



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119735681 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 01

(21) 申请号 202411927343.2

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(22) 申请日 2019.04.24

专利代理师 韦昌金 武晶晶

(30) 优先权数据

62/662,605 2018.04.25 US

62/756,494 2018.11.06 US

(62) 分案原申请数据

201980043250.4 2019.04.24

(71) 申请人 普罗米修斯生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 西达-赛奈医疗中心

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(72) 发明人 杰弗里·D·沃特金斯

辛迪·T·迪克森

J·蒙迪·沃特金斯

帕特丽夏·麦克内利

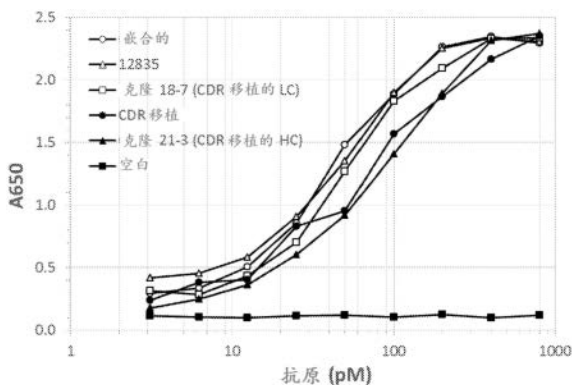
权利要求书2页 说明书73页
序列表(电子公布) 附图28页

(54) 发明名称

优化的抗TL1A抗体

(57) 摘要

本文描述了用于治疗炎性肠病 (IBD) 如克罗恩病 (CD) 和溃疡性结肠炎 (UC) 的人源化抗TL1A抗体和药物组合物。



1. 一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:
重链可变区,其包含:
 - (a) 包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列的HCDR1;
 - (b) 包含由SEQ ID NO:554至564或574至577中任一个所示的氨基酸序列的HCDR2;和
 - (c) 包含由SEQ ID NO:565至568或578至581中任一个所示的氨基酸序列的HCDR3;以及轻链可变区,其包含:
 - (d) 包含由SEQ ID NO:569或570中任一个所示的氨基酸序列的LCDR1;
 - (e) 包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列的LCDR2;和
 - (f) 包含由SEQ ID NO:571至573或582至585中任一个所示的氨基酸序列的LCDR3。
2. 一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:重链可变区,其包含:
 - (a) 选自SEQ ID NO:491、493、495、497、499、501、503、505、507、509、511、513、515、517、519、521、523、525、527、529、531、533、535、537、539或541中任一个的HCDR1、HCDR2和HCDR3;以及轻链可变区,其包含
 - (b) 选自SEQ ID NO:490、492、494、496、498、500、502、504、506、508、510、512、514、516、518、520、522、524、526、528、530、532、534、536、538或540中任一个的LCDR1、LCDR2和LCDR3;其中所述CDR由Kabat、Chothia或IMGT方法或其组合来定义。
3. 一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:
 - (a) 重链可变区,其包含与SEQ ID NO:491、493、495、497、499、501、503、505、507、509、511、513、515、517、519、521、523、525、527、529、531、533、535、537、539或541中的任一个至少约90%相同的氨基酸序列;以及
 - (b) 轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:490、492、494、496、498、500、502、504、506、508、510、512、514、516、518、520、522、524、526、528、530、532、534、536、538或540中的任一个至少约90%相同的氨基酸序列。
4. 一种药物组合物,其包含权利要求1至3中任一项的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。
5. 一种治疗个体的炎性肠病、克罗恩病或结肠炎的方法,其包括向所述个体施用有效量的权利要求1至3中任一项的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段或权利要求4的药物组合物,其中所述个体被诊断为患有或怀疑患有炎性肠病、克罗恩病或结肠炎。
6. 一种防止或减少个体中由T淋巴细胞分泌干扰素 γ 的方法,其包括向所述个体施用有效量的权利要求1至3中任一项的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段或权利要求4的药物组合物。
7. 一种核酸,其编码权利要求1至3中任一项的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段。
8. 一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治疗的方法,其包括在足以将权利要求1至3中任一项的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段分泌到培养基中的条件下,在所述培养基中孵育包含权利要求7的核酸的细胞。
9. 一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治疗的方法,其包括将权利要求1至3中任一项的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段与药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混

合。

10. 权利要求1至3中任一项的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段或权利要求4的药物组合物在制备用于在具有与疾病或病况相关的风险变体的个体中治疗该疾病或病况的药物中的用途,其中该疾病或病况包括炎性肠病(IBD)、克罗恩病(CD)或结肠炎中的至少一种。

优化的抗TL1A抗体

[0001] 本申请是申请日为2019年4月24日、申请号为201980043250.4、发明名称为“优化的抗TL1A抗体”的中国专利申请(其对应PCT申请的申请日为2019年4月24日、申请号为PCT/US2019/028987)的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2018年4月25日提交的第62/662,605号美国临时申请和2018年11月6日提交的第62/756,494号美国临时申请的权益,所述临时申请通过引用并入本文。

背景技术

[0004] 炎性肠病(IBD)是指引起胃肠道炎性状况的肠道病症的总称。IBD的主要类型是溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD)。这些疾病非常普遍,全球约有186万人被诊断为UC,全球约有130万人被诊断为CD。

[0005] 这些形式中的每一种都具有CD和UC患者亚群中存在的IBD严重形式所特有的各种亚临床表型。一种这样的病况是阻塞性克罗恩病,其可能是由可导致肠壁瘢痕组织形成(纤维狭窄)或肿胀的长期炎症引起的。这两种结局均可导致变窄或阻塞,并被称为纤维化狭窄或炎性狭窄。严重狭窄可导致肠阻塞,从而导致腹痛、腹胀、恶心和无法通过大便。作为另一个实例,以肠梗阻或内部穿透性瘘管或二者为特征的穿透性疾病表型通常导致与IBD相关的并发症,包括例如腹内脓毒症。

[0006] 遗憾的是,针对IBD患者的疗法数量有限,并且临床试验中的次佳结果阻碍了新治疗剂的开发。现有的抗炎疗法,如类固醇和肿瘤坏死因子(TNF)抑制剂,通常用作治疗IBD的一线治疗。遗憾的是,相当多的患者对现有抗炎疗法,特别是TNF- α 抑制剂缺乏反应或丧失反应。当用无效的抗炎疗法治疗患者时,病情恶化。对于对一线疗法无反应的患者,狭窄成形术(structureplasty)(肠的整形)或切除术(肠的切除)形式的手术是唯一的治疗选择。IBD的手术治疗是侵入性的,估计约三分之一的接受手术的患者会产生术后风险,如吻合口漏、感染和出血。

[0007] IBD的发病机理被认为涉及不受控制的免疫应答,后者可能是由遗传易感宿主中的某些环境因素触发的。疾病发病机理和临床过程的异质性,加上对治疗的可变反应及其相关的副作用,提示针对这些疾病的靶向治疗方法是最佳的治疗策略。然而,几乎没有针对IBD患者的靶向疗法,尤其是对于那些对现有IBD疗法(例如,抗TNF α 抑制剂)可能无反应的患者。因此,需要用来治疗IBD的、特异性靶向IBD发病机理中涉及的酶的新型治疗剂。

发明内容

[0008] 本公开提供了可用于治疗IBD的抗体,该IBD包括以本文公开的亚临床表型为特征的中度至重度形式的IBD(例如,难治性疾病、狭窄性疾病、穿透性疾病)。与其他肿瘤坏死因子配体1A(TL1A)结合抗体相比,本文描述的抗体具有优越的治疗方面。首先,本文描述的抗体与人种系框架具有高序列同源性,同时仍表现出高结合亲和力,在细菌和哺乳动物培养物中以高水平表达,并且具有较少的序列负债(liabilities),如脱酰胺位点,后者导致降

解增加和治疗效果降低。

[0009] TL1A和编码TL1A(肿瘤坏死因子配体超家族成员15(TNFSF15))的核酸提供于Entrez Gene:9966;UniProtKB:095150。TL1A是促炎性分子,在TCR刺激的存在下刺激CD8(+)细胞毒性T细胞以及Th1、Th2和Th17细胞的增殖和效应子功能。TL1A被认为通过桥接先天性和适应性免疫应答,通过增强Th1、Th2和Th17效应细胞功能以及T细胞积聚和发炎组织的免疫病理学来调节适应性免疫,从而参与IBD的发病机理。

[0010] 某些包含在TNFSF15基因处鉴定出的多态性的基因型关联于、因而可预测发生IBD(例如UC或CD)的风险,或IBD的亚临床表型。TL1AmRNA的表达在具有这些风险基因型的被诊断出IBD的患者中富集。因此,在包括IBD(例如UC和CD)在内的多种T细胞依赖性自身免疫病中,抑制TL1A的表达和/或活性是有前途的治疗策略。

[0011] 在一个方面,本文提供了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:重链可变区,其包含:(a)包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列的HCDR1;(b)包含由SEQ ID NO:554至564或574至577中任一个所示的氨基酸序列的HCDR2;和(c)包含由SEQ ID NO:565至568或578至581中任一个所示的氨基酸序列的HCDR3;以及轻链可变区,其包含:(d)包含由SEQ ID NO:569或570中任一个所示的氨基酸序列的LCDR1;(e)包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列的LCDR2;和(f)包含由SEQ ID NO:571至573或582至585中任一个所示的氨基酸序列的LCDR3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:545所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区1。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:546所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区2。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:547或586至588所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:548所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区4。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:549所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区1。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:550所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区2。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:551所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:552所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区4。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含:(a)与SEQ ID NO:545所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区1;(b)与SEQ ID NO:546所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区2;(c)与SEQ ID NO:547或586至588所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区3;(d)与SEQ ID NO:548所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区4;(e)与SEQ ID NO:549所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区1;(f)与SEQ ID NO:550所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区2;(g)与SEQ ID NO:551所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区3;以及(h)与SEQ ID NO:552所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区4。在某些实施方案中,如通过ELISA所确定的,所述抗体以比L8克隆更强的亲和力或强2倍的亲和力结合人TL1A,其中所述L8克隆包含SEQ ID NO:491所示的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:490所示的轻链可变区氨基

酸序列。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是嵌合的或人源化的。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是IgG抗体。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:542或543所示的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:542所示的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:544所示的氨基酸序列的轻链恒定区。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段抑制TL1A诱导的由T淋巴细胞分泌干扰素 γ 。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是药物组合物的组分,该药物组合物包含该抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。在某些实施方案中,所述药物组合物被配制用于静脉内给药。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段或药物组合物用于治疗炎性肠病、克罗恩病或结肠炎。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段由核酸编码。在某些实施方案中,细胞包含核酸。在某些实施方案中,该细胞是真核细胞。在某些实施方案中,该细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在某些实施方案中,本文描述了一种治疗患有炎性肠病、克罗恩病或结肠炎的个体的方法,其包括向所述个体施用有效量的所述抗体或抗原结合片段或药物组合物,其中所述个体被诊断为患有或怀疑患有炎性肠病、克罗恩病或结肠炎。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段或药物组合物用于防止或减少T淋巴细胞的干扰素 γ 分泌。在某些实施方案中,本文描述了一种防止或减少个体中由T淋巴细胞分泌干扰素 γ 的方法,其包括向所述个体施用有效量的所述抗体或抗原结合片段或药物组合物。在某些实施方案中,本文描述了一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治疗的方法,其包括在足以将所述抗体或抗原结合片段分泌到培养基中的条件下,在所述培养基中孵育包含编码所述抗体或抗原结合片段的核酸的细胞。在某些实施方案中,所述方法进一步包括使所述培养基经历至少一个纯化步骤。在某些实施方案中,本文描述了一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治疗的方法,其包括将所述抗体或抗原结合片段与药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

[0012] 在另一方面,本文提供了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:重链可变区,其包含:(a)包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列的HCDR1;(b)包含由SEQ ID NO:559所示的氨基酸序列的HCDR2;和(c)包含由SEQ ID NO:567所示的氨基酸序列的HCDR3;以及轻链可变区,其包含:(d)包含由SEQ ID NO:569所示的氨基酸序列的LCDR1;(e)包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列的LCDR2;和(f)包含由SEQ ID NO:573所示的氨基酸序列的LCDR3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:545所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区1。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:546所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区2。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:547或586至588所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:548所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区4。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:549所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区1。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:550所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区2。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结

合片段包含与SEQ ID NO:551所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:552所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区4。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含:(a)与SEQ ID NO:545所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区1;(b)与SEQ ID NO:546所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区2;(c)与SEQ ID NO:547或586至588所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区3;(d)与SEQ ID NO:548所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区4;(e)与SEQ ID NO:549所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区1;(f)与SEQ ID NO:550所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区2;(g)与SEQ ID NO:551所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区3;以及(h)与SEQ ID NO:552所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区4。在某些实施方案中,所述特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段包含:(a)重链可变区,其包含与SEQ ID NO:503至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及(b)轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:502至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,如通过ELISA所确定的,所述抗体以比L8克隆更强的亲和力或强2倍的亲和力结合人TL1A,其中所述L8克隆包含SEQ ID NO:491所示的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:490所示的轻链可变区氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是嵌合的或人源化的。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是IgG抗体。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:542或543所示的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:542所示的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:544所示的氨基酸序列的轻链恒定区。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段抑制TL1A诱导的由T淋巴细胞分泌干扰素 γ 。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是药物组合物的组分,该药物组合物包含该抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。在某些实施方案中,所述药物组合物被配制用于静脉内给药。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段或药物组合物用于治疗炎性肠病、克罗恩病或结肠炎。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段由核酸编码。在某些实施方案中,细胞包含核酸。在某些实施方案中,该细胞是真核细胞。在某些实施方案中,该细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在某些实施方案中,本文描述了一种治疗患有炎性肠病、克罗恩病或结肠炎的个体的方法,其包括向所述个体施用有效量的所述抗体或抗原结合片段或药物组合物,其中所述个体被诊断为患有或怀疑患有炎性肠病、克罗恩病或结肠炎。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段或药物组合物用于防止或减少T淋巴细胞的干扰素 γ 分泌。在某些实施方案中,本文描述了一种防止或减少个体中由T淋巴细胞分泌干扰素 γ 的方法,其包括向所述个体施用有效量的所述抗体或抗原结合片段或药物组合物。在某些实施方案中,本文描述了一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治疗的方法,其包括在足以将所述抗体或抗原结合片段分泌到培养基中的条件下,在所述培养基中孵育包含编码所述抗体或抗原结合片段的核酸的细胞。在某些实施方案中,所述方法进一步包括使所述培养基经历至少一个纯化步骤。在某些实施方案中,本文描述了一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治

疗的方法,其包括将所述抗体或抗原结合片段与药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

[0013] 在另一方面,本文提供了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:重链可变区,其包含:(a)包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列的HCDR1;(b)包含由SEQ ID NO:563所示的氨基酸序列的HCDR2;和(c)包含由SEQ ID NO:568所示的氨基酸序列的HCDR3;以及轻链可变区,其包含:(d)包含由SEQ ID NO:569所示的氨基酸序列的LCDR1;(e)包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列的LCDR2;和(f)包含由SEQ ID NO:572所示的氨基酸序列的LCDR3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:545所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区1。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:546所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区2。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:547或586至588所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:548所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区4。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:549所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区1。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:550所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区2。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:551所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:552所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区4。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含:(a)与SEQ ID NO:545所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区1;(b)与SEQ ID NO:546所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区2;(c)与SEQ ID NO:547或586至588所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区3;(d)与SEQ ID NO:548所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区4;(e)与SEQ ID NO:549所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区1;(f)与SEQ ID NO:550所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区2;(g)与SEQ ID NO:551所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区3;以及(h)与SEQ ID NO:552所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区4。在某些实施方案中,所述特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段包含:(a)重链可变区,其包含与SEQ ID NO:511至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及(b)轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:510至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,如通过ELISA所确定的,所述抗体以比L8克隆更强的亲和力或强2倍的亲和力结合人TL1A,其中所述L8克隆包含SEQ ID NO:491所示的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:490所示的轻链可变区氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是嵌合的或人源化的。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是IgG抗体。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:542或543所示的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:542所示的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段

包含含有SEQ ID NO:544所示的氨基酸序列的轻链恒定区。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段抑制TL1A诱导的由T淋巴细胞分泌干扰素 γ 。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是药物组合物的组分,该药物组合物包含该抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。在某些实施方案中,所述药物组合物被配制用于静脉内给药。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段或药物组合物用于治疗炎性肠病、克罗恩病或结肠炎。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段由核酸编码。在某些实施方案中,细胞包含核酸。在某些实施方案中,该细胞是真核细胞。在某些实施方案中,该细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在某些实施方案中,本文描述了一种治疗患有炎性肠病、克罗恩病或结肠炎的个体的方法,其包括向所述个体施用有效量的所述抗体或抗原结合片段或药物组合物,其中所述个体被诊断为患有或怀疑患有炎性肠病、克罗恩病或结肠炎。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段或药物组合物用于防止或减少T淋巴细胞的干扰素 γ 分泌。在某些实施方案中,本文描述了一种防止或减少个体中由T淋巴细胞分泌干扰素 γ 的方法,其包括向所述个体施用有效量的所述抗体或抗原结合片段或药物组合物。在某些实施方案中,本文描述了一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治疗的方法,其包括在足以将所述抗体或抗原结合片段分泌到培养基中的条件下,在所述培养基中孵育包含编码所述抗体或抗原结合片段的核酸的细胞。在某些实施方案中,所述方法进一步包括使所述培养基经历至少一个纯化步骤。在某些实施方案中,本文描述了一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治疗的方法,其包括将所述抗体或抗原结合片段与药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

[0014] 在另一方面,本文提供了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:重链可变区,其包含:(a)包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列的HCDR1;(b)包含由SEQ ID NO:555所示的氨基酸序列的HCDR2;和(c)包含由SEQ ID NO:566所示的氨基酸序列的HCDR3;以及轻链可变区,其包含:(d)包含由SEQ ID NO:569所示的氨基酸序列的LCDR1;(e)包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列的LCDR2;和(f)包含由SEQ ID NO:572所示的氨基酸序列的LCDR3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:545所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区1。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:546所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区2。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:547或586至588所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:548所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区4。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:549所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区1。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:550所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区2。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:551所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:552所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区4。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含:(a)与SEQ ID NO:545所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区1;(b)与SEQ ID NO:546所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区2;

(c) 与SEQ ID NO:547或586至588所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区3; (d) 与SEQ ID NO:548所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区4; (e) 与SEQ ID NO:549所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区1; (f) 与SEQ ID NO:550所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区2; (g) 与SEQ ID NO:551所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区3; 以及 (h) 与SEQ ID NO:552所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区4。在某些实施方案中, 所述特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段包含: (a) 重链可变区, 其包含与SEQ ID NO:493至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列; 以及 (b) 轻链可变区, 其包含与SEQ ID NO:492至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施方案中, 如通过ELISA所确定的, 所述抗体以比L8克隆更强的亲和力或强2倍的亲和力结合人TL1A, 其中所述L8克隆包含SEQ ID NO:491所示的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:490所示的轻链可变区氨基酸序列。在某些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段是嵌合的或人源化的。在某些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段是IgG抗体。在某些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段包含Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。在某些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:542或543所示的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:542所示的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:544所示的氨基酸序列的轻链恒定区。在某些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段抑制TL1A诱导的由T淋巴细胞分泌干扰素 γ 。在某些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段是药物组合物的组分, 该药物组合物包含该抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。在某些实施方案中, 所述药物组合物被配制用于静脉内给药。在某些实施方案中, 抗体或抗原结合片段或药物组合物用于治疗炎性肠病、克罗恩病或结肠炎。在某些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段由核酸编码。在某些实施方案中, 细胞包含核酸。在某些实施方案中, 该细胞是真核细胞。在某些实施方案中, 该细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在某些实施方案中, 本文描述了一种治疗患有炎性肠病、克罗恩病或结肠炎的个体的方法, 其包括向所述个体施用有效量的所述抗体或抗原结合片段或药物组合物, 其中所述个体被诊断为患有或怀疑患有炎性肠病、克罗恩病或结肠炎。在某些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段或药物组合物用于防止或减少T淋巴细胞的干扰素 γ 分泌。在某些实施方案中, 本文描述了一种防止或减少个体中由T淋巴细胞分泌干扰素 γ 的方法, 其包括向所述个体施用有效量的所述抗体或抗原结合片段或药物组合物。在某些实施方案中, 本文描述了一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治疗的方法, 其包括在足以将所述抗体或抗原结合片段分泌到培养基中的条件下, 在所述培养基中孵育包含编码所述抗体或抗原结合片段的核酸的细胞。在某些实施方案中, 所述方法进一步包括使所述培养基经历至少一个纯化步骤。在某些实施方案中, 本文描述了一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治疗的方法, 其包括将所述抗体或抗原结合片段与药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

