



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110121509 B

(45) 授权公告日 2024.05.07

(21) 申请号 201780080666.4

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2017.10.24

C07K 16/28 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 39/395 (2006.01)

申请公布号 CN 110121509 A

A61P 1/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.08.13

A61P 29/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 37/00 (2006.01)

62/413,188 2016.10.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

US 2016053007 A1, 2016.02.25

2019.06.26

WO 2014106602 A1, 2014.07.10

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2012161856 A1, 2012.11.29

PCT/US2017/058019 2017.10.24

WO 2009064854 A2, 2009.05.22

(87) PCT国际申请的公布数据

WO 2013044298 A1, 2013.04.04

W02018/081074 EN 2018.05.03

WO 2015073580 A1, 2015.05.21

(73) 专利权人 西达-赛奈医疗中心

US 2012079611 A1, 2012.03.29

地址 美国加利福尼亚州

D Q Shih et al.. Inhibition of a novel fibrogenic factor T11 a reverses established colonic fibrosis.《MUCOSAL IMMUNOLOGY》.2014, 第7卷(第6期),

(72) 发明人 J·比尔斯伯勒 斯蒂芬·塔尔干

审查员 刘东川

布拉德利·亨克尔

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

权利要求书1页 说明书44页

有限公司 11262

序列表20页 附图4页

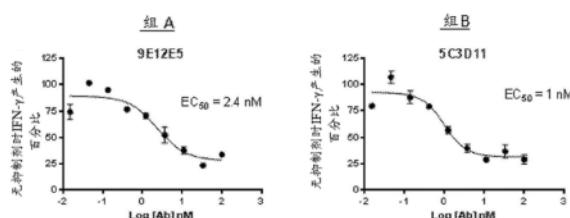
专利代理人 贺淑东

(54) 发明名称

中和抗TL1A单克隆抗体

(57) 摘要

本文描述了用于治疗炎性肠病 (IBD)、克罗恩病 (CD)、溃疡性结肠炎 (UC) 和医学难治性溃疡性结肠炎 (MR-UC) 的方法和药物组合物。特别地，公开了可用于治疗 IBD 的抗TL1A抗体。



1. 一种与TL1A多肽特异性结合的抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含:

(a) 重链可变区,其包含重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3,其中所述HCDR1由SEQ ID N0:5中所述的重链可变区的HCDR1的氨基酸序列组成,所述HCDR2由SEQ ID N0:5中所述的重链可变区的HCDR2的氨基酸序列组成,且所述HCDR3由SEQ ID N0:5中所述的重链可变区的HCDR3的氨基酸序列组成;

(b) 轻链可变区,其包含轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2、和LCDR3,其中所述LCDR1由SEQ ID N0:13中所述的轻链可变区的LCDR1的氨基酸序列组成,所述LCDR2由SEQ ID N0:13中所述的轻链可变区的LCDR2的氨基酸序列组成,且所述LCDR3由SEQ ID N0:13中所述的轻链可变区的LCDR3的氨基酸序列组成。

2. 根据权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段以1E-10M或更低的结合亲和力(KD)与人TL1A结合。

3. 根据权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是:单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、二硫键连接的Fv或scFv。

4. 根据权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,其中所述重链包含含有SEQ ID N0:5、35、36、37、38或39中任一项所述的氨基酸序列的重链可变区;并且所述轻链包含含有SEQ ID N0:13、40、41、42、43或44的氨基酸序列的轻链可变区。

5. 根据权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段为人源化抗体或抗原结合片段。

6. 根据权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段为抗体,并且所述抗体为IgG抗体。

7. 一种药物组合物,其包含:治疗有效量的根据权利要求1-6中任一项所述的抗体或抗原结合片段,以及药学上可接受的载体。

8. 根据权利要求1-6中任一项所述的抗体或抗原结合片段在制备用于治疗有需要的受试者中的溃疡性结肠炎的药物中的用途。

9. 根据权利要求8所述的用途,其中所述溃疡性结肠炎为医学难治性溃疡性结肠炎。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中所述受试者过表达TL1A。

11. 根据权利要求1-6中任一项所述的抗体或抗原结合片段在制备用于治疗有需要的受试者中的克罗恩病的药物中的用途。

12. 一种多核苷酸,其编码根据权利要求1-6中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

中和抗TL1A单克隆抗体

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年10月26日提交的美国临时申请62/413,188的优先权,该申请的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含已经以ASCII格式电子提交的序列表,并且其通过引用以其全文并入本文。所述ASCII副本创建于2017年10月23日,命名为52388-728_601_SL.txt且大小为33,920字节。

背景技术

[0005] 炎性肠病 (IBD) 是指在胃肠道中引起炎性病况的肠道病症的集合。IBD的主要类型是溃疡性结肠炎 (UC) 和克罗恩病 (CD)。这些疾病普遍存在,全球约有18.6亿人被诊断患有UC,并且全球约有130万人被诊断患有CD。不幸的是,IBD患者可用的疗法的数量有限,并且临床试验中欠佳的结果阻碍了新疗法的开发。因此,需要治疗IBD的新疗法。

发明内容

[0006] 本公开内容提供了可用于IBD治疗的抗体。在一方面,提供了与TL1A多肽特异性结合的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含:包含SEQ ID NO:6-8的互补决定区 (CDR) 的重链和包含SEQ ID NO:14-16的互补决定区 (CDR) 的轻链。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含:包含SEQ ID NO:22-24的互补决定区 (CDR) 的重链和包含SEQ ID NO:30-32的互补决定区 (CDR) 的轻链。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是:单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单结构域抗体、双抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体、双特异性抗体或其组合。进一步的实施方案提供了药物组合物,其包含:治疗有效量的所述的抗体或抗原结合片段,以及药学上可接受的载体。进一步的实施方案提供了治疗有需要的受试者中的炎性肠病的方法,其包括:向所述受试者施用治疗有效量的所述的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,所述炎性肠病包括克罗恩病、溃疡性结肠炎、医学难治性溃疡性结肠炎 (medically refractive-ulcerative colitis) 或其组合。在一些实施方案中,在向所述受试者施用所述抗体或抗原结合片段之前,所述受试者过表达TL1A。在一些实施方案中,所述受试者包含与所述炎性肠病相关的风险变体。

[0007] 在另一方面,本文提供了多肽,其包含:选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32的一个或多个互补决定区。

[0008] 在另一方面,本文提供了与参考抗体同人TL1A结合的区域相同的区域结合的抗体或抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:6-8的重链互补决定区 (CDR) 和SEQ ID NO:14-16的轻链互补决定区 (CDR)。在一些实施方案中,所述参考抗体包含SEQ ID NO:5的重链可变结构域和SEQ ID NO:13的轻链可变结构域。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是:单

克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单结构域抗体、双抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体、双特异性抗体或其组合。进一步的实施方案提供了药物组合物,其包含:治疗有效量的所述抗体或抗原结合片段,以及药学上可接受的载体。进一步的实施方案提供了治疗有需要的受试者中的炎性肠病的方法,其包括:向所述受试者施用治疗有效量的所述抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,所述炎性肠病包括克罗恩病、溃疡性结肠炎、医学难治性溃疡性结肠炎或其组合。在一些实施方案中,在向所述受试者施用所述抗体或抗原结合片段之前,所述受试者过表达TL1A。在一些实施方案中,所述受试者包含与所述炎性肠病相关的风险变体。

[0009] 在另一方面,本文提供了与参考抗体同人TL1A结合的区域相同的区域结合的抗体或抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:22-24的重链互补决定区(CDR)和SEQ ID NO:30-32的轻链互补决定区(CDR)。在一些实施方案中,所述参考抗体包含SEQ ID NO:21的重链可变结构域和SEQ ID NO:29的轻链可变结构域。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是:单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单结构域抗体、双抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体、双特异性抗体或其组合。进一步的实施方案提供了药物组合物,其包含:治疗有效量的所述抗体或抗原结合片段,以及药学上可接受的载体。进一步的实施方案提供了治疗有需要的受试者中的炎性肠病的方法,其包括:向所述受试者施用治疗有效量的所述抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,所述炎性肠病包括克罗恩病、溃疡性结肠炎、医学难治性溃疡性结肠炎或其组合。在一些实施方案中,在向所述受试者施用所述抗体或抗原结合片段之前,所述受试者过表达TL1A。在一些实施方案中,所述受试者包含与所述炎性肠病相关的风险变体。

[0010] 在另一方面,本文提供了包含具有SEQ ID NO:7的肽的组合物。在一些实施方案中,所述组合物进一步包含选自SEQ ID NO:6、8和14-16的一种或多种肽。进一步的实施方案提供了治疗患有炎性肠病的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的所述组合物。

[0011] 在另一方面,本文提供了包含具有SEQ ID NO:23的肽的组合物。在一些实施方案中,所述组合物进一步包含选自SEQ ID NO:22、24和30-32的一种或多种肽。进一步的实施方案提供了治疗患有炎性肠病的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的所述组合物。

[0012] 在另一方面,本文提供了治疗有需要的受试者中的炎性肠病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的抗TL1A抗体,条件是所述受试者包含在TNFSF15基因座处的一种或多种风险变体,并且条件是所述抗TL1A抗体包含:包含SEQ ID NO:6-8的互补决定区(CDR)的重链和包含SEQ ID NO:14-16的互补决定区(CDR)的轻链。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体是:单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单结构域抗体、双抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体、双特异性抗体或其组合。在一些实施方案中,所述炎性肠病包括克罗恩病、溃疡性结肠炎、医学难治性溃疡性结肠炎或其组合。

[0013] 在另一方面,本文提供了治疗有需要的受试者中的炎性肠病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的抗TL1A抗体,条件是所述受试者包含在TNFSF15基因座处的一种或多种风险变体,并且条件是所述抗TL1A抗体包含:包含SEQ ID NO:22-24的互补决定

区(CDR)的重链和包含SEQ ID NO:30-32的互补决定区(CDR)的轻链。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体是:单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单结构域抗体、双抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体、双特异性抗体或其组合。在一些实施方案中,所述炎性肠病包括克罗恩病、溃疡性结肠炎、医学难治性溃疡性结肠炎或其组合。

[0014] 在另一方面,本文提供了治疗有需要的受试者中的炎性肠病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的抗TL1A抗体,条件是所述受试者过表达TL1A,并且条件是所述抗TL1A抗体包含:包含SEQ ID NO:6-8的互补决定区(CDR)的重链和包含SEQ ID NO:14-16的互补决定区(CDR)的轻链。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体是:单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单结构域抗体、双抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体、双特异性抗体或其组合。在一些实施方案中,所述炎性肠病包括克罗恩病、溃疡性结肠炎、医学难治性溃疡性结肠炎或其组合。

[0015] 在另一方面,本文提供了治疗有需要的受试者中的炎性肠病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的抗TL1A抗体,条件是所述受试者过表达TL1A,并且条件是所述抗TL1A抗体包含:包含SEQ ID NO:22-24的互补决定区(CDR)的重链和包含SEQ ID NO:30-32的互补决定区(CDR)的轻链。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体是:单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单结构域抗体、双抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体、双特异性抗体或其组合。在一些实施方案中,所述炎性肠病包括克罗恩病、溃疡性结肠炎、医学难治性溃疡性结肠炎或其组合。

附图说明

[0016] 示例性实施方案在参考附图中说明。本文公开的实施方案和附图意在被认为是说明性的而非限制性的。

[0017] 图1描绘了来自杂交瘤684842-3(5C3D11)的总RNA的琼脂糖凝胶电泳。DNA标记物—标记物III示于泳道M中,且684842-3的总RNA示于泳道R中。

[0018] 图2描绘了684842-3的PCR产物的琼脂糖凝胶电泳。DNA标记物—标记物III示于泳道M中,684842-3的可变重链(VH)示于泳道1中,且684842-3的可变轻链(VL)示于泳道2中。

[0019] 图3描绘了来自杂交瘤684842-6(9E12E5)的总RNA的琼脂糖凝胶电泳。DNA标记物—标记物III示于泳道M中,且684842-6的总RNA示于泳道R中。

[0020] 图4描绘了684842-6的PCR产物的琼脂糖凝胶电泳。DNA标记物—标记物III示于泳道M中,684842-6的VH示于泳道1中,且684842-6的VL示于泳道2中。

[0021] 图5图示了9E12E5(组A)和5C3D11(组B)对人TL1A诱导的IFN- γ 产生的抑制。

[0022] 图6图示了5C3D11(组A)和9E12E5(组B)对鼠TL1A的识别能力。

[0023] 图7描绘了直方图,显示了与未转染的HEK293细胞系相比,在表达TL1A的HEK293细胞系上5C3D11(组A)和9E12E5(组B)抗TL1A抗体的荧光染色。

具体实施方式

[0024] 肿瘤坏死因子样蛋白1A (TL1A) 已经与严重的结肠炎和克罗恩病的发展和严重程度相关联。此外,临床前和人遗传关联数据表明TL1A是克罗恩病的潜在治疗靶点。本公开内容描述了针对TL1A的中和抗体,并提供了用于IBD治疗的新型治疗剂。

[0025] 本文引用的所有参考文献均通过引用以其全文并入,如同充分进行阐述。除非另有定义,否则本文使用的技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常所理解的相同含义。Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology第3版,修订版,J.Wiley&Sons (New York, NY 2006);以及Sambrook和Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012),向本领域技术人员提供了本申请中使用的许多术语的通用指南。对于参考如何制备抗体,参见D.Lane, Antibodies: A Laboratory Manual第2版 (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor NY, 2013); Kohler和Milstein, (1976) Eur. J. Immunol. 6:511; Queen等人,美国专利号5,585,089;以及Riechmann等人,Nature 332:323 (1988);美国专利号4,946,778;Bird, Science 242:423-42 (1988); Huston等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); Ward等人,Nature 334:544-54 (1989); Tomlinson I. 和Holliger P. (2000) Methods Enzymol, 326, 461-479; Holliger P. (2005) Nat. Biotechnol. Sep; 23 (9): 1126-36。

[0026] 本领域技术人员将认识到,许多类似于或等同于本文所述的方法和材料可用于实践本文所述的实施方案。实际上,本说明书不限于所述的方法和材料。本文使用的选定术语的非限制性定义提供如下。

[0027] “IBD”是指炎性肠病,并且包括但不限于克罗恩病、溃疡性结肠炎和医学难治性溃疡性结肠炎。

[0028] “CD”、“UC”和“MR-UC”分别指克罗恩病、溃疡性结肠炎和医学难治性溃疡性结肠炎。

[0029] “TL1A”是指TNF样蛋白1A。

[0030] “TNFSF15”是指肿瘤坏死因子超家族成员15,并且有时可与TL1A互换。

[0031] “SNP”是指单核苷酸多态性。

[0032] “风险变体”和“风险等位基因”是指相对于没有所述风险变体或风险等位基因的个体,其存在与炎性肠病,包括但不限于克罗恩病、溃疡性结肠炎和医学难治性溃疡性结肠炎的易感性提高相关联的等位基因。

[0033] “保护性变体”和“保护性等位基因”是指相对于没有所述保护性变体或保护性等位基因的个体,其存在与发生炎性肠病,包括但不限于克罗恩病、溃疡性结肠炎和医学难治性溃疡性结肠炎的可能性降低相关联的等位基因。与诊断患有炎性肠病的个体相比,保护性变体更常存在于健康个体中。

[0034] 关于存在特定的特异性变体或等位基因所用的“保护性”和“保护”是指对IBD,包括但不限于CD、UC和MR-UC的易感性降低。

[0035] 关于存在特异性变体或等位基因所用的“风险”是指对IBD,包括但不限于CD、UC和MR-UC的易感性提高。

[0036] “生物样品”是指可以从中发现核酸和/或蛋白质分子的任何生物材料。作为非限

制性实例,术语材料包括全血、血浆、血清、唾液、面颊拭子以及任何其他体液或组织。

[0037] “IC”是指免疫复合物。

[0038] “PBMC”是指外周血单个核细胞。

[0039] “抗TL1A疗法”是指抑制对TL1A的应答和/或抑制TL1A信号传导,包括但不限于抑制从TL1A配体通过其受体到各种上游和/或下游分子靶标的任何分子信号传导步骤的任何试剂。抗TL1A疗法可包括使用小分子;核酸,如siRNA、shRNA和miRNA;核酸类似物,如PNA、pc-PNA和LNA;适体;核糖体;肽;蛋白质;avimer;抗体或其变体和片段;以及/或者其任意组合。

[0040] 术语“抗体”是指通过免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点识别并特异性结合靶标如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或前述的组合的免疫球蛋白分子。如本文所用,术语“抗体”包括完整的多克隆抗体、完整的单克隆抗体、抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段)、单链Fv(scFv)突变体、CDR移植的抗体、多特异性抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体的抗原决定部分的融合蛋白以及包含抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子,只要该抗体显示出期望的生物活性即可。基于其重链恒定结构域的身份,称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ,抗体可以是五大类免疫球蛋白IgA、IgD、IgE、IgG和IgM中的任一种,或其亚类(同种型)(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。不同类别的免疫球蛋白具有不同且公知的亚基结构和三维配置。抗体可以是裸露的或与其他分子如毒素、放射性同位素等缀合。

[0041] 术语“抗体片段”包括“抗原结合片段”,其指具有抗体的抗原决定可变区的抗体部分。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段,线性抗体、单链抗体,以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0042] 术语“单克隆抗体”是指参与单个抗原决定簇或表位的高度特异性识别和结合的同源抗体群。这与通常包含针对不同抗原决定簇的不同抗体的多克隆抗体形成对比。

[0043] 术语“人源化抗体”是指具有特异性免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其片段的含有最小非人(例如鼠)序列的非人(例如鼠)抗体的形式。例如,人源化抗体在可变区中包含少于约40%的非人序列。在一些情况下,人源化抗体在全长抗体序列中包含少于约20%的非人序列。在一些情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白,其中来自互补决定区(CDR)的残基被来自具有期望的特异性、亲和力和能力的非人物种(例如,小鼠、大鼠、兔、仓鼠)的CDR的残基取代(Jones等人,1986,Nature,321:522-525;Riechmann等人,1988,Nature,332:323-327;Verhoeyen等人,1988,Science,239:1534-1536)。用于产生人源化抗体的方法的实例在美国专利号5,225,539中描述。

[0044] 术语“人抗体”是指由人产生的抗体或使用本领域已知的任何技术制备的具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的抗体。人抗体的这种定义包括完整的或全长抗体、其片段和/或包含至少一个人重链和/或轻链多肽的抗体,例如包含人轻链和人重链多肽的抗体。

[0045] 术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的序列衍生自两个或更多个物种的抗体。通常,轻链和重链两者的可变区对应于衍生自具有期望的特异性、亲和力和能力的一个物种的哺乳动物(例如、小鼠,大鼠,兔等)的抗体的可变区,而恒定区与抗体中衍生自来自另一个物种的哺乳动物(通常是人)的序列是同源的,以避免在该物种中引发免疫应答。

[0046] 每条重链和轻链由所述重链或轻链的“可变区”和所述重链或轻链的“恒定区”组成。重链和轻链区域可以进一步分为称为互补决定区(CDR)的高变区域，并且散布有被称为框架区(FR)的保守区域。因此，每个重链和轻链区由三个CDR和四个FR组成，它们从N末端到C末端按照以下顺序布置：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。该结构是本领域技术人员公知的。

[0047] 如本文所用，术语“CDR”是指抗体可变序列内的互补决定区，并有助于抗体的抗原结合位点的形成。用于确定CDR的技术是本领域已知的(例如，Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,1991,National Institutes of Health, Bethesda Md.;以及Al-lazikani等人(1997)J.Molec.Biol.273:927-948)。

[0048] “保守氨基酸置换”是其中一个氨基酸残基被另一个具有相似侧链的氨基酸残基取代的氨基酸置换。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族，包括碱性侧链(例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如，天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -支链侧链(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如，苯丙氨酸置换酪氨酸是保守置换。鉴别不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守置换的方法是本领域公知的(参见，例如，Brumme11等人，Biochem.32:1180-1 187(1993)；Kobayashi等人，Protein Eng.12 (10) : 879-884 (1999)；以及Burks等人，Proc.Nat1.Acad.Sci.USA 94:412-417(1997))。

[0049] 抗体与蛋白质“特异性结合”意指与包括无关蛋白质在内的备选物质相比，抗体更频繁、更快速、以更长的持续时间、以更大的亲和力或者以上的一些组合与蛋白质反应或相关联。由于不同物种中同源蛋白质之间的序列同一性，特异性结合可包括在多于一个物种中识别特定的蛋白质如TL1A的抗体。在某些实施方案中，抗体可以与通过抗体上的相同抗原结合位点结合的多个靶标结合，或者抗体可以是双特异性的并且包含具有不同特异性的至少两个抗原结合位点。

[0050] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文可互换使用，以指任何长度的氨基酸的聚合物。该聚合物可以是直链或支链的，其可以包含修饰的氨基酸，并且其可以被非氨基酸中断。该术语还包括已被天然修饰或通过干预修饰的氨基酸聚合物；该修饰例如二硫键形成、糖基化、脂化(lipidation)、乙酰化、磷酸化或者任何其他操作或修饰，如与另一多肽融合和/或与例如标记组分缀合。该定义中还包括，例如，含有一种或多种氨基酸类似物(例如，非天然氨基酸等)以及本领域已知的其他修饰的多肽。

[0051] 如本文可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合物，并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基以及/或者它们的类似物或可以通过DNA或RNA聚合酶掺入聚合物中的任何基质。多核苷酸可包含修饰的核苷酸，诸如但不限于甲基化核苷酸及其类似物或非核苷酸组分。对核苷酸结构的修饰可以在聚合物组装之前或之后被赋予。聚合后可以进一步修饰多核苷酸，如通过与标记组分缀合。

[0052] 术语“载体”意指能够在宿主细胞中递送并优选表达一种或多种感兴趣的基因和/或序列的构建体。载体的实例包括但不限于病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或

