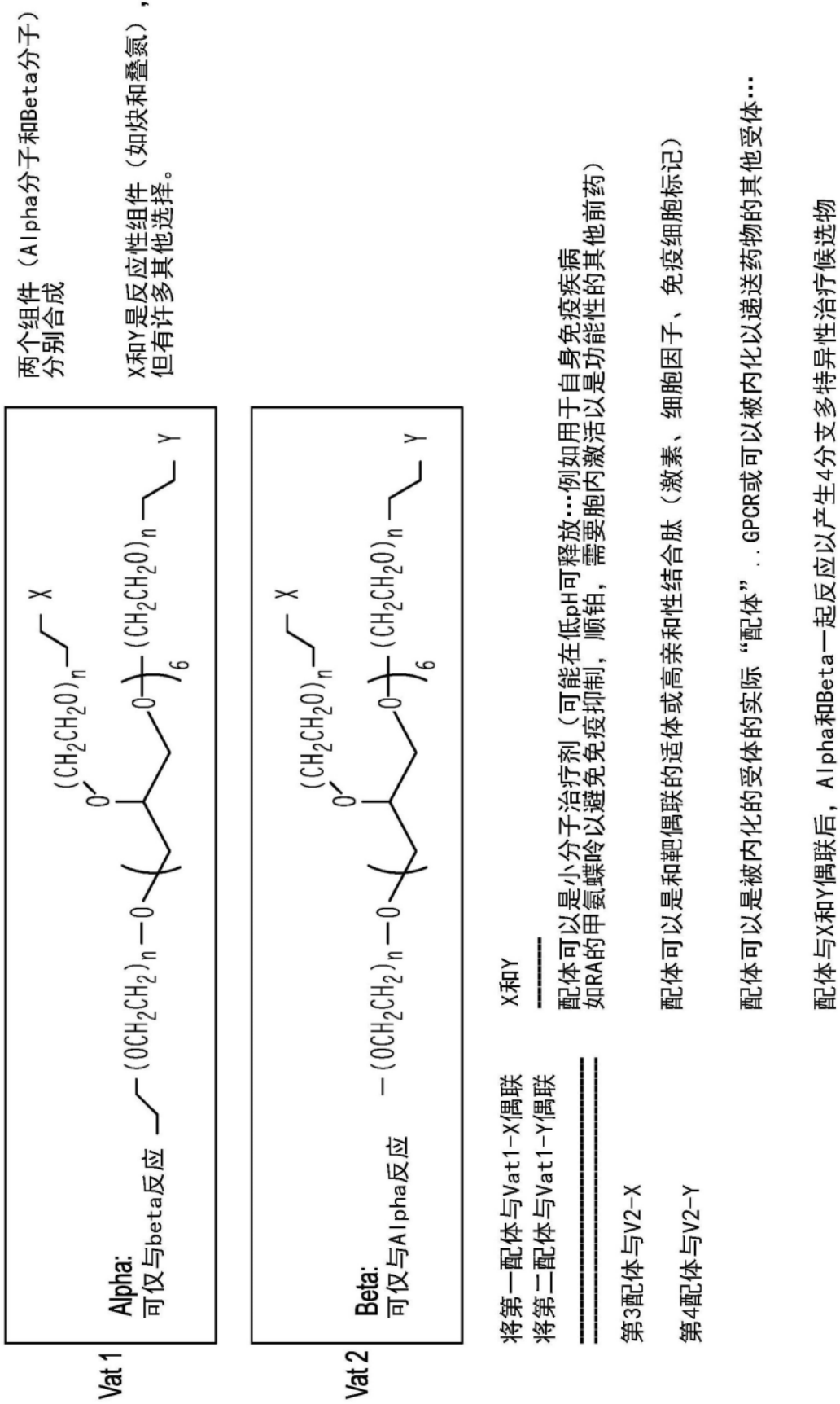


图5