[0015] 在另一方面, 本文提供了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段, 其包含: 重链可变区, 其包含: (a) 包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列的HCDR1; (b) 包含由SEQ ID NO:558所示的氨基酸序列的HCDR2; 和 (c) 包含由SEQ ID NO:566所示的氨基酸序列的

HCDR3;以及轻链可变区,其包含:(d)包含由SEQ ID NO:569所示的氨基酸序列的LCDR1;(e)包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列的LCDR2;和(f)包含由SEQ ID NO:572所示的氨基酸序列的LCDR3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:545所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区1。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:546所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区2。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:547或586至588所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:548所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区4。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:549所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区1。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:550所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区2。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:551所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:552所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区4。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含:(a)与SEQ ID NO:545所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区1;(b)与SEQ ID NO:546所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区2;(c)与SEQ ID NO:547或586至588所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区3;(d)与SEQ ID NO:548所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区4;(e)与SEQ ID NO:549所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区1;(f)与SEQ ID NO:550所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区2;(g)与SEQ ID NO:551所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区3;以及(h)与SEQ ID NO:552所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区4。在某些实施方案中,所述特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段包含:(a)重链可变区,其包含与SEQ ID NO:501至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及(b)轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:500至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,如通过ELISA所确定的,所述抗体以比L8克隆更强的亲和力或强2倍的亲和力结合人TL1A,其中所述L8克隆包含SEQ ID NO:491所示的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:490所示的轻链可变区氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是嵌合的或人源化的。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是IgG抗体。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:542或543所示的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:542所示的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:544所示的氨基酸序列的轻链恒定区。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段抑制TL1A诱导的由T淋巴细胞分泌干扰素 γ 。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是药物组合物的组分,该药物组合物包含该抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。在某些实施方案中,所述药物组合物被配制用于静脉内给药。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段或药物组合物用于治疗炎性肠病。在某些实

实施方案中,所述抗体或抗原结合片段由核酸编码。在某些实施方案中,细胞包含核酸。在某些实施方案中,该细胞是真核细胞。在某些实施方案中,该细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在某些实施方案中,本文描述了一种治疗患有炎性肠病、克罗恩病或结肠炎的个体的方法,其包括向所述个体施用有效量的所述抗体或抗原结合片段或药物组合物,其中所述个体被诊断为患有或怀疑患有炎性肠病、克罗恩病或结肠炎。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段或药物组合物用于防止或减少T淋巴细胞的干扰素 γ 分泌。在某些实施方案中,本文描述了一种防止或减少个体中由T淋巴细胞分泌干扰素 γ 的方法,其包括向所述个体施用有效量的所述抗体或抗原结合片段或药物组合物。在某些实施方案中,本文描述了一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治疗的方法,其包括在足以将所述抗体或抗原结合片段分泌到培养基中的条件下,在所述培养基中孵育包含编码所述抗体或抗原结合片段的核酸的细胞。在某些实施方案中,所述方法进一步包括使所述培养基经历至少一个纯化步骤。在某些实施方案中,本文描述了一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治疗的方法,其包括将所述抗体或抗原结合片段与药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

[0016] 在另一方面,本文提供了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:重链可变区,其包含:(a)包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列的HCDR1;(b)包含由SEQ ID NO:564所示的氨基酸序列的HCDR2;和(c)包含由SEQ ID NO:568所示的氨基酸序列的HCDR3;以及轻链可变区,其包含:(d)包含由SEQ ID NO:569所示的氨基酸序列的LCDR1;(e)包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列的LCDR2;和(f)包含由SEQ ID NO:572所示的氨基酸序列的LCDR3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:545所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区1。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:546所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区2。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:547或586至588所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:548所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人重链框架区4。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:549所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区1。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:550所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区2。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:551所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区3。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:552所示的至少90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的人轻链框架区4。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含:(a)与SEQ ID NO:545所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区1;(b)与SEQ ID NO:546所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区2;(c)与SEQ ID NO:547或586至588所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区3;(d)与SEQ ID NO:548所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人重链框架区4;(e)与SEQ ID NO:549所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区1;(f)与SEQ ID NO:550所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区2;(g)与SEQ ID NO:551所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区3;以及(h)与SEQ ID NO:552所示的至少90%、95%、97%或98%相同的人轻链框架区4。在某些实施方案中,所述特异性结合

TL1A的抗体或抗原结合片段包含：(a) 重链可变区，其包含与SEQ ID NO:515至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；以及(b) 轻链可变区，其包含与SEQ ID NO:514至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施方案中，如通过ELISA所确定的，所述抗体以比L8克隆更强的亲和力或强2倍的亲和力结合人TL1A，其中所述L8克隆包含SEQ ID NO:491所示的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:490所示的轻链可变区氨基酸序列。在某些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段是嵌合的或人源化的。在某些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段是IgG抗体。在某些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段包含Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。在某些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:542或543所示的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:542所示的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:544所示的氨基酸序列的轻链恒定区。在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段抑制TL1A诱导的由T淋巴细胞分泌干扰素 γ 。在某些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段是药物组合物的组分，该药物组合物包含该抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。在某些实施方案中，所述药物组合物被配制用于静脉内给药。在某些实施方案中，抗体或抗原结合片段或药物组合物用于治疗炎性肠病、克罗恩病或结肠炎。在某些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段由核酸编码。在某些实施方案中，细胞包含核酸。在某些实施方案中，该细胞是真核细胞。在某些实施方案中，该细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在某些实施方案中，本文描述了一种治疗患有炎性肠病、克罗恩病或结肠炎的个体的方法，其包括向所述个体施用有效量的所述抗体或抗原结合片段或药物组合物，其中所述个体被诊断为患有或怀疑患有炎性肠病、克罗恩病或结肠炎。在某些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段或药物组合物用于防止或减少T淋巴细胞的干扰素 γ 分泌。在某些实施方案中，本文描述了一种防止或减少个体中由T淋巴细胞分泌干扰素 γ 的方法，其包括向所述个体施用有效量的所述抗体或抗原结合片段或药物组合物。在某些实施方案中，本文描述了一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治疗的方法，其包括在足以将所述抗体或抗原结合片段分泌到培养基中的条件下，在所述培养基中繁育包含编码所述抗体或抗原结合片段的核酸的细胞。在某些实施方案中，所述方法进一步包括使所述培养基经历至少一个纯化步骤。在某些实施方案中，本文描述了一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治疗的方法，其包括将所述抗体或抗原结合片段与药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

[0017] 在另一方面，本文提供了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段，其包含：(a) 重链可变区，其包含来自SEQ ID NO:491、493、495、497、499、501、503、505、507、509、511、513、515、517、519、521、523、525、527、529、531、533、535、537、539或541中任一个的HCDR1、HCDR2和HCDR3；以及(b) 轻链可变区，其包含来自SEQ ID NO:490、492、494、496、498、500、502、504、506、508、510、512、514、516、518、520、522、524、526、528、530、532、534、536、538或540中任一个的LCDR1、LCDR2和LCDR3；其中所述CDR由Kabat、Chothia或IMGT方法或其组合来定义。在某些实施方案中，所述特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段包含：(a) 重链可变区，其包含与SEQ ID NO:491、493、495、497、499、501、503、505、507、509、511、513、515、517、519、521、523、525、527、529、531、533、535、537、539或541中的任一个至少约85%、

90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；以及(b)轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:490、492、494、496、498、500、502、504、506、508、510、512、514、516、518、520、522、524、526、528、530、532、534、536、538或540中的任一个至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,如通过ELISA所确定的,所述抗体以比L8克隆更强的亲和力或强2倍的亲和力结合人TL1A,其中所述L8克隆包含SEQ ID NO:491所示的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:490所示的轻链可变区氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是嵌合的或人源化的。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是IgG抗体。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:542或543所示的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:542所示的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:544所示的氨基酸序列的轻链恒定区。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是药物组合物的组分,该药物组合物包含该抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。在某些实施方案中,所述药物组合物被配制用于静脉内给药。

[0018] 在另一方面,本文描述了一种在具有与疾病或病况相关的风险变体的个体中治疗该疾病或病况的方法,该方法包括向具有风险变体的个体施用有效量的本公开的抗体或抗原结合片段,其中该疾病或病况包括炎性肠病(IBD)、克罗恩病(CD)或结肠炎中的至少一种。在某些实施方案中,所述个体具有多个风险变体。在某些实施方案中,所述多个风险变体是至少3、4、5或10个风险变体。在某些实施方案中,所述多个风险变体的风险变体与所述疾病或病况的亚临床表型相关。在某些实施方案中,所述疾病或病况是IBD、CD或结肠炎中至少一种的严重形式。

附图说明

[0019] 示例性实施方案在参考附图中进行说明。本文公开的实施方案和附图旨在被认为是说明性的,而非限制性的。

[0020] 图1描绘了作为嵌合5C3D11 Fab表达和抗原结合的定性评估进行的过滤器提升试验的结果。过滤器的A部分显示了重链5C3D11的表达,过滤器的B部分显示了轻链5C3D11的表达,过滤器的C部分显示了5C3D11 Fab与人TL1A抗原的结合。

[0021] 图2描绘了通过酶联免疫吸附测定(ELISA),嵌合5C3D11和人源化克隆12835抗体与人TL1A的结合。

[0022] 图3描绘了捕获过滤器提升试验的结果,其证明了嵌合5C3D11对人TL1A的高灵敏度和高结合强度。

[0023] 图4A描绘了ELISA的结果,其显示了CDR移植的抗体克隆18-7、21-3和人源化克隆12835与人TL1A的结合。

[0024] 图4B描绘了ELISA的结果,其显示了相比于人源化克隆12835与人TL1A的结合,CDR移植的抗体克隆L8与人TL1A的结合。

[0025] 图5描绘了ELISA的结果,其证明了固定化的Fab(嵌合5C3D11、人源化克隆12835、克隆18-7、克隆21-3和CDR移植克隆L8)与可溶性人TL1A抗原的强结合。

[0026] 图6A描绘了ELISA的结果,其证明了与CDR移植物(克隆L8)相比,具有重链CDR3突变的抗TL1A抗体H3-7(V102M)-SEQ ID NO:44、38,H3-7(V102K)-SEQ ID NO:43、38,和H3-7(V102Q)-SEQ ID NO:45、38和人源化克隆12835与人TL1A的亲合力增加。

[0027] 图6B描绘了ELISA的结果,其证明了与CDR移植克隆L8相比,具有重链CDR3突变的抗TL1A抗体H3-7(V102W)-SEQ ID NO:46、38和人源化克隆12835与人TL1A的亲合力增加。

[0028] 图7A描绘了ELISA的结果,其证明了与CDR移植克隆L8相比,具有轻链CDR3突变的抗TL1A抗体L3-4(S92D)-SEQ ID NO:47、40,L3-4(S92E)-SEQ ID NO:48、40,L3-4(S92H)-SEQ ID NO:49、40,L3-4(S92N)-SEQ ID NO:50、40和人源化克隆12835与人TL1A的亲合力增加。

[0029] 图7B描绘了ELISA的结果,其证明了与CDR移植克隆L8相比,具有轻链CDR3突变的抗TL1A抗体L3-4(S92Q)-SEQ ID NO:51、40和人源化克隆12835与人TL1A的亲合力增加。

[0030] 图8A、8B和8C描绘了ELISA,其证明了包含移植到人重链种系IGH1-46*02和人轻链种系IGKV3-20*01上的5C3D11 CDR变体的Fab与固定化人TL1A的结合。

[0031] 图9A和9B描绘了ELISA,其证明了包含移植到人重链种系IGH1-3*01和人轻链种系IGKV3-20*01上的5C3D11 CDR变体的Fab与固定化人TL1A的结合。

[0032] 图10A和10B描绘了ELISA,其证明了包含移植到人重链种系IGH1-46*02和人轻链种系IGKV3-20*01上的5C3D11 CDR变体的固定化Fab与可溶性生物素化人TL1A的结合。

[0033] 图11A和11B描绘了ELISA,其证明了包含移植到人重链种系IGH1-46*02和人轻链种系IGKV3-20*01上的5C3D11 CDR变体的固定化Fab与可溶性生物素化人TL1A的结合。

[0034] 图12A和12B描绘了ELISA,其证明了包含移植到人重链种系IGH1-46*02和人轻链种系IGKV3-20*01上的5C3D11 CDR变体的固定化Fab与可溶性生物素化人TL1A的结合。

[0035] 图13A和13B描绘了ELISA,其证明了包含移植到人重链种系IGH1-3*01和人轻链种系IGKV3-20*01上的5C3D11 CDR变体的固定化Fab与可溶性生物素化人TL1A的结合。

[0036] 图14A和14B证明了包含5C3D11 CDR变体的Fab与膜缔合的人TL1A的结合。

[0037] 图15A和15B描绘了包含移植到人重链种系IGH1-46*02和人轻链种系IGKV3-20*01上的5C3D11 CDR变体的Fab与TRAIL缺乏结合。

[0038] 图16A和16B描绘了包含移植到人重链种系IGH1-46*02和人轻链种系IGKV3-20*01上的5C3D11 CDR变体的Fab与LIGHT缺乏结合。

[0039] 图17A和17B描绘了包含移植到人重链种系IGH1-46*02和人轻链种系IGKV3-20*01上的5C3D11 CDR变体的Fab与Fas缺乏结合。

[0040] 图18描绘了包含移植到人重链种系IGH1-3*01和人轻链种系IGKV3-20*01上的5C3D11 CDR变体的Fab与TRAIL缺乏结合。

[0041] 图19描绘了包含移植到人重链种系IGH1-3*01和人轻链种系IGKV3-20*01上的5C3D11 CDR变体的Fab与LIGHT缺乏结合。

[0042] 图20描绘了包含移植到人重链种系IGH1-3*01和人轻链种系IGKV3-20*01上的5C3D11 CDR变体的Fab与Fas缺乏结合。

[0043] 图21A和21B描绘了ELISA,其证明了具有IgG1重链(修饰的)和 κ 轻链恒定区(21A)或具有IgG2重链和 κ 轻链恒定区(21B)的包含5C3D11 CDR变体的重链和轻链可变区与固定化人TL1A的结合。

[0044] 图22A和22B描绘了ELISA,其证明了可溶性生物素化人TL1A与具有IgG1重链(修饰的)和 κ 轻链恒定区(22A)或具有IgG2重链和 κ 轻链恒定区(22B)的包含5C3D11 CDR变体的固定化重链和轻链可变区的结合。

[0045] 图23证明了具有IgG1重链(修饰的)和 κ 轻链恒定区或具有IgG2重链和 κ 轻链恒定区的包含5C3D11 CDR变体的重链和轻链可变区与膜缔合形式的人TL1A的结合的维持。

[0046] 图24A、24B和24C描绘了ELISA,其证明了具有IgG1重链(修饰的)和 κ 轻链恒定区或具有IgG2重链和 κ 轻链恒定区的包含5C3D11 CDR变体的重链和轻链可变区与TNFSF家族成员Fas(24A)、TRAIL(24B)或LIGHT(24C)缺乏结合。

[0047] 图25证明了人源化Ig构建体对食蟹猴TL1A诱导的全血中IFN- γ 产生的抑制,所述人源化Ig构建体包含移植到人重链种系IGH1-46*02和人轻链种系IGKV3-20*01上的5C3D11 CDR变体,具有IgG1重链(修饰的)和 κ 轻链恒定区。

[0048] 图26A、26B和26C示出了本文所述的抗体抑制TL1A诱导的从人全血中产生IFN- γ 。显示了来自3个不同的供体(26A)、(26B)和(26C)的结果,抗体浓度(纳摩尔)显示在x轴上。

[0049] 图27A、27B和27C示出了本文所述的抗体抑制TL1A诱导的从食蟹猴全血中产生IFN- γ 。显示了来自3个不同的供体(27A)、(27B)和(27C)的结果,抗体浓度(纳摩尔)显示在x轴上。

具体实施方式

[0050] 肿瘤坏死因子样蛋白1A(TL1A)与严重炎症肠病(IBD)——包括严重形式的结肠炎和克罗恩病(CD)——的发展和严重程度相关。另外,临床前和人类遗传相关性数据提示,TL1A是克罗恩病的潜在治疗靶标。本公开描述了针对TL1A的优化的抗体,并且提供了用于治疗IBD的新型治疗剂。

[0051] 在一个方面,本文描述了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:重链可变区,其包含:(a)包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列的HCDR1;(b)包含由SEQ ID NO:554至564或574至577中任一个所示的氨基酸序列的HCDR2;和(c)包含由SEQ ID NO:565至568或578至581中任一个所示的氨基酸序列的HCDR3;以及轻链可变区,其包含:(d)包含由SEQ ID NO:569或570中任一个所示的氨基酸序列的LCDR1;(e)包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列的LCDR2;和(f)包含由SEQ ID NO:571至573或582至585中任一个所示的氨基酸序列的LCDR3。

[0052] 在另一方面,本文描述了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:(a)重链可变区,其包含与SEQ ID NO:491、493、495、497、499、501、503、505、507、509、511、513、515、517、519、521、523、525、527、529、531、533、535、537、539或541中的任一个至少约90%相同的氨基酸序列;以及(b)轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:490、492、494、496、498、500、502、504、506、508、510、512、514、516、518、520、522、524、526、528、530、532、534、536、538或540中的任一个至少约90%相同的氨基酸序列。

[0053] 在一些实施方案中,抗体是指通过免疫球蛋白分子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。在一些实施方案中,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,以及其他任何修饰的包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子,只要该抗体表现出所需的生物学活性。抗体可以是免疫球蛋白的五种主要类别中的任何一种: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,或其亚类(同种型)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2),基于它们的重链恒定结构域的身份,分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白具有不同且众所周知的亚单位结构和三维构型。抗体可以是裸露的,或与诸如毒素、放射性同位素等其他分子缀合。

[0054] 在一些实施方案中,可将一个或多个氨基酸修饰引入本文提供的抗体的Fc区中,从而产生Fc区变体。本文中的Fc区是包含恒定区的至少一部分的免疫球蛋白重链的C-末端区域。Fc区包括天然序列Fc区和变异Fc区。Fc区变体可包含在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如,置换)的人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)。

[0055] 在一些实施方案中,本公开的抗体具有降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或降低的固定补体的能力。这在需要抑制目标功能的情况下是理想的,但是下游免疫应答的激活可产生不希望的副作用。一些Fc区天然缺乏效应子功能(例如,IgG2,SEQ ID NO:543),并且一些Fc区可包含降低效应子功能的突变(例如,修饰的IgG1,SEQ ID NO:542)。在某些实施方案中,本公开的抗体具有降低的效应子功能。在某些实施方案中,本公开的抗体包含如SEQ ID NO:543所示的IgG2恒定区。在某些实施方案中,本公开的抗体包含如SEQ ID NO:542所示的修饰的IgG1恒定区。

[0056] 在一些实施方案中,本公开的抗体是具有一些但并非全部效应子功能的变体,这使其对于其中抗体的体内半衰期至关重要而某些效应子功能(如补体和ADCC)非必需或有害的应用,成为理想的候选物。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定,以确认CDC和/或ADCC活性的降低/消耗。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定,以确保抗体缺乏Fc γ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。在美国专利5,500,362和5,821,337中描述了用来评估目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例。或者,可以采用非放射性测定方法(例如,ACTITM和CytoTox96[®]非放射性细胞毒性测定)。用于此类测定的有用的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)、单核细胞、巨噬细胞和自然杀伤(NK)细胞。

[0057] 抗体可具有增加的半衰期和/或改善的与新生儿Fc受体(FcRn)的结合(参见,例如,US2005/0014934)。此类抗体可包含其中具有一个或多个改善Fc区与FcRn的结合的置换的Fc区,并且包括在一个或多个以下Fc区残基处具有置换的抗体:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,其根据EU编号系统(参见,例如,美国专利7,371,826)。还考虑了Fc区变体的其他实例(参见,例如,Duncan&Winter,Nature322:738-40(1988);美国专利5,648,260和5,624,821;以及W094/29351)。在某些实施方案中,由于Fc区的改变,本公开的抗体具有增加的血清半衰期。在某些实施方案中,所述改变包括针对IgG1的M252Y/S254T/T256E突变,或针对IgG1的M428L/N434S突变。

[0058] 在一些实施方案中,抗体包含抗原结合片段,抗原结合片段是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、单链抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0059] 在一些实施方案中,人源化抗体是指具有特定免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其片段的非人(例如鼠)抗体的形式,其包含最少的非人(例如鼠)序列。在非限制性实例中,

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,人源化抗体是这样的人免疫球蛋白,其中来自互补决定区(CDR)的残基被具有所需特异性、亲和力和能力的来自非人类物种(例如小鼠、大鼠、兔、仓鼠)的CDR的残基所替代。