噬菌体载体、与阳离子缩合剂相关联的DNA或RNA表达载体、包封在脂质体中的DNA或RNA表达载体以及某些真核细胞,如生产细胞。

[0053] “分离的”多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是处于非天然存在形式的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物包括已经纯化至其不再处于天然存在形式的程度的那些。在一些实施方案中,分离的抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是基本上纯的。在一些情况下,“基本上纯的”是指至少50%纯(即,无污染物)、至少90%纯、至少95%纯、至少98%纯或至少99%纯的物质。

[0054] 在两个或更多个核酸或多肽的上下文中,术语“相同”或“同一性”百分比是指当进行比较和比对以获得最大的对应性时,两个或更多个序列或子序列相同或者具有相同的指定百分比的核苷酸或氨基酸残基。可以使用序列比较软件或算法或者通过目视检查来测量同一性百分比。可用于获得氨基酸或核苷酸序列的比对的各种算法和软件是本领域已知的。这样的算法/软件程序包括但不限于NBLAST、XBLAST、Gapped BLAST、BLAST-2、WU-BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign (DNASTAR)。

[0055] 诸如“治疗”或“处理”或“缓解”或“减轻”等术语是指治疗性处理以及/或者预防性或防范性措施,其中目的在于预防或减缓(减轻)目标病理状况、预防病理状况、追求或获得良好的总体生存或者降低个体发生该状况的几率,即使治疗最终不成功。因此,需要治疗的人包括那些已经患有该病症的人;那些倾向于患有该病症的人;以及该病症待进行预防的人。

[0056] 术语“受试者”是指任何动物(例如哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类动物、啮齿动物以及家养动物和狩猎动物,它们将成为特定治疗的接受者。灵长类动物包括黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和猕猴,例如恒河猴(Rhesus)。啮齿动物包括小鼠、大鼠、土拨鼠、白鼬、兔和仓鼠。家养动物和狩猎动物包括牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科物种例如家猫,犬类物种例如狗、狐、狼,鸟类物种例如鸡、鸸鹋、鸵鸟,以及鱼类例如鳟鱼、鲅鱼和鲑鱼。通常,术语“受试者”和“患者”在本文可互换使用,用于提及人受试者。在各个实施方案中,受试者可以是先前已被诊断患有或者被鉴别为正在经受或者患有需要治疗的病况的受试者。在各个其他实施方案中,先前被诊断患有或者被鉴别为正在经受或者患有病况的受试者可已经经历或可未经历过针对病况的治疗。在其他实施方案中,受试者还可以是先前尚未被诊断为患有病况的受试者(即,表现出针对于病况的一种或多种风险因子的受试者)。对特定病况进行治疗的“又需要的受试者”可以是患有该病况、被诊断为患有该病况或有发生该病况的风险的受试者。

[0057] 术语“治疗有效量”是指有效“治疗”受试者或哺乳动物中的疾病或病症的抗体、多肽、多核苷酸、小有机分子或其他药物的量。在一些情况下,治疗有效量的药物降低了IBD症状,包括CD和UC/MR-UC症状的严重程度。这些症状包括但不限于腹泻、发热、疲劳、腹痛、腹部痉挛、炎症、溃疡、恶心、呕吐、出血、大便带血、食欲下降、体重减轻及其组合。

[0058] 在一方面,本公开内容描述了两种中和抗人TL1A单克隆抗体和五种中和人源化抗人TL1A单克隆抗体的鉴别。这些抗体在体外中和TL1A的活性并识别可溶性TL1A和膜结合TL1A两者。

[0059] TL1A (TNFSF15) 是主要由内皮细胞、巨噬细胞和树突细胞 (DC) 表达的TNF家族成员。其表达由免疫复合物 (IC) 和细胞因子诱导。TL1A受体DR3主要在T细胞和NKT细胞上表

达。在体外,TL1A已显示增强人和小鼠两者的T细胞增殖和细胞因子产生。在体内,TL1A转基因小鼠产生类似于人克罗恩病的IBD表型。此外,重组TL1A蛋白的治疗也加重了 $mdr1^{-/-}$ 小鼠的结肠炎。

[0060] 本公开内容提供了用于治疗IBD、CD、UC和MR-UC的中和抗TL1A单克隆抗体。在一些情况下,这些抗TL1A抗体被用于治疗特定的炎性肠病(IBD)患者群体。还提供了相关的多肽和多核苷酸、包含所述抗TL1A抗体的组合物以及制备所述抗TL1A抗体的方法。进一步提供了使用所述新型抗TL1A抗体进行治疗的方法。

[0061] 抗TL1A抗体

[0062] 各个实施方案提供了与TL1A特异性结合的抗体。在一些实施方案中,抗体与可溶性TL1A特异性结合。在一些实施方案中,抗体与膜结合TL1A特异性结合。TL1A抗体“5C3D11”的全长氨基酸(aa)序列包含:SEQ ID NO:5(重链)和SEQ ID NO:13(轻链),如表1中所示。在各个实施方案中,TL1A抗体包含SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:13。单体TL1A抗体包含SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:13的两个实例。在各个实施方案中,TL1A抗体包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16,如表1中所示。在一些实施方案中,TL1A抗体包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16中的至少一种或任意组合。

[0063] TL1A抗体“5C3D11”的全长核苷酸(nt)序列由包含SEQ ID NO:1(重链)和SEQ ID NO:9(轻链)的核酸序列编码。在各个实施方案中,TL1A抗体由包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:9的核酸序列编码,如表1中所示。单体TL1A抗体由包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:9的核酸序列的两个实例编码。在各个实施方案中,TL1A抗体由包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的核酸序列编码,如表1中所示。在一些实施方案中,TL1A抗体由包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的核酸序列中的至少一种或任意组合编码。

[0064] TL1A抗体“9E12E5”的全长氨基酸(aa)序列包含:SEQ ID NO:21(重链)和SEQ ID NO:29(轻链),如表1中所示。在各个实施方案中,TL1A抗体包含SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:29。单体TL1A抗体包含SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:29的两个实例。在各个实施方案中,TL1A抗体包含SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32,如表1中所示。在一些实施方案中,TL1A抗体包含SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32中的至少一种或任意组合。

[0065] TL1A抗体“9E12E5”的全长核苷酸(nt)序列由包含SEQ ID NO:17(TL1A重链)和SEQ ID NO:25(TL1A轻链)的核酸序列编码,如表1中所示。在各个实施方案中,TL1A抗体由包含SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:25的核酸序列编码。单体TL1A抗体由包含SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:25的核酸序列的两个实例编码。在各个实施方案中,TL1A抗体由包含SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的核酸序列编码,如表1中所示。在一些实施方案中,TL1A抗体由包含SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的核酸序列中的至少一种或任意组合编码。

[0066] 表1:5C3D11和9E12E5的核苷酸和氨基酸序列

| 抗体 | 序列类型 | 大小 | 前导序列 | 序列 | SEQ ID NO: |
|---------------|------|-----|-------|--|--|
| 5C3D11 | | | | | |
| [0067] | 重链 | DNA | 405bp | FRI-CDR 1-FR2-CD R2-FR3-C DR3-FR4 | ATGAAATGCAGCTGGTTATCTT CTTCCTGATGGCAGTGGTTACAG GGGTCAATTCAAGAGGTTCAGCTG CAGCAGTCTGGGGCAGAACTTGTG AAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTG TCCTGCACAGCTTCTGGCTTCGACA TTCAAGACACCTATATGCACTGG GTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGC CTGGAGTGGATTGGAAGGATTGA TCCTGCGAGTGGACATACTAAA TATGACCCGAAGTCCAGGTCA AGGCCACTATAACAAACGGACACAT |

[0068]

| | | | | | |
|--------|----|-----|-------|---|---|
| | | | | <i>CCTCCAACACAGCCTACCTGCAGC TCAGCAGCCTGACATCTGAGGACA CTGCCGTCTATTACTGTTCTAGATC GGGGGGCCTACCTGATGTCTGG GGCGCAGGGACCACGGTCACCGT CTCCTCA</i> | |
| | | | CDR1 | GACACCTATATGCAC | 2 |
| | | | CDR2 | AGGATTGATCCTGCGAGTGGACA TACTAAATATGACCCGAAGTTCC AGGTC | 3 |
| | | | CDR3 | TCGGGGGGCCTACCTGATGTC | 4 |
| [0068] | 重链 | 氨基酸 | 135aa | <i>FRI-CDR</i> MKCSWVIFFLMAVVTVGVNSEVQL | 5 |
| | | | | <i>1-FR2-CD</i> <i>QQSGAELVKPGASVQLSCTASGFDI</i> Q | |
| | | | | <i>R2-FR3-C</i> <i>DTYMHWVKQRPEQGLEWIGRIDP</i> | |
| | | | | <i>DR3-FR4</i> <i>ASGHTKYDPKFQVKATITTDSSN</i> <i>TAYLQLSSLTSEDTAVYYCSRSGGLP</i> <i>DVWGAGTTTVSS</i> | |
| | | | | CDR1 DTYMH | 6 |
| | | | | CDR2 RIDPASGHTKYDPKFQV | 7 |
| | | | | CDR3 SGGLPDV | 8 |
| | | | | <i>FRI-CDR</i> ATGGATTTCAGTGCAGATTTC <i>1-FR2-CD</i> CAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTT <i>R2-FR3-C</i> CAGTCATAATGTCCAGAGGACAA <i>DR3-FR4</i> <i>ATTGTTCTCTCCCAGTCTCCTGCAA</i> <i>TCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGA</i> <i>AGGTCACAATGACTTGCAGGGCC</i> <i>AGCTCAAGTGTAAAGTTACATGT</i> <i>ACTGGTACCAAGCAGAAGCCTGGAT</i> <i>CCTCCCCAAACCCCTGGATTTATG</i> | 9 |
| [0068] | 轻链 | DNA | 384bp | | |

| | | | | | | |
|---------------|-----|-------|--|---|---|----|
| [0069] | | | | | CCACATCCAACCTGGCTTCTGG <i>AGTCCCTGATCGCTTCAGTGGCAG</i> <i>TGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTC</i> <i>ACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAA</i> <i>GATGCTGCCACTTATTACTGCCAG</i> CAGTGGAGTGGTAACCCACGG ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCT <i>GGAAATCAAA</i> | |
| | | | CDR1 | | AGGGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTA CATGTAC | 10 |
| | | | CDR2 | | GCCACATCCAACCTGGCTTCT | 11 |
| | | | CDR3 | | CAGCAGTGGAGTGGTAACCCACG GACG | 12 |
| | 轻链 | 氨基酸 | 128aa | FR1-CDR 1-FR2-CD R2-FR3-C DR3-FR4 | MDFQVQIFSFLLISASVIMSRG <i>QIVL</i> <i>SQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVS</i> YMYWYQQKPGSSPKPWIYATSNLA SGVPDRFSGSGSGTSYSLTISRVEAED <i>AATYYCQQWSGNPRTFGGGTKLEI</i> <i>K</i> | 13 |
| | | | | CDR1 | RASSSVSYMY | 14 |
| | | | | CDR2 | ATSNLAS | 15 |
| | | | | CDR3 | QQWSGNPRT | 16 |
| 9E12E5 | | | | | | |
| 重链 | DNA | 405bp | FR1-CDR 1-FR2-CD R2-FR3-C DR3-FR4 | ATGGGATGGAGCTGGGTCTTCT CTTCCTCCTGTCAGTGACTGCAG GTGTCCACTCCCAGGTTCACCTGC AGCAGTCTGGACCTGAACCTGGTAA AGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGT CCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTT | 17 | |

[0070]

| | | | | | |
|----|-----|-------|--|---|----|
| | | | | <p><i>CACAAAGTATGATATAAACTGG</i></p> <p><i>GTGAGGCAGAGGCCTGAACAGGG</i></p> <p><i>ACTTGAGTGGATTGGATGGATTT</i></p> <p>TCCTGGAGATGGTAGAACTGA</p> <p>CTACAATGAGAAGTTCAAGGGT</p> <p><i>AAGGCCACACTGACTACAGACAAAT</i></p> <p><i>CCTCCAGCACAGCCTACATGGAGG</i></p> <p><i>TCAGCAGGCTGACATCTGAGGACT</i></p> <p><i>CTGCTGTCTATTCTGTGCAAGATA</i></p> <p>TGGCCCCGCTATGGACTACTGG</p> <p><i>GGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTC</i></p> <p><i>GCCTCA</i></p> | |
| | | | CDR1 | AAGTATGATATAAAC | 18 |
| | | | CDR2 | TGGATTTCCTGGAGATGGTAG AACTGACTACAATGAGAAGTTCA AGGGT | 19 |
| | | | CDR3 | TATGGCCCCGCTATGGACTA | 20 |
| 重链 | 氨基酸 | 135aa | <i>FRI-CDR</i> <i>1-FR2-CD</i> <i>R2-FR3-C</i> <i>DR3-FR4</i> | <i>MGWSWVFLFLSVTAGVHSQVHL</i> <i>QQSGPELVKPGASVKSCKASGYTFT</i> <i>KYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPG</i> <i>DGRTDYNEKFKGKATLTTDKSSST</i> <i>AYMEVSRLTSEDSAVYFCARYGPAM</i> <i>DYWGQGTSVTVA S</i> | 21 |
| | | | CDR1 | KYDIN | 22 |
| | | | CDR2 | WIFPGDGRTDYNEKFKG | 23 |
| | | | CDR3 | YGPAMDY | 24 |
| 轻链 | DNA | 393bp | <i>FRI-CDR</i> <i>1-FR2-CD</i> <i>R2-FR3-C</i> | <i>ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTT</i> <i>GGTGCTGATGTTCTGGATTCTG</i> <i>CTTCCAGCAGTGTGATGTTTGATGA</i> | 25 |

| | | | | | |
|--------|-----|-------|--|--|----|
| | | | DR3-FR4 | <i>CCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGT CAGTCTGGAGATCAAGCCTCCATC TCTTGCAGATCTAGTCAGACCAT TGTACATAGTAATGGAGACACC TATTTAGACTGGTCTGCAGAAA CCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTG ATCTACAAAGTTCCAACCGATT TTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA TGGCAGTGGATCAGGGACAGATT CACACTCAAGATCAGCAGAGTGG GGCTGAGGATCTGGGAGTTATT CTGCTTCAGGTTCACATGTT CCGTACACGTTCGGAGGGGGGA CCAAGCTGGAAATAAAA</i> | |
| [0071] | | | CDR1 | AGATCTAGTCAGACCATTGTACA TAGTAATGGAGACACCTATTAG AC | 26 |
| | | | CDR2 | AAAGTTCCAACCGATTTC | 27 |
| | | | CDR3 | TTTCAAGGTTCACATGTTCCGTA CACG | 28 |
| 轻链 | 氨基酸 | 131aa | FR1-CDR 1-FR2-CD R2-FR3-C DR3-FR4 | <i>MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVLMT QTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTIVH SNGDTYLDWFLQKPGQSPKLLIYK VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGYYCFQGSHVPYTFGG GTKLEIK</i> | 29 |
| | | | CDR1 | RSSQTIVHSNGDTYLD | 30 |
| | | | CDR2 | KVSNRFS | 31 |
| | | | CDR3 | FQGSHVPY | 32 |

[0072] 在各个实施方案中,抗TL1A抗体与同包含由SEQ ID N0:1编码的重链可变区和由SEQ ID N0:9编码的轻链可变区的抗体与之特异性结合的TL1A的区域重叠的TL1A区域特异

性结合或同与之相同的TL1A区域特异性结合。在各个其他实施方案中,抗TL1A抗体与同包含含有SEQ ID NO:5的序列的重链和含有SEQ ID NO:13的序列的轻链的抗体与之特异性结合的TL1A的区域重叠的TL1A的区域特异性结合或同与之相同的TL1A区域特异性结合。在其他实施方案中,抗TL1A抗体与同包含由SEQ ID NO:17编码的重链可变区和由SEQ ID NO:25编码的轻链可变区的抗体与之特异性结合的TL1A的区域重叠的TL1A的区域特异性结合或同与之相同的TL1A区域特异性结合。在某些其他实施方案中,抗TL1A抗体与同包含含有SEQ ID NO:21的重链和含有SEQ ID NO:29的轻链的抗体与之特异性结合的TL1A的区域重叠的TL1A的区域特异性结合或同与之相同的TL1A区域特异性结合。

[0073] 进一步的实施方案提供了多肽,其包括但不限于与TL1A特异性结合的抗体,其包含5C3D11和/或9E12E5的CDR(参见表1,以及下文的实施例1和2中的表2和表3)中的一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一和/或十二个。在某些实施方案中,多肽包含5C3D11的重链CDR(SEQ ID NO:6、7和8)和/或9E12E5的重链CDR(SEQ ID NO:22、23和24)、5C3D11的轻链CDR(NO:14、15和16)和/或9E12E5的轻链CDR(SEQ ID NO:30、31和32)或其组合。在某些其他实施方案中,重链CDR包含在重链可变区内并且/或者轻链CDR包含在轻链可变区内。在一些实施方案中,还提供了包含本文所述的单个轻链或重链之一的多肽,以及包含轻链和重链两者的多肽(例如,抗体)。在一些实施方案中,抗TL1A抗体包含5C3D11的重链和轻链。在其他实施方案中,抗TL1A抗体包含9E12E5的重链和轻链。在某些实施方案中,抗TL1A抗体中的每个CDR包含每CDR至多四个(即,0、1、2、3或4个)保守氨基酸置换。

[0074] 在各个实施方案中,抗TL1A抗体或片段具有至少约 $1E^{-7}$ 、 $1E^{-8}$ 、 $1E^{-9}$ 、 $1E^{-10}$ 或 $1E^{-11}$ 的对TL1A的结合亲和力。在一些情况下,结合亲和力为约 $1E^{-9}$ 至约 $1E^{-11}$ 。例如,在一些情况下,结合亲和力为约 $7.90E^{-11}$ 。在各个实施方案中,抗TL1A抗体或片段具有约 $7.90E^{-9}$ 至约 $7.90E^{-10}$ 的对TL1A的结合亲和力。在各个实施方案中,抗TL1A抗体或片段具有约 $7.90E^{-10}$ 至约 $7.90E^{-12}$ 的对TL1A的结合亲和力。在各个实施方案中,抗TL1A抗体或片段具有约 $7.90E^{-12}$ 至约 $7.90E^{-13}$ 的对TL1A的结合亲和力。

[0075] 在各个实施方案中,抗TL1A抗体或片段具有约 $5.20E^{-11}$ 的对TL1A的结合亲和力。在各个实施方案中,抗TL1A抗体或片段具有约 $5.20E^{-9}$ 至约 $5.20E^{-10}$ 的对TL1A的结合亲和力。在各个实施方案中,抗TL1A抗体或片段具有约 $5.20E^{-10}$ 至约 $5.20E^{-12}$ 的对TL1A的结合亲和力。在各个实施方案中,抗TL1A抗体或片段具有约 $5.20E^{-12}$ 至 $5.20E^{-13}$ 的对TL1A的结合亲和力。

[0076] 各个实施方案提供了与参考抗体如本文所述的任何抗TL1A抗体同TL1A蛋白结合的区域相同的区域或其部分结合的抗TL1A抗体。在一些实施方案中,参考抗体包含SEQ ID NO:6-8的重链CDR和SEQ ID NO:14-16的轻链CDR。在一些情况下,参考抗体包含SEQ ID NO:5的重链可变结构域和SEQ ID NO:13的轻链可变结构域。在一些实施方案中,参考抗体包含SEQ ID NO:22-24的重链CDR和SEQ ID NO:30-32的轻链CDR。在一些情况下,参考抗体包含SEQ ID NO:21的重链可变结构域和SEQ ID NO:29的轻链可变结构域。在一些情况下,参考抗体是5C3D11。在一些情况下,参考抗体是9E12E5。

[0077] 提供了用于确定抗TL1A抗体(即测试抗体)是否与本文所述的抗体同TL1A蛋白结合的区域相同的区域或其部分结合的非限制性方法。示例性实施方案包括竞争性测定。例如,该方法包括确定测试抗体是否可以与参考抗体和TL1A蛋白或其部分之间的结合竞争,或确定参考抗体是否可以与测试抗体和TL1A蛋白或其部分之间的结合竞争。示例性方法包

括使用表面等离子体共振来评估抗TL1A抗体是否可以与TL1A和另一种抗TL1A抗体之间的结合竞争。在一些情况下,在竞争测定中利用表面等离子体共振。非限制性方法描述于实施例9和实施例10中。

[0078] 生成抗体的方法

[0079] 各个实施方案提供了使用多肽或核苷酸序列生成的抗体。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施方案中,抗体是抗体片段。例如,抗体是Fab。在一些实施方案中,抗体是嵌合抗体。

[0080] 可以通过本领域已知的任何方法测定本文所述的抗体的特异性结合。可以使用的免疫测定包括但不限于竞争性和非竞争性测定系统,其使用的技术诸如BIACore分析、FACS分析、免疫荧光、免疫细胞化学、Western印迹、放射免疫测定、ELISA、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀反应、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体结合测定、免疫放射测定、荧光免疫测定和蛋白A免疫测定。这样的测定是常规的并且是本领域公知的(参见,例如Ausubel等人编著,1994,Current Protocols in Molecular Biology,第1卷,John Wiley&Sons, Inc., New York)。

[0081] 在各个实施方案中,抗体是TL1A受体诸如但不限于DR3和TR6/DcR3的拮抗剂。在某些实施方案中,抗体抑制结合的TL1A受体的一种或多种活性的至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约50%、至少约75%、至少约90%或约100%。

[0082] 在各个实施方案中,使用本领域已知的方法制备单克隆抗体,该方法诸如但不限于杂交瘤方法,其中宿主动物如上所述发生免疫以引发淋巴细胞产生将会与免疫抗原特异性结合的抗体(Kohler和Milstein(1975)Nature 256:495)。杂交瘤产生特异性针对选定抗原的单克隆抗体。当在体外或体内繁殖时,通过本领域已知的技术从培养基或腹水中纯化单克隆抗体。

[0083] 在一些实施方案中,单克隆抗体使用重组DNA方法制备,如美国专利号4,816,567中所述。编码单克隆抗体的多核苷酸从成熟B细胞或杂交瘤细胞中分离。然后将编码重链和轻链的分离的多核苷酸克隆到合适的表达载体中,其在转染到宿主细胞(例如,大肠杆菌(E.coli)细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞)中时产生单克隆抗体。编码单克隆抗体的多核苷酸可以使用重组DNA技术以多种不同方式进一步修饰以生成替代抗体。