[0060] 在一些实施方案中,嵌合抗体是指其中免疫球蛋白分子的序列来源于两个或更多个物种的抗体。作为非限制性实例,轻链和重链的可变区均对应于具有所需特异性、亲和力和能力的来源于一个哺乳动物物种(例如,小鼠、大鼠、兔等)的抗体的可变区,而恒定区与来源于另一个物种(通常是人)的抗体中的序列同源,以避免在该物种中引发免疫应答。

[0061] 如本文所用的,术语“约”是指在所述量的10%以内。

[0062] 如本文所用的,“风险变体”是指个体的任何遗传序列,通常是DNA序列,其增加个体发展出表型(例如炎症肠病、克罗恩病、结肠炎或其亚临床表型)的风险。风险变体包括但不限于单核苷酸多态性(SNP)、任何长度的插入缺失、短串联重复序列(STR)以及染色体易位、重复或缺失。所述风险变体包括与严重形式的炎症肠病、克罗恩病或结肠炎相关的那些变体。所述风险变体包括那些可指示个体可能对针对炎症肠病、克罗恩病或结肠炎的任何当前疗法的治疗为难治性的变体。如本文预期的,可以使用风险变体来获知采用本文描述的任何抗体的治疗决定。

[0063] 与“高变区”或“HVR”同义的术语“互补决定区”和“CDR”在本领域中是已知的,是指抗体可变区内的非连续氨基酸序列,其赋予抗原特异性和/或结合亲和力。通常,每个重链可变区中有三个CDR(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3),并且每个轻链可变区中有三个CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。“框架区”和“FR”在本领域中是已知的,是指重链和轻链的可变区的非CDR部分。通常,每个全长重链可变区中有四个FR(FR-H1、FR-H2、FR-H3和FR-H4),并且每个全长轻链可变区中有四个FR(FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4)。给定CDR或FR的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知方案中的任何一种来容易地确定,包括以下文献中描述的那些方案:Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(“Kabat”编号方案);Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案);MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996),“Antibody-antigen interactions:Contact analysis and binding site topography,”J.Mol.Biol.262,732-745.”(“Contact”编号方案);Lefranc MP等人,“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,”Dev Comp Immunol,2003年1月;27(1):55-77(“IMGT”编号方案);Honegger A和Plückthun A,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool,”J Mol Biol,2001年6月8日;309(3):657-70(“Aho”编号方案);和Whitelegg NR和Rees AR,“WAM:an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB,”Protein Eng.2000年12月;13(12):819-24(“AbM”编号方案)。在某些实施方案中,本文所述抗体的CDR可以通过选自Kabat、Chothia、IMGT、Aho、AbM或其组合的方法来定义。

[0064] 在一些实施方案中,与蛋白质特异性结合的抗体表示,与包括不相关蛋白质在内的替代物质相比,该抗体与该蛋白质的反应或缔合更频繁、更快速、持续时间更长、亲和力更高,或以上所述的一些组合。

[0065] 在一些实施方案中,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,是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,并且其可被非氨基酸中断。这些术语还包括天然修饰的或通过干预而修饰的氨基酸聚合物;例如,通过二硫键形成、糖基化、酯化、乙酰化、磷酸化或其他任何操作或修饰,例如与另一种多肽融合和/或缀合,例如与标记组分缀合而修饰的。该定义内还包括,例如,含有一种或多种氨基酸类似物(例如,非天然氨基酸等)的多肽,以及本领域已知的其他修饰。

[0066] 在一些实施方案中,在本文中可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸聚合物,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和/或它们的类似物,或可以通过DNA或RNA聚合酶掺入聚合物中的任何底物。多核苷酸可包含修饰的核苷酸,例如但不限于甲基化的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装配之前或之后赋予。多核苷酸可以在聚合后进一步修饰,例如通过与标记组分缀合。

[0067] 相对于参考多肽序列的序列同一性百分比(%)是在将序列进行比对并在必要时引入空位以达到最大序列同一性百分比之后,候选序列中的氨基酸残基与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的百分比,并且不认为任何保守置换是序列同一性的一部分。旨在确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以通过各种已知的方式来实现,例如使用可公开获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。能够确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的算法。然而,对于本文而言,使用序列比较计算机程序ALIGN-2生成氨基酸序列同一性百分比。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech, Inc. 开发,源代码已作为用户文档提交美国版权局(Washington D.C., 20559),并以美国版权登记号TXU510087进行了登记。ALIGN-2程序可从Genentech, Inc., South San Francisco, Calif. 公开获得,也可以从源代码进行编译。ALIGN-2程序应进行编译,以供在UNIX操作系统(包括数字UNIX V4.0D)上使用。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置,并且保持不变。

[0068] 在使用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A与或相对于给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性百分比(或者可以用以下短语表示:给定氨基酸A与或相对于给定氨基酸序列B具有或包含一定的氨基酸序列同一性百分比)计算如下:分数 X/Y 乘以100,其中X是在A和B的该程序比对中由序列比对程序ALIGN-2评分为相同匹配的氨基酸残基数,并且其中Y是B中的氨基酸残基总数。应当理解,在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A与B的氨基酸序列同一性百分比将不等于B与A的氨基酸序列同一性百分比。除非另有特别说明,否则使用ALIGN-2计算机程序如前一段所述获得本文使用的所有氨基酸序列同一性百分比值。

[0069] 在一些实施方案中,术语“个体”或“受试者”可互换使用,并且是指任何动物,包括但不限于人类、非人灵长类动物、啮齿类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。啮齿类动物包括小鼠、大鼠、土拨鼠、雪貂、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,犬科物种,例如狗、狐狸、狼,禽类物种,例如鸡、鹌鹑、鸵鸟,和鱼类,例如,鳟鱼、鲑鱼和鲑鱼。在各个实施方案中,受试者可以是先前已经被诊断出患有或被确定为患有或具有需要治疗的病况的受试者。在某些实施方案中,受试者是人。在各个其他实施

方案中,先前被诊断出患有或被确定为患有或具有病况的受试者可以经历过或可以未经历过针对该病况的治疗。在另外其他的实施方案中,受试者还可以是先前未被诊断出具有病况的受试者(即,表现出病况的一种或多种风险因素的受试者)。“需要针对特定病况的治疗的受试者”可以是具有该病况、被诊断出具有该病症或处于发展该病况的风险中的受试者。在一些实施方案中,受试者是已被诊断出患有本文所述的疾病或病况的“患者”。

[0070] 在一些实施方案中,术语“治疗有效量”是指有效“治疗”受试者或哺乳动物的疾病或病症的抗体、多肽、多核苷酸、有机小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疾病或病症的症状的严重程序。在一些情况下,该疾病或病症包括炎性肠病(IBD)、克罗恩病(CD)或溃疡性结肠炎(UC)。在一些情况下,该IBD、CD和/或UC是IBD、CD和/或UC的严重或医学上难治性形式。IBD、CD和/或UC症状的非限制性实例包括但不限于腹泻、发热、疲劳、腹痛、腹部绞痛、炎症、溃疡、恶心、呕吐、出血、便血、食欲降低和体重减轻。

[0071] 在一些实施方案中,如本文所用的术语“治疗”或“处理”是指治疗性处理和预防性或防范性措施,其中目的是预防或减慢(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率,或降低个体发生该病况的机会,即使治疗最终未获成功。在本文提供的一些方面中,需要治疗的受试者包括已经患有疾病或病况的受试者,以及易患该疾病或病况的受试者或有待预防该疾病或病况的受试者。该疾病或病况可包括炎性疾病或病况,纤维狭窄疾病或纤维化疾病,疏嘌呤毒性或与疏嘌呤毒性有关的疾病,针对抗TNF疗法、类固醇类或免疫调节剂无反应。

[0072] 抗TL1A抗体

[0073] 各个实施方案提供了与TL1A结合的抗体。在一些实施方案中,所述抗体与可溶性TL1A特异性结合。在一些实施方案中,所述抗体与膜结合TL1A特异性结合。在一些实施方案中,提供了一种抗TL1A抗体,其具有包含四个重链框架区(HCFR)和三个重链互补决定区(HCDR)的重链:HCFR1、HCFR2、HCFR3、HCFR4;以及包含四个轻链框架区(LCFR)和三个轻链互补决定区(LCDR)的轻链:LCFR1、LCFR2、LCFR3、LCFR4。抗TL1A抗体可包含本文提供的任何区域,例如,如表1、2、3、实施例以及SEQ ID NO:1至54、490至588中所提供的。在一些实施方案中,抗TL1A抗体包含可变域,例如本文所提供的,其具有如表2或19至22中所示的一个或多个CDR突变。在一些实施方案中,抗TL1A抗体包含一个或多个CDR,该CDR包含表19至22中所示的序列。

[0074] 在某些实施方案中,所述抗TL1A抗体包含与表19至22中所示的那些相对应的CDR。在某些实施方案中,所述抗TL1A抗体或抗原结合片段包含:重链可变区,其包含:(a)包含由SEQ ID NO:484所示的氨基酸序列(DTYMH)的HCDR1;(b)包含由SEQ ID NO:485所示的氨基酸序列(PASGH)的HCDR2;和(c)包含由SEQ ID NO:486所示的氨基酸序列(SGGLPD)的HCDR3;以及轻链可变区,其包含:(d)包含由SEQ ID NO:487所示的氨基酸序列(ASSSVSYMY)的LCDR1;(e)包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列(ATSNLAS)的LCDR2;和(f)包含由SEQ ID NO:489所示的氨基酸序列(GNPRT)的LCDR3。

[0075] 在某些实施方案中,本文描述了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:重链可变区,其包含:(a)包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列的HCDR1;(b)包含由SEQ ID NO:554至564或574至577中任一个所示的氨基酸序列的HCDR2;和(c)包含由SEQ ID NO:565至568或578至581中任一个所示的氨基酸序列的HCDR3;以及轻链可变区,其包

含：(d) 包含由SEQ ID NO:569或570中任一个所示的氨基酸序列的LCDR1；(e) 包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列的LCDR2；和(f) 包含由SEQ ID NO:571至573或582至585中任一个所示的氨基酸序列的LCDR3。

[0076] 在某些实施方案中，本文描述了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段，其包含：重链可变区，其包含：(a) 包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列的HCDR1；(b) 包含由SEQ ID NO:559所示的氨基酸序列的HCDR2；和(c) 包含由SEQ ID NO:567所示的氨基酸序列的HCDR3；以及轻链可变区，其包含：(d) 包含由SEQ ID NO:569所示的氨基酸序列的LCDR1；(e) 包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列的LCDR2；和(f) 包含由SEQ ID NO:573所示的氨基酸序列的LCDR3。在某些实施方案中，本文描述了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段，其包含：重链可变区，其包含与SEQ ID NO:503至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；以及轻链可变区，其包含与SEQ ID NO:502至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施方案中，该抗体或抗原结合片段包含 κ 轻链恒定区和IgG1重链恒定区。在某些实施方案中，该抗体或抗原结合片段包含 κ 轻链恒定区和IgG2重链恒定区。

[0077] 在某些实施方案中，本文描述了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段，其包含：重链可变区，其包含：(a) 包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列的HCDR1；(b) 包含由SEQ ID NO:563所示的氨基酸序列的HCDR2；和(c) 包含由SEQ ID NO:568所示的氨基酸序列的HCDR3；以及轻链可变区，其包含：(d) 包含由SEQ ID NO:569所示的氨基酸序列的LCDR1；(e) 包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列的LCDR2；和(f) 包含由SEQ ID NO:572所示的氨基酸序列的LCDR3。在某些实施方案中，本文描述了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段，其包含：重链可变区，其包含与SEQ ID NO:511至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；以及轻链可变区，其包含与SEQ ID NO:510至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施方案中，该抗体或抗原结合片段包含 κ 轻链恒定区和IgG1重链恒定区。在某些实施方案中，该抗体或抗原结合片段包含 κ 轻链恒定区和IgG2重链恒定区。

[0078] 在某些实施方案中，本文描述了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段，其包含：重链可变区，其包含：(a) 包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列的HCDR1；(b) 包含由SEQ ID NO:555所示的氨基酸序列的HCDR2；和(c) 包含由SEQ ID NO:566所示的氨基酸序列的HCDR3；以及轻链可变区，其包含：(d) 包含由SEQ ID NO:569所示的氨基酸序列的LCDR1；(e) 包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列的LCDR2；和(f) 包含由SEQ ID NO:572所示的氨基酸序列的LCDR3。在某些实施方案中，本文描述了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段，其包含：重链可变区，其包含与SEQ ID NO:493至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；以及轻链可变区，其包含与SEQ ID NO:492至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施方案中，该抗体或抗原结合片段包含 κ 轻链恒定区和IgG1重链恒定区。在某些实施方案中，该抗体或抗原结合片段包含 κ 轻链恒定区和IgG2重链恒定区。

[0079] 在某些实施方案中，本文描述了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段，其包含：重链可变区，其包含：(a) 包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列的HCDR1；(b) 包含由SEQ ID NO:558所示的氨基酸序列的HCDR2；和(c) 包含由SEQ ID NO:566所示的氨基酸序

列的HCDR3;以及轻链可变区,其包含:(d)包含由SEQ ID NO:569所示的氨基酸序列的LCDR1;(e)包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列的LCDR2;和(f)包含由SEQ ID NO:572所示的氨基酸序列的LCDR3。在某些实施方案中,本文描述了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:501至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:500至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,该抗体或抗原结合片段包含 κ 轻链恒定区和IgG1重链恒定区。在某些实施方案中,该抗体或抗原结合片段包含 κ 轻链恒定区和IgG2重链恒定区。

[0080] 在某些实施方案中,本文描述了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:重链可变区,其包含:(a)包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列的HCDR1;(b)包含由SEQ ID NO:564所示的氨基酸序列的HCDR2;和(c)包含由SEQ ID NO:568所示的氨基酸序列的HCDR3;以及轻链可变区,其包含:(d)包含由SEQ ID NO:569所示的氨基酸序列的LCDR1;(e)包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列的LCDR2;和(f)包含由SEQ ID NO:572所示的氨基酸序列的LCDR3。在某些实施方案中,本文描述了一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:515至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:514至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,该抗体或抗原结合片段包含 κ 轻链恒定区和IgG1重链恒定区。在某些实施方案中,该抗体或抗原结合片段包含 κ 轻链恒定区和IgG2重链恒定区。

[0081] 在某些实施方案中,所述抗TL1A抗体或抗原结合片段包含:重链可变区,其包含来自SEQ ID NO:491、493、495、497、499、501、503、505、507、509、511、513、515、517、519、521、523、525、527、529、531、533、535、537、539或541中任一个的HCDR1、HCDR2和HCDR3;以及轻链可变区,其包含来自SEQ ID NO:490、492、494、496、498、500、502、504、506、508、510、512、514、516、518、520、522、524、526、528、530、532、534、536、538或540中任一个的LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中所述CDR由Kabat方法、IMGT方法、Chothia方法或其组合来定义。在某些实施方案中,所述抗TL1A抗体或抗原结合片段包含:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:491、493、495、497、499、501、503、505、507、509、511、513、515、517、519、521、523、525、527、529、531、533、535、537、539或541中的任一个至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:490、492、494、496、498、500、502、504、506、508、510、512、514、516、518、520、522、524、526、528、530、532、534、536、538或540中的任一个至少约85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0082] 在某些实施方案中,所述抗TL1A抗体或抗原结合片段包含:重链可变区,其包含:(a)与SEQ ID NO:545所示的至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人重链框架区1;(b)包含由SEQ ID NO:484所示的氨基酸序列(DTYMH)的HCDR1;(c)与SEQ ID NO:546所示的至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人重链框架区2;(d)包含由SEQ ID NO:485所示的氨基酸序列(PASGH)的HCDR2;(e)与SEQ ID NO:547或586至588所示的至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人重链框架区3;(f)包含由SEQ ID NO:486所示的氨基酸序列(SGGLPD)的HCDR3;和(g)与SEQ ID NO:548所示的至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人重链框架区4;以及轻链可变区,其包含:(h)与SEQ ID NO:549所示的至少

90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人轻链框架区1; (i) 包含由SEQ ID NO:487所示的氨基酸序列 (ASSSVSYMY) 的LCDR1; (j) 与SEQ ID NO:550所示的至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人轻链框架区2; (k) 包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列 (ATSNLAS) 的LCDR2; (l) 与SEQ ID NO:551所示的至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人轻链框架区3; (m) 包含由SEQ ID NO:489所示的氨基酸序列 (GNPRT) 的LCDR3; 和 (n) 与SEQ ID NO:552所示的至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人轻链框架区4。

[0083] 表1. 示例性抗TL1A抗体

克隆	HC - DNA	HC - 蛋白质	LC - DNA	LC - 蛋白质	鼠 FR 回复突变
[0084] 鼠 5C3D11	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6	NA
鼠 5C3D11 (密码子优化的)	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	NA
嵌合 5C3D11	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	NA
[0085] 12835 (人源化的 5C3D11)	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28	9
18-7 (CDR 移植的 LC)	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38	2
21-3 (CDR 移植的 HC)	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42	2
L8 (CDR 移植物)	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38	0

[0086] 表2. 示例性抗TL1A CDR序列

CDR	SEQ ID NO	序列	定义
[0087] H1	150	GFX ₁ X ₂ X ₃ DX ₄ X ₅ X ₆ H	X ₁ = D 或 E X ₂ = I、L、P 或 V X ₃ = G、Q、S 或 V X ₄ = A、S、T X ₅ = F 或 Y X ₆ = I、L 或 M
H2	12	RX ₁ X ₂ PX ₃ X ₄ X ₅ HX ₆ KX ₇ X ₈ PKFX ₉ X ₁₀	X ₁ = I 或 L X ₂ = D 或 E X ₃ = A 或 E X ₄ = G 或 S X ₅ = A 或 G X ₆ = I、L、T 或 V X ₇ = I、L、M、S、T、V 或 Y X ₈ = D、I、N、R 或 S X ₉ = Q 或 R X ₁₀ = A、D、E、G、H、K、L、M、N、P、R、S、T 或 V
H3	152	X ₁ X ₂ GX ₃ PX ₄ X ₅	X ₁ = L 或 S X ₂ = A 或 G X ₃ = A、L 或 M X ₄ = D 或 E X ₅ = K、M、Q、R、S、T、V 或 W
L1	18	X ₁ ASSSVX ₂ X ₃ X ₄ X ₅	X ₁ = G、R 或 W X ₂ = I 或 S X ₃ = F 或 Y X ₄ = L 或 M
[0088] L2	21	AX ₁ X ₂ X ₃ LX ₄ S	X ₅ = R 或 Y X ₁ = K 或 T X ₂ = E、P 或 S X ₃ = L、N 或 P X ₄ = A 或 T
L3	155	X ₁ QX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ PRX ₆	X ₁ = H、N、Q 或 S X ₂ = F、H、I、P、R、S、W 或 Y X ₃ = D、E、H、N、Q、S 或 V X ₄ = A、D、G、Q 或 S X ₅ = D、F、H、K、L、M、N、Q、R、S 或 T

[0089] 在各个实施方案中,抗TL1A抗体特异性结合相同的TL1A区域,或特异性结合与以下抗体所特异性结合的TL1A区域重叠的TL1A区域,该抗体包含重链和轻链,该重链包含与SEQ ID NO:3至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列,该轻链包含与SEQ ID NO:6至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列。在各个实施方案中,抗TL1A抗体特异性结合相同的TL1A区域,或特异性结合与以下抗体所特异性结合的TL1A区域重叠的TL1A区域,该抗体包含重链和轻链,该重链包含与SEQ ID NO:26至少约90%、92%、95%、98%或

100%相同的序列,该轻链包含与SEQ ID NO:28至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列。在各个实施方案中,抗TL1A抗体特异性结合相同的TL1A区域,或特异性结合与以下抗体所特异性结合的TL1A区域重叠的TL1A区域,该抗体包含重链和轻链,该重链包含与SEQ ID NO:36至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列,该轻链包含与SEQ ID NO:38至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列。在各个实施方案中,抗TL1A抗体特异性结合相同的TL1A区域,或特异性结合与以下抗体所特异性结合的TL1A区域重叠的TL1A区域,该抗体包含重链和轻链,该重链包含与SEQ ID NO:40至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列,该轻链包含与SEQ ID NO:42至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列。在各个实施方案中,抗TL1A抗体特异性结合相同的TL1A区域,或特异性结合与以下抗体所特异性结合的TL1A区域重叠的TL1A区域,该抗体包含重链和轻链,该重链包含与SEQ ID NO:40至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列,该轻链包含与SEQ ID NO:38至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列。在各个实施方案中,抗TL1A抗体特异性结合相同的TL1A区域,或特异性结合与以下抗体所特异性结合的TL1A区域重叠的TL1A区域,该抗体包含重链和轻链,该重链包含与SEQ ID NO:503至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列,该轻链包含与SEQ ID NO:502至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列。在各个实施方案中,抗TL1A抗体特异性结合相同的TL1A区域,或特异性结合与以下抗体所特异性结合的TL1A区域重叠的TL1A区域,该抗体包含重链和轻链,该重链包含与SEQ ID NO:511至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列,该轻链包含与SEQ ID NO:510至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列。在各个实施方案中,抗TL1A抗体特异性结合相同的TL1A区域,或特异性结合与以下抗体所特异性结合的TL1A区域重叠的TL1A区域,该抗体包含重链和轻链,该重链包含与SEQ ID NO:493至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列,该轻链包含与SEQ ID NO:492至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列。在各个实施方案中,抗TL1A抗体特异性结合相同的TL1A区域,或特异性结合与以下抗体所特异性结合的TL1A区域重叠的TL1A区域,该抗体包含重链和轻链,该重链包含与SEQ ID NO:501至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列,该轻链包含与SEQ ID NO:500至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列。在各个实施方案中,抗TL1A抗体特异性结合相同的TL1A区域,或特异性结合与以下抗体所特异性结合的TL1A区域重叠的TL1A区域,该抗体包含重链和轻链,该重链包含与SEQ ID NO:515至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列,该轻链包含与SEQ ID NO:514至少约90%、92%、95%、98%或100%相同的序列。