[0084] 在各个实施方案中,可以产生“嵌合抗体”——一种其中不同部分衍生自不同动物物种的分子,诸如具有衍生自鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些抗体(例如,人源化抗体)。嵌合抗体可以使用本领域已知的各种技术产生(参见Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.81:851-855(1984);Neuberger等人,Nature 312:604-608(1984);Takeda等人,Nature 314:452-454(1985))。

[0085] 在一些实施方案中,抗TL1A单克隆抗体是人源化抗体,以在向人受试者施用时降低抗原性和HAMA(人抗小鼠抗体)应答。可以使用本领域已知的各种技术产生人源化抗体。例如,通过以下过程使抗体人源化:(1)确定起始抗体轻链和重链可变结构域的核苷酸和预测的氨基酸序列;(2)设计人源化抗体,即决定在人源化过程中使用哪个抗体框架区;(3)实际的人源化方法/技术;以及(4)人源化抗体的转染和表达(参见,例如,美国专利号5,585,089;6,835,823;6,824,989)。在各个实施方案中,可以进一步优化人源化抗体以降低潜在

的免疫原性,同时维持用于人类治疗的功能活性。

[0086] 在一些实施方案中,人源化抗TL1A抗体包含SEQ ID N0:35-39中任一项的重链可变结构域。在一些实施方案中,人源化抗TL1A抗体包含SEQ ID N0:40-44中任一项的轻链可变结构域。在一些情况下,人源化抗TL1A抗体包含具有SEQ ID N0:35的重链可变结构域和具有SEQ ID N0:40的轻链可变结构域。在一些情况下,人源化抗TL1A抗体包含具有SEQ ID N0:36的重链可变结构域和具有SEQ ID N0:41的轻链可变结构域。在一些情况下,人源化抗TL1A抗体包含具有SEQ ID N0:37的重链可变结构域和具有SEQ ID N0:42的轻链可变结构域。在一些情况下,人源化抗TL1A抗体包含具有SEQ ID N0:38的重链可变结构域和具有SEQ ID N0:43的轻链可变结构域。在一些情况下,人源化抗TL1A抗体包含具有SEQ ID N0:39的重链可变结构域和具有SEQ ID N0:44的轻链可变结构域。

[0087] 在一些实施方案中,抗TL1A抗体是人抗体。可以使用本领域已知的各种技术直接制备人抗体。可以产生在体外免疫的或从产生针对靶抗原的抗体的免疫个体分离的永生化人B淋巴细胞(参见,例如,Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,p.77 (1985);Boerner等人,1991,J.Immunol.,147 (1):86-95;以及美国专利号5,750,373)。可以从噬菌体文库中选择人抗体。用于生成和使用抗体噬菌体文库的技术描述于美国专利号5,969,108;6,172,197;5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915;6,593,081;6,300,064;6,653,068;6,706,484;和7,264,963;以及Rothe等人,2007,J.Mol.Bio.,doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018中。

[0088] 人源化抗体也可以在含有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中制备,所述转基因小鼠在免疫后能够在不存在内源性免疫球蛋白产生的条件下产生完整的人抗体组库(repertoire)。这种方法描述于美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016中。人源化抗体还可以通过新型基因工程方法获得,所述方法能够在较大动物(例如,兔和小鼠)中产生亲和力成熟的人样多克隆抗体(参见例如美国专利号6,632,976)。

[0089] 可以通过首先设计包含嵌入人衍生的框架序列中的非人例如啮齿动物衍生的CDR的可变区氨基酸序列来产生全人源化抗体。非人CDR提供期望的特异性。因此,在一些情况下,这些残基包括在基本上不变的重构的可变区的设计中。因此,在一些情况下,应将修饰限制在最低限度,并密切关注抗体的特异性和亲和力的变化。在另一方面,理论上的框架残基可以衍生自任何人可变区。应选择同样适用于产生重构的可变区和保持抗体亲和力的人框架序列,以便产生显示出可接受的甚至改善的亲和力的重构抗体。人框架可属于种系来源,或可以源自非种系(例如,突变的或亲和力成熟的)序列。可使用的本领域技术人员公知的基因工程技术,例如但不限于人抗体文库的噬菌体展示、转基因小鼠、人-人杂交瘤、杂种杂交瘤、B细胞永生化和克隆、单细胞RT-PCR或HuRAb技术来产生具有含人框架和非人CDR的杂合DNA序列的人源化抗体。获得“人源化抗体”的方法是本领域技术人员公知的(例如,美国专利号5,861,155、美国专利号6,479,284、美国专利号6,407,213、美国专利号5,624,821、US2003166871、US20020078757,Queen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:10029-10032(1989)和Hodgson等人,Bio/Technology,9:421(1991))。

[0090] 嵌合、人源化和人抗体通常通过重组表达产生。重组多核苷酸构建体通常包含与抗体链的编码序列可操作地连接的表达控制序列,包括天然相关的或异源的启动子区。在

某些实施方案中,可能需要生成这些人源化抗体的氨基酸序列变体,特别是当这些变体改善抗体的结合亲和力或其他生物学特性时。

[0091] 在某些实施方案中,使用抗体片段来治疗和/或改善IBD。已知有各种技术用于产生抗体片段。通常,这些片段经由完整抗体的蛋白水解消化来衍生(例如Morimoto等人,1993,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117;Brennan等人,1985,Science,229:81)。Fab、Fv和scFv抗体片段均可在大肠杆菌或其他宿主细胞中表达并且从中分泌,从而允许产生大量的这些片段。用于产生抗体片段的其他技术对于技术人员而言将会是显而易见的。

[0092] 根据本公开内容,技术可以适用于产生对TL1A具有特异性的单链抗体(参见例如美国专利号4,946,778)。此外,方法可以适用于构建Fab表达文库(参见例如Huse等人,Science 246:1275-1281(1989)),以允许快速有效地鉴别具有针对TL1A的期望特异性的单克隆Fab片段或其衍生物、片段、类似物或同源物。抗体片段可以通过本领域技术产生,其包括但不限于:(a)通过胃蛋白酶消化抗体分子产生的F(ab')2片段;(b)通过还原F(ab')2片段的二硫桥产生的Fab片段,(c)通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子产生的Fab片段,以及(d)Fv片段。

[0093] 本文还提供了修饰的抗体,其包含提供抗体与TL1A的关联的任何类型的可变区。本领域技术人员将理解,该修饰的抗体可包括抗体(例如,全长抗体或其免疫反应性片段),其中恒定区结构域中的一个或多个的至少一部分已被删除或以其他方式改变以便提供期望的生物化学特征,如减少TL1A。在某些实施方案中,重链和轻链中的可变区通过至少部分地取代一个或多个CDR并在必要时通过部分框架区取代和序列改变来进行改变。在一些实施方案中,取代的CDR可衍生自相同类别、相同亚类的抗体、衍生自不同类别的抗体(例如来自不同物种的抗体)和/或其组合。在一些实施方案中,修饰的抗体的恒定区将包含人恒定区。与本公开内容相容的对恒定区的修饰包括一个或多个结构域中的一个或多个氨基酸的添加、缺失或置换。

[0094] 在各个实施方案中,如本文所述的抗体或其抗原结合片段的表达可以发生在原核或真核细胞中。合适的宿主包括细菌或真核宿主,包括酵母、昆虫、真菌、鸟和体内或原位的哺乳动物细胞,或者哺乳动物、昆虫、鸟或酵母来源的宿主细胞。哺乳动物细胞或组织可以是人、灵长类动物、仓鼠、兔、啮齿动物、奶牛、猪、绵羊、马、山羊、狗或猫来源的,但也可使用任何其他哺乳动物细胞。在其他实施方案中,可以将如本文所述的抗体或其抗原片段转染到宿主中。

[0095] 在一些实施方案中,将表达载体转染到接受者细胞系中以产生本文所述的嵌合、人源化或复合人抗体。在各个实施方案中,哺乳动物细胞可用作产生抗体蛋白的宿主,所述哺乳动物细胞可包括但不限于成纤维细胞来源的细胞如Vero(ATCC CRL 81)或CHO-K1(ATCC CRL 61)细胞、HeLa细胞和L细胞。可用于表达多肽的示例性真核细胞包括但不限于COS细胞,包括COS 7细胞;293细胞,包括293-6E细胞;CHO细胞,包括CHO-S和DG44细胞;PER.C6TM细胞(Cruce11);以及NS0细胞。在一些实施方案中,基于其对重链和/或轻链进行期望的翻译后修饰的能力来选择特定的真核宿主细胞。

[0096] 本领域已经开发了能够分泌完整的异源蛋白质的许多合适的宿主细胞系,包括但不限于CHO细胞系、各种COS细胞系、HeLa细胞、L细胞和多发性骨髓瘤细胞系。

[0097] 取决于细胞宿主的类型,携带如本文所述的嵌合、人源化或复合人抗体构建体、抗体或其抗原结合片段的表达载体可通过多种合适手段中的任一种引入适当的宿主细胞中,该手段包括但不限于转化、转染、脂质转染、缀合、电穿孔、直接显微注射和微粒轰击,如本领域普通技术人员已知的。这些细胞的表达载体可包含表达控制序列,如复制起始位点、启动子、增强子和必需的加工信息位点,如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。

[0098] 在各个实施方案中,酵母也可以用作产生本文所述的抗体分子或肽的宿主。在各个其他实施方案中,细菌菌株也可以用作产生本文所述的抗体分子或肽的宿主。细菌菌株的实例包括但不限于大肠杆菌、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 物种、肠杆菌 (*enterobacteria*) 和各种假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 物种。

[0099] 在一些实施方案中,根据任何合适的方法,可以在已被工程化(转基因)或者用一种或多种编码所述多肽的核酸分子转染的动物中体内产生如本文所述的一种或多种抗体或其抗原结合片段。为了产生转基因动物,可以将转基因显微注射到受精的卵母细胞中,或者可以将其引入胚胎干细胞的基因组中,并将该胚胎干细胞细胞的细胞核转移到无核的卵母细胞中。一旦表达,可以根据本领域的标准程序,包括HPLC纯化、柱色谱、凝胶电泳等纯化抗体(通常参见Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982))。

[0100] 一旦在宿主中表达,可以通过已知的技术例如免疫吸附或免疫亲和色谱、色谱法如HPLC(高效液相色谱)、硫酸铵沉淀、凝胶电泳或这些的任意组合重新获得并纯化本公开内容的整个抗体、抗体片段(例如,单个轻链和重链)或其他免疫球蛋白形式。通常参见Scopes, *PROTEIN PURIF.* (Springer-Verlag, NY, 1982)。具有至少约90%至95%同质性的基本上纯的免疫球蛋白是有利的,具有98%至99%或更高同质性的那些免疫球蛋白也是有利的,特别是对于药物用途。一旦根据需要部分纯化或纯化为同质的,随后可以在治疗上或在开发和进行测定程序、免疫荧光染色等中使用人源化或复合人抗体。通常参见第I卷和第II卷 *Immunol. Meth.* (Lefkovits&Pernis编著, Acad. Press, NY, 1979和1981)。

[0101] 各个实施方案提供了遗传构建体,其包含编码本文提供的抗TL1A抗体或片段的核酸。抗体的遗传构建体可以是表达盒的形式,其可适用于表达编码的抗TL1A抗体或片段。可在掺入或不掺入载体的情况下将遗传构建体引入宿主细胞中。例如,遗传构建体可掺入脂质体或病毒颗粒中。或者,可以通过本领域已知的方法将纯化的核酸分子直接插入宿主细胞中。可以通过转染、感染、电穿孔、细胞融合、原生质体融合、显微注射或弹道轰击(*ballistic bombardment*)将遗传构建体直接引入宿主受试者的细胞中。

[0102] 各个实施方案提供了包含本文提供的抗体的遗传构建体的重组载体。重组载体可以是质粒、粘粒或噬菌体。重组载体可包含其他功能元件;例如,合适的启动子以启动基因表达。

[0103] 各个实施方案提供了包含本文所述的遗传构建体和/或重组载体的宿主细胞。

[0104] 多肽和多核苷酸

[0105] 各个实施方案提供了多肽,其包含:选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32的一个或多个互补决定区。在各个实施方案中,多肽包含这些互补决定区中的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个。

[0106] 在各个实施方案中,使用多肽或多核苷酸生成抗体。

[0107] 多肽可以是包含针对TL1A的抗体或其片段的重组多肽或合成多肽。当特别指出时,多肽可以是天然多肽。本领域将认识到,可以改变一些氨基酸序列而不显著影响蛋白质的结构或功能。因此,进一步提供了多肽的变体,其显示出基本活性或包含针对TL1A蛋白的抗体或其片段的区域。这样的修饰包括缺失、插入、倒位、重复和类型置换。

[0108] 本文所述的分离的多肽可以通过本领域已知的任何合适的方法产生。这样的方法的范围从直接蛋白质合成方法到构建编码分离的多肽序列的DNA序列并在合适的转化宿主中表达这些序列。在一些实施方案中,通过分离或合成编码感兴趣的野生型蛋白质的DNA序列,使用重组技术构建DNA序列。

[0109] 各种宿主系统也被有利地用于表达重组蛋白。合适的哺乳动物宿主细胞系的实例包括猴肾细胞的COS-7系和能够表达适当载体的其他细胞系,包括例如L细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢(CHO)、HeLa和BHK细胞系。哺乳动物表达载体可包含非转录元件,诸如复制起点、与待表达基因连接的合适启动子和增强子以及其他5'或3'侧翼非转录序列和5'或3'非翻译序列,如必需的核糖体结合位点、多聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点以及转录终止序列。

[0110] 由转化的宿主产生的蛋白质可以根据任何合适的方法进行纯化。这样的标准方法包括色谱法(例如,离子交换色谱、亲和色谱和尺寸柱色谱)、离心、差分溶解或通过蛋白质纯化的任何其他标准技术。亲和标签如六组氨酸(SEQ ID NO:45)、麦芽糖结合结构域、流感外壳序列和谷胱甘肽-S-转移酶可以附着到蛋白质,以允许通过经过合适的亲和柱而容易地纯化。还可以使用如蛋白水解、核磁共振和x射线晶体学等技术来对分离的蛋白质进行物理表征。可以分离在细菌培养物中产生的重组蛋白。本领域已知的用于纯化抗体和其他蛋白质的方法还包括,例如,描述于美国专利公开号2008/0177048和2009/0187005的那些。

[0111] 技术人员将认识到,改变编码序列中的单个氨基酸或小百分比氨基酸的对核酸、肽、多肽或蛋白质序列的单个置换、缺失或添加是“保守修饰的变体”,其中改变导致用化学上相似的氨基酸置换氨基酸并保留与靶抗原特异性结合的能力。这样的保守修饰的变体是对与本公开内容一致的多态变体、种间同源物和等位基因的补充,但不排除与本公开内容一致的多态变体、种间同源物和等位基因。

[0112] 给定氨基酸可以被具有相似生理化学特性的残基取代,例如,用一个脂肪族残基置换另一个(诸如He、Val、Leu或Ala彼此之间),或用一个极性残基置换另一个(诸如在Lys与Arg;Glu与Asp;或Gin与Asn之间)。其他这样的保守置换,例如具有相似疏水性特性的整个区域的置换是公知的。包含保守氨基酸置换的多肽可以在本文所述的任何一种测定中进行测试,以证实期望的活性例如天然或参考多肽的抗原结合活性和特异性得以保留。

[0113] 特定的保守置换包括,例如:Ala置换成Gly或置换成Ser;Arg置换成Lys;Asn置换成Gin或置换成His;Asp置换成Glu;Cys置换成Ser;Gin置换成Asn;Glu置换成Asp;Gly置换成Ala或置换成Pro;His置换成Asn或置换成Gin;Ile置换成Leu或置换成Val;Leu置换成Ile或置换成Val;Lys置换成Arg、置换成Gin或置换成Glu;Met置换成Leu、置换成Tyr或置换成Ile;Phe置换成Met、置换成Leu或置换成Tyr;Ser置换成Thr;Thr置换成Ser;Trp置换成Tyr;Tyr置换成Trp;以及/或者Phe置换成Val、置换成Ile或置换成Leu。

[0114] 在一些实施方案中,本文所述的抗体和/或其抗原结合片段可以是本文所述序列

的变体,例如抗体多肽的保守置换变体。在一些实施方案中,变体是保守修饰的变体。如本文提及的,关于多肽的“变体”是与天然或参考多肽基本上同源的多肽,但其因为一个或多个缺失、插入或置换而具有与天然或参考多肽不同的氨基酸序列。与天然或参考DNA序列相比,编码变体多肽的DNA序列包含含有核苷酸的一个或多个添加、缺失或置换的序列,但该序列编码保留了活性例如针对相关靶多肽的抗原特异性结合活性的变体蛋白或其片段。

[0115] 天然氨基酸序列的改变可以通过本领域技术人员已知的许多技术中的任一种来完成。可以在特定基因座处或通过寡核苷酸指导的位点特异性诱变程序来引入突变。用于进行这样的改变的技术已经得到良好建立,并且包括例如Walder等人(Gene 42:133, 1986);Bauer等人(Gene 37:73, 1985);Craik(BioTechniques, January 1985, 12-19);Smith等人(Genetic Engineering:Principles and Methods, Plenum Press, 1981);以及美国专利号4,518,584和4,737,462公开的那些。

[0116] 在某些实施方案中,提供了编码与TL1A或其片段特异性结合的多肽的多核苷酸。例如,提供了包含编码TL1A的抗体或编码这样的抗体的片段的核酸序列的多核苷酸。多核苷酸可处于RNA的形式或DNA的形式。DNA包括cDNA、基因组DNA和合成DNA;并且可以是双链或单链的,并且如果是单链的可以是编码链或非编码(反义)链。在某些实施方案中,多核苷酸被分离。在某些实施方案中,多核苷酸是基本上纯的。

[0117] 还提供了包含选自SEQ ID N0:1、9、17、25及其组合的序列的多核苷酸。还提供了本文所述的多核苷酸的变体,其编码例如片段、类似物和衍生物。

[0118] 编码抗体的氨基酸序列变体的核酸分子通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于通过寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR诱变和抗体的早期制备的变体或非变体形式的盒式诱变来制备。编码如本文所述的至少一个抗体、其部分或多肽的核酸序列可以根据包括但不限于用于连接和限制酶消化的平端或交错端末端等常规技术与载体DNA重组。用于这样的操作的技术公开于例如Maniatis等人,Molecular Cloning, Lab. Manual(Cold Spring Harbor Lab. Press, NY, 1982和1989)中,并且可用于构建编码单克隆抗体分子或抗原结合区的核酸序列。

[0119] 在一些实施方案中,编码如本文所述的抗体或其抗原结合片段的核酸由载体组成。在本文所述的一些方面,编码如本文所述的抗体或其抗原结合片段的核酸序列或其任何模块与载体可操作地连接。如本文所用,术语“载体”是指被设计用于递送至宿主细胞或用于在不同宿主细胞之间转移的核酸构建体。如本文所用,载体可以是病毒的或非病毒的。术语“载体”包括当与适当的控制元件相关联时能够复制,并且可以将基因序列转移至细胞的任何遗传元件。载体可包括但不限于克隆载体、表达载体、质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、病毒、病毒体等。

[0120] 如本文所用,术语“表达载体”是指引导来自载体上与转录调节序列连接的序列的RNA或多肽的表达的载体。术语“表达”是指涉及产生RNA和蛋白质并在适当时分泌蛋白质的细胞过程,在适用的情况下包括但不限于例如转录、转录物加工、翻译以及蛋白质折叠、修饰和加工。“表达产物”包括从基因转录的RNA,以及通过翻译从基因转录的mRNA获得的多肽。术语“基因”意指当与适当的调节序列可操作地连接时在体外或体内转录(DNA)成RNA的核酸序列。该基因可以=包含或可不包含编码区之前和之后的区域,例如5'非翻译(5'UTR)或“前导”序列以及3'UTR或“尾随”序列,以及单独的编码区段(外显子)之间的插入序列(内

含子)。

[0121] 如本文所用,术语“病毒载体”是指包含至少一个病毒来源的元件并且具有包装成病毒载体颗粒的能力的核酸载体构建体。病毒载体可含有编码如本文所述的抗体或其抗原结合部分的核酸来代替非必需病毒基因。载体和/或颗粒可用于在体外或体内将任何核酸转移到细胞中的目的。许多形式的病毒载体是本领域已知的。

[0122] “重组载体”意指载体包括能够在体内表达的异源核酸序列或“转基因”。

[0123] 在某些实施方案中,提供了分离的多核苷酸,其包含具有与编码包含针对于本文所述的TL1A的抗体或其片段的多肽的多核苷酸至少80%相同、至少85%相同、至少90%相同、至少95%相同,并且在一些实施方案中,至少96%、97%、98%或99%相同的核苷酸序列的多核苷酸。

[0124] 与参考核苷酸序列例如至少95%“相同”的核苷酸序列的多核苷酸意指除了所述多核苷酸序列可包含每参考核苷酸序列的100个核苷酸至多五个点突变之外,所述多核苷酸的核苷酸序列与参考序列相同。参考序列的这些突变可以发生在参考核苷酸序列的氨基或羧基末端位置处或那些末端位置之间的任何位置处,单独散布在参考序列中的核苷酸之间或以一个或多个连续组散布在参考序列内。

[0125] 多核苷酸变体可包含在编码区、非编码区或两者中的改变。在一些实施方案中,多核苷酸变体含有产生沉默置换、添加或缺失,但不改变编码的多肽的性质或活性的改变。在一些实施方案中,由于遗传密码的简并性,通过沉默置换产生核苷酸变体。可以出于多种原因产生多核苷酸变体,例如,以优化特定宿主的密码子表达(将人mRNA中的密码子改变为细菌宿主如大肠杆菌优选的密码子)。

[0126] 在一些实施方案中,对基因进行融合以产生期望的序列。将每个融合基因组装或插入到表达载体中,所述表达载体被转染到接受者中。在允许表达掺入的基因的条件下培养转染的接受者细胞,并从培养物重新获得表达的免疫球蛋白链或者完整的抗体或片段。在一些实施方案中,编码抗体、其抗原结合片段的融合基因在单独的表达载体中组装,然后用于共转染接受者细胞。