[0090] 在各个实施方案中,所述抗TL1A抗体或片段对TL1A的结合亲和力为至少约 $1E^{-7}$ 、 $1E^{-8}$ 、 $1E^{-9}$ 、 $1E^{-10}$ 或 $1E^{-11}$ 。在一些情况下,该结合亲和力为约 $1E^{-9}$ 至约 $1E^{-11}$ 。

[0091] 各个实施方案提供了与参考抗体,例如本文所述的任何抗TL1A抗体结合TL1A蛋白或其部分的相同区域的抗TL1A抗体。在一些实施方案中,参考抗体包含SEQ ID NO:150、12和152的重链CDR以及SEQ ID NO:18、21和155的轻链CDR。

[0092] 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结合TL1A蛋白或其部分的相同区域的非限制性方法。示例性实施方案包括竞争测定。例如,所述方法包括确定测试抗体是否可以竞争参考抗体与TL1A蛋白或其部分之间的结合,或者确定参考抗体是否可以竞争测试抗体与TL1A蛋白或其部分之间的结合。示例性方法包括使用表面等离子

体共振来评价抗TL1A抗体是否可以竞争TL1A与另一种抗TL1A抗体之间的结合。在一些情况下,该竞争测定中利用表面等离子体共振。实施例中描述了非限制性方法。

[0093] 本文所述的TL1A抗体与人TL1A的特定区域或表位结合。本文证明了这些区域可用于抑制从T淋巴细胞分泌干扰素 γ 。在某些实施方案中,本文公开了与本文所述的抗体竞争结合TL1A的抗体。在某些实施方案中,本文公开了与本文所述抗体结合TL1A的相同表位的抗体。在某些实施方案中,本文公开了结合与被本文所述抗体所结合的TL1A表位重叠的离散表位的抗体。在某些实施方案中,本文公开了这样的抗体,其结合TL1A的相同表位,与TL1A的表位重叠一个或多个氨基酸残基,或与以下抗体或其片段竞争结合TL1A的表位:该抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:503氨基酸序列的重链可变区;和含有SEQ ID NO:502氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方案中,本文公开了这样的抗体,其结合TL1A的相同表位,与TL1A的表位重叠一个或多个氨基酸残基,或与以下抗体或其片段竞争结合TL1A的表位:该抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:511氨基酸序列的重链可变区;和含有SEQ ID NO:510氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方案中,本文公开了这样的抗体,其结合TL1A的相同表位,与TL1A的表位重叠一个或多个氨基酸残基,或与以下抗体或其片段竞争结合TL1A的表位:该抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:493氨基酸序列的重链可变区;和含有SEQ ID NO:492氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方案中,本文公开了这样的抗体,其结合TL1A的相同表位,与TL1A的表位重叠一个或多个氨基酸残基,或与以下抗体或其片段竞争结合TL1A的表位:该抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:501氨基酸序列的重链可变区;和含有SEQ ID NO:500氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方案中,本文公开了这样的抗体,其结合TL1A的相同表位,与TL1A的表位重叠一个或多个氨基酸残基,或与以下抗体或其片段竞争结合TL1A的表位:该抗体或其片段包含SEQ ID NO:515的氨基酸序列;和含有SEQ ID NO:514氨基酸序列的轻链可变区。

[0094] 产生抗体的方法

[0095] 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,该抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,该抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施方案中,该抗体是抗体片段。例如,该抗体是Fab、scFv或(Fab)₂。在一些实施方案中,该抗体是嵌合抗体。

[0096] 可以通过本领域已知的任何方法来测定本文所述抗体的特异性结合。可以使用的免疫测定包括但不限于使用诸如BIAcore分析、FACS分析、免疫荧光、免疫细胞化学、Western印迹法、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、补体固定测定、免疫放射测定、荧光免疫测定和蛋白A免疫测定等技术的竞争和非竞争测定系统。这类测定例如在Ausubel等人编,1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1, John Wiley&Sons, Inc., New York中提供。

[0097] 在各个实施方案中,所述抗TL1A抗体是TL1A受体的拮抗剂,例如但不限于DR3和TR6/DcR3。在某些实施方案中,该抗体抑制所结合的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%。在某些实施方案中,如通过人血中的干扰素 γ 释放所测量的,该抗体抑制TL1A活化。在某些实施方案中,该抗体以约1纳摩尔至约100皮摩尔的IC₅₀抑制人血中干扰素 γ 的释放。在某些实施方案

中,该抗体以约500皮摩尔至约100皮摩尔的 IC_{50} 抑制人血中干扰素 γ 的释放。在某些实施方案中,该抗体以约500皮摩尔的 IC_{50} 抑制人血中干扰素 γ 的释放。在某些实施方案中,该抗体以约250皮摩尔的 IC_{50} 抑制人血中干扰素 γ 的释放。

[0098] 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,例如但不限于杂交瘤方法,其中如上所述对宿主动物进行免疫,以引发淋巴细胞产生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所选抗原的单克隆抗体。当在体外或体内增殖时,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。

[0099] 在一些实施方案中,使用如美国专利4,816,567中描述的重组DNA方法制备单克隆抗体。从成熟B细胞或杂交瘤细胞中分离出编码单克隆抗体的多核苷酸。然后将分离的编码重链和轻链的多核苷酸克隆到合适的表达载体中,所述载体在被转染到宿主细胞(例如,大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞)中时生成单克隆抗体。可以使用重组DNA技术以多种不同方式进一步修饰编码单克隆抗体的多核苷酸,以生成备选抗体。

[0100] 在各个实施方案中,可以生成嵌合抗体,即其中不同部分来源于不同动物物种的分子,例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)。嵌合抗体可以使用多种技术来产生,例如Morrisson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)中阐述的技术。

[0101] 在一些实施方案中,所述抗TL1A单克隆抗体是人源化抗体,以便在施用于人类受试者时降低抗原性和HAMA(人抗小鼠抗体)应答。可以使用本领域已知的多种技术来产生人源化抗体。例如,通过以下步骤使抗体人源化:(1)确定起始抗体轻链和重链可变域的核苷酸和预测的氨基酸序列;(2)设计人源化抗体,例如,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;和(4)人源化抗体的转染和表达(参见,例如,美国专利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,同时保持功能活性,以用于人类治疗。

[0102] 也可以在含有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中制备人源化抗体,该基因座能够在免疫后在不产生内源性免疫球蛋白的情况下产生人抗体的全部组库(repertoire)。该方法描述于美国专利5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016。人源化抗体还可以通过新型遗传工程方法获得,该方法能够在大型动物,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6,632,976)。

[0103] 可以通过首先设计包含嵌入人源框架序列中的非人源,例如啮齿类动物来源的CDR的可变区氨基酸序列来创建完全人源化的抗体。非人CDR提供所需的特异性。因此,在一些情况下,这些残基基本上未改变地包含在重塑的可变区的设计中。因此,在一些情况下,应将修饰限制在最低限度,并密切关注抗体特异性和亲和力的变化。另一方面,理论上框架残基可以来源于任何人类可变区。应当选择人类框架序列,其同样适合于创建重塑的可变区并保持抗体亲和力,以便创建显示出可接受的或甚至改善的亲和力的重塑抗体。人类框架可以是种系起源的,或者可以衍生自非种系(例如突变的或亲和力成熟的)序列。本领域技术人员公知的遗传工程技术,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、杂合杂交瘤、B细胞无限增殖化和克隆、单细胞RT-PCR或HuRAb技术,可用来生成具有包含人类框架和非人类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5,861,155,美国专利6,479,284,美国专利6,407,213,美国专利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))。

[0104] 在某些实施方案中,所述抗TL1A抗体是人抗体。可以使用本领域已知的多种技术直接制备人抗体。可以生成在体外免疫或从免疫个体中分离的、产生针对靶抗原的抗体的无限增殖化人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;和美国专利5,750,373)。人抗体可以从噬菌体文库中选择。抗体噬菌体文库的生成和使用技术描述于美国专利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。

[0105] 嵌合、人源化和人抗体可以通过重组表达来产生。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,包括天然关联的或异源的启动子区域。在某些实施方案中,可能希望生成这些人源化抗体的氨基酸序列变体,特别是在这些改善抗体的结合亲和力或其他生物学性质的情况下。

[0106] 在某些实施方案中,抗体片段用来治疗和/或改善IBD。产生抗体片段的各种技术是已知的。通常,这些片段是通过完整抗体的蛋白水解消化而衍生的(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抗体片段都可以在大肠杆菌或其他宿主细胞中表达以及从中分泌,从而允许产生大量这些片段。产生抗体片段的其他技术对熟练技术人员来说将是显而易见的。

[0107] 根据本公开,可以改变技术以适应于产生TL1A特异性的单链抗体(参见,例如,美国专利号4,946,778)。另外,可以改变方法以适应于Fab表达文库的构建(参见例如Huse等人,Science 246:1275-1281(1989)),以允许快速有效地鉴定对TL1A具有所需特异性的单克隆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的技术产生,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片段的二硫键生成的Fab片段,(c)通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子生成的Fab片段,和(d)Fv片段。

[0108] 本文还提供了包含任何类型的可变区的修饰抗体,该可变区提供该抗体与TL1A的缔合。本领域技术人员将会理解,修饰抗体可包含这样的抗体(例如,全长抗体或其免疫反应性片段),其中一个或多个恒定区结构域的至少一部分已经缺失或以其他方式改变,以提供所需的生物化学特性,例如减少TL1A。在某些实施方案中,重链和轻链中的可变区均被改变,方法是通过至少部分替换一个或多个CDR,并且如果必要,通过部分框架区替换和序列改变。在一些实施方案中,替换的CDR可以衍生自相同类别、亚类的抗体,衍生自不同类别的抗体,例如衍生自来自不同物种的抗体,和/或其组合。在一些实施方案中,修饰抗体的恒定区将包含人恒定区。与本公开相容的恒定区的修饰包括在一个或多个结构域中一个或多个氨基酸的添加、缺失或置换。

[0109] 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在原核或真核细胞中发生。合适的宿主包括细菌或真核宿主,包括体内或原位的酵母、昆虫、真菌、鸟类和哺乳动物细胞,或哺乳动物、昆虫、鸟类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、啮齿类动物、牛、猪、绵羊、马、山羊、狗或猫来源的,但是可以使用其他任何哺乳动物细胞。在其他实施方案中,本文所述的抗体或其抗原片段可以被转染到宿主中。

[0110] 在一些实施方案中,将表达载体转染到接受细胞系中,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质的宿主,其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 (CruCell);和NS0细胞。在一些实施方案中,特定的真核宿主细胞基于其对重链和/或轻链进行所需翻译后修饰的能力来选择。

[0111] 在本领域中已经开发了许多能够分泌完整异源蛋白质的合适的宿主细胞系,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。

[0112] 根据细胞宿主的类型,可以通过多种合适的手段中的任一种,包括但不限于本领域普通技术人员已知的转化、转染、脂质转染、缀合、电穿孔、直接显微注射和微粒轰击,将携带本文所述的嵌合、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引入合适的宿主细胞中。用于这些细胞的表达载体可包含表达控制序列,如复制起点、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、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。

[0113] 在各个实施方案中,酵母也可以用作宿主,以供产生本文所述的抗体分子或肽。在各个其他实施方案中,细菌菌株也可以用作宿主,以供产生本文所述的抗体分子或肽。细菌菌株的实例包括但不限于大肠杆菌、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的种、肠杆菌属 (*enterobacteria*) 和各种假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的种。

[0114] 在一些实施方案中,本文所述的一种或多种抗体或其抗原结合片段可以根据任何合适的方法,在已经被工程改造 (转基因) 或用一种或多种编码所述多肽的核酸分子转染的动物体内产生。为了产生转基因动物,可将转基因显微注射到受精卵母细胞中,或者可将其引入胚胎干细胞的基因组中,并将这类细胞的核转移到去核卵母细胞中。一旦表达,就可以按照本领域的标准程序纯化抗体,包括HPLC纯化、柱色谱法、凝胶电泳等 (一般参见Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982))。

[0115] 一旦在宿主中表达,本公开的完整抗体、抗体片段 (例如,单个轻链和重链) 或其他免疫球蛋白形式可以通过已知技术回收并纯化,例如免疫吸附或免疫亲和色谱法、色谱方法如HPLC (高效液相色谱法)、硫酸铵沉淀、凝胶电泳或这些方法的任意组合。一般参见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,尤其用于制药用途。一旦部分纯化或纯化到所需的同质性,人源化抗体或复合人抗体然后可以治疗性地使用,或用于开发和进行测定程序、免疫荧光染色等。一般参见 *Immunol. Meth.* (Lefkovits&Pernis编著, Acad. Press, NY, 1979和1981) 的第I卷和第II卷。

[0116] 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,其可以适合于表达所编码的抗TL1A抗体或片段。可以将遗传构建体在并入或不并入载体中的情况下引入宿主细胞中。例如,可以将遗传构建体并入脂质体或病毒颗粒内。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到宿主细胞中。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将遗传构建体直接引入宿主受试者的细胞中。

[0117] 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。该重组载体可以是质粒、粘粒或噬菌体。该重组载体可包括其他功能元件;例如,合适的启动子以启动基因表达。

[0118] 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。

[0119] 各种宿主系统也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,以及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的元件,如复制起点,与待表达的基因连接的合适的启动子和增强子,以及其他5'或3'侧翼非转录序列,以及5'或3'非翻译序列,如必要的核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点以及转录终止序列。

[0120] 可以根据任何合适的方法纯化由转化的宿主产生的蛋白质。这类标准方法包括色谱法(例如,离子交换色谱法、亲和色谱法和大小柱色谱法)、离心、差异溶解度或通过用于蛋白质纯化的其他任何标准技术。可以将亲和和标签如六组氨酸、麦芽糖结合域、流感外壳序列和谷胱甘肽-S-转移酶附接到蛋白质上,以使其易于通过合适的亲和柱纯化。分离的蛋白质还可以使用诸如蛋白水解、核磁共振和X射线晶体学等技术进行物理表征。可以分离在细菌培养物中产生的重组蛋白。纯化抗体和其他蛋白质的本领域已知方法还包括,例如,美国专利公开2008/0177048和2009/0187005中描述的那些。

[0121] 技术人员将会认识到,对核酸、肽、多肽或蛋白质序列进行个别的置换、缺失或添加,以改变编码序列中的一个氨基酸或一小部分氨基酸,是一种“保守修饰的变体”,其中的改变导致氨基酸被化学上相似的氨基酸所置换,并保留特异性结合靶抗原的能力。这类保守修饰的变体是与本公开一致的多态性变体、种间同源体和等位基因的补充,并且不排除它们。

[0122] 可以将给定的氨基酸替换为具有相似理化特性的残基,例如,用一个脂肪族残基置换另一个(例如He、Val、Leu或Ala彼此置换),或者用一个极性残基置换另一个(例如在Lys与Arg之间;Glu与Asp之间;或Gln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,是众所周知的。可以在本文所述的任何一种测定中测试包含保守性氨基酸置换的多肽,以证实天然或参考多肽的所需活性例如抗原结合活性和特异性得到保留。

[0123] 具体的保守置换包括,例如:Ala置换为Gly或置换为Ser;Arg置换为Lys;Asn置换为Gln或置换为His;Asp置换为Glu;Cys置换为Ser;Gln置换为Asn;Glu置换为Asp;Gly置换为Ala或置换为Pro;His置换为Asn或置换为Gln;Ile置换为Leu或置换为Val;Leu置换为Ile或置换为Val;Lys置换为Arg、置换为Gln或置换为Glu;Met置换为Leu、置换为Tyr或置换为Ile;Phe置换为Met、置换为Leu或置换为Tyr;Ser置换为Thr;Thr置换为Ser;Trp置换为Tyr;

Tyr置换为Trp;和/或Phe置换为Val、置换为Ile或置换为Leu。

[0124] 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的序列的变体,例如抗体多肽的保守置换变体。在一些实施方案中,该变体是保守修饰的变体。变体可指与天然或参考多肽基本同源的多肽,但是由于一个或多个缺失、插入或置换而具有与天然或参考多肽的氨基酸序列不同的氨基酸序列。编码变体多肽的DNA序列包括这样的序列,与天然或参考DNA序列相比,该序列包含核苷酸的一个或多个添加、缺失或置换,但是编码保留针对相关目标多肽的活性例如抗原特异性结合活性的变体蛋白质或其片段。

[0125] 天然氨基酸序列的改变可以通过本领域技术人员已知的多种技术中的任何技术来完成。可以在特定基因座处或通过寡核苷酸引导的位点特异性诱变程序引入突变。进行这类改变的技术已经非常完善,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);和美国专利4,518,584和4,737,462所公开的那些。

[0126] 通过本领域已知的多种方法来制备编码抗体的氨基酸序列变体的核酸分子。这些方法包括但不限于通过对先前制备的抗体变体或非变体形式进行寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR诱变和盒式诱变来制备。可以根据常规技术将编码至少一种本文所述的抗体、部分或多肽的核酸序列与载体DNA重组,所述常规技术包括但不限于用于连接的平端或交错末端和限制酶消化。此类操作的技术公开于,例如,Maniatis等人,Molecular Cloning,Lab.Manual(Cold Spring Harbor Lab.Press,NY,1982和1989),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。

[0127] 在一些实施方案中,编码本文所述的抗体或其抗原结合片段的核酸由载体包含。在本文所述的一些方面中,将编码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可操作地连接至载体。如本文所用的术语“载体”是指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。如本文所用的,载体可以是病毒载体或非病毒载体。术语“载体”涵盖当与适当的控制元件缔合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。载体可以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。

[0128] 如本文所用的,术语“表达载体”是指指导从载体上与转录调节序列连接的序列表达RNA或多肽的载体。术语“表达”是指涉及产生RNA和蛋白质以及适当时分泌蛋白质的细胞过程,在适用时包括但不限于例如转录、转录物加工、翻译和蛋白质折叠、修饰和加工。“表达产物”包括从基因转录的RNA和通过从基因转录的mRNA的翻译获得的多肽。术语“基因”是指当可操作地连接至合适的调节序列时,在体外或体内转录(DNA)为RNA的核酸序列。该基因可以包括或不包括编码区之前和之后的区域,例如,5'非翻译(5'UTR)或“前导”序列和3'UTR或“尾随”序列,以及各个编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

[0129] 如本文所用的,术语“病毒载体”是指核酸载体构建体,其包含至少一个病毒来源的元件并且具有被包装到病毒载体颗粒中的能力。病毒载体可包含编码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。可以将载体和/或颗粒用于在体外或体内将任何核酸转移到细胞中的目的。多种形式的病毒载体是本领域已知的。

[0130] 所谓“重组载体”意指该载体包含能够在体内表达的异源核酸序列或“转基因”。

[0131] 药物组合物、给药和剂量

[0132] 提供的抗TL1A抗体可用于多种应用,包括但不限于治疗性处理方法,如IBD的治疗。所述使用方法可以是体外、离体或体内方法。在某些实施方案中,该抗TL1A抗体是TL1A受体的拮抗剂。

[0133] 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。

[0134] 在各个实施方案中,所述药物组合物被配制用于通过任何给药途径递送。“给药途径”可指本领域已知的任何给药途径,包括但不限于气雾剂、经鼻、口服、经粘膜、经皮或肠胃外。

[0135] “经皮”给药可以使用局部乳膏或软膏或借助于透皮贴剂来完成。

[0136] “肠胃外”是指通常与注射有关的给药途径,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、包膜下、皮下、经粘膜或经气管。通过肠胃外途径,组合物可以是用于输注或注射的溶液或混悬液形式,或者是冻干粉末。