[0127] 药物组合物、施用和剂量

[0128] 所提供的抗TL1A抗体可用于多种应用,包括但不限于治疗性治疗方法,诸如IBD的治疗。使用方法可以是体外、离体或体内方法。在某些实施方案中,抗TL1A抗体是针对于TL1A受体的拮抗剂。

[0129] 在某些实施方案中,用抗TL1A抗体或TL1A受体拮抗剂治疗的疾病是IBD、CD、UC和/或MR-UC。

[0130] 在各个实施方案中,药物组合物被配制用于经由任何施用途径进行递送。“施用途径”可以指本领域已知的任何施用途径,包括但不限于气溶胶、鼻、服、经粘膜、经皮或肠胃外。

[0131] “经皮”施用可以使用局部乳膏或软膏或者通过经皮贴剂完成。

[0132] “肠胃外”是指通常与注射相关联的施用途径,包括眶内、输注、动脉内、囊内、心内、皮内、肌肉内、腹膜内、肺内、脊柱内、胸骨内、鞘内、子宫内、静脉内、蛛网膜下、囊下、皮下、经粘膜或经气管。经由肠胃外途径,组合物可处于用于输注或用于注射的溶液或悬浮液的形式,或者作为冻干粉末。

[0133] 经由肠途径,药物组合物可处于片剂、凝胶胶囊、糖衣片剂、糖浆、悬浮液、溶液、粉末、颗粒、乳液、允许控释的微球或纳米球或脂质囊泡或聚合物囊泡的形式。

[0134] 经由局部途径,药物组合物被配制用于治疗皮肤和粘膜,并且处于软膏、乳膏、乳、药膏、粉末、浸渍垫、溶液、凝胶、喷雾剂、洗液或悬浮液的形式。它们还可处于允许控释的微球或纳米球或脂质囊泡或聚合物囊泡或聚合物贴剂和水凝胶的形式。根据临床适应症,这些局部途径组合物可处于无水形式或含水形式。

[0135] 经由眼途径,它们可处于滴眼剂的形式。

[0136] 在各个实施方案中,可以通过注射或通过随时间逐渐输注来静脉内施用药剂。考虑到针对给定途径的适当制剂,例如,用于本文所述的方法和组合物的药剂可静脉内、鼻内、通过吸入、腹膜内、肌肉内、皮下、腔内进行施用,并且可通过蠕动手段(如果需要)或者通过本领域技术人员已知的其他手段进行递送。在特定实施方案中,本文使用的化合物口服、静脉内或肌肉内施用于患有IBD、CD、UC和/或MR-UC的患者。

[0137] 药物组合物还可含有任何药学上可接受的载体。“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或媒介物,其涉及将感兴趣的化合物从一个组织、器官或身体部分携带或运送到另一个组织、器官或身体部分。例如,载体可以是液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料或其组合。载体的每种组分必须是“药学上可接受的”,因为其必须与制剂的其他成分相容。其还必须适合用于与其可能与之接触的任何组织或器官进行接触,这意味着其必须不携带毒性、刺激、变态反应、免疫原性或者任何其他过度超过其治疗益处的并发症的风险。

[0138] 在各个实施方案中,提供了药物组合物,其包含药学上可接受的赋形剂以及治疗有效量的抗TL1A抗体。“药学上可接受的赋形剂”意指用于制备通常安全、无毒且期望的药物组合物的赋形剂,并且包括兽医用途以及人类药物用途的可接受的赋形剂。活性成分可与赋形剂混合,所述赋形剂是药学上可接受的并且可与活性成分相容并且处于适用于本文所述的治疗方法的量。这样的赋形剂可以是固体、液体、半固体的,或者在气溶胶组合物的情况下可以是气体的。合适的赋形剂是例如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、水、盐水、右旋糖、丙二醇、甘油、乙醇、甘露醇、聚山梨醇酯等及其组合。此外,如果需要,该组合物可含有少量辅助物质,如增强或维持活性成分的有效性的润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂等。如本文所述的治疗组合物可包含药学上可接受的盐。药学上可接受的盐包括由无机酸如盐酸或磷酸,有机酸如乙酸、酒石酸或扁桃酸形成的酸加成盐;由无机碱如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁形成的盐;以及由有机碱如异丙胺、三甲胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等形成的盐。液体组合物还可含有除水之外以及排除水的液相,例如甘油、植物油如棉籽油,以及水-油乳液。生理上可耐受的载体是本领域公知的。在治疗特定病症或病况方面将会有效的使用的活性剂(即,抗体或其片段)的量将取决于该病症或病况的性质,并且可由本领域技术人员用标准临床技术确定。

[0139] 药物组合物还可以进行包封、片剂化或制备成乳液或糖浆以供口服施用。可添加药学上可接受的固体或液体载体以增强或稳定组合物,或促进组合物的制备。液体载体包括糖浆、花生油、橄榄油、甘油、盐水、醇和水。固体载体包括淀粉、乳糖、硫酸钙、二水合物、白土、硬脂酸镁或硬脂酸、滑石、果胶、阿拉伯胶、琼脂或明胶。载体还可包括单独或与蜡一

起的持续释放物质,如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0140] 药物制剂按照常规的药剂学技术制备,包括针对片剂形式的碾磨、混合、粒化和挤压(必要时);或针对硬明胶胶囊形式的碾磨、混合和填充。当使用液体载体时,制剂将处于糖浆、酏剂、乳液或者水性或非水性悬浮液的形式。这样的液体制剂可以直接口服(p.o.)施用或填充至软明胶胶囊中。

[0141] 药物组合物可以以治疗有效量递送。精确的治疗有效量是在给定受试者中的治疗功效方面将产生最有效结果的组合物的量。该量将根据多种因素而变化,包括但不限于治疗化合物的特性(包括活性、药代动力学、药效学和生物利用度)、受试者的生理状况(包括年龄、性别、疾病类型和阶段、一般身体状况、对给定剂量的反应性和药物类型)、制剂中医学上可接受的载体的性质以及施用途径。临床和药理学领域的技术人员将能够通过常规实验确定治疗有效量,例如,通过监测受试者对化合物施用的反应并相应地调整剂量。有关其他指导,参见Remington: The Science and Practice of Pharmacy(Gennaro编著,第20版,Williams&Wilkins PA,USA) (2000)。

[0142] 有效的抗TL1A抗体的典型的剂量可以如体外反应或动物模型中的反应对技术人员所指示的。这样的剂量通常可以在浓度或量上减小至多约一个数量级而不丧失相关的生物活性。因此,实际剂量将取决于医师的判断、患者的状况以及基于例如相关原代培养细胞或组织培养组织样品(如获得的生物样品)的体外反应性的治疗方法的有效性,或在适当的动物模型中观察到的反应。

[0143] 对于疾病的治疗,适当的抗体剂量取决于待治疗的疾病的类型、疾病的严重程度和病程、疾病的反应性、施用抗体用于治疗目的还是预防目的、先前的治疗以及患者的临床病史。如果出现任何并发症并且在由治疗医师酌情决定时,也可以由个体医师调整剂量。施用医师可以确定最佳剂量、给药方法和重复率。TL1A抗体可以施用一次或者施用持续数天至数月的一系列治疗,或者直至实现治愈或实现疾病状态的减轻(例如,治疗或改善IBD)。治疗的持续时间取决于受试者的临床进展和对治疗的反应。在某些实施方案中,剂量为每千克体重0.01μg至100mg,并且可以每天、每周、每月或每年给予一次或多次。对于全身施用,可以向受试者施用治疗量,例如,0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg或更多。

[0144] 治疗方法

[0145] 各个实施方案提供了治疗炎性肠病(IBD)的方法,包括向有需要的受试者施用本文所述的抗TL1A抗体。在一些实施方案中,受试者包含一种或多种风险变体。

[0146] 在各个实施方案中,本文提供了治疗有需要的受试者中的炎性肠病(IBD)的方法,其包括:向受试者施用治疗有效量的与TL1A特异性结合的抗体或抗原结合片段,其中该抗体或抗原结合片段选自:(a)包含SEQ ID NO:5的重链和包含SEQ ID NO:13的轻链;(b)包含SEQ ID NO:21的重链和包含SEQ ID NO:29的轻链;(c)SEQ ID NO:6-8的重链互补决定区(CDR)和SEQ ID NO:14-16的轻链互补决定区(CDR);(d)SEQ ID NO:22-24的重链互补决定区(CDR)和SEQ ID NO:30-32的轻链互补决定区(CDR);(e)SEQ ID NO:5和/或21的重链;(f)SEQ ID NO:13和/或29的轻链;(g)SEQ ID NO:6-8和/或SEQ ID NO:22-24的重链互补决定区(CDR);(h)SEQ ID NO:14-16和/或SEQ ID NO:30-32的轻链互补决定区(CDR);以及(i)其组合。

[0147] 在各个实施方案中,炎性肠病(IBD)是克罗恩病、溃疡性结肠炎和/或医学难治性溃疡性结肠炎。

[0148] 在各个实施方案中,抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体是人抗体。在各个实施方案中,抗体是人源化抗体。在各个实施方案中,抗体是中和抗体。

[0149] 在各个其他实施方案中,确定受试者具有增加的TL1A表达。在一些实施方案中,施用治疗有效量的抗TL1A抗体导致所治疗的受试者中TL1A减少。

[0150] 在各个实施方案中,抗体或抗原结合片段选自:(a)包含SEQ ID NO:5的重链和包含SEQ ID NO:13的轻链;(b)SEQ ID NO:6-8的重链互补决定区(CDR)和SEQ ID NO:14-16的轻链互补决定区(CDR);(c)SEQ ID NO:5的重链;(d)SEQ ID NO:13的轻链;(e)SEQ ID NO:6-8的重链互补决定区(CDR);(f)SEQ ID NO:14-16的轻链互补决定区(CDR);以及(g)其组合。

[0151] 在各个其他实施方案中,抗体或抗原结合片段选自:(a)包含SEQ ID NO:21的重链和包含SEQ ID NO:29的轻链;(b)SEQ ID NO:22-24的重链互补决定区(CDR)和SEQ ID NO:30-32的轻链互补决定区(CDR);(c)SEQ ID NO:21的重链;(d)SEQ ID NO:29的轻链;(e)SEQ ID NO:22-24的重链互补决定区(CDR);(f)SEQ ID NO:30-32的轻链互补决定区(CDR);以及(g)其组合。

[0152] 在各个实施方案中,抗体或抗原结合片段由具有选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:25及其组合的序列的核酸编码。

[0153] 在各个其他实施方案中,抗体或抗原结合片段由具有选自下组的序列的核酸编码:(a)SEQ ID NO:2-4的重链互补决定区(CDR)和SEQ ID NO:10-12的轻链互补决定区(CDR);(b)SEQ ID NO:18-20的重链互补决定区(CDR)和SEQ ID NO:26-28的轻链互补决定区(CDR);(c)SEQ ID NO:1和/或17的重链;(d)SEQ ID NO:9和/或25的轻链;(e)SEQ ID NO:2-4和/或SEQ ID NO:18-20的重链互补决定区(CDR);(f)SEQ ID NO:10-12和/或SEQ ID NO:26-28的轻链互补决定区(CDR);以及(g)其组合。

[0154] 在各个方面,将抗TL1A抗体施用于受试者以进行治疗。在各个其他实施方案中,抗TL1A抗体以一系列治疗施用。在一些实施方案中,抗TL1A抗体和第二IBD治疗可以以任何顺序施用或同时施用。在选定的实施方案中,抗TL1A抗体将会施用于先前已经接受过第二IBD治疗的患者。在某些其他实施方案中,抗TL1A抗体和第二IBD治疗将基本上同步或同时施用。例如,可以在经历第二IBD治疗的治疗过程中向受试者给予抗TL1A抗体。在某些实施方案中,抗TL1A抗体将在第二IBD治疗的治疗后1年内施用。在某些替代实施方案中,抗TL1A抗体将在第二IBD治疗的任何治疗的10、8、6、4或2个月内施用。在某些其他实施方案中,抗TL1A抗体将在第二IBD治疗的任何治疗的4、3、2或1周内施用。在一些实施方案中,抗TL1A抗体将在第二IBD治疗的任何治疗的第5、4、3、2或1天内施用。将会进一步理解,两种治疗可在数小时或数分钟内(即同步)施用于受试者。

[0155] 其他IBD治疗包括但不限于1)抗炎药(例如,氨基水杨酸类,诸如但不限于柳氮磺胺吡啶、Azulfidine、5-氨基水杨酸、Mesalamine、Asacol、Lialda、Rowasa、Canasa、巴柳氮、Colazal和奥沙拉秦、Dipentum);2)皮质类固醇(例如泼尼松和氢化可的松);3)免疫系统抑制剂(例如,硫唑嘌呤、Azasan、Imuran、巯基嘌呤、Purinethol、Purixan、环孢菌素、Gengraf、Neoral和Sandimmune、英夫利昔单抗、Remicade、阿达木单抗、Humira、戈利木单抗

和Simponi、肿瘤坏死因子(TNF)- α 抑制剂(例如,英夫利昔单抗)、甲氨蝶呤、Rheumatrex、那他珠单抗、Tysabri、维多珠单抗、Entyvio、优特克单抗(Ustekinumab)和Stelara)；4)抗生素(例如,甲硝唑、Flagyl、环丙沙星、Cipro)；5)抗腹泻药物(例如,纤维补充剂Metamucil或Citrucel或者洛哌丁胺)；6)止痛药(例如,Tylenol、布洛芬、萘普生钠和双氯芬酸钠)；7)手术(例如,去除结肠、去除部分消化道、结肠切除术、直肠结肠切除术和/或狭窄缝合术)。在一些实施方案中,这些IBD治疗可以与抗TL1A抗体联合施用。抗体治疗可以在施用IBD治疗之前、同时或之后发生。联合施用可包括在单一药物制剂中或使用单独的制剂共同施用,或者以任一顺序但通常在一段时间内连续施用,使得所有活性剂可同步发挥其生物活性。,还可以使用如熟练从业者所确定的任何用于这样的IBD治疗的给药方案。

[0156] 在一些实施方案中,第二IBD治疗包含抗体。因此,治疗可涉及本文提供的抗体与针对另外的IBD相关抗原的其他抗体的联合施用,该IBD相关抗原诸如但不限于肿瘤坏死因子(TNF)- α 。联合施用可包括在单一药物制剂中或使用单独的制剂共同施用,或者以任一顺序但通常在一段时间内连续施用,使得所有活性剂可同步发挥其生物活性。

[0157] 试剂盒

[0158] 还提供了治疗IBD(例如,CD、UC和/或MR-UC)的试剂盒。该试剂盒包含本文所述的抗体,其可用于实施本文所述的方法。该试剂盒可用于实践通过施用抗TL1A抗体向IBD、CD、UC和/或MR-UC患者提供治疗的本发明方法。该试剂盒是材料或组分的集合,包含至少一种本发明的组合物。因此,在一些实施方案中,试剂盒含有包含抗TL1A抗体的组合物,用于如上所述治疗IBD、CD、UC和/或MR-UC。在其他实施方案中,试剂盒包含进行针对TL1A的检测测定所必需和/或足够的所有组分,包括所有对照、进行测定的方向以及用于分析和呈现结果的任何必需软件。

[0159] 在本发明的试剂盒中被配置的组分的确切性质取决于其预期目的。例如,一些实施方案被配置用于治疗IBD、CD、UC和/或MR-UC的目的。在一个实施方案中,试剂盒特别被配置用于治疗哺乳动物受试者的目的。在另一个实施方案中,试剂盒特别被配置用于治疗人类受试者的目的。在进一步的实施方案中,所述试剂盒被配置用于兽医应用,治疗诸如但不限于农场动物、家养动物和实验室动物等受试者。

[0160] 试剂盒中可能包含使用说明。“使用说明”通常包括有形表达,描述在使用试剂盒的组分以实现期望结果,诸如治疗或改善IBD、CD、UC和/或MR-UC中得以应用的技术。任选地,该试剂盒还包含其他有用的组分,如稀释剂、缓冲液、药学上可接受的载体、注射器、导管、涂抹器、移液或测量工具、包扎材料或如本领域技术人员将容易认识到的其他有用的用具。

[0161] 组装在试剂盒中的材料或组分可以以保持其可操作性和实用性的任何方便和合适的方式提供给从业者。例如,组分可以是溶解的、脱水的或冻干的形式;它们可以在室温下、冷藏温度下或冷冻温度下提供。组分通常包含在合适的包装材料中。如本文所用,短语“包装材料”是指用于容纳试剂盒的内容物如本发明组合物等的一种或多种物理结构。包装材料通过公知的方法构造,优选地提供无菌、无污染的环境。试剂盒中使用的包装材料是习惯上用于基因表达测定和治疗施用的那些材料。如本文所用,术语“包装”是指能够保持各个试剂盒组分的合适的固体基质或材料,如玻璃、塑料、纸、箔等。因此,例如,包装可以是用于容纳合适量的含有抗TL1A抗体和/或针对TL1A的引物和探针的本发明组合物的玻璃小瓶

或预填充注射器。包装材料通常具有表明试剂盒和/或其组分的内容物和/或目的的外部标签。

[0162] 实施例

[0163] 以下实施例是对本文所述实施方案的说明,并且不应解释为限制所述实施方案的范围。在提及具体材料的程度上,其仅用于说明目的而非意在限制。在不运用发明能力且不脱离本公开内容的范围的情况下,本领域技术人员可开发等同的手段或反应物。

[0164] 实施例1

[0165] 免疫原的生成和用于杂交瘤生成的免疫方案

[0166] 在大肠杆菌中表达具有点突变C66S(从全长蛋白质中的前导甲硫氨酸计数)并且缺少前导的57个氨基酸的重组TL1A蛋白。重组TL1A序列由SEQ ID NO:33 (QLRAQGEASVQFQALKGQEFAPSHQQVYAPLRADGKPRAHLTIVRQTPTQHFKNQFPALHWEHELGLAFTKNRMNYTNKFLLIPESGDYFIYSQVTFRGMTSECSEIRQAGRPNKPDSITVVITKVTD SYPEPTQLLMGTKSVCEVGSNWFQPIYLGAMFSLQEGDKLMVNVDISLVDYTKEDKTFGAFLL) 表示。

[0167] 通过用含有全长TL1A蛋白序列的慢病毒构建体转导生成表达TL1A的HEK293细胞系。该细胞系表达蛋白质的膜结合形式和分泌形式(如分别通过流式细胞术和基于ELISA的方法所确定的)。由HEK293细胞系表达的TL1A的序列由SEQ ID NO:34 (MAEDLGLSFGTASVEMLPEHGSCRPKARSSSARWALTCCVLVPFLAGLTTYLLVSQLRAQGEACVQFQALKGQEFAPSHQQVYAPLRADGKPRAHLTIVRQTPTQHFKNQFPALHWEHELGLAFTKNRMNYTNKFLLIPESGDYFIYSQVTFRGMTSECSEIRQAGRPNKPDSITVVITKVTD SYPEPTQLLMGTKSVCEVGSNWFQPIYLGAMFSLQEGDKLMVNVDISLVDYTKEDKTFGAFLL) 表示。

[0168] 使用重组蛋白和表达TL1A的细胞系,用多轮免疫对小鼠进行免疫。该策略涉及初次免疫和两轮加强。对两组动物进行免疫,交换两组之间的初次和加强免疫原,第1组:用重组TL1A蛋白进行初次免疫,并用表达TL1A的细胞系进行加强;第2组:用表达TL1A的细胞系进行初次免疫,并用重组TL1A蛋白进行加强。将从小鼠移取的B细胞与骨髓瘤细胞进行融合,筛查表达5C3D11和9E12E5抗体的杂交瘤。

[0169] 杂交瘤5C3D11的单克隆抗体测序

[0170] 从冷冻的杂交瘤细胞提取总RNA,并从RNA合成cDNA。然后进行PCR以扩增抗体的可变区(重链和轻链),随后将其分别克隆到标准克隆载体中并对其进行测序。

[0171] 材料与方法

[0172] 使用的材料包括杂交瘤细胞、TRIzol®试剂(Ambion,登录号:15596-026)和PrimeScript™第一链cDNA合成试剂盒(Takara,登录号:6110A)。

[0173] 总RNA提取和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

[0174] 按照TRIzol®试剂的技术手册,从杂交瘤细胞分离总RNA。通过琼脂糖凝胶电泳分析总RNA。

[0175] 按照PrimeScript™第一链cDNA合成试剂盒的技术手册,使用同种型特异性反义引物或通用引物将总RNA逆转录成cDNA。根据GenScript的RACE的标准操作程序扩增VH和VL的抗体片段。

[0176] 抗体基因克隆、筛选和测序

[0177] 使用标准分子克隆程序将扩增的抗体片段分别克隆到标准克隆载体中。

[0178] 进行菌落PCR筛选以鉴别具有正确大小的插入物的克隆。针对每个抗体片段对具有正确大小的插入物的不少于5个单个菌落进行测序。

[0179] 结果和分析

[0180] 分离的样品的总RNA与DNA标记物Marker III (TIANGEN, 登录号:MD103)一起在1.5%琼脂糖/GelRedTM凝胶上运行,如图1所示。

[0181] 每个样品的4微升PCR产物与DNA标记物Marker III一起在1.5%琼脂糖/GelRedTM凝胶上运行,如图2所示。纯化PCR产物并储存在-20℃下直至进一步使用。

[0182] 测序结果和分析

[0183] 对具有正确VH和VL插入物大小的五个单个菌落进行测序。发现五个不同克隆的VH和VL基因几乎相同。重链、轻链和CDR区域的DNA和氨基酸序列描述于SEQ ID NO:1-16(参见表2)中,其对应于抗TL1A抗体5C3D11。

[0184] 表2:5C3D11的核苷酸和氨基酸序列

| 抗体 | 序列类型 | 大小 | 前导序列 | 序列 | SEQ ID NO: |
|---------------|------|-------|--|--|------------|
| 5C3D11 | | | | | |
| 重链 | DNA | 405bp | FR1-CDR 1-FR2-CD R2-FR3-C | ATGAAATGCAGCTGGGTTATCTT CTTCCTGATGGCAGTGGTTACAG GGGTCAATTCAAGAGGGTTAGCTG | 1 |

[0186]

| | | | | | |
|----|-----|-------|--|--|---|
| | | | DR3-FR4 | <i>CAGCAGTCTGGGGCAGAACCTTGTG AAGCCAGGGGCCTCAGTCAGTTG TCCTGCACAGCTTCTGGCTTCGACA TTCAAGACACCTATATGCACTGG GTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGC CTGGAGTGGATTGGAAGGATTGA TCCTGCGAGTGGACATACTAAA TATGACCCGAAGTTCCAGGTCA AGGCCACTATAACAACGGACACAT CCTCCAACACAGCCTACCTGCAGC TCAGCAGCCTGACATCTGAGGACA CTGCCGTCTATTACTGTTCTAGATC GGGGGGCCTACCTGATGTCTGG GGCGCAGGGACCACGGTCACCGT CTCCTCA</i> | |
| | | | CDR1 | GACACCTATATGCAC | 2 |
| | | | CDR2 | AGGATTGATCCTGCGAGTGGACA TACTAAATATGACCCGAAGTTCC AGGTC | 3 |
| | | | CDR3 | TCGGGGGGCCTACCTGATGTC | 4 |
| 重链 | 氨基酸 | 135AA | FR1-CDR 1-FR2-CD R2-FR3-C DR3-FR4 | <i>MKCSWVIFFLMAVVTGVNSEVQL QOSGAELVKPGASVKLSCTASGFDIQ DTYMHWVKQRPEQGLEWIGRIDP ASGHTKYDPKFQVKATITTDSSN TAYLQLSSLTSEDTAVYYCSRSGLP DVWGAGTTTVSS</i> | 5 |
| | | | CDR1 | DTYMH | 6 |
| | | | CDR2 | RIDPASGHTKYDPKFQV | 7 |
| | | | CDR3 | SGGLPDV | 8 |

[0187]

| | | | | | |
|----|-----|-------|------------------------|--|----|
| 轻链 | DNA | 384bp | <i>FR1-CDR</i> | ATGGATTTCAAGTGCAGATT | 9 |
| | | | <i>1-FR2-CD</i> | CAGCTTCCTGCTAACAGTGCT | |
| | | | <i>R2-FR3-C</i> | CAGTCATAATGTCCAGAGGACAA | |
| | | | <i>DR3-FR4</i> | <i>ATTGTTCTCTCCCAGTCTCCTGCAA</i> <i>TCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGA</i> <i>AGGTCACAAATGACTTGCAGGGCC</i> <i>AGCTCAAGTGTAAAGTTACATGT</i> <i>ACTGGTACCAAGCAGAACGCTGGAT</i> <i>CCTCCCCAAACCTGGATTATG</i> <i>CCACATCCAACCTGGCTTCTGG</i> <i>AGTCCCTGATCGCTTCAGTGGCAG</i> <i>TGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTC</i> <i>ACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAA</i> <i>GATGCTGCCACTTATTACTGCCAG</i> <i>CAGTGGAGTGGTAACCCACGG</i> <i>ACGTTGGTGGAGGCACCAAGCT</i> <i>GGAAATCAAA</i> | |
| | | | CDR1 | AGGGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTA CATGTAC | |
| | | | CDR2 | GCCACATCCAACCTGGCTTCT | |
| | | | CDR3 | CAGCAGTGGAGTGGTAACCCACG GACG | |
| | | | <i>FR1-CDR</i> | MDFQVQIFSFLISASVIMSRGQIVL | |
| | | | <i>1-FR2-CD</i> | <i>SQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVS</i> | |
| | | | <i>R2-FR3-C</i> | <i>YMYWYQQKPGSSPKPWYATSNLA</i> | |
| | | | <i>DR3-FR4</i> | <i>SGVPDRFSGSGSGTSYSLTISRVEAED</i> <i>AATYYCQQWSGNPRTFGGGTKLEI</i> <i>K</i> | |
| | | | CDR1 | RASSSVSYMY | 14 |

| | | | | | |
|--------|--|--|------|-----------|----|
| [0188] | | | CDR2 | ATSNLAS | 15 |
| | | | CDR3 | QQWSGNPRT | 16 |

[0189] nt-核苷酸;aa-氨基酸

[0190] 杂交瘤9E12E5的单克隆抗体测序

[0191] 从冷冻的杂交瘤细胞提取总RNA,并从RNA合成cDNA。然后进行PCR以扩增抗体的可变区(重链和轻链),随后将其分别克隆到标准克隆载体中并对其进行测序。

[0192] 材料与方法

[0193] 使用的材料包括杂交瘤细胞、TRIzol®试剂(Ambion,登录号:15596-026)和PrimeScriptTM第一链cDNA合成试剂盒(Takara,登录号:6110A)。

[0194] 总RNA提取和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

[0195] 按照TRIzol®试剂的技术手册从杂交瘤细胞分离总RNA。通过琼脂糖凝胶电泳分析总RNA。

[0196] 按照PrimeScriptTM第一链cDNA合成试剂盒的技术手册,使用同种型特异性反义引物或通用引物将总RNA逆转录成cDNA。根据GenScript的RACE的标准操作程序扩增VH和VL的抗体片段。

[0197] 抗体基因克隆、筛选和测序

[0198] 使用标准分子克隆程序将扩增的抗体片段分别克隆到标准克隆载体中。

[0199] 进行菌落PCR筛选以鉴别具有正确大小的插入物的克隆。针对每个抗体片段对具有正确大小的插入物的不少于5个单个菌落进行测序。

[0200] 结果和分析

[0201] 分离的样品的总RNA与DNA标记物Marker III (TIANGEN,登录号:MD103)一起在1.5%琼脂糖/GelRedTM凝胶上运行,如图3所示。

[0202] 每个样品的4微升PCR产物与DNA标记物Marker III一起在1.5%琼脂糖/GelRedTM凝胶上运行,如图4所示。纯化PCR产物并储存在-20℃下直至进一步使用。

[0203] 测序结果和分析

[0204] 对具有正确VH和VL插入物大小的五个单个菌落进行测序。发现五个不同克隆的VH和VL基因几乎相同。重链、轻链和CDR区域的DNA和氨基酸序列描述于SEQ ID N0:17-32(参见表3)中,其对应于抗TL1A抗体9E12E5。

[0205] 表3:9E12E5的核苷酸和氨基酸序列

| 抗体 | 序列类型 | 大小 | 前导序列 | 序列 | SEQ ID NO: |
|---------------|------|-------|--|--|------------|
| 9E12E5 | | | | | |
| 重链 [0206] | DNA | 405bp | FR1-CDR 1-FR2-CD R2-FR3-C DR3-FR4 | ATGGGATGGAGCTGGGTCTTCT CTTCCTCCTGTCAGTGACTGCAG GTGTCCACTCCCAGGTTCACCTGC AGCAGTCTGGACCTGAACCTGGTAA AGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGT CCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTT CACAAAGTATGATATAAACTGG GTGAGGCAGAGGCCTGAACAGGG ACTTGAGTGGATTGGATGGATT TCCTGGAGATGGTAGAACTGA CTACAATGAGAAGTTCAAGGGT AAGGCCACACTGACTACAGACAAAT CCTCCAGCACAGCCTACATGGAGG TCAGCAGGCTGACATCTGAGGACT CTGCTGTCTATTCTGTGCAAGATA TGGCCCCGCTATGGACTACTGG GGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTC | 17 |

[0207]

| | | | | | |
|----|-----|-------|--|---|----|
| | | | | <i>GCCTCA</i> | |
| | | | CDR1 | AAGTATGATATAAAC | 18 |
| | | | CDR2 | TGGATTTCCTGGAGATGGTAG AACTGACTACAATGAGAAGTTCA AGGGT | 19 |
| | | | CDR3 | TATGGCCCCGCTATGGACTA | 20 |
| 重链 | 氨基酸 | 135AA | <i>FR1-CDR</i> <i>1-FR2-CD</i> <i>R2-FR3-C</i> <i>DR3-FR4</i> | <i>MGWSWVFLFLSVTAGVHSQVHL</i> <i>QQSGPELVKPGASVKSCKASGYTFT</i> <i>KYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPG</i> <i>DGRTDYNEKFKGKATLTTDKSSST</i> <i>AYMEVSRLTSEDSAVYFCARYGPAM</i> <i>DYWGQGTSVTVA S</i> | 21 |
| | | | CDR1 | KYDIN | 22 |
| | | | CDR2 | WIFPGDGRTDYNEKFKG | 23 |
| | | | CDR3 | YGPAMDY | 24 |
| 轻链 | DNA | 393bp | <i>FR1-CDR</i> <i>1-FR2-CD</i> <i>R2-FR3-C</i> <i>DR3-FR4</i> | <i>ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTT</i> <i>GGTGCTGATGTTCTGGATTCTG</i> <i>CTTCCAGCAGTGATGTTTGATGA</i> <i>CCCAAACCTCCACTCTCCCTGCCTGT</i> <i>CAGTCTGGAGATCAAGCCTCCATC</i> <i>TCTTGCAGATCTAGTCAGACCAT</i> <i>TGTACATAGTAATGGAGACACC</i> <i>TATTTAGACTGGTTCTGCAGAAA</i> <i>CCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTG</i> <i>ATCTACAAAGTTCCAACCGATT</i> <i>TTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA</i> <i>TGGCAGTGGATCAGGGACAGATT</i> <i>CACACTCAAGATCAGCAGAGTGG</i> <i>GGCTGAGGATCTGGGAGTTATT</i> | 25 |

| | | | | | |
|--------|----|-----|-------|--|----|
| | | | | CTGCTTCAGGTTCACATGTT CCGTACACGTTGGAGGGGGGA CCAAGCTGGAAATAAAA | |
| | | | CDR1 | AGATCTAGTCAGACCATTGTACA TAGTAATGGAGACACCTATTAG AC | 26 |
| | | | CDR2 | AAAGTTCCAACCGATTTCT | 27 |
| | | | CDR3 | TTTCAAGGTTCACATGTTCCGTA CACG | 28 |
| [0208] | 轻链 | 氨基酸 | 131AA | FR1-CDR MKLPVRLVLMFWIPASSSDVLMT 1-FR2-CD QTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTIVH R2-FR3-C SNGDTYLDWFLQKPGQSPKLLIYK DR3-FR4 VSNRFSGVPDFRSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGG GTKLEIK | 29 |
| | | | CDR1 | RSSQTIVHSNGDTYLD | 30 |
| | | | CDR2 | KVSNRFS | 31 |
| | | | CDR3 | FQGSHVPY | 32 |

[0209] nt-核苷酸;aa-氨基酸

[0210] 实施例2

[0211] 使用BLASTP 2.2.32+比对比较两种抗体序列的重链可变区(表4)和轻链可变区(表5)。

[0212] 表4:重链可变区的BLAST分析

[0213]

前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (按出现顺序分别公开了SEQ ID NO 46-47)
查询1 = 9E12E5
主题 = 5C3D11

长度=135

得分= 173 bit (439), 期望值= 1e-60, 方法: 成分矩阵调整。

同一性= 84/135 (62%), 阳性= 104/135 (77%), 间隙= 0/135 (0%)

| | | |
|---|---|-----|
| Query 1 | MGWSWVFLFLLSVTAGVHSQVHLQQSGPELVKPGASVVLSCASGYTFTKYDINWVRQRP | 60 |
| M SWV FL++V GV+S+V LQQSG ELVPGASVVLSC ASG+ ++WV+QRP | | |
| Sbjct 1 | MKCSWVIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVPGASVVLSCASGFIDIQDTYMHWVKQRP | 60 |
| Query 61 | EQGLEWIGWIFPGDGRTDYNEFKGKATLTDKSSSTAYMEVSRLTSEDSAVYFCARYGP | 120 |
| EQGLEWIG I P G T Y+ KF+ KAT+TDD SS+TAY++S LTSED+AVY+C+R G | | |
| Sbjct 61 | EQGLEWIGRIDPASGHTKYDPKFQVKATITTDSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCSRSGG | 120 |
| Query 121 | AMDYWGQGTSVTVAS 135 | |
| D WG GT+VTV+S | | |
| Sbjct 121 | LPDVWGAGTTVTVSS 135 | |

[0214]

表5:轻链可变区的BLAST分析

前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (按出现顺序分别公开了SEQ ID NO 48-49)

查询1 = 9E12E5

主题= 5C3D11

[0216]

长度=128

得分= 107 bit (268), 期望值= 4e-35, 方法: 成分矩阵调整。

同一性= 62/115 (54%), 阳性= 80/115 (70%), 间隙= 6/115 (5%)

| | | |
|---|---|-----|
| Query 17 | SSSDVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTIVHSNGDTYLDWFLQKPGQSPKLLIYKVS | 76 |
| S ++++=Q+P L S G++ ++++CR+S ++ +Y+ W+ QKPG SPK IY S | | |
| Sbjct 20 | SRGQIVLSQSPAISASPGEKVTMTCRASSS-----SYMYWYQQKPGSSPKPWIYATS | 73 |
| Query 77 | NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTLEIK | 131 |
| N SGVPDRFSGSGSGT ++L ISRVEAED YYC Q S P TFGGGTLEIK | | |
| Sbjct 74 | NLASGVVPDRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSGNPRTFGGGTLEIK | 128 |

[0217]

实施例3

[0218] 抗人TL1A单克隆抗体9E12E5和5C3D11在体外中和人TL1A的活性。评估TL1A抗体对IFN- γ 产生的影响,并且两种TL1A抗体均显示出对TL1A诱导的IFN- γ 产生的抑制,如图5所示。用鼠TL1A涂覆MSD板并与各种浓度的5C3D11或9E12E5一起温育,以评估抗体识别鼠TL1A的能力,如图6所示。包含人TL1A作为阳性对照。5C3D11以浓度依赖性方式识别鼠TL1A。使用TL1A转染的HEK293细胞系评估5C3D11和9E12E5抗体的结合谱,并与未转染的亲本HEK293细胞系进行比较。将表达TL1A的HEK293细胞中的抗TL1A抗体的荧光染色与未转染的亲本HEK293细胞进行比较,如图7所示。通过Biacore测量抗TL1A抗体的结合亲和力,解离常数如表6所示。

[0219]

表6:抗TL1A抗体的结合亲和力值

[0220]

| 抗体 | 分析物 | K_D (M) |
|--------|------|-----------|
| 5C3D11 | TL1A | 7.90E-11 |
| 9E12E5 | TL1A | 5.20E-10 |

[0221]

实施例4

[0222] 表现抗TL1A抗体在结肠炎动物模型中的功效。

[0223] 在通过直肠内施用二硝基苯磺酸或三硝基苯磺酸(D/TNBS)或噁唑酮诱导的急性结肠炎以及通过在饮用水中施用DSS或转移CD45RB^{hi}T细胞诱导的慢性结肠炎的啮齿动物模型中测试抗TL1A抗体。TNBS和噁唑酮诱导局部溃疡和炎症。DSS施用诱导肠道强烈的普遍性炎症,其特征在于侵蚀性病变和炎性浸润。所有这些模型的症状通常包括腹泻、潜血、体重减轻和偶尔直肠脱垂。

[0224] 在预防性模型中,抗体治疗在结肠炎诱导化合物的施用起始时开始。在治疗模型中,抗体治疗在诱导起始后几天开始。测定治疗对体重、粪便硬度和潜血的影响,以及对上皮完整性和炎性浸润程度的微观影响。基于粪便硬度以及潜血的存在性进行每日临床评分,给出疾病活动指数(DAI)评分。

[0225] 实施例5

[0226] 进行1期临床试验以评估本文提供的抗TL1A抗体在患有克罗恩病的受试者中的安全性、耐受性、药代动力学和药效学。

[0227] 单递增剂量(SAD)组:每组中的受试者(受试者基于风险变体的存在或不存在分组)接受单剂量的抗体或安慰剂。示例性的剂量是1、3、10、30、100、300、600和800mg抗体。在预定时间进行安全性监测和PK评估。基于PK数据的评估,并且如果抗体被认为是良好耐受的,则在相同组或另一组健康受试者内发生剂量增加。剂量递增持续到直至达到最大剂量,除非达到预定的最大暴露或不可忍受的副作用变得明显。

[0228] 多递增剂量(SAD)组:每组中的受试者(受试者基于风险变体的存在或不存在分组)接受多剂量的抗体或安慰剂。剂量水平和给药间隔选择为根据SAD数据预测安全的剂量水平和给药间隔。选择剂量水平和给药频率以在体循环内达到治疗药物水平,其维持稳定达数天以允许监测适当的安全性参数。收集样品并分析以确定PK曲线。

[0229] 入选标准:年龄在18至55岁之间,具有无生育潜力的健康受试者。健康被定义为通过详细的病史、包括血压和脉搏率测量在内的全面体格检查、12导联ECG和临床实验室测试没有确定临床相关异常。无生育潜力的女性受试者必须满足以下标准中的至少一种:(1)达到绝经后状态,定义为:在没有其他病理或生理原因的情况下,至少连续12个月停止正常月经;并且具有在绝经后女性的实验室参考范围内的血清促卵泡激素(FSH)水平;(2)接受过有记录的子宫切除术和/或双侧卵巢切除术;(3)具有医学证实的卵巢衰竭。所有其他女性受试者(包括输卵管结扎的女性和没有记录的子宫切除术、双侧卵巢切除术和/或卵巢衰竭的女性)将被视为具有生育潜力。体重指数(BMI)为17.5至30.5kg/m²;并且总体重>50kg(1101b)。个人签署并注明日期的知情同意文件的证据表明受试者(或法律代表人)已被告知研究的所有相关方面。

[0230] 选择两组健康受试者:具有风险变体(其存在与克罗恩病的易感性提高相关)的受试者和缺乏风险变体的受试者。

[0231] 排除标准:临幊上显著的血液学、肾、内分泌、肺、胃肠、心血管、肝、精神、神经或变应性疾病(包括药物变态反应,但排除在给药时未经治疗的无症状季节性变态反应)的证据或病史。对于以下任何血清学测试具有病史或当前阳性结果的受试者:乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎核心抗体(HBcAb)、抗丙型肝炎抗体(HCV Ab)或人免疫缺陷病毒(HIV)。对治疗药物有变态反应或过敏反应史的受试者。在第一剂研究药物之前30天内(或根据当

地要求确定,以较长者为准)或者对于生物制剂在5个半衰期内或180天内接受了研究性药物治疗。怀孕的女性;母乳喂养的女性;和有生育潜力的女性。

[0232] 主要结果测量:剂量限制性或不耐受性治疗相关不良事件(AE)的发生率[时间框架:12周]。治疗突发AE(TEAE)以及由于治疗突发不良事件的撤回的发生率、严重程度和因果关系[时间框架:12周]。异常实验室发现结果的发生率和量级[时间框架:12周]。生命体征、血压(BP)和心电图(ECG)参数的异常以及临床相关变化[时间框架:12周]。

[0233] 次要结果测量:

[0234] 单递增剂量:最大观察血浆浓度(C_{max}) [时间框架:12周]。单递增剂量:达到最大观察血浆浓度的时间(T_{max}) [时间框架:12周]。单递增剂量:从时间零点到14天的血浆浓度-时间曲线下面积(AUC_{14天}) [时间框架:12周]。单递增剂量:从时间零点外推到无限时间的血浆浓度-时间曲线下面积(AUC_{inf}) [时间框架:12周]。单递增剂量:从时间零点到最后可量化浓度的时间的血浆浓度-时间曲线下面积(AUC_{last}) [时间框架:12周]。单递增剂量:剂量标准化的最大血浆浓度(C_{max}[dn]) [时间框架:12周]。单递增剂量:从时间零点外推到无限时间的血浆浓度-时间曲线下的剂量标准化面积(AUC_{inf}[dn]) [时间框架:12周]。单递增剂量:从时间零点到最后可量化浓度的时间的血浆浓度-时间曲线下的剂量标准化面积(AUC_{last}[dn]) [时间框架:12周]。单递增剂量:血浆衰变半衰期(t_{1/2}) [时间框架:12周]。血浆衰变半衰期是血浆浓度降低一半所测量的时间。单递增剂量:平均滞留时间[时间框架:12周]。单递增剂量:稳态分布容积(V_{ss}) [时间框架:6周]。分布容积定义为其中药物的总量需要均匀分布以产生期望的药物血液浓度的理论容积。稳态分布容积(V_{ss})是稳态时的表观分布容积。单递增剂量:总清除率(CL) [时间框架:6]。CL是药物从体内去除的速率的定量量度。

[0235] 多递增剂量第一剂量:最大观察血浆浓度(C_{max}) [时间框架:12周]。多递增剂量第一剂量:达到最大观察血浆浓度的时间(T_{max}) [时间框架:12周]。多递增剂量第一剂量:从时间零点到时间 τ 的血浆浓度-时间曲线下面积,给药间隔 $\tau=2$ 周(AUC τ) [时间框架:12周]。多递增剂量第一剂量:剂量标准化的最大血浆浓度(C_{max}[dn]) [时间框架:12周]。多递增剂量第一剂量:从时间零点到时间 τ 的血浆浓度-时间曲线下的剂量标准化面积,给药间隔 $\tau=2$ 周(AUC τ [dn]) [时间框架:12周]。血浆衰变半衰期(t_{1/2}) [时间框架:12周]。血浆衰变半衰期是血浆浓度降低一半所测量的时间。多递增剂量第一剂量:平均滞留时间(MRT) [时间框架:12周]。表观分布容积(V_{z/F}) [时间框架:12周]。分布容积定义为其中药物的总量需要均匀分布以产生期望的药物血浆浓度的理论容积。口服剂量后的表观分布容积(V_{z/F})受吸收分数的影响。多递增剂量第一剂量:稳态分布容积(V_{ss}) [时间框架:12周]。分布容积定义为其中药物的总量需要均匀分布以产生期望的药物血液浓度的理论容积。稳态分布容积(V_{ss})是稳态时的表观分布容积。多递增剂量第一剂量:表观口服清除率(CL/F) [时间框架:12周]。药物清除率是通过正常生物过程代谢或消除药物的速率的量度。口服剂量后获得的清除率(表观口服清除率)受吸收剂量的分数的影响。通过群体药代动力学(PK)建模估计清除率。药物清除率是药物从血液去除的速率的定量量度。多递增剂量第一剂量:总清除率(CL) [时间框架:12周]。CL是药物从体内去除的速率的定量量度。