[0137] 通过肠途径,药物组合物可以是片剂、凝胶胶囊、糖衣片剂、糖浆、混悬液、溶液、粉末、颗粒、乳剂、微球或纳米球或脂质囊泡或聚合物囊泡的形式,从而允许控制释放。

[0138] 通过局部途径,药物组合物被配制用于治疗皮肤和粘膜,并且是软膏、乳膏、乳剂、药膏、粉末、浸渍垫、溶液、凝胶、喷雾剂、洗剂或混悬剂的形式。它们也可以是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,从而允许控制释放。根据临床适应症,这些局部途径组合物可以是无水形式或含水形式。

[0139] 通过眼部途径,它们可以是滴眼剂的形式。

[0140] 在各个实施方案中,药剂可通过注射或通过随时间逐渐输注而静脉内施用。给定用于给定途径的适当制剂,例如,可用于本文所述方法和组合物中的试剂可以通过静脉内,鼻内,通过吸入,腹膜内,肌内,皮下,腔内给药,并且如果需要,可以通过蠕动方式或通过本领域技术人员已知的其他方式递送。在特定的实施方案中,本文使用的化合物经口服、静脉内或肌肉内施用于IBD、CD、UC和/或MR-UC患者。

[0141] 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”是指在将目的化合物从一个组织、器官或身体部分携带或转运至另一个组织、器官或身体部分中所涉及的药学上可接受的材料、组合物或媒介物。例如,该载体可以是液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料或其组合。该载体的每个组分必须是“药学上可接受的”,因为它必须与制剂的其他成分相容。它也必须适用于接触任何可能与之接触的组织或器官,这意味着它一定不能带有毒性、刺激性、变态反应、免疫原性或远远超过其治疗益处的其他任何并发症的风险。

[0142] 在各个实施方案中,提供了包含药学上可接受的赋形剂以及治疗有效量的抗TL1A抗体的药物组合物。“药学上可接受的赋形剂”意指可用于制备药物组合物的通常是安全的、无毒的且理想的赋形剂,并且包括针对兽医应用以及人类药学应用可接受的赋形剂。活性成分可以与药学上可接受的且与活性成分相容的赋形剂混合,并且其量适合用于本文所述的治疗方法。这样的赋形剂可以是固体、液体、半固体,或者在气雾剂组合物的情况下是气态的。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、聚山梨酸酯等及其组合。另外,如果需要,所述组合物可以含有少量辅助物质,如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂等,它们增强或维持活性成分的有效性。本文所述的治疗性组合物可包含药学上可接受的盐。药学上可接受的盐包括与无机酸如盐酸或磷酸形成的酸加成盐,与有机酸如乙酸、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。液体组合物还可包含除水以外的液相,例如甘油、植物油如棉籽油和油包水乳剂,该组合物包含水以及不包含水。生理上可耐受的载体是本领域公知的。在特定病症或病况的治疗中有效的活性剂(即抗体或其片段)的使用量将取决于该病症或病况的性质,并且可以由本领域技术人员通过标准临床技术来确定。

[0143] 所述药物组合物也可以包封、制片或制备为用于口服给药的乳剂或糖浆。可以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、酒精和水。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。该载体还可以包括单独的或与蜡一起的持续释放材料,如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0144] 药物制品按照常规制药技术来制备,对于片剂形式,该技术包括研磨、混合、造粒以及必要时的压制;或者对于硬明胶胶囊形式,包括研磨、混合和填充。当使用液体载体时,该制品将为糖浆、酞剂、乳剂或水性或非水性混悬液的形式。这样的液体制剂可以直接口服施用或者填充至软明胶胶囊中。

[0145] 所述药物组合物可以以治疗有效量进行递送。精确的治疗有效量是在给定受试者中的治疗效果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,这些因素包括但不限于治疗性化合物的特性(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)、制剂中的一种或多种药学上可接受的载体的性质以及给药途径。临床和药理学领域的技术人员将能够通过常规实验,例如通过监测受试者对化合物给药的反应并相应地调整剂量来确定治疗有效量。关于其他指导,参见Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro编,第20版,Williams&Wilkins PA,USA) (2000)。

[0146] 有效的抗TL1A抗体的典型剂量可以通过体外反应或在动物模型中的反应提供给技术人员。这样的剂量通常可以在浓度或量上减少至多约一个数量级,而不丧失相关的生物学活性。因此,实际剂量将取决于医师的判断、患者的状况以及治疗方法的有效性,例如基于相关原代培养细胞或组织培养的组织样品如获得的生物样品的体外反应性,或者基于在适当动物模型中观察到的反应。

[0147] 对于疾病的治疗,抗体的适当剂量取决于待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和病程、疾病的反应性、施用抗体是用于治疗目的还是预防目的、既往治疗以及患者的临床病史。在发生任何并发症的情况下,根据主治医师的考量,也可以由单独的医生调整剂量。用药医师可以确定最佳剂量、给药方法和重复频率。TL1A抗体可以一次性施用或在持续数天至数月的一系列治疗期间施用,或施用到实现治愈或达到疾病状态减轻(例如,IBD的治疗或改善)。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性。在某些实施方案中,剂量是每kg体重0.01 μ g至100mg,并且可以每天一次或多次、每周、每月或每年给予。对

于全身给药,可以向受试者施用治疗量,例如,约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。在某些实施方案中,治疗量选自作为平稳剂量施用的约1、3、10、30、100、300、600和800毫克。在某些实施方案中,治疗量是作为平稳剂量施用的约1、2、3、4、5、6、7、8或9毫克。在某些实施方案中,治疗量是作为平稳剂量施用的约10、20、30、40、50、60、70、80或90毫克。在某些实施方案中,治疗量是作为平稳剂量施用的约100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850或900毫克。在某些实施方案中,治疗量为约5至约30毫克/千克。在某些实施方案中,治疗量为约5至约30毫克/千克,每周或每隔一周给药。在某些实施方案中,治疗量为约5、10、15、20、25或30毫克/千克。在某些实施方案中,治疗量为约5、10、15、20、25或30毫克/千克,每周或每隔一周给药。

[0148] 治疗方法

[0149] 各个实施方案提供了治疗炎性肠病 (IBD) 的方法,其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,该受试者包括一种或多种风险基因型。在一些实施方案中,该IBD是IBD的严重形式。IBD的严重形式的特征可在于本文所述的亚临床表型。

[0150] 在各个实施方案中,本文提供了一种在有需要的受试者中治疗炎性肠病 (IBD) 的方法,其包括:向该受试者施用治疗有效量的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体包含HCFR1,该HCFR1包含SEQ ID NO:545,或与SEQ ID NO:545相差最多约5、4、3或2个氨基酸的序列。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体包含HCDR1,该HCDR1选自SEQ ID NO:9、150、484和553,或与选自SEQ ID NO:9、150、484和553的序列相差最多约5、4、3或2个氨基酸的序列。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体包含HCFR2,该HCFR2包含SEQ ID NO:546,或与SEQ ID NO:546相差最多约5、4、3或2个氨基酸的序列。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体包含HCDR2,该HCDR2选自SEQ ID NO:12、554至564和574至577,或与选自SEQ ID NO:12、554至564和574至577的序列相差最多约5、4、3或2个氨基酸的序列。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体包含HCFR3,该HCFR3包含选自SEQ ID NO:547和586至588的序列,或与选自SEQ ID NO:547和586至588的序列相差最多约5、4、3或2个氨基酸的序列。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体包含HCDR3,该HCDR3选自SEQ ID NO:15、152、565至568和578至581,或与选自SEQ ID NO:15、152、565至568和578至581的序列相差最多约5、4、3或2个氨基酸的序列。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体包含HCFR4,该HCFR4包含SEQ ID NO:548,或与SEQ ID NO:548相差最多约5、4、3或2个氨基酸的序列。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体包含LCFR1,该LCFR1包含SEQ ID NO:549,或与SEQ ID NO:549相差最多约5、4、3或2个氨基酸的序列。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体包含LCDR1,该LCDR1选自SEQ ID NO:487、569和570,或与SEQ ID NO:487、569和570相差最多约5、4、3或2个氨基酸的序列。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体包含LCFR2,该LCFR2包含SEQ ID NO:550,或与SEQ ID NO:550相差最多约5、4、3或2个氨基酸的序列。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体包含LCDR2,该LCDR2包含SEQ ID NO:488,或与SEQ ID NO:488相差最多约5、4、3或2个氨基酸的序列。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体包含LCFR3,该LCFR3包含SEQ ID NO:551,或与SEQ ID NO:551相差最多约5、4、3或2个氨基酸的序列。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体包含LCDR3,该LCDR3选自SEQ ID NO:571至573和582至585,或与选自SEQ ID

N0:571至573和582至585的序列相差最多约5、4、3或2个氨基酸的序列。在一些实施方案中,所述抗TL1A抗体包含LCFR4,该LCFR4包含SEQ ID N0:552,或与SEQ ID N0:552相差最多约5、4、3或2个氨基酸的序列。

[0151] 本文公开的受试者可以是哺乳动物,例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、非人灵长类动物或农场动物。在一些情况下,该受试者是人。在一些情况下,该受试者是被诊断出患有IBD的患者。在一些情况下,该受试者未被诊断出患有IBD。在一些情况下,该受试者罹患与本文公开的疾病或病况有关的症状(例如,腹痛、绞痛、腹泻、直肠出血、发热、体重减轻、疲劳、食欲不振、脱水和营养不良、贫血或溃疡)。

[0152] 在各个实施方案中,受试者对于抗TNF疗法(例如,阿达木单抗、赛妥珠单抗、依那西普、戈利木单抗、英夫利昔单抗)的诱导无反应(抗TNF无反应),或者在治疗期间的一段时间后失去对所述抗TNF疗法的反应(抗TNF反应丧失)。在各个实施方案中,受试者处于发展为抗TNF无反应或抗TNF反应丧失的风险中。在一些实施方案中,通过向受试者施用本文公开的抗TL1A抗体来治疗该受试者,条件是该受试者处于发展为抗TNF无反应或抗TNF反应丧失的风险中或者已经是抗TNF无反应或抗TNF反应丧失的。

[0153] 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,治疗有效量的抗TL1A抗体的施用导致所治疗的受试者中的TL1A减少。

[0154] 本文公开的方法提供了通过向受试者施用本文所述的抗TL1A抗体来治疗受试者的炎性肠病(IBD)的方法。在各个实施方案中,IBD是克罗恩病(CD)或溃疡性结肠炎(UC)。在一些实施方案中,该IBD是IBD的严重形式。在一些实施方案中,该IBD的严重形式的特征在于亚临床表型。在一些实施方案中,该IBD是IBD的中度至重度形式。在一些实施方案中,该IBD是IBD的中度形式。

[0155] IBD的亚临床表型可包括但不限于非狭窄、狭窄、狭窄和穿透,以及孤立的内部穿透性疾病和肛周CD(pCD)。狭窄是肠的进行性变窄。内部穿透性疾病在肠与其他结构之间创建了异常通道(瘘管)。pCD是克罗恩病的一种形式,其引起肛门周围的炎症。

[0156] 所述IBD可以是难治性的。如本文所用的术语“医学上难治性的”或“难治性的”是指标准治疗无法诱导疾病的缓解。在一些实施方案中,该疾病包括本文公开的炎性疾病。难治性炎性疾病的非限制性实例包括难治性克罗恩病和难治性溃疡性结肠炎(例如,mrUC)。标准治疗的非限制性实例包括糖皮质激素、抗TNF疗法、抗a4-b7疗法(维多珠单抗(vedolizumab))、抗IL12p40疗法(乌司奴单抗(ustekinumab))、沙利度胺和细胞毒素。在一些实施方案中,该UC是医学难治性UC(mrUC)。在一些实施例中,该CD是难治性的。

[0157] 本文公开了向有需要的受试者施用抗TL1A抗体的方法。在各个实施方案中,该抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,该抗体是人抗体。在各个实施方案中,该抗体是人源化抗体。在各个实施方案中,该抗体是中和抗体。

[0158] 在各个方面,将抗TL1A抗体施用于受试者以供治疗本文所述的IBD。在各个其他实施方案中,在一系列治疗中施用抗TL1A抗体。在一些实施方案中,可以以任何顺序或同时施用抗TL1A抗体和第二IBD治疗。在选定的实施方案中,将抗TL1A抗体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治疗将基本上同时或并行施用。例如,可以在对受试者进行第二IBD治疗的治疗过程中给予该受试者抗TL1A抗体。在某些实施方案中,抗TL1A抗体将在第二IBD治疗的1年内施用。在某些备选实施方案

中,抗TL1A抗体将在采用第二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抗体将在采用第二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抗体将在采用第二IBD治疗的任何治疗的5、4、3、2或1天内施用。应进一步理解,可在大约数小时或数分钟内(即,同时)将两种治疗施用于受试者。

[0159] 其他IBD治疗包括但不限于1) 抗炎药(例如,氨基水杨酸盐,例如但不限于柳氮磺胺吡啶Azulfidine,5-氨基水杨酸盐,美沙拉嗪、Asacol、Lialda、Rowasa、Canasa,巴柳氮Colazal,和奥沙拉嗪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,巯嘌呤Purinethol、Purixan,环孢菌素、Gengraf、Neural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),氨甲蝶呤、Rheumatrex,那他珠单抗、Tysabri,维多珠单抗、Entyvio,乌司奴单抗和Stelara);4) 抗生素(例如,甲硝唑、Flagyl,环丙沙星、Cipro);5) 止泻药(例如,纤维补充剂-Metamucil或Citrucel)或洛哌丁胺;6) 止痛药(例如,Tylenol、布洛芬、萘普生钠和双氯芬酸钠);以及7) 手术(例如,结肠切除、消化道部分切除、结肠切除术、直肠结肠切除术和/或狭窄成形术)。在一些实施方案中,这些IBD治疗可以与抗TL1A抗体联合施用。采用抗体的治疗可以在施用IBD治疗之前、同时或之后进行。联合施用可包括以单一药物制剂或使用分开的制剂进行共同施用,或以任一顺序连续施用,但通常在一段时间内进行,以使得所有活性剂可同时发挥其生物活性。也可以如熟练技术人员所确定的,使用用于这类IBD治疗的任何给药时间表。

[0160] 在一些实施方案中,第二IBD治疗包含抗体。因此,治疗可涉及将本文提供的抗体与针对另外的IBD相关抗原(例如但不限于肿瘤坏死因子(TNF)- α)的其他抗体联合施用。联合施用可包括以单一药物制剂或使用分开的制剂进行共同施用,或以任一顺序连续施用,但通常在一段时间内进行,以使得所有活性剂可同时发挥其生物活性。

[0161] 试剂盒

[0162] 进一步提供了用于治疗IBD(例如,CD、UC和/或mrUC)的试剂盒。该试剂盒包含可用于执行本文所述方法的本文所述的抗体。该试剂盒可用于实施通过施用抗TL1A抗体为IBD、CD、UC和/或mrUC患者提供治疗的本发明的方法。该试剂盒是材料或组分的集合,包括至少一种本发明的组合物。因此,在一些实施方案中,该试剂盒包含如上所述用于治疗IBD、CD、UC和/或MR-UC的包含抗TL1A抗体的组合物。在其他实施方案中,该试剂盒包含对TL1A进行检测测定所必需的和/或足以进行该检测测定的所有组分,包括所有对照、关于进行测定的指导以及用于分析和呈现结果的任何必要软件。

[0163] 本发明试剂盒中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,该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,该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,该试剂盒被配置用于兽医应用,从而治疗受试者,诸如但不限于农场动物、家养动物和实验室动物。

[0164] 所述试剂盒中可包含使用说明书。“使用说明书”通常包括描述在使用试剂盒的组分来实现所需结果(例如治疗或缓解IBD、CD、UC和/或MR-UC)中所采用的技术的有形表示。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、包扎材料或本领域技术人员容易认识到的其他有用的

用具。

[0165] 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且合适的方式提供给从业者。例如,所述组分可以是溶解的、脱水的或冻干的形式;它们可以在室温、冷藏或冷冻温度下提供。这些组分通常包含在合适的包装材料中。如本文所用的,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个或多个物理结构。通过公知的方法构建包装材料,以优选地提供无菌、无污染的环境。试剂盒中采用的包装材料是在基因表达试验中和治疗施用中惯常使用的那些包装材料。如本文所用的,术语“包装”是指能够容纳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,包装可以是玻璃小瓶或预填充注射器,其用来容纳适量的包含抗TL1A抗体和/或针对TL1A的引物和探针的本发明组合物。包装材料通常具有指示试剂盒的内容物和/或目的和/或其组分的外部标签。

[0166] 本发明提供了包括但不限于以下实施方式:

[0167] 1. 一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:

[0168] 重链可变区,其包含:

[0169] (g) 包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列的HCDR1;

[0170] (h) 包含由SEQ ID NO:554至564或574至577中任一个所示的氨基酸序列的HCDR2;
和

[0171] (i) 包含由SEQ ID NO:565至568或578至581中任一个所示的氨基酸序列的HCDR3;
以及

[0172] 轻链可变区,其包含:

[0173] (j) 包含由SEQ ID NO:569或570中任一个所示的氨基酸序列的LCDR1;

[0174] (k) 包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列的LCDR2;和

[0175] (l) 包含由SEQ ID NO:571至573或582至585中任一个所示的氨基酸序列的LCDR3。

[0176] 2. 根据实施方式1所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中:

[0177] (a) 所述HCDR1包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列;

[0178] (b) 所述HCDR2包含由SEQ ID NO:559所示的氨基酸序列;

[0179] (c) 所述HCDR3包含由SEQ ID NO:567所示的氨基酸序列;

[0180] (d) 所述LCDR1包含由SEQ ID NO:569所示的氨基酸序列;

[0181] (e) 所述LCDR2包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列;并且

[0182] (f) 所述LCDR3包含由SEQ ID NO:573所示的氨基酸序列。

[0183] 3. 根据实施方式1所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中:

[0184] (a) 所述HCDR1包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列;

[0185] (b) 所述HCDR2包含由SEQ ID NO:563所示的氨基酸序列;

[0186] (c) 所述HCDR3包含由SEQ ID NO:568所示的氨基酸序列;

[0187] (d) 所述LCDR1包含由SEQ ID NO:569所示的氨基酸序列;

[0188] (e) 所述LCDR2包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列;并且

[0189] (f) 所述LCDR3包含由SEQ ID NO:572所示的氨基酸序列。

[0190] 4. 根据实施方式1所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中:

[0191] (a) 所述HCDR1包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列;

- [0192] (b) 所述HCDR2包含由SEQ ID NO:555所示的氨基酸序列;
- [0193] (c) 所述HCDR3包含由SEQ ID NO:566所示的氨基酸序列;
- [0194] (d) 所述LCDR1包含由SEQ ID NO:569所示的氨基酸序列;
- [0195] (e) 所述LCDR2包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列;并且
- [0196] (f) 所述LCDR3包含由SEQ ID NO:572所示的氨基酸序列。
- [0197] 5. 根据实施方式1所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中:
- [0198] (a) 所述HCDR1包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列;
- [0199] (b) 所述HCDR2包含由SEQ ID NO:558所示的氨基酸序列;
- [0200] (c) 所述HCDR3包含由SEQ ID NO:566所示的氨基酸序列;
- [0201] (d) 所述LCDR1包含由SEQ ID NO:569所示的氨基酸序列;
- [0202] (e) 所述LCDR2包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列;并且
- [0203] (f) 所述LCDR3包含由SEQ ID NO:572所示的氨基酸序列。
- [0204] 6. 根据实施方式1所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中:
- [0205] (a) 所述HCDR1包含由SEQ ID NO:553所示的氨基酸序列;
- [0206] (b) 所述HCDR2包含由SEQ ID NO:564所示的氨基酸序列;
- [0207] (c) 所述HCDR3包含由SEQ ID NO:568所示的氨基酸序列;
- [0208] (d) 所述LCDR1包含由SEQ ID NO:569所示的氨基酸序列;
- [0209] (e) 所述LCDR2包含由SEQ ID NO:488所示的氨基酸序列;并且
- [0210] (f) 所述LCDR3包含由SEQ ID NO:572所示的氨基酸序列。
- [0211] 7. 一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:重链可变区,其包含:
- [0212] (c) 选自SEQ ID NO:491、493、495、497、499、501、503、505、507、509、511、513、515、517、519、521、523、525、527、529、531、533、535、537、539或541中任一个的HCDR1、HCDR2和HCDR3;以及
- [0213] 轻链可变区,其包含
- [0214] (d) 选自SEQ ID NO:490、492、494、496、498、500、502、504、506、508、510、512、514、516、518、520、522、524、526、528、530、532、534、536、538或540中任一个的LCDR1、LCDR2和LCDR3;
- [0215] 其中所述CDR由Kabat、Chothia或IMGT方法或其组合来定义。
- [0216] 8. 根据实施方式1至7中任一项所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:
- [0217] (a) 与SEQ ID NO:545所示的至少95%相同的人重链框架区1;
- [0218] (b) 与SEQ ID NO:546所示的至少95%相同的人重链框架区2;
- [0219] (c) 与SEQ ID NO:547或586至588所示的至少95%相同的人重链框架区3;
- [0220] (d) 与SEQ ID NO:548所示的至少95%相同的人重链框架区4;
- [0221] (e) 与SEQ ID NO:549所示的至少95%相同的人轻链框架区1;
- [0222] (f) 与SEQ ID NO:550所示的至少95%相同的人轻链框架区2;
- [0223] (g) 与SEQ ID NO:551所示的至少95%相同的人轻链框架区3;以及
- [0224] (h) 与SEQ ID NO:552所示的至少95%相同的人轻链框架区4。
- [0225] 9. 根据实施方式1至8中任一项所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其