[0236] 多递增剂量多次剂量:最大观察血浆浓度(C_{max}) [时间框架:12周]。多递增剂量多次剂量:达到最大观察血浆浓度的时间(T_{max}) [时间框架:12周]。多递增剂量多次剂量:从

时间零点到时间 τ 的血浆浓度-时间曲线下面积,给药间隔 $\tau=2$ 周(AUC_τ) [时间框架:12周]。多递增剂量多次剂量:剂量标准化的最大血浆浓度($C_{max}[dn]$) [时间框架:12周]。多递增剂量多次剂量:从时间零点到时间 τ 的血浆浓度-时间曲线下的剂量标准化面积,给药间隔 $\tau=2$ 周($AUC_\tau[dn]$) [时间框架:12周]。多递增剂量多次剂量:血浆衰变半衰期($t_{1/2}$) [时间框架:12周]。血浆衰变半衰期是血浆浓度降低一半所测量的时间。多递增剂量多次剂量:表观分布容积(V_z/F) [时间框架:12周]。分布容积定义为其中药物的总量需要均匀分布以产生期望的药物血浆浓度的理论容积。口服剂量后的表观分布容积(V_z/F)受吸收分数的影响。多递增剂量多次剂量:稳态分布容积(V_{ss}) [时间框架:12周]。分布容积定义为其中药物的总量需要均匀分布以产生期望的药物血液浓度的理论容积。稳态分布容积(V_{ss})是稳态时的表观分布容积。多递增剂量多次剂量:表观口服清除率(CL/F) [时间框架:12周]。药物清除率是通过正常生物过程代谢或消除药物的速率的量度。口服剂量后获得的清除率(表观口服清除)受吸收剂量的分数的影响。通过群体药代动力学(PK)建模估计清除率。药物清除率是药物从血液去除的速率的定量量度。多递增剂量多次剂量:总清除率(CL) [时间框架:12周]。 CL 是药物从体内去除的速率的定量量度。多递增剂量多次剂量:最小观察血浆谷浓度(C_{min}) [时间框架:12周]。多递增剂量多次剂量:稳态下的平均浓度(C_{av}) [时间框架:12周]。多递增剂量多次剂量:观察累积比(R_{ac}) [时间框架:12周]。多递增剂量多次剂量:峰谷波动(PTF) [时间框架:12周]。多递增剂量附加参数:在相应的静脉内剂量下皮下给药的生物利用度(F)的评估 [时间框架:12周]。单递增剂量和多递增剂量两者的免疫原性:抗药物抗体(ADA)的发生 [时间框架:12周]。

[0237] 实施例6

[0238] 进行1b期开放标签临床试验以评估本文提供的抗TL1A抗体对具有与克罗恩病相关的风险变体的患者的功效。

[0239] 组:向10名风险变体(其存在与克罗恩病的易感性提高相关)阳性的患者施用抗体。向风险变体阴性的5-10名患者施用抗体。对患者进行实时监测。使用中心就绪的内窥镜检查和活组织检查,读者对治疗时间点和终点不知情。

[0240] 入选标准:选择两组受试者:具有风险变体(其存在与克罗恩病的易感性提高相关)的受试者和缺乏风险变体的受试者。

[0241] 主要结果测量:克罗恩病的简单内窥镜评分(SES-CD)、克罗恩病活动指数(CDAI)和患者报告结果(PRO)。如果风险变体阳性组显示距基线下降少50%,则进行2a期临床试验。

[0242] 入选标准:PRO准入标准:腹痛评分为2或更高并且/或者大便频率评分为4或更高。主要结果将是疼痛评分为0或1并且大便频率评分为3或更低,距离基线没有恶化。内窥镜检查准入标准:对于SES-CD,仅有回肠则评分4准入,如果涉及结肠则评分6准入。主要内窥镜检查结果是平均SES-CD的40-50% δ 。

[0243] 实施例7

[0244] 进行2a期临床试验以评估本文提供的抗TL1A抗体在患有克罗恩病的受试者中的疗效。

[0245] 组:每组(抗体和安慰剂组)40名患者用抗体或安慰剂治疗12周。在以最高剂量治疗每组20名患者之后进行期中分析,以寻求安慰剂组与治疗组之间40-50% δ 的主要结果(SES-CD、CDAI和PRO距离基线下降50%)。

[0246] 主要结果测量:克罗恩病(SESCD)的简单内窥镜评分、克罗恩病活动指数(CDAI)和患者报告结果(PRO)。

[0247] 入选标准:PRO准入标准:腹痛评分为2或更高并且/或者大便频率评分为4或更高。主要结果将是疼痛评分为0或1并且大便频率评分为3或更低,距离基线没有恶化。内窥镜检查准入标准:对于SESCD,仅有回肠则评分4准入,如果涉及结肠则评分6准入。主要内窥镜检查结果是平均SESCD的40-50% δ 。

[0248] 实施例8

[0249] 生成人源化抗TL1A抗体。简而言之,创建包含5C3D11的CDR以及来自人种系抗体的框架区的抗体的文库。使用噬菌体展示筛选文库以鉴别对人TL1A(hTL1A)抗原具有亲和力的抗体。使用表面等离振子共振(SPR)对60个克隆进行亲和力排序。基于亲和力数据和框架序列评估选择五种抗体:AS12816、AS12819、AS12823、AS12824和AS12825。选定的克隆的序列数据显示在表7(VH)和表8(VL)中。五个选定克隆的亲和力数据显示在表9中。选择五个选定克隆中的四个(AS12816、AS12819、AS12823和AS12824)进行多循环亲和力测量,相应数据显示在表10中。

[0250] 表7:人源化抗TL1A克隆:重链序列。

| 克隆 | SEQ ID NO. | 序列 |
|--------|------------|--|
| [0251] | AS12824 35 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFDICDTYMHWVKQRPGQG LEWIGRIDPASGHTKYDPKFQVRATITDTSTSTAYLELSSLRSEDT AVYYCARSGGLPDVWGQGTTVTVSS |
| | AS12823 36 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGFDICDTYMHWVRQRPGQG LEWIGRIDPASGHTKYDPKFQVRATMTDTSTVYLELSSLRSEDT AVYYCARSGGLPDVWGQGTTVTVSS |
| | AS12819 37 | QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFDICDTYMHWVRQRPGQG LEWMGRIDPASGHTKYDPKFQVRVTMTDTSTVYLELSSLRSED TAVYYCARSGGLPDVWGQGTTVTVSS |
| | AS12816 38 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFDICDTYMHWVKQRPGQG LEWIGRIDPASGHTKYDPKFQVRATITRDTSTSTAYLELSSLRSEDT AVYYCSRSGGLPDVWGQGTTVTVSS |
| | AS12825 39 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFDICDTYMHWVKQAPGQG LEWMGRIDPASGHTKYDPKFQVRATMTDTSTSTAYLELSSLRSED TAVYYCSRSGGLPDVWGQGTTVTVSS |

[0252] 表8:人源化抗TL1A克隆:轻链序列。

| 克隆 | SEQ ID NO. | 序列 |
|--------|----------------|---|
| [0253] | AS12824 | 40 EIVLTQSPGTLASPGERATMSCRASSSVSYM WYQQKPGQAPRP WIYATSNLASGV PDRFSGSGSGT DYT LTIS RVE PEDFAVYYCQQWS GNPRTFGGGTKLEIK |
| [0254] | AS12823 | 41 EIVLTQSPGTL SLPGERATMSCRASSSVSYM WYQQKPGQAPRP WIYATSNLASGIPDRFSGSGSGT DFT LTIS RVE PEDFAVYYCQQWSG NPRTFGGGTKLEIK |
| | AS12819 | 42 EIVLTQSPGTL SLPGERVTM SCRASSSVSYM WYQQKPGQAPRP WIYATSNLASGV PDRFSGSGSGT DFT LTIS RVE PEDFAVYYCQQWS GNPRTFGGGTKVEIK |
| | AS12816 | 43 EIVLTQSPGTLASPGERVTLS CRASSSVSYM WYQQKPGQAPRW IYATSNLASGV PDRFSGSGSGT DFT LTIS RLE PEDFAVYYCQQWSGN PRTFGGGTKLEIK |
| | AS12825 | 44 EIVLTQSPGTLASPGERVTM SCRASSSVSYM WYQQKPGQAPRLL IYATSNLASGV PDRFSGSGSGT DFT LTIS RVE PEDFAVYYCQQWSG NPRTFGGGTKLEIK |

[0255] 表9:人源化抗TL1A克隆:轻链突变。

| 克隆编号 | 配体 | 曲线 | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (M) | R _{max} (RU) | Chi ₂ (RU2) |
|------------------|---------------|--------|-----------|----------|----------|-----------------------|------------------------|
| 对照 | | | | | | | |
| [0256] | 移植物 -BM-SH | Fc=2-1 | 1.01E+06 | 6.39E-06 | 6.32E-12 | 445.9 | 1.48 |
| | 移植物 -BM-SH | Fc=2-1 | 1.46E+06 | 1.70E-05 | 1.16E-11 | 437.2 | 49.10 |
| | 嵌合 | Fc=4-1 | 1.56E+06 | 3.70E-05 | 2.37E-11 | 247.9 | 44.00 |
| | 嵌合 | Fc=4-1 | 9.03E+05 | 3.12E-05 | 3.46E-11 | 269.9 | 1.00 |
| 按亲和力排名的克隆 | | | | | | | |
| AS12824 | 15 | Fc=3-1 | 1.03E+06 | 1.69E-05 | 1.63E-11 | 324 | 1.09 |
| AS12835 | 28 | Fc=2-1 | 9.22E+05 | 2.73E-05 | 2.96E-11 | 119.9 | 25.70 |
| AS12823 | 14 | Fc=3-1 | 8.64E+05 | 3.66E-05 | 4.24E-11 | 155 | 0.58 |
| AS12819 | 10 | Fc=3-1 | 8.25E+05 | 3.81E-05 | 4.62E-11 | 178 | 1.05 |
| AS12831 | 23 | Fc=4-1 | 8.25E+05 | 3.83E-05 | 4.64E-11 | 167.4 | 0.33 |

[0257]

| | | | | | | | |
|---------|----|--------|----------|----------|----------|-------|------|
| AS12821 | 12 | Fc=3-1 | 1.05E+06 | 4.93E-05 | 4.72E-11 | 342 | 1.11 |
| AS12851 | 54 | Fc=4-1 | 8.78E+05 | 4.52E-05 | 5.15E-11 | 185.8 | 0.82 |
| AS12816 | 6 | Fc=2-1 | 7.63E+05 | 4.73E-05 | 6.20E-11 | 273.4 | 0.39 |
| AS12850 | 52 | Fc=2-1 | 1.37E+06 | 9.21E-05 | 6.71E-11 | 97.5 | 1.71 |
| AS12817 | 7 | Fc=2-1 | 1.00E+06 | 6.92E-05 | 6.89E-11 | 93.5 | 0.37 |
| AS12839 | 33 | Fc=3-1 | 9.93E+05 | 7.46E-05 | 7.52E-11 | 97.7 | 0.62 |
| AS12837 | 30 | Fc=2-1 | 8.80E+05 | 6.64E-05 | 7.55E-11 | 195.4 | 0.41 |
| AS12843 | 38 | Fc=3-1 | 9.22E+05 | 7.10E-05 | 7.70E-11 | 113.9 | 0.47 |
| AS12838 | 31 | Fc=2-1 | 9.04E+05 | 7.14E-05 | 7.90E-11 | 112.7 | 0.24 |
| AS12828 | 20 | Fc=4-1 | 7.31E+05 | 5.80E-05 | 7.94E-11 | 180.6 | 0.48 |
| AS12842 | 37 | Fc=3-1 | 1.10E+06 | 9.07E-05 | 8.23E-11 | 244.7 | 2.15 |
| AS12841 | 35 | Fc=3-1 | 8.32E+05 | 6.87E-05 | 8.26E-11 | 187.9 | 0.54 |
| AS12822 | 13 | Fc=3-1 | 8.95E+05 | 7.46E-05 | 8.33E-11 | 121.8 | 0.82 |
| AS12815 | 4 | Fc=2-1 | 8.25E+05 | 6.91E-05 | 8.37E-11 | 197.5 | 0.40 |
| AS12820 | 11 | Fc=3-1 | 1.14E+06 | 9.54E-05 | 8.40E-11 | 78.1 | 0.54 |
| AS12833 | 26 | Fc=2-1 | 7.22E+05 | 6.66E-05 | 9.22E-11 | 160.9 | 2.91 |
| AS12818 | 8 | Fc=2-1 | 8.61E+05 | 8.64E-05 | 1.00E-10 | 142.1 | 0.35 |
| AS12825 | 16 | Fc=3-1 | 5.18E+05 | 5.45E-05 | 1.05E-10 | 132.1 | 2.95 |
| AS12848 | 49 | Fc=2-1 | 7.95E+05 | 8.47E-05 | 1.06E-10 | 125.7 | 0.74 |
| AS12813 | 2 | Fc=2-1 | 7.03E+05 | 8.20E-05 | 1.17E-10 | 136 | 0.36 |
| AS12845 | 41 | Fc=4-1 | 7.65E+05 | 9.35E-05 | 1.22E-10 | 99 | 0.37 |
| AS12849 | 50 | Fc=2-1 | 8.97E+05 | 1.18E-04 | 1.32E-10 | 92.3 | 0.69 |
| AS12846 | 42 | Fc=4-1 | 7.80E+05 | 1.03E-04 | 1.33E-10 | 112.2 | 0.34 |
| AS12847 | 45 | Fc=4-1 | 8.30E+05 | 1.11E-04 | 1.34E-10 | 197.6 | 1.11 |
| AS12832 | 24 | Fc=4-1 | 7.31E+05 | 9.90E-05 | 1.36E-10 | 104.6 | 0.29 |
| AS12834 | 27 | Fc=2-1 | 8.38E+05 | 1.31E-04 | 1.57E-10 | 111.3 | 0.58 |
| AS12830 | 22 | Fc=4-1 | 4.48E+05 | 7.86E-05 | 1.76E-10 | 282.7 | 1.07 |
| AS12840 | 34 | Fc=3-1 | 9.04E+05 | 1.62E-04 | 1.79E-10 | 37.6 | 0.45 |
| AS12852 | 56 | Fc=4-1 | 5.06E+05 | 9.18E-05 | 1.81E-10 | 113.6 | 1.65 |

[0258]

| | | | | | | | |
|-------------|------|--------|----------|----------|----------|-------|-------|
| AS12836 | 29 | Fc=2-1 | 8.85E+05 | 1.61E-04 | 1.82E-10 | 120.2 | 1.14 |
| AS12827 | 19 | Fc=4-1 | 3.15E+05 | 5.83E-05 | 1.85E-10 | 308.3 | 1.45 |
| AS12826 | 18 | Fc=4-1 | 4.91E+05 | 9.15E-05 | 1.86E-10 | 116.9 | 2.33 |
| AS12814 | 3 | Fc=2-1 | 4.56E+05 | 9.64E-05 | 2.11E-10 | 102.2 | 2.51 |
| AS12829 | 21 | Fc=4-1 | 3.48E+05 | 1.48E-04 | 4.24E-10 | 202.9 | 0.54 |
| AS12844 | 39 | Fc=3-1 | 4.95E+05 | 2.27E-04 | 4.58E-10 | 60.7 | 0.54 |
| AS12853 | 59 | Fc=3-1 | 5.11E+05 | 3.17E-04 | 6.21E-10 | 104 | 2.26 |
| | 32 | Fc=2-1 | 1.01E+06 | 3.26E-05 | 3.24E-11 | 90.6 | 0.983 |
| | 40 | Fc=3-1 | 1.08E+06 | 4.27E-05 | 3.97E-11 | 79.2 | 1.06 |
| | 36 | Fc=3-1 | 5.46E+05 | 2.63E-05 | 4.82E-11 | 59.1 | 28.1 |
| | 44 | Fc=4-1 | 8.64E+05 | 4.19E-05 | 4.85E-11 | 76.6 | 28.1 |
| | 58 | Fc=3-1 | 1.12E+06 | 7.72E-05 | 6.91E-11 | 86.6 | 0.616 |
| | 48 | Fc=4-1 | 9.86E+05 | 7.46E-05 | 7.56E-11 | 56 | 0.474 |
| | 57 | Fc=3-1 | 1.05E+06 | 8.69E-05 | 8.29E-11 | 48.2 | 0.825 |
| | 60 | Fc=3-1 | 2.02E+06 | 1.78E-04 | 8.81E-11 | 53.9 | 1.77 |
| | 25 | Fc=2-1 | 1.03E+06 | 9.75E-05 | 9.43E-11 | 56.4 | 0.27 |
| | 47 | Fc=4-1 | 9.01E+05 | 8.60E-05 | 9.55E-11 | 74.1 | 0.332 |
| | 17 | Fc=4-1 | 6.25E+05 | 6.00E-05 | 9.60E-11 | 186.7 | 0.735 |
| | 53 | Fc=4-1 | 8.08E+05 | 8.26E-05 | 1.02E-10 | 76.3 | 0.803 |
| | 43 | Fc=4-1 | 8.35E+05 | 8.64E-05 | 1.03E-10 | 59.2 | 0.153 |
| | 5 | Fc=2-1 | 1.05E+06 | 1.17E-04 | 1.11E-10 | 28.1 | 0.203 |
| | 46 | Fc=4-1 | 8.23E+05 | 1.06E-04 | 1.29E-10 | 82.7 | 0.261 |
| | 9 | Fc=3-1 | 8.71E+05 | 1.27E-04 | 1.46E-10 | 49.5 | 1.76 |
| | 55 | Fc=4-1 | 4.82E+06 | 7.16E-04 | 1.48E-10 | 48.1 | 1.59 |
| | 51 | Fc=2-1 | 1.15E+06 | 2.79E-04 | 2.42E-10 | 59.2 | 1.86 |
| | 1 | Fc=2-1 | 5.10E+04 | 5.15E-04 | 1.01E-08 | 18.4 | 0.2 |
| 阴性对照 | | | | | | | |
| | SASA | Fc=4-1 | 7.84E+03 | 9.25E-07 | 1.18E-10 | 19.7 | 0.755 |
| | SASA | Fc=4-1 | 7.84E+03 | 9.25E-07 | 1.18E-10 | 19.7 | 0.755 |

| | | | | | | | |
|--------|------|--------|----------|----------|----------|------|-------|
| [0259] | SASA | Fc=2-1 | 1.52E+04 | 4.71E-06 | 3.10E-10 | 21.7 | 0.7 |
| | SASA | Fc=2-1 | 1.52E+04 | 4.71E-06 | 3.10E-10 | 21.7 | 0.7 |
| | SASA | Fc=3-1 | 2.70E+04 | 2.81E-05 | 1.04E-09 | 7.4 | 0.783 |

[0260] 表10: 使用SPR对hTL1A与人源化抗体之间的结合的多循环亲和力测量。

| 配体 | 分析物 | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | K_D (M) | Rmax | Chi ² | U值 |
|---------|------|--------------|-------------|-----------|-------|------------------|----|
| AS12816 | TL1A | 8.19E+05 | 2.29E-05 | 2.79E-11 | 202.6 | 1.51 | 5 |
| AS12819 | TL1A | 9.46E+05 | 1.37E-05 | 1.45E-11 | 164.9 | 1.08 | 9 |
| AS12823 | TL1A | 1.11E+06 | <1.00E-05 | 9.03E-12 | 175.4 | 1.34 | 12 |
| AS12824 | TL1A | 1.07E+06 | <1.00E-05 | 9.39E-12 | 272.9 | 1.6 | 95 |
| BM-SH | TL1A | 9.61E+05 | 5.03E-05 | 5.24E-11 | 201.3 | 2.07 | 3 |
| 嵌合 | TL1A | 1.26E+06 | 1.15E-05 | 9.09E-12 | 261.6 | 1.02 | 7 |

[0262] 实施例9

[0263] 使用表面等离振子共振 (SPR) 进行结合竞争测定以评估测试抗TL1A抗体是否与本文所述的任何抗TL1A抗体一样同TL1A上的相同区域结合。在本实施例中,参考抗体包含SEQ ID NO:6-8的重链CDR和SEQ ID NO:14-16的轻链CDR。

[0264] 使用Biacore 2000或3000仪器将参考抗体经由胺偶联直接固定在羧甲基化的葡聚糖传感器芯片表面 (CMS) 上。将在8.1mM Na₂HPO₄, 1.47mM KF₂PO₄, pH 7.2, 237mM NaCl, 2.7mM KC1, 3.4mM EDTA和0.01% 吐温20 (PBS-NET) 中稀释至10nM的重组可溶人TL1A或鼠TL1A以10RI/分钟的流速注射约1分钟以在固定化抗体上达到至少100个反应单元 (RU) 的结合水平。然后以30nM注射参考抗体5分钟,以使TL1A上的所有潜在结合位点饱和。进行参考抗体的重复注射以确认该饱和。接下来,将PBS-NET中的测试抗体或者单独的PBS-NET作为对照以30nM注射5分钟。如果测试抗体与用第一抗体饱和的TL1A结合,则表明测试抗体与参考抗体相比与TL1A上的非竞争区域结合。如果测试抗体不与饱和的TL1A结合,则表明这两种抗体与相同区域结合或竞争性地与TL1A结合。可以在测试抗体固定并且在测试抗体与TL1A结合后注射参考抗体的情况下重复该策略。可以重复每个循环。在每个循环结束时,固定的抗体表面通过30秒的3M MgCl₂脉冲或者通过0.1% TFA随后连续两次15秒的PBS-NET脉冲进行再生。所有注射均在25°C下以10Hz的收集速率进行。通过使用对照表面和缓冲液注射两者,所有传感图都是双参考的。