包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含与SEQ ID NO:503、511、493、501或515中的任一个至少约90%相同的氨基酸序列;该轻链可变区包含与SEQ ID NO:502、510、492、500或514中的任一个至少约90%相同的氨基酸序列。

[0226] 10.根据实施方式1至8中任一项所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:503、511、493、501或515中的任一个所示的氨基酸序列;该轻链可变区包含SEQ ID NO:502、510、492、500或514中的任一个所示的氨基酸序列。

[0227] 11.一种特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含:

[0228] (c)重链可变区,其包含与SEQ ID NO:491、493、495、497、499、501、503、505、507、509、511、513、515、517、519、521、523、525、527、529、531、533、535、537、539或541中的任一个至少约90%相同的氨基酸序列;以及

[0229] (d)轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:490、492、494、496、498、500、502、504、506、508、510、512、514、516、518、520、522、524、526、528、530、532、534、536、538或540中的任一个至少约90%相同的氨基酸序列。

[0230] 12.根据实施方式11所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:503至少约90%相同的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:502至少约90%相同的氨基酸序列。

[0231] 13.根据实施方式12所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:503的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:502的氨基酸序列。

[0232] 14.根据实施方式11所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:511至少约90%相同的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:510至少约90%相同的氨基酸序列。

[0233] 15.根据实施方式14所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:511的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:510的氨基酸序列。

[0234] 16.根据实施方式11所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:493至少约90%相同的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:492至少约90%相同的氨基酸序列。

[0235] 17.根据实施方式16所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:493的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:492的氨基酸序列。

[0236] 18.根据实施方式11所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:501至少约90%相同的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:500至少约90%相同的氨基酸序列。

[0237] 19.根据实施方式18所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:501的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:500的氨基酸序列。

[0238] 20.根据实施方式11所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中所述重

链可变区包含与SEQ ID NO:515至少约90%相同的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:514至少约90%相同的氨基酸序列。

[0239] 21. 根据实施方式20所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:515的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:514的氨基酸序列。

[0240] 22. 根据实施方式1至21中任一项所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中如通过ELISA所确定的,所述抗体以比L8克隆更强的亲和力结合人TL1A,其中所述L8克隆包含SEQ ID NO:491所示的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:490所示的轻链可变区氨基酸序列。

[0241] 23. 根据实施方式22所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中如通过ELISA所确定的,所述抗体以比L8克隆至少强2倍的亲和力结合人TL1A,其中所述L8克隆包含SEQ ID NO:491所示的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:490所示的轻链可变区氨基酸序列。

[0242] 24. 根据实施方式1至23中任一项所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是嵌合的或人源化的。

[0243] 25. 根据实施方式1至23中任一项所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是IgG抗体。

[0244] 26. 根据实施方式1至25中任一项所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含Fab、F(ab)₂、单结构域抗体、单链可变片段(scFv)或纳米抗体。

[0245] 27. 根据实施方式1至26中任一项所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:542或543所示的氨基酸序列的重链恒定区。

[0246] 28. 根据实施方式1至26中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:542所示的氨基酸序列的重链恒定区。

[0247] 29. 根据实施方式1至26中任一项所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:544所示的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0248] 30. 根据实施方式1至29中任一项所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段抑制TL1A诱导的由T淋巴细胞分泌干扰素 γ 。

[0249] 31. 一种药物组合物,其包含实施方式1至30中任一项的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0250] 32. 根据实施方式31所述的药物组合物,其被配制用于静脉内给药。

[0251] 33. 根据实施方式1至30中任一项所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段或根据实施方式31或32所述的药物组合物,其用于治疗炎性肠病、克罗恩病或结肠炎。

[0252] 34. 一种治疗个体的炎性肠病、克罗恩病或结肠炎的方法,其包括向所述个体施用有效量的实施方式1至30中任一项的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段或实施方式31或32的药物组合物,其中所述个体被诊断为患有或怀疑患有炎性肠病、克罗恩病或结肠炎。

[0253] 35. 根据实施方式1至30中任一项所述的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段或根据实施方式31或32所述的药物组合物,其用于防止或减少T淋巴细胞的干扰素 γ 分泌。

[0254] 36. 一种防止或减少个体中由T淋巴细胞分泌干扰素 γ 的方法,其包括向所述个体

施用有效量的实施方式1至30中任一项的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段或实施方式31或32的药物组合物。

[0255] 37.一种核酸,其编码实施方式1至30中任一项的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段。

[0256] 38.一种细胞,其包含实施方式37的核酸。

[0257] 39.根据实施方式38所述的细胞,其中所述细胞是真核细胞。

[0258] 40.根据实施方式38所述的细胞,其中所述细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0259] 41.一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治疗的方法,其包括在足以将实施方式1至30中任一项的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段分泌到培养基中的条件下,在所述培养基中孵育实施方式38至40中任一项的细胞。

[0260] 42.根据实施方式41所述的方法,其进一步包括使所述培养基经历至少一个纯化步骤。

[0261] 43.一种准备炎性肠病、克罗恩病或结肠炎治疗的方法,其包括将实施方式1至30中任一项的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段与药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

[0262] 44.一种在具有与疾病或病况相关的风险变体的个体中治疗该疾病或病况的方法,该方法包括向具有该疾病或病况的风险变体的个体施用有效量的实施方式1至30中任一项的特异性结合TL1A的抗体或抗原结合片段或实施方式31或32的药物组合物,其中该疾病或病况包括炎性肠病(IBD)、克罗恩病(CD)或结肠炎中的至少一种。

[0263] 45.根据实施方式44所述的方法,其中所述个体具有多个风险变体。

[0264] 46.根据实施方式45所述的方法,其中所述多个风险变体是至少3、4、5或10个风险变体。

[0265] 47.根据实施方式44至46中任一项所述的方法,其中所述多个风险变体的风险变体与所述疾病或病况的亚临床表型相关。

[0266] 48.根据实施方式44所述的方法,其中所述疾病或病况是IBD、CD或结肠炎中至少一种的严重形式。

[0267] 实施例

[0268] 以下实施例说明了本文所述的实施方案,而不应解释为限制本公开的范围。在提及具体材料时,这仅仅是为了说明目的,而非旨在限制。本领域技术人员可以开发等同的手段或反应物,而无需具有创造性能力,并且不会偏离本公开的范围。

[0269] 实施例1:人源化抗TL1A抗体的生成和表征

[0270] 对鼠抗TL1A抗体进行人源化,以降低潜在的免疫原性。生成了第一变体12835,其由移植到人可变区框架中的鼠5C3D11 CDR(SEQ ID NO:9、12、15、18、21、24)组成,以生成包含SEQ ID NO:26的重链可变区和包含SEQ ID NO:28的轻链可变区。遗憾的是,克隆12835含有九(9)个框架回复突变(鼠框架残基),导致不完全人源化的变体。完全人源化对于减少受试者发生对所施用抗体的免疫应答的机会至关重要。因此,目标是生成包含较少鼠框架残基、同时保留亲本12835抗体的功能活性的人源化抗体。遗憾的是,通过目测序列,无法直接将对抗体功能至关重要的鼠框架残基与非关键的鼠框架残基区分开来,因此不容易确定哪些氨基酸残基可以被相应的人框架残基替代。因此,作为第一步,通过将CDR移植到最接近

的完全人种系框架(通过NCBI的igblast工具确定的IGV1-46*02和IGKV3-20*01)中,对12835进行重新人源化。该克隆为L8,并且包含通过Kabat、Chothia和IMGT方法的组合定义的5C3D11和12835CDR(HCDR1,GFDIQDTYMH;HCDR2,RIDPASGHTKYDPKFQV;HCDR3,SRSGLPDV;LCDR1,RASSVSVMY;LCDR2,ATSNLAS;LCDR3,QQWSGNPRT)。

[0271] 在本研究中,制备并测试了12835的许多变体,以鉴定更多保留亲本12835抗体的功能活性的人样抗体。在第一阶段,鉴定出含有明显更少的鼠框架残基的变体。随后,将12835的CDR文库与完全人种系框架组合,以鉴定出不包含任何鼠框架残基但仍保留亲本12835抗体的功能活性和/或亲和力的多个变体。

[0272] 将鼠5C3D11和人源化构建体12835克隆到噬菌体表达系统中

[0273] 将编码鼠5C3D11和人源化12835的重链和轻链可变区的DNA克隆到包含人 κ 轻链恒定区和人G1重链恒定区1的噬菌体表达载体中。另外,该载体在重链的羧基末端包含his标签和血凝素A标签,以促进纯化和检测。将鼠可变区克隆到含有人恒定域的噬菌体表达载体中导致嵌合5C3D11的表达。

[0274] 鼠5C3D11重链可变区DNA(SEQ ID NO:1)和轻链可变区DNA(SEQ ID NO:4)针对细菌表达进行密码子优化,以分别生成SEQ ID NO:2和5。对人源化12835重链可变区DNA进行密码子优化,以生成SEQ ID NO:25,并且对轻链可变区DNA进行密码子优化,以生成SEQ ID NO:27。

[0275] Fab在大肠杆菌的周质间隙中的表达和定量。

[0276] 通过对大肠杆菌的周质间隙中Fab的表达和定量来验证克隆。简言之,XL-0细菌在37°C下在2X YT培养基中生长,直到培养物在OD600达到0.9-1.1的密度。然后将异丙基 β -D-硫代半乳糖苷添加到细胞中至终浓度为1mM,并将3.0mL培养物转移至14mL掀盖(snap-top)管中。用25 μ L高滴度噬菌体储备液转染每个管,并将培养物置于37°C的摇床(225rpm)中。一小时后,将温度改变为25°C,并使培养物再生长14-16h。通过在Eppendorf 5810R离心机(约3,200x g)中以3900rpm离心30min来收集细胞,倾出上清液,并将细胞重悬于0.3mL裂解缓冲液(30mM Tris,pH 8.0,2mM EDTA,20%蔗糖,2mg/ml溶菌酶,5U/mL DNA酶I)中并置于冰上15min。将细胞悬浮液转移至1.5mL管中,并通过在Eppendorf 5424微量离心机(约21,000x g)中以15,000rpm离心15min沉淀细胞碎片。小心地取出上清液而不干扰沉淀物,并将其在4°C下储存直至使用。

[0277] 为了对Fab表达进行定量,96孔Costar-3366板用50 μ L/孔的2 μ g/ml绵羊抗人Fd(Southern Biotech,产品编号2046-01,批号A7212-VJ06)在PBS中于4°C包被过夜。用含有0.05%吐温20的PBS(PBS-T)将板洗涤3次,并加入50 μ L/孔的样品稀释液。用PBS-T进行样品稀释。使用从500ng/ml开始连续3倍稀释的人Fab(Rockland,产品编号009-01015,批号38543)生成标准曲线。将板在25°C下孵育1h,用PBS-T洗涤3次,并与50 μ L/孔的在PBS-T中稀释10,000倍的抗 κ HRP缀合物(Southern Biotech,产品编号2060-05,批号K3114-S506B)一起于25°C孵育1h。将板用PBS-T洗涤3次,用50 μ L/孔的1-Step Ultra TMB-ELISA(Thermo Scientific,产品编号34028,批号SF2405221)显色。通过添加2N H₂SO₄终止反应,并使用Spectramax酶标仪分别在添加H₂SO₄之前和之后确定A650和A450。

[0278] 嵌合5C3D11和12835的表征——过滤器提升试验

[0279] 开发了过滤器提升试验,以促进重链和轻链表达的表征,并通过与生物素化抗原

的结合来验证Fab构建体的功能活性。对于过滤器提升试验,在每个噬菌体产生不同噬斑(细菌生长较慢的区域)的条件下,用噬菌体感染菌苔。将硝酸纤维素过滤器放置在菌苔上,捕获表达的Fab。随后,可以用生物素化的抗原和/或针对免疫球蛋白或肽标签的试剂探查过滤器。

[0280] 将高滴度噬菌体储备液(通常为 10^6 倍)的稀释液与0.35ml汇合的大肠杆菌菌株XL培养物和20 μ g/ml四环素合并。将该混合物与3.5ml顶部琼脂(Luria肉汤中的0.7%Bacto-琼脂)合并,并覆盖在LB琼脂板(Luria肉汤中的1.5%Bacto-琼脂)上。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育6-8h,此时将硝酸纤维素过滤器(Whatman 82-mm直径,0.45 μ m孔径,GE Healthcare,产品编号10401116)置于顶部,并将板在25 $^{\circ}$ C下孵育12-15h。移除过滤器,在PBS中短暂漂洗,并转移至5%M-P封闭溶液中,在25 $^{\circ}$ C、恒定搅拌下2h。

[0281] 随后,将过滤器切成三部分:一个用于评估轻链表达,一个用于评估重链表达,一个用于评估抗原结合。将每个部分转移至初级检测试剂:在5%M-P中稀释1000倍的山羊抗人 κ ,HRP缀合物(Southern Biotech,产品编号2060-05,批号K3114-S506B)以供检测轻链,在5%M-P中稀释1000倍的大鼠抗HA,HRP缀合物(Roche,产品编号12013819001)以供检测重链,或5%M-P中所需浓度的生物素化抗原。

[0282] 为了用生物素标记抗原,将500 μ g人TL1A(Fitzgerald,产品编号30R-AT070,批号A13102302)重悬于水中至1mg/ml。悬浮于水中后,蛋白质处于含有75mM精氨酸的10mM Tris,pH 8.5中。使用已用含有65mM NaCl的10mM磷酸盐缓冲液pH 8.0平衡的7KMW截止5ml Zeba旋转脱盐柱(Thermo产品编号89891),通过缓冲液交换除去Tris和精氨酸。回收蛋白质后,通过将其与EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin(Thermo产品编号21327)以5:1摩尔比在25 $^{\circ}$ C下混合30min,立即对其进行生物素化。通过添加750mM精氨酸终止反应,以达到75mM的终浓度。将反应转移至冰上并在4 $^{\circ}$ C下储存。

[0283] 将过滤器在恒定搅拌下于25 $^{\circ}$ C孵育2h,在PBS-0.05%吐温20中洗涤5次(每次2分钟,恒定搅拌)。将用生物素化抗原探查的过滤器转移到10ml在含1%BSA的PBS中稀释5000倍的High Sensitivity Neutravidin,HRP缀合物(Thermo Scientific,产品编号31030)中,并在25 $^{\circ}$ C下孵育1h。然后将过滤器在PBS-0.05%吐温20中洗涤5次(每次洗涤2分钟,恒定搅拌)。所有过滤器均用1-Step Ultra TMB-Blotting(Thermo Scientific,产品编号37574)显色。

[0284] 使用这种方法,证明了重链(图1A)和轻链(图1B)的表达。此外,当用8nM生物素化的人TL1A探查过滤器时,观察到染色(图1C),表明该细菌表达功能性Fab。

[0285] 通过ELISA对Fab结合的特征

[0286] 过滤器提升试验提供了对抗原结合的定性评估。为了以更为定量的方式比较嵌合5C3D11与人源化构建体12835的结合活性,开发了ELISA。96孔Costar-3366板用50 μ l/孔的2 μ g/ml人TL1A(Fitzgerald,产品编号30R-AT070,批号A13102302)在PBS中于4 $^{\circ}$ C包被过夜。将板用PBS-T漂洗一次,并在25 $^{\circ}$ C下用100 μ l/孔的PBS中的1%BSA(1%BSA)封闭1h。使用1%BSA将Fab样品连续稀释3倍,并在25 $^{\circ}$ C下(50 μ l/孔)孵育1h。将板用PBS-T洗涤3次,并加入50 μ l/孔的在1%BSA中稀释10,000倍的抗人 κ ,HRP缀合物(Southern Biotech,产品编号2060-05,批号K3114-S506B),在25 $^{\circ}$ C下保持1h。在某些试验(延长洗涤形式)中,将板置于大体积(至多1L)的PBS-T中,并在混合下孵育2-5小时,之后加入抗人 κ ,HRP缀合物。将板用PBS-T洗

涤3次,用50 μ l/孔的1-Step Ultra TMB-ELISA(Thermo Scientific,产品编号34028,批号SF2405221)显色。通过添加2N H₂SO₄终止反应,并使用Spectramax酶标仪分别在添加H₂SO₄之前和之后确定A650和A450。为了测量与鼠TL1A的结合,使用相同的方案,但是板用2 μ g/ml鼠TL1A(BioLegend,产品编号753004,批号B204691)包被,并且Fab样品连续2倍稀释。

[0287] 将嵌合5C3D11 Fab的结合活性与人源化12835Fab进行比较(图2)。尽管5C3D11和人源化12835的IgG形式(二价)的结合活性看起来相似,但观察到与嵌合Fab相比,Fab形式的12835(一价)的结合活性略微降低(图2)。这种差异可能反映了真实亲和力(单价形式)与相似亲和力(二价形式)之间的差异。使用单价测定形式,嵌合Fab的亲和力似乎是人源化12835Fab的2至3倍。

[0288] 捕获提升试验

[0289] 使硝酸纤维素过滤器(Whatman 82-mm直径,0.45 μ m孔径,GE Healthcare,产品编号10401116)漂浮在10ml的10mg/ml山羊抗人 κ (Southern Biotech产品编号2060-01)的顶部,在25 $^{\circ}$ C下2小时。将过滤器短暂浸没,然后取出并转移到10ml的5%M-P中,在25 $^{\circ}$ C下2h。从5%M-P中取出过滤器,用PBS短暂漂洗一次,并风干。随后,与上述过滤器提升试验相同的方式对过滤器进行处理,具有细微的些改动。简言之,将高滴度噬菌体储备液(通常为10⁶倍)的稀释液与0.35ml汇合的大肠杆菌菌株XL培养物和20 μ g/ml四环素合并。将该混合物与3.5ml顶部琼脂(Luria肉汤中的0.7%Bacto-琼脂)合并,并覆盖在LB琼脂板(Luria肉汤中的1.5%Bacto-琼脂)上。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育6-8h,此时将预处理的硝酸纤维素过滤器(以上所述)放置在顶部,并将板在25 $^{\circ}$ C下孵育12-15h。取出过滤器,在PBS中短暂漂洗,并转移到5%M-P中所需浓度的生物素化抗原。将过滤器在恒定搅拌下于25 $^{\circ}$ C孵育2h,在PBS-0.05%吐温20中洗涤5次(在恒定搅拌下每次洗涤2分钟),并转移至10ml在含1%BSA的PBS中稀释5000倍的高灵敏度Neutravidin,HRP缀合物(Thermo Scientific,产品编号31030),并在25 $^{\circ}$ C下孵育1h。然后将过滤器在PBS-0.05%吐温20中洗涤5次(每次洗涤2分钟,恒定搅拌)。所有过滤器均用1-Step Ultra TMB-Blotting(Thermo Scientific,产品编号37574)显色。如图3所示显色的过滤器证明了5C3D11对TL1A的高灵敏度和亲和力。

[0290] 从12835中去除鼠框架残基以鉴定多个活性人源化克隆,包括18-7和21-3使用Kunkel诱变(Kunkel TA 1985.PNAS 82:488-492)去除鼠框架残基。简言之,分离单链M13质粒,并用编码人框架残基的诱变寡核苷酸而不是编码鼠框架残基的寡核苷酸引发DNA复制。延伸以成环后,细菌的转化产生了野生型(未配对的鼠框架残基)和突变型(人框架残基)质粒的混合物。在多个位点同时进行诱变,以生成小的组合文库,其中包含含有鼠和人框架突变的各种组合的克隆混合物。随后,将混合物接种平板,并通过捕获提升进行筛选,以鉴定最具活性的框架组合。文库克隆通过DNA测序进行表征。

[0291] Fab在大肠杆菌中表达,通过ELISA定量,并通过针对固定化抗原进行滴定通过ELISA评估其结合活性。Fab的表达、周质部分的分离、Fab表达的定量以及通过ELISA与抗原的结合均如上所述进行。