[0265] 实施例10

[0266] 使用SPR进行另一结合竞争测定,以评估测试抗TL1A抗体是否与本文所述的任何抗TL1A抗体与TL1A上的相同区域结合。在本实施例中,参考抗体包含SEQ ID NO:6-8的重链CDR和SEQ ID NO:14-16的轻链CDR。

[0267] 参考抗体经由在阵列上以三种或四种不同的密度偶联的胺固定在SPR芯片上。以增加的浓度系列注射TL1A蛋白以评估竞争性分箱实验期间的动力学参数和适当的注射浓度。一旦确定了用于分箱实验的最佳抗原浓度,评估再生条件 (通常是短暂的低pH注射) 以建立在分箱测定的循环之间再生的最佳条件。

[0268] 使用预混合方法进行分箱,其中中等浓度的TL1A自身被注射到阵列上,或者在饱和抗体浓度 (例如,30-50μg/mL) 下与测试抗体预复合而注射到阵列上。可以进行测定以使

得测试抗体固定化并且参考抗体与TL1A预复合。与不同于固定化抗体的区域结合的克隆提供信号增加,而竞争性克隆将会降低抗原结合信号。进行竞争测定以使得所有克隆作为配体和分析物两者进行测试。

[0269] 以上在详细描述中描述了各种实施方案。虽然这些描述直接描述了上述实施方案,但应该理解,本领域技术人员可以想到对本文示出和描述的特定实施方案的修改和/或变化。落入本说明书范围内的任何此类修改或变化也意在包括在本发明中。除非特别指出,否则本发明人的意图是给予说明书和权利要求书中的词语和短语对于适用领域的普通技术人员而言一般和习惯的含义。

[0270] 已经呈现了申请人在提交本申请时已知的各个实施方案的前述描述,并且该描述意在用于说明和描述的目的。本说明书并非旨在穷举,也并非限制于所公开的精确形式,并且根据上述教导可以进行许多修改和变化。所描述的实施方案用于解释原理及实际应用,并且使得本领域的其他技术人员能够利用各个实施方案,其可选地具有适合于预期的特定用途的各种修改。因此,意图是本公开内容不限于所公开的特定实施方案。

[0271] 虽然已经示出和描述了特定实施方案,但对于本领域技术人员而言显而易见的是,基于本文的教导,可以在不脱离本公开内容及其更宽泛的方面的情况下进行改变和修改,因此,所附权利要求在其范围内包含在本公开内容的真实精神和范围内的所有这些改变和修改。本领域技术人员将理解,通常,本文使用的术语通常旨在作为“开放性”术语(例如,术语“包括”应被解释为“包括但不限于”,术语“具有”应被解释为“至少具有”,术语“包含”应被解释为“包含但不限于”等)。

- [0001] 序列表
[0002] <110> 西达-赛奈医疗中心
[0003] <120> 中和抗TL1A单克隆抗体
[0004] <130> 52388-728.601
[0005] <140>
[0006] <141>
[0007] <150> 62/413,188
[0008] <151> 2016-10-26
[0009] <160> 49
[0010] <170> PatentIn version 3.5
[0011] <210> 1
[0012] <211> 405
[0013] <212> DNA
[0014] <213> 人工序列
[0015] <220>
[0016] <223> 人工序列的描述:合成多核苷酸
[0017] <400> 1
[0018] atgaaatgca gctgggttat cttcttcctg atggcagtgg ttacaggggt caattcagag 60
[0019] gttcagctgc agcagtctgg ggcagaactt gtgaagccag gggcctcagt caagttgtcc 120
[0020] tgcacagctt ctggcttcga cattcaagac acctatatgc actgggtgaa gcagaggcct 180
[0021] gaacagggcc tggagtggat tggaggatt gatcctgcga gtggacatac taaatatgac 240
[0022] ccgaagttcc aggtcaaggc cactataaca acggacacat cctccaacac agcctacctg 300
[0023] cagctcagca gcctgacatc tgaggacact gccgtctatt actgttctag atcggggggc 360
[0024] ctacctgatg tctggggcgc agggaccacg gtcaccgtct cctca 405
[0025] <210> 2
[0026] <211> 15
[0027] <212> DNA
[0028] <213> 人工序列
[0029] <220>
[0030] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0031] <400> 2
[0032] gacacctata tgcac 15
[0033] <210> 3
[0034] <211> 51
[0035] <212> DNA
[0036] <213> 人工序列
[0037] <220>
[0038] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸

- [0039] <400> 3
- [0040] aggattgatc ctgcgagtgg acatactaaa tatgaccgga agttccaggt c 51
- [0041] <210> 4
- [0042] <211> 21
- [0043] <212> DNA
- [0044] <213> 人工序列
- [0045] <220>
- [0046] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
- [0047] <400> 4
- [0048] tcggggggcc tacctgatgt c 21
- [0049] <210> 5
- [0050] <211> 135
- [0051] <212> PRT
- [0052] <213> 人工序列
- [0053] <220>
- [0054] <223> 人工序列的描述:合成多肽
- [0055] <400> 5
- [0056] Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
- | | | | |
|----------|---|----|----|
| [0057] 1 | 5 | 10 | 15 |
|----------|---|----|----|
- [0058] Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
- | | | |
|-----------|----|----|
| [0059] 20 | 25 | 30 |
|-----------|----|----|
- [0060] Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Ile
- | | | |
|-----------|----|----|
| [0061] 35 | 40 | 45 |
|-----------|----|----|
- [0062] Gln Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
- | | | |
|-----------|----|----|
| [0063] 50 | 55 | 60 |
|-----------|----|----|
- [0064] Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly His Thr Lys Tyr Asp
- | | | | |
|-----------|----|----|----|
| [0065] 65 | 70 | 75 | 80 |
|-----------|----|----|----|
- [0066] Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn
- | | | |
|-----------|----|----|
| [0067] 85 | 90 | 95 |
|-----------|----|----|
- [0068] Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
- | | | |
|------------|-----|-----|
| [0069] 100 | 105 | 110 |
|------------|-----|-----|
- [0070] Tyr Tyr Cys Ser Arg Ser Gly Gly Leu Pro Asp Val Trp Gly Ala Gly
- | | | |
|------------|-----|-----|
| [0071] 115 | 120 | 125 |
|------------|-----|-----|
- [0072] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
- | | |
|------------|-----|
| [0073] 130 | 135 |
|------------|-----|
- [0074] <210> 6
- [0075] <211> 5
- [0076] <212> PRT
- [0077] <213> 人工序列

[0078] <220>
[0079] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0080] <400> 6
[0081] Asp Thr Tyr Met His
[0082] 1 5
[0083] <210> 7
[0084] <211> 17
[0085] <212> PRT
[0086] <213> 人工序列
[0087] <220>
[0088] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0089] <400> 7
[0090] Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly His Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
[0091] 1 5 10 15
[0092] Val
[0093] <210> 8
[0094] <211> 7
[0095] <212> PRT
[0096] <213> 人工序列
[0097] <220>
[0098] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0099] <400> 8
[0100] Ser Gly Gly Leu Pro Asp Val
[0101] 1 5
[0102] <210> 9
[0103] <211> 384
[0104] <212> DNA
[0105] <213> 人工序列
[0106] <220>
[0107] <223> 人工序列的描述:合成多核苷酸
[0108] <400> 9
[0109] atggattttc aagtgcagat tttagcttc ctgctaatca gtgcttcagt cataatgtcc 60
[0110] agaggacaaa ttgttctctc ccagtctcct gcaatcctgt ctgcacatctcc aggggagaag 120
[0111] gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaagttaca tgtactggta ccagcagaag 180
[0112] cctggatcct ccccaaaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc tggagtcct 240
[0113] gatcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtggag 300
[0114] gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtgagtg gtaaccacg gacgttcggt 360
[0115] ggaggcacca agctggaaat caaa 384
[0116] <210> 10

[0117] <211> 30
[0118] <212> DNA
[0119] <213> 人工序列
[0120] <220>
[0121] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0122] <400> 10
[0123] agggccagct caagtgttaag ttacatgtac 30
[0124] <210> 11
[0125] <211> 21
[0126] <212> DNA
[0127] <213> 人工序列
[0128] <220>
[0129] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0130] <400> 11
[0131] gccacatcca acctggcttc t 21
[0132] <210> 12
[0133] <211> 27
[0134] <212> DNA
[0135] <213> 人工序列
[0136] <220>
[0137] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0138] <400> 12
[0139] cagcagtggaa gtggtaaccc acggacg 27
[0140] <210> 13
[0141] <211> 128
[0142] <212> PRT
[0143] <213> 人工序列
[0144] <220>
[0145] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[0146] <400> 13
[0147] Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
[0148] 1 5 10 15
[0149] Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
[0150] 20 25 30
[0151] Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
[0152] 35 40 45
[0153] Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
[0154] 50 55 60
[0155] Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

| | | | | |
|--------|---|-----|-----|-----|
| [0156] | 65 | 70 | 75 | 80 |
| [0157] | Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile | | | |
| [0158] | | 85 | 90 | 95 |
| [0159] | Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp | | | |
| [0160] | | 100 | 105 | 110 |
| [0161] | Ser Gly Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys | | | |
| [0162] | | 115 | 120 | 125 |
| [0163] | <210> 14 | | | |
| [0164] | <211> 10 | | | |
| [0165] | <212> PRT | | | |
| [0166] | <213> 人工序列 | | | |
| [0167] | <220> | | | |
| [0168] | <223> 人工序列的描述:合成肽 | | | |
| [0169] | <400> 14 | | | |
| [0170] | Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr | | | |
| [0171] | 1 | 5 | 10 | |
| [0172] | <210> 15 | | | |
| [0173] | <211> 7 | | | |
| [0174] | <212> PRT | | | |
| [0175] | <213> 人工序列 | | | |
| [0176] | <220> | | | |
| [0177] | <223> 人工序列的描述:合成肽 | | | |
| [0178] | <400> 15 | | | |
| [0179] | Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser | | | |
| [0180] | 1 | 5 | | |
| [0181] | <210> 16 | | | |
| [0182] | <211> 9 | | | |
| [0183] | <212> PRT | | | |
| [0184] | <213> 人工序列 | | | |
| [0185] | <220> | | | |
| [0186] | <223> 人工序列的描述:合成肽 | | | |
| [0187] | <400> 16 | | | |
| [0188] | Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Arg Thr | | | |
| [0189] | 1 | 5 | | |
| [0190] | <210> 17 | | | |
| [0191] | <211> 405 | | | |
| [0192] | <212> DNA | | | |
| [0193] | <213> 人工序列 | | | |
| [0194] | <220> | | | |

- [0195] <223> 人工序列的描述:合成多核苷酸
- [0196] <400> 17
- [0197] atggatgga gctgggtctt tctttcctc ctgtcagtga ctgcaggtgt ccactccag 60
- [0198] gttcacctgc agcagtctgg acctgaactg gtaaaggcctg gggcttcagt gaagttgtcc 120
- [0199] tgcaaggcct ctggctacac cttcacaaag tatgatataa actgggtgag gcagaggcct 180
- [0200] gaacaggac ttgagtgat tggatggatt tttcctggag atggtagaac tgactacaat 240
- [0201] gagaagttca aggtaaggc cacactgact acagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
- [0202] gaggtcagca ggctgacatc tgaggactct gctgtctatt tctgtgcaag atatggcccc 360
- [0203] gctatggact actgggtca aggaacctca gtcaccgtcg cctca 405
- [0204] <210> 18
- [0205] <211> 15
- [0206] <212> DNA
- [0207] <213> 人工序列
- [0208] <220>
- [0209] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
- [0210] <400> 18
- [0211] aagtatgata taaac 15
- [0212] <210> 19
- [0213] <211> 51
- [0214] <212> DNA
- [0215] <213> 人工序列
- [0216] <220>
- [0217] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
- [0218] <400> 19
- [0219] tggattttc ctggagatgg tagaactgac tacaatgaga agttcaaggg t 51
- [0220] <210> 20
- [0221] <211> 20
- [0222] <212> DNA
- [0223] <213> 人工序列
- [0224] <220>
- [0225] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
- [0226] <400> 20
- [0227] tatggcccg ctatggacta 20
- [0228] <210> 21
- [0229] <211> 135
- [0230] <212> PRT
- [0231] <213> 人工序列
- [0232] <220>
- [0233] <223> 人工序列的描述:合成多肽

- [0234] <400> 21
- [0235] Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
- [0236] 1 5 10 15
- [0237] Val His Ser Gln Val His Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
- [0238] 20 25 30
- [0239] Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
- [0240] 35 40 45
- [0241] Thr Lys Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
- [0242] 50 55 60
- [0243] Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Arg Thr Asp Tyr Asn
- [0244] 65 70 75 80
- [0245] Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser
- [0246] 85 90 95
- [0247] Thr Ala Tyr Met Glu Val Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
- [0248] 100 105 110
- [0249] Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
- [0250] 115 120 125
- [0251] Thr Ser Val Thr Val Ala Ser
- [0252] 130 135
- [0253] <210> 22
- [0254] <211> 5
- [0255] <212> PRT
- [0256] <213> 人工序列
- [0257] <220>
- [0258] <223> 人工序列的描述:合成肽
- [0259] <400> 22
- [0260] Lys Tyr Asp Ile Asn
- [0261] 1 5
- [0262] <210> 23
- [0263] <211> 17
- [0264] <212> PRT
- [0265] <213> 人工序列
- [0266] <220>
- [0267] <223> 人工序列的描述:合成肽
- [0268] <400> 23
- [0269] Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
- [0270] 1 5 10 15
- [0271] Gly
- [0272] <210> 24

- [0273] <211> 7
[0274] <212> PRT
[0275] <213> 人工序列
[0276] <220>
[0277] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0278] <400> 24
[0279] Tyr Gly Pro Ala Met Asp Tyr
[0280] 1 5
[0281] <210> 25
[0282] <211> 393
[0283] <212> DNA
[0284] <213> 人工序列
[0285] <220>
[0286] <223> 人工序列的描述:合成多核苷酸
[0287] <400> 25
[0288] atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttctctgttc cagcagtgtat 60
[0289] gttttgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
[0290] tcttgcagat ctagtcagac cattgtacat agtaatggag acacctattt agactggttc 180
[0291] ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
[0292] ggggtcccag acaggttcag tggcagtggta tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
[0293] agagtggagg ctgaggatct gggagttat tactgcttcc aaggttcaca tgttccgtac 360
[0294] acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 393
[0295] <210> 26
[0296] <211> 48
[0297] <212> DNA
[0298] <213> 人工序列
[0299] <220>
[0300] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0301] <400> 26
[0302] agatctagtc agaccattgt acatagtaat ggagacacct atttagac 48
[0303] <210> 27
[0304] <211> 21
[0305] <212> DNA
[0306] <213> 人工序列
[0307] <220>
[0308] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0309] <400> 27
[0310] aaagttcca accgatttcc t 21
[0311] <210> 28

- [0312] <211> 27
- [0313] <212> DNA
- [0314] <213> 人工序列
- [0315] <220>
- [0316] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
- [0317] <400> 28
- [0318] ttcaagggtt cacatgttcc gtacacg 27
- [0319] <210> 29
- [0320] <211> 131
- [0321] <212> PRT
- [0322] <213> 人工序列
- [0323] <220>
- [0324] <223> 人工序列的描述:合成多肽
- [0325] <400> 29
- [0326] Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
- | | | | |
|----------|---|----|----|
| [0327] 1 | 5 | 10 | 15 |
|----------|---|----|----|
- [0328] Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
- | | | |
|-----------|----|----|
| [0329] 20 | 25 | 30 |
|-----------|----|----|
- [0330] Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile
- | | | |
|-----------|----|----|
| [0331] 35 | 40 | 45 |
|-----------|----|----|
- [0332] Val His Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Asp Trp Phe Leu Gln Lys Pro
- | | | |
|-----------|----|----|
| [0333] 50 | 55 | 60 |
|-----------|----|----|
- [0334] Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
- | | | | |
|-----------|----|----|----|
| [0335] 65 | 70 | 75 | 80 |
|-----------|----|----|----|
- [0336] Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
- | | | |
|-----------|----|----|
| [0337] 85 | 90 | 95 |
|-----------|----|----|
- [0338] Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
- | | | |
|------------|-----|-----|
| [0339] 100 | 105 | 110 |
|------------|-----|-----|
- [0340] Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu
- | | | |
|------------|-----|-----|
| [0341] 115 | 120 | 125 |
|------------|-----|-----|
- [0342] Glu Ile Lys
- | |
|------------|
| [0343] 130 |
|------------|
- [0344] <210> 30
- [0345] <211> 16
- [0346] <212> PRT
- [0347] <213> 人工序列
- [0348] <220>
- [0349] <223> 人工序列的描述:合成肽
- [0350] <400> 30

| | | | | |
|--------|---|----|----|----|
| [0351] | Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Asp | | | |
| [0352] | 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0353] | <210> 31 | | | |
| [0354] | <211> 7 | | | |
| [0355] | <212> PRT | | | |
| [0356] | <213> 人工序列 | | | |
| [0357] | <220> | | | |
| [0358] | <223> 人工序列的描述:合成肽 | | | |
| [0359] | <400> 31 | | | |
| [0360] | Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser | | | |
| [0361] | 1 | 5 | | |
| [0362] | <210> 32 | | | |
| [0363] | <211> 9 | | | |
| [0364] | <212> PRT | | | |
| [0365] | <213> 人工序列 | | | |
| [0366] | <220> | | | |
| [0367] | <223> 人工序列的描述:合成肽 | | | |
| [0368] | <400> 32 | | | |
| [0369] | Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr | | | |
| [0370] | 1 | 5 | | |
| [0371] | <210> 33 | | | |
| [0372] | <211> 194 | | | |
| [0373] | <212> PRT | | | |
| [0374] | <213> 人工序列 | | | |
| [0375] | <220> | | | |
| [0376] | <223> 人工序列的描述:合成多肽 | | | |
| [0377] | <400> 33 | | | |
| [0378] | Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu Ala Ser Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys | | | |
| [0379] | 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0380] | Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg | | | |
| [0381] | 20 | 25 | 30 | |
| [0382] | Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr | | | |
| [0383] | 35 | 40 | 45 | |
| [0384] | Pro Thr Gln His Phe Lys Asn Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His | | | |
| [0385] | 50 | 55 | 60 | |
| [0386] | Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys | | | |
| [0387] | 65 | 70 | 75 | 80 |
| [0388] | Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val | | | |
| [0389] | 85 | 90 | 95 | |

| | | | | |
|--------|---|-----|-----|-----|
| [0390] | Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly | | | |
| [0391] | | 100 | 105 | 110 |
| [0392] | Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr | | | |
| [0393] | | 115 | 120 | 125 |
| [0394] | Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val | | | |
| [0395] | | 130 | 135 | 140 |
| [0396] | Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met | | | |
| [0397] | | 145 | 150 | 155 |
| [0398] | Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile | | | |
| [0399] | | 165 | 170 | 175 |
| [0400] | Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe | | | |
| [0401] | | 180 | 185 | 190 |
| [0402] | Leu Leu | | | |
| [0403] | <210> 34 | | | |
| [0404] | <211> 251 | | | |
| [0405] | <212> PRT | | | |
| [0406] | <213> 人工序列 | | | |
| [0407] | <220> | | | |
| [0408] | <223> 人工序列的描述:合成多肽 | | | |
| [0409] | <400> 34 | | | |
| [0410] | Met Ala Glu Asp Leu Gly Leu Ser Phe Gly Glu Thr Ala Ser Val Glu | | | |
| [0411] | | 1 | 5 | 10 |
| [0412] | | 15 | | |
| [0413] | Met Leu Pro Glu His Gly Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser | | | |
| [0414] | | 20 | 25 | 30 |
| [0415] | | | | |
| [0416] | Ala Arg Trp Ala Leu Thr Cys Cys Leu Val Leu Pro Phe Leu Ala | | | |
| [0417] | | 35 | 40 | 45 |
| [0418] | Gly Leu Thr Thr Tyr Leu Leu Val Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu | | | |
| [0419] | | 50 | 55 | 60 |
| [0420] | | | | |
| [0421] | Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser | | | |
| [0422] | | 65 | 70 | 75 |
| [0423] | | | 80 | |
| [0424] | His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg | | | |
| [0425] | | 85 | 90 | 95 |
| [0426] | Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn | | | |
| [0427] | | 100 | 105 | 110 |
| [0428] | Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr | | | |
| [0429] | | 115 | 120 | 125 |
| [0430] | | | | |
| [0431] | Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser | | | |
| [0432] | | 130 | 135 | 140 |
| [0433] | | | | |
| [0434] | Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser | | | |

| | | | | |
|--------|---|-----|-----|-----|
| [0429] | 145 | 150 | 155 | 160 |
| [0430] | Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser | | | |
| [0431] | | 165 | 170 | 175 |
| [0432] | Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr | | | |
| [0433] | | 180 | 185 | 190 |
| [0434] | Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp | | | |
| [0435] | | 195 | 200 | 205 |
| [0436] | Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp | | | |
| [0437] | | 210 | 215 | 220 |
| [0438] | Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys | | | |
| [0439] | | 225 | 230 | 235 |
| [0440] | Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu | | | |
| [0441] | | 245 | 250 | |
| [0442] | <210> 35 | | | |
| [0443] | <211> 116 | | | |
| [0444] | <212> PRT | | | |
| [0445] | <213> 人工序列 | | | |
| [0446] | <220> | | | |
| [0447] | <223> 人工序列的描述:合成多肽 | | | |
| [0448] | <400> 35 | | | |
| [0449] | Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala | | | |
| [0450] | 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0451] | Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Ile Cys Asp Thr | | | |
| [0452] | | 20 | 25 | 30 |
| [0453] | Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile | | | |
| [0454] | | 35 | 40 | 45 |
| [0455] | Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly His Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe | | | |
| [0456] | | 50 | 55 | 60 |
| [0457] | Gln Val Arg Ala Thr Ile Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr | | | |
| [0458] | | 65 | 70 | 75 |
| [0459] | 75 | 80 | | |
| [0460] | Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | | | |
| [0461] | | 85 | 90 | 95 |
| [0462] | Ala Arg Ser Gly Gly Leu Pro Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val | | | |
| [0463] | | 100 | 105 | 110 |
| [0464] | Thr Val Ser Ser | | | |
| [0465] | | 115 | | |
| [0466] | <210> 36 | | | |
| [0467] | <211> 116 | | | |
| | <212> PRT | | | |