[0292] 使用这种方法,鉴定出包含不同数目的鼠框架残基的多个活性克隆。表3总结了具有不同数目和位置的鼠框架残基的活性克隆的实例。

[0293] 表3.具有不同量的框架回复突变的活性人源化5C3D11构建体

克隆	轻链						重链			Mu FR 回复 突变
	V19	M21	P46	W47	V58	Y71	L20	T71	S93	
[0294] 12835	V19	M21	P46	W47	V58	Y71	L20	T71	S93	9
1-3					V58I					8
5-2								T71R		8
22						Y71F				8
5-4	V19A	M21L								7
1-4			P46L		V58I					7
2-3	V19A	M21L			V58I					6
3-4	V19A	M21L				Y71F				6
5-1	V19A	M21L						T71R		6
7-4	V19A	M21L	P46L							6
26	V19A	M21L					L20V			6
9-1	V19A	M21L				Y71F		T71R		5
13-2	V19A	M21L						T71R	S93A	5
[0295] 21	V19A	M21L	P46L		V58I					5
27	V19A	M21L		W47L			L20V			5
10-1	V19A	M21L	P46L	W47L				T71R		4
19	V19A	M21L	P46L	W47L	V58I					4
16-2	V19A	M21L	P46L	W47L	V58I			T71R		3
17-2	V19A	M21L	P46L	W47L		Y71F		T71R		3
18-7	V19A	M21L	P46L	W47L	V58I	Y71F		T71R		2
19-5	V19A	M21L	P46L	W47L			L20V	T71R		3
20-7	V19A	M21L	P46L	W47L				T71R	S93A	3
21-3	V19A	M21L	P46L	W47L			L20V	T71R	S93A	2

[0296] CDR移植的构建体的合成

[0297] 鉴定出的两个克隆——18-7和21-3——仅包含两个鼠框架回复突变。克隆18-7的轻链不含任何鼠框架残基，而克隆21-3的重链不含任何鼠框架残基。对框架组合文库的筛查未鉴定出CDR移植的变体（在重链和轻链上均没有鼠框架残基）。为了比较，使用Kunkel诱变合成了CDR移植的变体并进行了比较，通过ELISA表征了其结合活性。尽管CDR移植的构建体与抗原结合，但是人源化12835变体始终显示出对抗原的更强结合（图4B）。

[0298] 如表3所示进行鼠框架残基的回复突变后，重链可变区框架1-3与人种系IGHV1-46*01、IGHV1-46*02和IGHV1-46*03相同，而轻链可变区框架与人种系IGKV3-20*01相同。

[0299] 另外，将不同的回复突变引入到重链可变区的第三个框架中，使得新的重链可变区与人种系IGHV1-3*01同源（参见VH SEQ ID 519、521、523、525、527、529、531、533、535、537、539和541）。总的来说，包含这些回复突变的克隆被称为备选框架变体。

[0300] 备选ELISA形式中对人源化变体的表征

[0301] 使用允许快速且直接比较（无需稀释系列的单孔测定）从不同培养物分离的不同Fab克隆的相对亲和力，而无需考虑克隆的相对表达水平的备选形式（Watkins等人1997, Analytical Biochemistry 253），通过ELISA表征多个Fab变体。该测定能够更加定量地比

较变体的相对结合强度,因为尽管板的表达水平不同,但是板被不同的Fab饱和。因此,消除了由Fab定量测定的变化引起的结合概况的细微差异。简言之,96孔Costar-3366板用50 μ l/孔的2 μ g/ml山羊抗人 κ (Southern Biotech产品编号2060-01)在25 $^{\circ}$ C下包被2h,用PBS-0.05%吐温20洗涤一次,并在50 $^{\circ}$ C下与50 μ l/孔的样品Fab一起孵育2h。用PBS-0.05%吐温20将板洗涤4次,并与50 μ l/孔的生物素化抗原的系列稀释液一起在25 $^{\circ}$ C下孵育2h。上文描述了生物素化抗原的制备。用PBS-0.05%吐温20将板洗涤4次,并与50 μ l/孔的在含1%BSA的PBS溶液中稀释5000倍的高灵敏度Neutravidin,HRP缀合物(Thermo Scientific,产品编号31030)在25 $^{\circ}$ C下孵育1h。将板用PBS-T洗涤3次,用50 μ l/孔的1-Step Ultra TMB-ELISA(Thermo Scientific,产品编号34028,批号SF2405221)显色。通过添加2N H₂SO₄终止反应,并使用Spectramax酶标仪分别在添加H₂SO₄之前和之后确定A650和A450。

[0302] 在备选ELISA形式中,嵌合Fab比CDR移植的Fab更强地结合抗原(图5,比较空心圆和实心圆)。与嵌合体相比,人源化12835克隆的结合略微减弱(比较空心三角形与空心圆),其次是克隆18-7和21-3。克隆21-3的结合与CDR移植的变体最相似,提示鼠重链框架回复突变之一对于维持与亲本(野生型)CDR的完全结合活性可能至关重要。

[0303] 实施例2:具有优化的CDR的抗TL1A抗体的生成和表征

[0304] 为了鉴定可以恢复并改善CDR移植构建体(完全人种系框架)的结合活性的CDR突变,使用其中编码目标氨基酸的密码子被NNK替换的简并寡核苷酸,通过Kunkel诱变分别对所有六个CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2和HCDR3)的每个位置进行了诱变。最初,在HCDR3和LCDR3的每个位置合成一个文库。通过捕获提升来筛查这些位置文库,其理论多样性为32个密码子/20个氨基酸/1个终止密码子。在一些情况下,每个位置均由自身筛查(文库的理论多样性等于32),而在其他情况下,将特定CDR的位置合并,并作为CDR文库进行筛查(文库的理论多样性等于合并的位置数的32倍;例如,HCDR3由7个位置组成,因此理论文库大小为32x 7等于224个成员)。以15至1,000pM的生物素化人TL1A的浓度筛查文库。挑取阳性噬斑并测序。如前所述,表达Fab,从周质部分中分离,并通过ELISA进行表征。表4和表5中分别显示了LCDR3和HCDR3的一些初始筛选的捕获提升筛选、DNA测序以及通过ELISA的相对结合活性的总结。表6至表12中汇总了所有6个CDR的更详尽的捕获提升筛选结果。

[0305] 另外,制备了使用备选重链可变区框架构建的LCDR3和HCDR3文库,并通过捕获提升对其进行了筛查(表13和14)。筛查在备选框架上构建的CDR文库鉴定出一些在VH1-46*01框架上鉴定的突变,而且还鉴定出以前未鉴定的新型突变(例如重链CDR3 L98S、V102H、V102F和轻链CDR3 S92A、S92F和S92Y)。

[0306] 表4. 轻链CDR3位置扫描(用200pM抗原筛选)

位置	氨基酸	噬斑	CL命中	CL挑取	获取的序列	突变(频率)	相对 ELISA 活性 (最强到最弱的结合物)	
[0307]	1	Q89	374	19	12	10	H (3) N (3) S (2) Q (2)	Q = N > H, S
	2	Q90	322	4	4	2	Q (2)	
	3	W91	234	0	6 (随机)	1	S (1)	W >>> S (无活性)
	4	S92	212	44	12	11	E (4) D (2) Q (2) N (1) V (1) H (1)	D, E > H, N, Q > S
	5	G93	168	22	12	11	S (3) A (1) D (1)	G = A > D > Q, S
[0308]							Q (1) G (5)	
	6	N94	224	2	2	1	N (1)	
	7	P95	160	10	10	10	P (10)	
	8	R96	202	12	12	9	R (9)	
	9	T97	662	108	12	12	S (4)	T > S

[0309] 表5. 重链CDR3位置扫描(用500pM抗原筛选)

位置	氨基酸	噬斑	CL命中	CL挑取	获取的序列	突变(频率)	相对 ELISA 活性 (最强到最弱的结合物)
1	S95	228	29	12	12	L (1) S (11)	S >>> L (无活性)
2	G96	272	6	6	5	A (1) G (4)	G > A
3	G97	188	7	7	7	G (7)	
4	L98	192	23	12	10	M (2) A (2) L (6)	L = M > A
5	P99	396	58	12	11	P (11)	
6	D101	165	2	2	1	E (1)	D > E
7	V102	>300	57	12	12	M (5) K (2) R (1) S (1) T (1) Q (1) W (1)	M, K, Q, W > V = T

[0311] 表6. 重链CDR1筛选总结 (L8模板;1-46*02框架)

[b-TL1A] (pM)	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	CDR SEQ
	G	F	D	I	Q	D	T	Y	M	H	
500	G	F	E	I	Q	D	T	Y	M	H	GFELQDTYMH
500	G	F	D	P	Q	D	T	Y	M	H	GFDPQDTYMH
500	G	F	D	V	Q	D	T	Y	M	H	GFQVQDTYMH
500	G	F	D	I	G	D	T	Y	M	H	GFDIGDTYMH
500	G	F	D	I	S	D	T	Y	M	H	GFDISDTYMH
500	G	F	D	I	V	D	T	Y	M	H	GFQIVDTYMH
500	G	F	D	I	Q	D	A	Y	M	H	GFQIQDAYMH
500	G	F	D	I	Q	D	S	Y	M	H	GFQIQDSYMH
500	G	F	D	I	Q	D	T	F	M	H	GFQIQDTFMH
500	G	F	D	I	Q	D	T	Y	I	H	GFQIQDTYIH
150	G	F	D	L	Q	D	T	Y	M	H	GFQDLQDTYMH
150	G	F	D	P	Q	D	T	Y	M	H	GFDPQDTYMH
150	G	F	D	I	S	D	T	Y	M	H	GFDISDTYMH
150	G	F	D	I	Q	D	T	Y	I	H	GFQIQDTYIH
150	G	F	D	I	Q	D	T	Y	L	H	GFQIQDTYLH

[0314] 表7. 重链CDR2a筛选总结 (L8模板;1-46*02框架)

[b-TL1A] (pM)	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	CDR SEQ
	R	I	D	P	A	S	G	H	T	K	
200	R	L	D	P	A	S	G	H	T	K	RLDPASGHTK
200	R	I	E	P	A	S	G	H	T	K	RIEPASGHTK
200	R	I	D	P	E	S	G	H	T	K	RIDPESGHTK
200	R	I	D	P	A	S	G	H	T	K	RIDPASGHTK
200	R	I	D	P	A	G	G	H	T	K	RIDPAGGHTK
200	R	I	D	P	A	S	A	H	T	K	RIDPASAHTK
200	R	I	D	P	A	S	G	H	I	K	RIDPASGHIK
200	R	I	D	P	A	S	G	H	L	K	RIDPASGHLK
200	R	I	D	P	A	S	G	H	V	K	RIDPASGHVK

[0315] 表8. 重链CDR2b筛选总结(各种模板;1-46*02框架)

[b-TL1A] (pM)	59	60	61	62	63	64	65	CDR SEQ	模板
	Y	D	P	K	F	Q	V		
100	I	D	P	K	F	Q	V	IDPKFQV	17V
100	L	D	P	K	F	Q	V	LDPKFQV	20L
100	M	D	P	K	F	Q	V	MDPKFQV	20EL
100	S	D	P	K	F	Q	V	SDPKFQV	20L
100	T	D	P	K	F	Q	V	TDPKFQV	20L
100	V	D	P	K	F	Q	V	VDPKFQV	20EL
100	Y	I	P	K	F	Q	V	YIPKFQV	20EL
100	Y	N	P	K	F	Q	V	YNPKFQV	17V, 20EL
100	Y	R	P	K	F	Q	V	YRPKFQV	17R
100	Y	S	P	K	F	Q	V	YSPKFQV	20EL
100	Y	D	P	K	F	R	V	YDPKFRV	6EV

	100	Y	D	P	K	F	Q	A	YDPKFQA	6EI, 17L
	100	Y	D	P	K	F	Q	D	YDPKFQD	17L
	100	Y	D	P	K	F	Q	E	YDPKFQE	20EL
	100	Y	D	P	K	F	Q	G	YDPKFQG	17V
	100	Y	D	P	K	F	Q	H	YDPKFQH	20EL
[0318]	100	Y	D	P	K	F	Q	K	YDPKFQK	17L, 17I
	100	Y	D	P	K	F	Q	L	YDPKFQL	17V
	100	Y	D	P	K	F	Q	M	YDPKFQM	20EL
	100	Y	D	P	K	F	Q	N	YDPKFQN	20EL
	100	Y	D	P	K	F	Q	P	YDPKFQP	17L, 17I, 17V
	100	Y	D	P	K	F	Q	R	YDPKFQR	17L, 17I
	100	Y	D	P	K	F	Q	S	YDPKFQS	17L
	100	Y	D	P	K	F	Q	T	YDPKFQT	17L, 17I

[0319] 表9. 重链CDR3筛选总结 (L8模板;1-46*02框架)

[b-TL1A] (pM)	95	96	97	98	99	101	102	CDR SEQ
		S	G	G	L	P	D	
500	L	G	G	L	P	D	V	LGGLPDV
500	S	A	G	L	P	D	V	SAGLPDV
500	S	G	G	A	P	D	V	SGGAPDV
500	S	G	G	M	P	D	V	SGGMPDV
500	S	G	G	L	P	E	V	SGGLPEV
500	S	G	G	L	P	D	K	SGGLPDK
500	S	G	G	L	P	D	M	SGGLPDM
500	S	G	G	L	P	D	Q	SGGLPDQ
500	S	G	G	L	P	D	R	SGGLPDR
500	S	G	G	L	P	D	S	SGGLPDS
500	S	G	G	L	P	D	T	SGGLPDT
500	S	G	G	L	P	D	W	SGGLPDW

[0321] 表10. 轻链CDR1筛选总结 (L8模板;与重链1-46*02框架配对)

[b-TL1A] (pM)	24	25	26	27	29	30	31	32	33	34	CDR SEQ
		R	A	S	S	S	V	S	Y	M	
150	G	A	S	S	S	V	S	Y	M	Y	GASSSVSYMY
150	W	A	S	S	S	V	S	Y	M	Y	WASSSVSYMY
150	R	A	S	S	S	V	I	Y	M	Y	RASSSVIYMY
150	R	A	S	S	S	V	S	F	M	Y	RASSSVSFMY

[0323]	150	R	A	S	S	S	V	S	Y	L	Y	RASSSVSYLY
	150	R	A	S	S	S	V	S	Y	M	R	RASSSVSYMR

[0324] 表11.轻链CDR2筛选总结 (L8模板;与重链1-46*02框架配对)

[b-TL1A] (pM)	50	51	52	53	54	55	56	CDR SEQ
	A	T	S	N	L	A	S	
150	A	K	S	N	L	A	S	AKSNLAS
150	A	T	P	N	L	A	S	ATPNLAS
150	A	T	E	N	L	A	S	ATENLAS
150	A	T	S	L	L	A	S	ATSLLAS
150	A	T	S	P	L	A	S	ATSPLAS
150	A	T	S	N	L	T	S	ATSNLTS

[0326] 表12.轻链CDR3筛选总结 (各种模板;与重链1-46*02框架配对)

[b-TL1A] (pM)	89	90	91	92	93	94	95	96	97	CDR SEQ	模板
	Q	Q	W	S	G	N	P	R	T		
200	H	Q	W	S	G	N	P	R	T	HQWSGNPRT	L8
200	N	Q	W	S	G	N	P	R	T	NQWSGNPRT	L8
200	S	Q	W	S	G	N	P	R	T	SQWSGNPRT	L8
200	Q	Q	S	S	G	N	P	R	T	QQSSGNPRT	L8
200	Q	Q	W	D	G	N	P	R	T	QQWDGNPRT	L8
200	Q	Q	W	E	G	N	P	R	T	QQWEGNPRT	L8
200	Q	Q	W	H	G	N	P	R	T	QQWHGNPRT	L8
200	Q	Q	W	N	G	N	P	R	T	QQWNGNPRT	L8
200	Q	Q	W	Q	G	N	P	R	T	QQWQGNPRT	L8
200	Q	Q	W	V	G	N	P	R	T	QQWVGNPRT	L8
200	Q	Q	W	S	A	N	P	R	T	QQWSANPRT	L8
200	Q	Q	W	S	D	N	P	R	T	QQWSDNPRT	L8
200	Q	Q	W	S	Q	N	P	R	T	QQWSQNPRT	L8
200	Q	Q	W	S	S	N	P	R	T	QQWSSNPRT	L8
500	Q	Q	W	S	G	N	P	R	S	QQWSGNPRS	L8
500	Q	Q	F	S	G	N	P	R	T	QQFSGNPRT	16
500	Q	Q	H	S	G	N	P	R	T	QQHSGNPRT	46
500	Q	Q	I	S	G	N	P	R	T	QQISGNPRT	16
500	Q	Q	P	S	G	N	P	R	T	QQPSGNPRT	16
500	Q	Q	R	S	G	N	P	R	T	QQRSNPRT	46
500	Q	Q	Y	S	G	N	P	R	T	QQYSNPRT	46

[0328]	500	Q	Q	W	S	G	H	P	R	T	QQWSGHPRT	16, 46
	500	Q	Q	W	S	G	L	P	R	T	QQWSGLPRT	46
	500	Q	Q	W	S	G	Q	P	R	T	QQWSGQPRT	46
	500	Q	Q	W	S	G	S	P	R	T	QQWSGSPRT	16, 46
	500	Q	Q	W	S	G	T	P	R	T	QQWSGTPRT	46
	500	Q	Q	W	S	G	M	P	R	T	QQWSGMPRT	16, 46
	500	Q	Q	W	S	G	F	P	R	T	QQWSGFPRT	46
	500	Q	Q	W	S	G	K	P	R	T	QQWSGKPRT	46
	500	Q	Q	W	S	G	R	P	R	T	QQWSGRPRT	46
	1000	Q	Q	W	S	G	D	P	R	T	QQWSGDPRT	L8
	1000	Q	Q	W	S	G	T	P	R	T	QQWSGTPRT	L8

[0329] 表13. 重链CDR3筛选总结 (L8mod模板; 重链1-3*01相关框架)

[b-TL1A] (pM)	95	96	97	98	99	101	102	CDR SEQ
	S	G	G	L	P	D	V	
15	S	G	G	L	P	D	H	SGGLPDH
15	S	G	G	L	P	D	R	SGGLPDR
15	S	G	G	L	P	D	F	SGGLPDF
15	S	G	G	L	P	D	V	SGGLPDV
15	S	G	G	S	P	D	V	SGGSPDV

[0331] 表14. 轻链CDR3筛选总结 (L8mod模板; 与重链1-3*01相关框架配对)

[b-TL1A] (pM)	89	90	91	92	93	94	95	96	97	CDR SEQ
	Q	Q	W	S	G	N	P	R	T	
15	Q	Q	W	V	G	N	P	R	T	QQWVGNPRT
15	Q	Q	W	A	G	N	P	R	T	QQWAGNPRT
15	Q	Q	W	Y	G	N	P	R	T	QQWYGNPRT
15	Q	Q	W	S	G	N	P	R	T	QQWSGNPRT
15	Q	Q	W	F	G	N	P	R	T	QQWFGNPRT
15	Q	Q	W	Q	G	N	P	R	T	QQWQGNPRT
15	Q	Q	W	S	Q	N	P	R	T	QQWSQNPRT

[0333] 实施例3. 使用突变 (S93) 重链, 具有优化CDR的抗TL1A抗体的生成和表征

[0334] 包含CDR移植的重链的克隆 (CDR移植的和21-3) 比在重链位置93处包含鼠回复突变 (S) 的克隆具有更低的结合活性。因此, 构建了另一个HCDR3文库。如上所述构建文库, 不同之处在于在诱变之前混合所有位置的简并寡核苷酸, 并且将文库合成并表达为池, 与单独检查每个位置不同。与对L8重链骨架 (S93A) 进行的HCDR3位置扫描相似, HCDR3的位置102产生多个突变, 这些突变在捕获提升形式中增强了抗原结合。基于重链S93模板筛查HCDR3文库鉴定出一些在重链A93模板上鉴定的突变, 而且还鉴定出以前未鉴定的新型突变 (例如, 重链CDR3 V102I和V102Y)。表15显示了捕获提升筛选和DNA测序的总结。

[0335] 表15.具有S93的重链模板上HCDR3文库池的捕获提升筛选

突变	频率
V102K	10
V102M	7
V102Y	4
V102L	2
V102I	1
V102E	1
V102T	1

[0337] 实施例4.潜在序列文库的鉴定和工程化

[0338] 使用Molecular Operating Environment (MOE) 2018.01软件 (Chemical Computing Group, Montreal, 加拿大), 基于已知PDB抗体结构建立了CDR移植构建体L8可变区的结构同源性模型。该模型和BioMOE预测算法用来进行序列负债评估。另外, 基于已知的潜在不稳定序列基序, 分析了变体12835和L8的潜在序列负债 (Jarasch等人, J.Pharm.Sci.104:1885-1898(2015); Sydow等人, PLOS ONE 9:e100736(2014); Vlasak和Ionescu mAbs 3:253-263(2011))。使用这些方法, 将多个残基鉴定为潜在不稳定的, 包括: 轻链M33、W35、W47、W91和N94; 重链D31T32、M34、D52P52a、M69和W103 (总结在表17中; FR表示框架)。