- [0468] <213> 人工序列
- [0469] <220>
- [0470] <223> 人工序列的描述:合成多肽
- [0471] <400> 36
- [0472] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
- [0473] 1 5 10 15
- [0474] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Ile Cys Asp Thr
- [0475] 20 25 30
- [0476] Tyr Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
- [0477] 35 40 45
- [0478] Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly His Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
- [0479] 50 55 60
- [0480] Gln Val Arg Ala Thr Met Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
- [0481] 65 70 75 80
- [0482] Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [0483] 85 90 95
- [0484] Ala Arg Ser Gly Gly Leu Pro Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
- [0485] 100 105 110
- [0486] Thr Val Ser Ser
- [0487] 115
- [0488] <210> 37
- [0489] <211> 116
- [0490] <212> PRT
- [0491] <213> 人工序列
- [0492] <220>
- [0493] <223> 人工序列的描述:合成多肽
- [0494] <400> 37
- [0495] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
- [0496] 1 5 10 15
- [0497] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Ile Cys Asp Thr
- [0498] 20 25 30
- [0499] Tyr Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
- [0500] 35 40 45
- [0501] Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly His Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
- [0502] 50 55 60
- [0503] Gln Val Arg Val Thr Met Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
- [0504] 65 70 75 80
- [0505] Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [0506] 85 90 95

| | | | | |
|--------|---|-----|-----|-----|
| [0507] | Ala Arg Ser Gly Gly Leu Pro Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val | | | |
| [0508] | | 100 | 105 | 110 |
| [0509] | Thr Val Ser Ser | | | |
| [0510] | | 115 | | |
| [0511] | <210> 38 | | | |
| [0512] | <211> 116 | | | |
| [0513] | <212> PRT | | | |
| [0514] | <213> 人工序列 | | | |
| [0515] | <220> | | | |
| [0516] | <223> 人工序列的描述:合成多肽 | | | |
| [0517] | <400> 38 | | | |
| [0518] | Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala | | | |
| [0519] | 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0520] | Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Ile Cys Asp Thr | | | |
| [0521] | | 20 | 25 | 30 |
| [0522] | Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile | | | |
| [0523] | | 35 | 40 | 45 |
| [0524] | Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly His Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe | | | |
| [0525] | | 50 | 55 | 60 |
| [0526] | Gln Val Arg Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr | | | |
| [0527] | | 65 | 70 | 75 |
| [0528] | Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | | | |
| [0529] | | 85 | 90 | 95 |
| [0530] | Ser Arg Ser Gly Gly Leu Pro Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val | | | |
| [0531] | | 100 | 105 | 110 |
| [0532] | Thr Val Ser Ser | | | |
| [0533] | | 115 | | |
| [0534] | <210> 39 | | | |
| [0535] | <211> 116 | | | |
| [0536] | <212> PRT | | | |
| [0537] | <213> 人工序列 | | | |
| [0538] | <220> | | | |
| [0539] | <223> 人工序列的描述:合成多肽 | | | |
| [0540] | <400> 39 | | | |
| [0541] | Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala | | | |
| [0542] | 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0543] | Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Ile Cys Asp Thr | | | |
| [0544] | | 20 | 25 | 30 |
| [0545] | Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met | | | |

| | | | |
|--------|---|-----|-----|
| [0546] | 35 | 40 | 45 |
| [0547] | Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly His Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe | | |
| [0548] | 50 | 55 | 60 |
| [0549] | Gln Val Arg Ala Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr | | |
| [0550] | 65 | 70 | 75 |
| [0551] | Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | | 80 |
| [0552] | | 85 | 90 |
| [0553] | Ser Arg Ser Gly Gly Leu Pro Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val | | 95 |
| [0554] | | 100 | 105 |
| [0555] | Thr Val Ser Ser | | 110 |
| [0556] | | 115 | |
| [0557] | <210> 40 | | |
| [0558] | <211> 106 | | |
| [0559] | <212> PRT | | |
| [0560] | <213> 人工序列 | | |
| [0561] | <220> | | |
| [0562] | <223> 人工序列的描述:合成多肽 | | |
| [0563] | <400> 40 | | |
| [0564] | Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Ala Ser Pro Gly | | |
| [0565] | 1 | 5 | 10 |
| [0566] | 15 | | |
| [0567] | Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met | | |
| [0568] | 20 | 25 | 30 |
| [0569] | Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr | | |
| [0570] | 35 | 40 | 45 |
| [0571] | | | |
| [0572] | Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser | | |
| [0573] | 50 | 55 | 60 |
| [0574] | Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu | | |
| [0575] | 65 | 70 | 75 |
| [0576] | 80 | 85 | 90 |
| [0577] | Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Arg Thr | | |
| [0578] | 95 | | |
| [0579] | Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys | | |
| [0580] | <210> 41 | | |
| [0581] | <211> 106 | | |
| [0582] | <212> PRT | | |
| [0583] | <213> 人工序列 | | |
| [0584] | <220> | | |
| [0585] | <223> 人工序列的描述:合成多肽 | | |
| [0586] | <400> 41 | | |

| | | | | |
|--------|---|-----|----|----|
| [0585] | Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly | | | |
| [0586] | 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0587] | Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met | | | |
| [0588] | 20 | 25 | 30 | |
| [0589] | Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr | | | |
| [0590] | 35 | 40 | 45 | |
| [0591] | Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser | | | |
| [0592] | 50 | 55 | 60 | |
| [0593] | Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu | | | |
| [0594] | 65 | 70 | 75 | 80 |
| [0595] | Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Arg Thr | | | |
| [0596] | 85 | 90 | 95 | |
| [0597] | Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys | | | |
| [0598] | 100 | 105 | | |
| [0599] | <210> 42 | | | |
| [0600] | <211> 106 | | | |
| [0601] | <212> PRT | | | |
| [0602] | <213> 人工序列 | | | |
| [0603] | <220> | | | |
| [0604] | <223> 人工序列的描述:合成多肽 | | | |
| [0605] | <400> 42 | | | |
| [0606] | Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly | | | |
| [0607] | 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0608] | Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met | | | |
| [0609] | 20 | 25 | 30 | |
| [0610] | Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr | | | |
| [0611] | 35 | 40 | 45 | |
| [0612] | Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser | | | |
| [0613] | 50 | 55 | 60 | |
| [0614] | Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu | | | |
| [0615] | 65 | 70 | 75 | 80 |
| [0616] | Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Arg Thr | | | |
| [0617] | 85 | 90 | 95 | |
| [0618] | Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys | | | |
| [0619] | 100 | 105 | | |
| [0620] | <210> 43 | | | |
| [0621] | <211> 106 | | | |
| [0622] | <212> PRT | | | |
| [0623] | <213> 人工序列 | | | |

- [0624] <220>
- [0625] <223> 人工序列的描述:合成多肽
- [0626] <400> 43
- [0627] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Ala Ser Pro Gly
- [0628] 1 5 10 15
- [0629] Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
- [0630] 20 25 30
- [0631] Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr
- [0632] 35 40 45
- [0633] Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
- [0634] 50 55 60
- [0635] Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
- [0636] 65 70 75 80
- [0637] Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Arg Thr
- [0638] 85 90 95
- [0639] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
- [0640] 100 105
- [0641] <210> 44
- [0642] <211> 106
- [0643] <212> PRT
- [0644] <213> 人工序列
- [0645] <220>
- [0646] <223> 人工序列的描述:合成多肽
- [0647] <400> 44
- [0648] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Ala Ser Pro Gly
- [0649] 1 5 10 15
- [0650] Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
- [0651] 20 25 30
- [0652] Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
- [0653] 35 40 45
- [0654] Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
- [0655] 50 55 60
- [0656] Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu
- [0657] 65 70 75 80
- [0658] Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Arg Thr
- [0659] 85 90 95
- [0660] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
- [0661] 100 105
- [0662] <210> 45

- [0663] <211> 6
- [0664] <212> PRT
- [0665] <213> 人工序列
- [0666] <220>
- [0667] <223> 人工序列的描述:合成6xHis标签
- [0668] <400> 45
- [0669] His His His His His His
- [0670] 1 5
- [0671] <210> 46
- [0672] <211> 135
- [0673] <212> PRT
- [0674] <213> 人工序列
- [0675] <220>
- [0676] <223> 人工序列的描述:合成多肽
- [0677] <400> 46
- [0678] Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Ser Val Thr Ala Gly
- [0679] 1 5 10 15
- [0680] Val His Ser Gln Val His Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
- [0681] 20 25 30
- [0682] Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
- [0683] 35 40 45
- [0684] Thr Lys Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
- [0685] 50 55 60
- [0686] Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Arg Thr Asp Tyr Asn
- [0687] 65 70 75 80
- [0688] Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser
- [0689] 85 90 95
- [0690] Thr Ala Tyr Met Glu Val Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
- [0691] 100 105 110
- [0692] Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
- [0693] 115 120 125
- [0694] Thr Ser Val Thr Val Ala Ser
- [0695] 130 135
- [0696] <210> 47
- [0697] <211> 135
- [0698] <212> PRT
- [0699] <213> 人工序列
- [0700] <220>
- [0701] <223> 人工序列的描述:合成多肽

| | | | | |
|--------|---|-----|-----|----|
| [0702] | <400> 47 | | | |
| [0703] | Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly | | | |
| [0704] | 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0705] | Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys | | | |
| [0706] | 20 | 25 | 30 | |
| [0707] | Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Ile | | | |
| [0708] | 35 | 40 | 45 | |
| [0709] | Gln Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu | | | |
| [0710] | 50 | 55 | 60 | |
| [0711] | Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly His Thr Lys Tyr Asp | | | |
| [0712] | 65 | 70 | 75 | 80 |
| [0713] | Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn | | | |
| [0714] | 85 | 90 | 95 | |
| [0715] | Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val | | | |
| [0716] | 100 | 105 | 110 | |
| [0717] | Tyr Tyr Cys Ser Arg Ser Gly Gly Leu Pro Asp Val Trp Gly Ala Gly | | | |
| [0718] | 115 | 120 | 125 | |
| [0719] | Thr Thr Val Thr Val Ser Ser | | | |
| [0720] | 130 | 135 | | |
| [0721] | <210> 48 | | | |
| [0722] | <211> 115 | | | |
| [0723] | <212> PRT | | | |
| [0724] | <213> 人工序列 | | | |
| [0725] | <220> | | | |
| [0726] | <223> 人工序列的描述:合成多肽 | | | |
| [0727] | <400> 48 | | | |
| [0728] | Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val | | | |
| [0729] | 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0730] | Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile | | | |
| [0731] | 20 | 25 | 30 | |
| [0732] | Val His Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Asp Trp Phe Leu Gln Lys Pro | | | |
| [0733] | 35 | 40 | 45 | |
| [0734] | Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser | | | |
| [0735] | 50 | 55 | 60 | |
| [0736] | Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr | | | |
| [0737] | 65 | 70 | 75 | 80 |
| [0738] | Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys | | | |
| [0739] | 85 | 90 | 95 | |
| [0740] | Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu | | | |

| | | | |
|--------|---|-----|-----|
| [0741] | 100 | 105 | 110 |
| [0742] | Glu Ile Lys | | |
| [0743] | 115 | | |
| [0744] | <210> 49 | | |
| [0745] | <211> 109 | | |
| [0746] | <212> PRT | | |
| [0747] | <213> 人工序列 | | |
| [0748] | <220> | | |
| [0749] | <223> 人工序列的描述:合成多肽 | | |
| [0750] | <400> 49 | | |
| [0751] | Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala | | |
| [0752] | 1 5 10 15 | | |
| [0753] | Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val | | |
| [0754] | 20 25 30 | | |
| [0755] | Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro | | |
| [0756] | 35 40 45 | | |
| [0757] | Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe | | |
| [0758] | 50 55 60 | | |
| [0759] | Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val | | |
| [0760] | 65 70 75 80 | | |
| [0761] | Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn | | |
| [0762] | 85 90 95 | | |
| [0763] | Pro Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys | | |
| [0764] | 100 105 | | |



图1

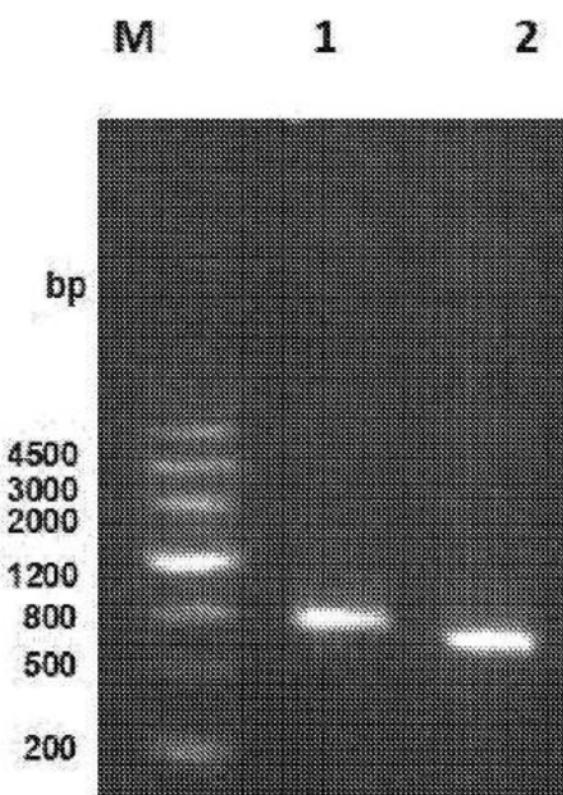


图2



图3

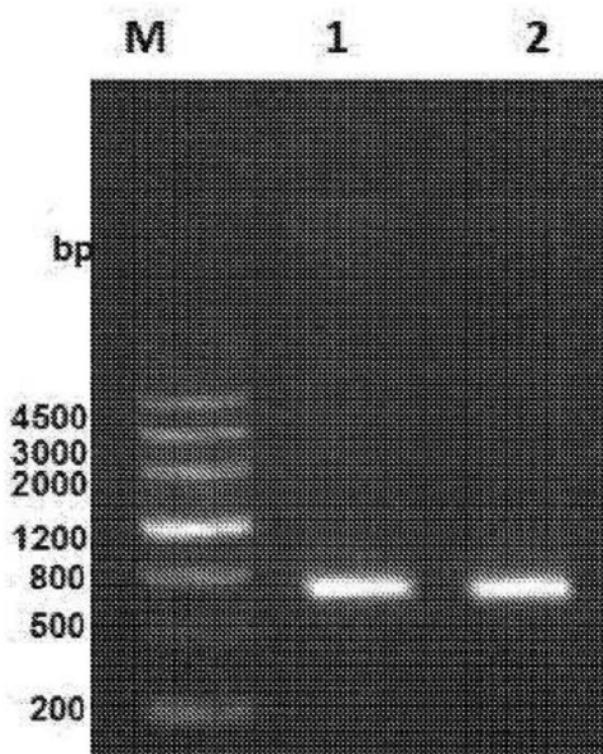


图4

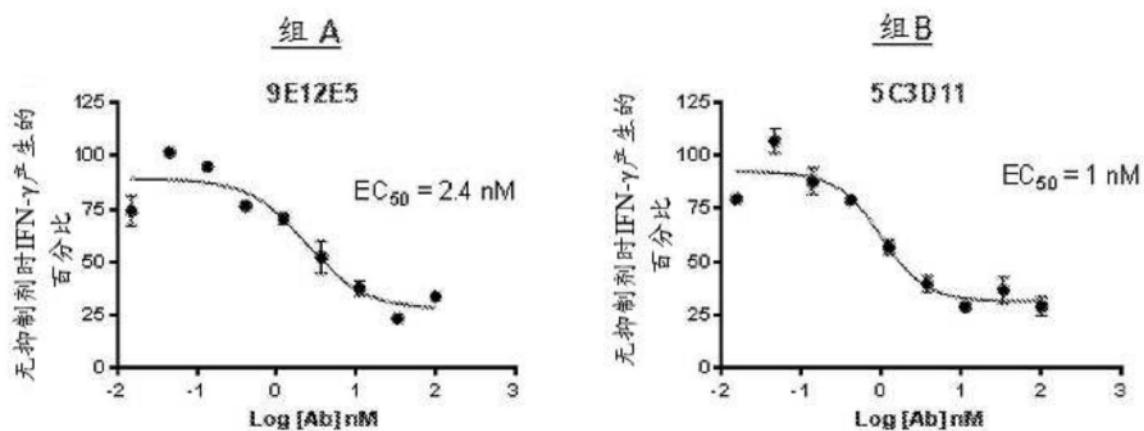


图5

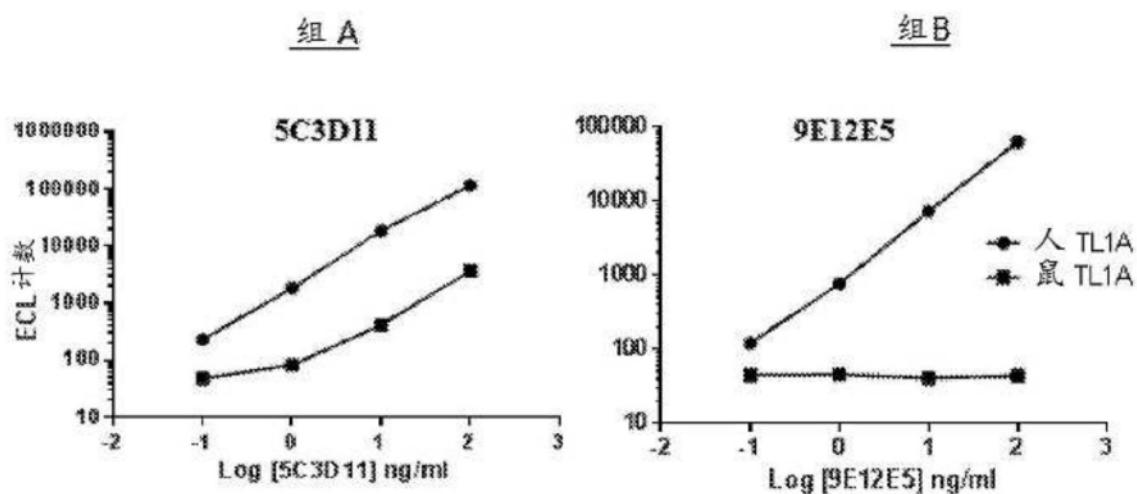


图6

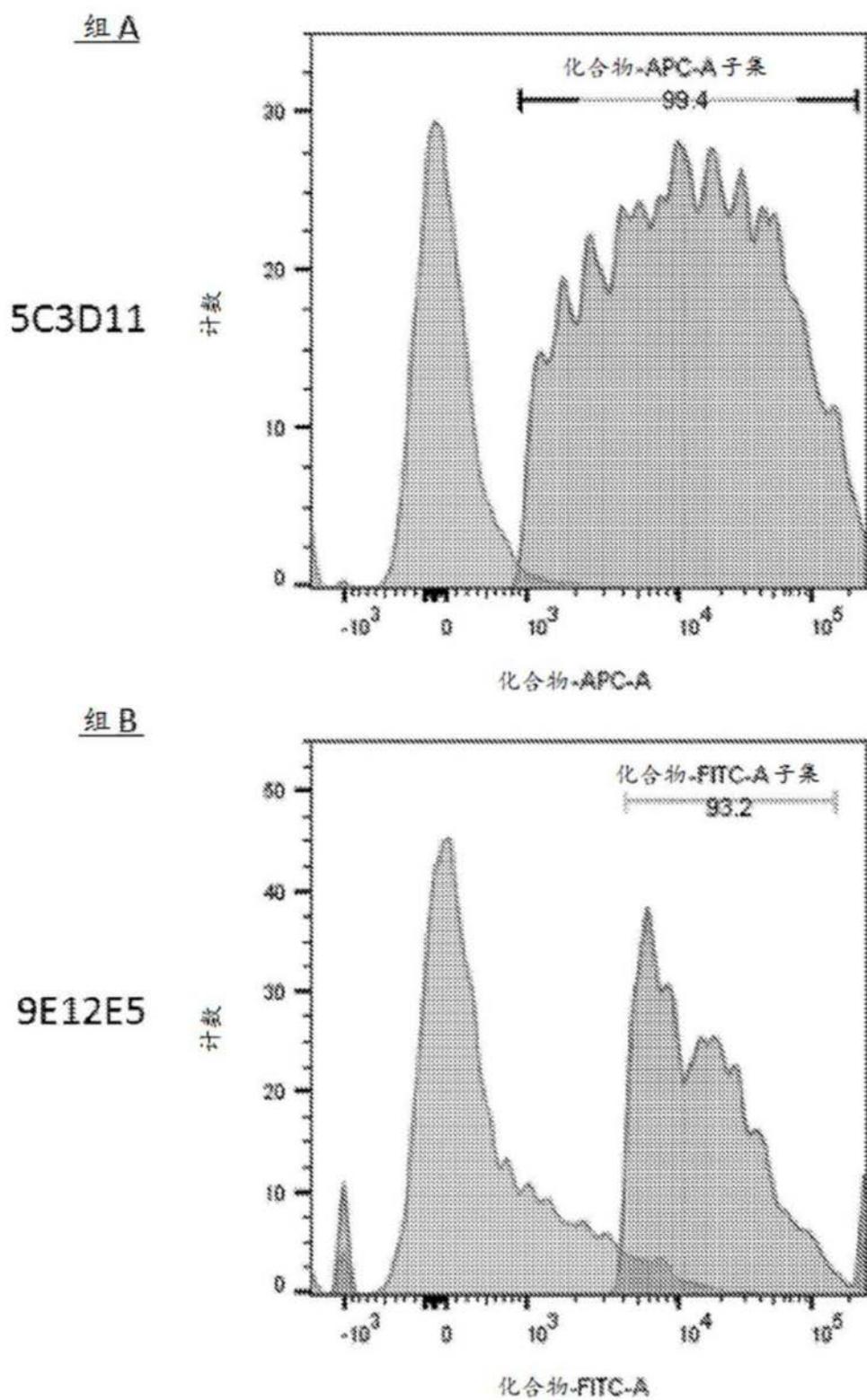


图7