[0339] 在位于CDR内的所有潜在不定位点处进行了详尽捕获提升筛选, 以鉴定可消除这些残基同时保留抗原结合的氨基酸置换。例如, 一个筛选聚焦在轻链CDR3 N94 (潜在的脱酰胺位点) 上。LCDR3位置94的初始捕获提升筛选无法鉴定相对于野生型序列显示出增强的亲和力的突变。因此, 为了鉴定可接受的突变以消除这些潜在不稳定的残基, 改变了初始捕获提升筛选的条件。具体而言, 不是在野生型序列不提供信号的浓度下用抗原进行筛选, 而是提高了抗原浓度, 使得表达野生型序列的克隆在提升上可见。以这种方式, 可以鉴定出以与野生型序列相似的亲和力结合但消除有问题的残基的变体。

[0340] 对于LCDR3位置94文库, 将大约3,000个克隆接种平板, 并通过捕获提升进行分析。使用1000pM人TL1A筛选捕获提升, 挑取显示八种最深色和六种较浅色染色强度的噬斑并进行测序。结果总结在表16中。如所预期的, 两个最深色染色的噬斑表达野生型残基N94。然而, 其他六个深色染色噬斑表达T94, 表明变体N94T在很大程度上保留了野生型序列的结合亲和力, 同时消除了潜在的脱酰胺位点。另外, 从较浅色染色噬斑中鉴定出五个不同的序列。它们包括D、F、K、R和S。尽管这些备选序列的亲和力可能略低于野生型序列, 但是当与在其他地方鉴定出的其他更高亲和力突变组合时, 所有这些备选序列也可以充当N94的替代物。

[0341] 表16.潜在不定位点LCDR3 N94处的备选残基的鉴定 (用1000pM抗原筛选)

克隆	捕获提升染色	核苷酸序列	DNA	氨基酸序列	蛋白质
L8	深	AAT	-	N	-
L3-6-01, -04	深	ACT	SEQ ID 75	T	SEQ ID 76
L3-6-02, -07	深	AAT	-	N	-
[0342] L3-6-03, -05, -06, -08	深	ACG	SEQ ID 77	T	SEQ ID 76
L3-6-09	浅	GAT	SEQ ID 79	D	SEQ ID 78
L3-6-10	浅	TTT	SEQ ID 81	F	SEQ ID 80
L3-6-11, -12	浅	AAG	SEQ ID 83	K	SEQ ID 82
L3-6-14	浅	CGG	SEQ ID 85	R	SEQ ID 84
L3-6-15	浅	TCT	SEQ ID 87	S	SEQ ID 86

[0343] 表17.潜在不稳定残基和消除不稳定性的活性变体的总结

链	残基(位置)	备选物	备注
[0344] 轻链	M33 (CDR1)	L	
	W35 (FR2)		
	W47 (FR2)	I	改变为I以匹配人种系序列
	W91 (CDR3)		
	N94 (CDR3)	D, F, K, R, S, T; H, L, M, Q	
[0345] 重链	D31T32 (CDR1)	A32	
	M34 (CDR1)	I, L	
	D52P52a (CDR2)	E52	
	M69 (FR3)	I69	基于备选重链框架VH1-3*01在所有变体中去除
	W103 (FR4)		

[0346] 实施例5.致使在大肠杆菌中的表达增强的突变的鉴定

[0347] 通过捕获提升在CDR文库筛查过程中鉴定出的某些突变并不总是在ELISA形式中显示出增强的结合,而是在细菌的周质间隙中以比其他变体更高的水平持续表达可溶性Fab。特别是,在重链CDR2位置V65 (V65G、V65T和V65K) 和轻链CDR1位置R24 (R24G) 处观察到该现象。这些结果令人惊讶,因为捕获提升筛选形式被配置为使得不同表达水平的影响最小化,同时使得亲和力对信号强度的影响最大化。因此,注意到这些突变,并将其整合到后来的组合文库中,这些组合文库包括增强亲和力的突变,以确定这些突变是否会将表达和/或热稳定性益处赋予在哺乳动物表达系统中表达为完整免疫球蛋白的候选物。

[0348] 实施例6.具有组合HCDR3和LCDR3突变的抗TL1A抗体的生成和表征。

[0349] 基于对HCDR3和LCDR3中有益突变的初步鉴定,合成、表达并筛查另一个文库,以鉴定可进一步改善结合亲和力的独立突变的组合。使用编码在位置扫描中鉴定的突变子集的寡核苷酸,通过两位点诱变来构建文库。还包括编码野生型残基的寡核苷酸。该组合文库含

有30个不同的变体:野生型(无突变),9个包含单突变的变体(具有在位置筛选中鉴定的变体的冗余,如表4和表5所示),以及20个独特的组合。用200pM抗原进行的捕获提升筛选鉴定出21个活性克隆。21个克隆的DNA测序比其他克隆更频繁地鉴定出某些组合(表18)。

[0350] 表18. 组合文库筛查和DNA序列总结

		HCDR3 V102X					
		M	K	Q	W	V	
[0351]	LCDR3	D	4	4	0	0	0
		E	0	1	0	1	0
		H	0	0	0	0	0
		N	0	4	0	1	0
		Q	1	0	1	0	0
		S	0	3	0	1	0

[0352] 随后,合成、表达并筛查了多个组合文库(以下详述)。通常,这些文库组合被鉴定为改善亲和力的突变(实施例2和3)与改变潜在不稳定残基的突变(实施例4)以及可能赋予增强的热稳定性/表达的突变(实施例5)。以多种ELISA形式筛查组合文库,以鉴定具有用于进一步开发的最佳属性(亲和力、选择性、与膜缔合TL1A的结合以及可开发性)的克隆。如表19至表22中所总结的,鉴定出利用不同的VH种系模板具有优化和多样化CDR序列的多个变体。

[0353] 表19.1-46*02重链模板上的重链CDR

克隆 ID	SEQ ID	HCDR1 (26-35)	SEQ ID	HCDR2 (50-65), (第 1 个 P 为 52a)	SEQ ID	HCDR3 (93-102)
起点	553	GFDIQDTYMH	554	RIDPASGHTKYDPKFQV	565	ARSGGLPDV
34	553	GFDIQDTYMH	555	RIEPASGHIKYDPKFQG	566	ARSGGLPDW
2	553	GFDIQDTYMH	556	RIEPASGHIKYSPKFQG	566	ARSGGLPDW
52	553	GFDIQDTYMH	556	RIEPASGHIKYSPKFQG	566	ARSGGLPDW
46	553	GFDIQDTYMH	557	RIEPASGHVKYSPKFQV	566	ARSGGLPDW
47	553	GFDIQDTYMH	558	RIEPASGHVKYDPKFQT	566	ARSGGLPDW
14	553	GFDIQDTYMH	559	RIDPASGHIKYDPKFQK	567	ARSGGLPDM
16	553	GFDIQDTYMH	560	RIDPASGHVKIDPKFQV	567	ARSGGLPDM
17L	553	GFDIQDTYMH	561	RIDPASGHLKYDPKFQV	567	ARSGGLPDM
17L-1	553	GFDIQDTYMH	562	RIDPASGHLKYDPKFQR	567	ARSGGLPDM
23	553	GFDIQDTYMH	563	RIDPASGHLKYDPKFQN	568	ARSGGLPDK
A1	553	GFDIQDTYMH	563	RIDPASGHLKYDPKFQN	568	ARSGGLPDK
53	553	GFDIQDTYMH	564	RIEPASGHLKYDPKFQE	568	ARSGGLPDK
E1	553	GFDIQDTYMH	564	RIEPASGHLKYDPKFQE	568	ARSGGLPDK
	484	DTYMH	485	PASGH	486	SGGLPD

[0356] 表20.3-20*01轻链模板上的轻链CDR

克隆 ID	SEQ ID	LCDR1 (24-33)	SEQ ID	LCDR2 (50-56)	SEQ ID	LCDR3 (89-97)
起点	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	571	QQWSGNPRT
34	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	572	QQWEGNPRT
2	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	572	QQWEGNPRT
52	570	GASSSVSYMY	488	ATSNLAS	572	QQWEGNPRT
46	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	572	QQWEGNPRT
47	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	572	QQWEGNPRT
14	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	573	QQWQGNPRT
16	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	573	QQWQGNPRT
[0357] 17L	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	573	QQWQGNPRT
17L-1	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	573	QQWQGNPRT
23	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	572	QQWEGNPRT
A1	570	GASSSVSYMY	488	ATSNLAS	572	QQWEGNPRT
53	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	572	QQWEGNPRT
E1	570	GASSSVSYMY	488	ATSNLAS	572	QQWEGNPRT
SEQ ID NO:487 ASSSVSYMY						
SEQ ID NO:488 ATSNLAS						
SEQ ID NO:489 GNPRT						

[0358] 表21.1-3*01重链模板上的重链CDR

克隆 ID	SEQ ID	HCDR1 (26-35)	SEQ ID	HCDR2 (50-65), (第 1 个 P 为 52a)	SEQ ID	HCDR3 (93-102)
起点	553	GFDIQDTYMH	554	RIDPASGHTKYDPKFQV	578	ARSGGLPDV
[0359] 3-17L V-A	553	GFDIQDTYMH	574	RIDPASGHLKYDPKFQG	579	ARSGGLPDM
3-17L	553	GFDIQDTYMH	574	RIDPASGHLKYDPKFQG	579	ARSGGLPDM
L8mod	553	GFDIQDTYMH	575	RIDPASGHTKYDPKFQG	578	ARSGGLPDV
X-V	553	GFDIQDTYMH	554	RIDPASGHTKYDPKFQV	580	ARSGGLPDF

	X	553	GFDIQDTYMH	554	RIDPASGHTKYDPKFQV	580	ARSGGLPDF
	H3-1	553	GFDIQDTYMH	575	RIDPASGHTKYDPKFQG	581	ARSGGLPDL
	XL3-6	553	GFDIQDTYMH	575	RIDPASGHTKYDPKFQG	580	ARSGGLPDF
[0360]	XL3-10	553	GFDIQDTYMH	575	RIDPASGHTKYDPKFQG	580	ARSGGLPDF
	XL3-15	553	GFDIQDTYMH	575	RIDPASGHTKYDPKFQG	580	ARSGGLPDF
	L3-13	553	GFDIQDTYMH	575	RIDPASGHTKYDPKFQG	580	ARSGGLPDF
	H2-2	553	GFDIQDTYMH	576	RIDPASGHSKYDPKFQV	580	ARSGGLPDF
	H2-5	553	GFDIQDTYMH	577	RIDPASGHYKYDPKFQV	580	ARSGGLPDF

[0361] 表22.3-20*01轻链模板上的轻链CDR

克隆 ID	SEQ ID	LCDR1 (24-33)	SEQ ID	LCDR2 (50-56)	SEQ ID	LCDR3 (89-97)
起点	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	571	QQWSGNPRT
3-17L V-A	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	573	QQWQGNPRT
3-17L	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	573	QQWQGNPRT
L8mod	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	571	QQWSGNPRT
X-V	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	571	QQWSGNPRT
[0362] X	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	571	QQWSGNPRT
H3-1	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	571	QQWSGNPRT
XL3-6	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	582	SQWSGNPRT
XL3-10	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	583	QQWSGNPRS
XL3-15	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	584	QQWSRNPRT
L3-13	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	585	QQWKGNPRT
H2-2	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	571	QQWSGNPRT
H2-5	569	RASSSVSYMY	488	ATSNLAS	571	QQWSGNPRT

[0363] 在多种形式中测试了具有表19至表22所示的CDR的Fab与人TL1A的结合。首先,将人TL1A固定在ELISA板的表面上,并滴定可溶性Fab变体,如图8和9所示。接下来,在ELISA板的表面上捕获均匀(饱和)量的可溶性Fab变体,并且如图10至图13所示滴定可溶性生物素化人TL1A。在两种ELISA形式中,所有Fab变体都结合人TL1A,并且相对于CDR移植的变体L8显示出显著增强的结合。另外,这些变体都同样地或更好地结合变体12835,同时在框架中没有或具有显著更少的鼠回复突变。结果,这些实验阐明了一组抗TL1A可变区,其与人种系Ig序列显示出高结合亲和力和高同源性。

[0364] 测试所有Fab变体与膜结合的TL1A的结合。对于这些研究,使用已经用人TL1A转染的HEK293细胞系。将表达膜结合的人TL1A的293细胞在含有5%CO₂的37°C培养箱中维持在含有L-谷氨酰胺、葡萄糖、丙酮酸钠和酚红(ThermoFisher目录号11995-065)加10%胎牛血清、1X青霉素-链霉素(Fisher目录号15140122)和2μg/ml嘌呤霉素(Gibco目录号A11138-03)的DMEM中。在测定前三天,将3x 10⁶个细胞接种到T-75培养瓶中,以便在测定当天培养瓶为90-95%汇合。吸出培养基,并用5ml PBS轻轻洗涤细胞单层。通过将10ml冰冷的1%BSA/PBS反复吸移到单层上,去除贴壁细胞。地细胞进行计数,对于每个待分析样品等分5x

10^5 。通过在4℃下以300xg离心5分钟收集细胞,并弃去洗液。将细胞重悬于在1%BSA/PBS中稀释的100 μ l Fab或IgG中,并置于冰上30min。接下来,将细胞用1ml 1%BSA/PBS洗涤,并通过在4℃下以300xg离心5min来收集。弃去洗液,并加入在BSA/PBS中1:200稀释的100 μ l第二山羊F(ab')₂抗人 κ FITC(Southern Biotech目录号2062-02)或山羊F(ab')₂抗人IgG PE(Southern Biotech目录号2043-09)缀合物。将细胞置于冰上30min。最后,用1ml BSA/PBS洗涤细胞,通过在4℃下以300xg离心5min收集细胞。除去洗液,将细胞重悬于500 μ l 1%BSA/PBS中。每个样品加入一滴Sytox AADvanced ReadyFlow Reagent(ThermoFisher目录号R37173),并在Attune NxT流式细胞仪(ThermoFisher)上分析样品。所有变体均结合膜缔合的人TL1A,如图14所示。

[0365] 接下来,表征所有Fab变体相对于其他TNFSF成员TRAIL、LIGHT和Fas对人TL1A的选择性。简言之,将ELISA板在4℃下用在PBS中为1 μ g/ml的50 μ l/孔的抗原(Fas/TNFSF6,R&D Systems,目录号126-FL/CF;TRAIL/TNFSF10,R&D Systems,目录号375-TL/CF;LIGHT/TNFSF14,R&D Systems,目录号664-LI/CF)包被过夜。将该板用PBS-T洗涤3次,并用100 μ l 1%BSA/PBS封闭。弃去封闭液,并在50 μ l 1%BSA/PBS中滴定Fab变体或对照抗体(Fas/TNFSF6,R&D Systems,目录号AF126;TRAIL/TNFSF10,R&D Systems,目录号AF375;LIGHT/TNFSF14,R&D Systems,目录号AF664),并在25℃下孵育1h。将板用PBS-T洗涤3次,并添加HRP缀合的第二抗体(在1%BSA/PBS中稀释5,000倍),在25℃下1h。将板用PBS-T洗涤3次并显色。如图15至图20所示,变体均未显示出与相关家族成员的可检测结合,这表明在使用人种系框架模板设计更高亲和力时,保留了对人TL1A相对于其他TNFSF家族成员的选择性。

[0366] 实施例7:在不同IgG恒定区上表达的所选人源化变体的表征

[0367] 将来自以上表19和表20的克隆14、17L、23、34、47和53的轻链和重链可变区分别克隆到 κ 轻链恒定区和修饰的IgG1或IgG2重链骨架上。选择经修饰的IgG1骨架和IgG2以减少抗体的潜在效应子功能。瞬时表达和纯化特性示于以下表23中。对于这些变体,其表达为修饰的IgG1都好于表达为IgG2。此外,获得的产量与关于某些突变对细菌表达的影响的观察结果一致(参见实施例5)。具体而言,表达最高的变体14、34和47均在重链CDR2 V65G、V65T或V65K处包含突变,而表达最低的变体17L、23和53则不含。

[0368] 通常,如通过与抗原包被板的ELISA结合(图21)和通过ELISA捕获可溶性生物素化抗原(图21)所评估的,在两种形式(修饰的IgG1和IgG2)下,所有变体与人TL1A的结合均得到保留。22)。另外,对于所有变体都保留了与膜缔合的人TL1A的结合,但当变体53表达为IgG2时除外(图23)。最后,由于没有克隆显示出与TNFSF家族成员Fas、TRAIL或LIGHT的明显结合,因此对人TL1A相对于其他TNFSF成员的选择性得到维持(图24)。

[0369] 表23. 所选CDR变体表达为人IgG1(修饰的)和IgG2

克隆	IgG1 产量 (mg)	IgG1 纯度	IgG2 产量 (mg)	IgG2 纯度
[0370] 34	5.9	90%	3.1	90%
47	5.5	95%	3.2	95%
14	6.1	90%	2.6	95%
17L	0.15	90%	0.03	<80%
23	3.0	80%	0.6	80%
[0371] 53	1.8	95%	0.1	85%

[0372] 实施例8:在全血测定中效力和物种选择性的表征。

[0373] 使用健康供体在人全血测定中测试了表达为IgG1 (修饰的) 和IgG2的本文所述变体的中和活性和效力。该测定是对Cassatella等人, “Soluble TNF-like cytokine (TL1A) production by immune complexes stimulated monocytes in rheumatoid arthritis” J Immunol. 2007年6月1日1;178 (11) :7325-33的修改;并在上调并激活TL1A及其受体DR3的条件下测量IFN- γ 的产生。在该测定中,产生了可溶性和膜缔合的TL1A。该测定的结果已显示与在结肠炎小鼠模型中的体内结果相关。参见Takedatsu, “TL1A (TNFSF15) regulates the development of chronic colitis by modulating both T-helper 1 and T-helper 17a ctivation. Gastroenterology. 2008年8月;135 (2) :552-567。

[0374] 简言之,将96孔板在PBS中于4°C用人 γ 球蛋白包被过夜,用PBS洗涤,然后在25°C下与抗人IgG (Fc片段特异性) 一起孵育至少1小时以产生免疫复合物(IC)。临使用前,将板用PBS洗涤3次。将收集的血液样品用IL-12和IL-18处理,在样品中滴定抗体,将样品添加到板中并在37°C下放置24小时。接下来,将100 μ l PBS/5% BSA加入到每个孔中并混合。将板以500g离心5分钟,然后收集约150 μ l稀释的血浆用于IFN- γ 测量。加入PBS以使从板上收集细胞血浆更容易,因为血液百分比很高(95%)。稀释所有样品以确保其值在标准曲线的线性范围内。所有变体,不管IgG形式如何(修饰的IgG1或IgG2),都显示出对IFN- γ 产生的有效抑制(表24)。为了比较,鼠亲本抗体5C3D11和人源化12835的典型IC50值分别为1.38 \pm 0.95nM(供体n=16)和9.28 \pm 10.71nM(供体n=4)。

[0375] 表24. 在人全血测定中的效力

克隆	IgG 亚类	平均 IC50 +/- SD (nM)	供体数
[0376] 34	G1	0.18 \pm 0.05	6
34	G2	0.16 \pm 0.06	3
47	G1	1.26 \pm 0.40	6
47	G2	1.01 \pm 0.16	3

[0377]	14	G1	0.19 ± 0.06	6
	14	G2	0.35 ± 0.13	3
	23	G1	0.41 ± 0.10	6
	23	G2	0.33 ± 0.12	3
	53	G1	0.39 ± 0.06	6

[0378] 接下来,使用从食蟹猴获得的血液,在同一测定中评价样品,以评价优化的人源化变体与食蟹猴TL1A的交叉反应性。该测定与利用人全血的测定相似地进行,不同之处在于变体以单一浓度(10nM)进行测试,而不是进行完全滴定。变体均抑制IFN- γ 的产生,但是变体47和53没有抑制到变体14、23或34和鼠5C3D11的程度(图25)。这些数据证明,优化的人源化变体保留了与食蟹猴TL1A的交叉反应性。

[0379] 中和TL1A抗体也被形式化为无效应IgG1(如SEQ ID NO:542所示)分子,从CHO细胞表达并纯化,并且如上所述在使用人(图26A-C)和食蟹猴(图27A)全血的效力测定中进行测试。结果总结在以下表25中。

[0380] 表25. CHO表达的变体在人和食蟹猴全血测定中的效力(IC₅₀, nM)

克隆	人全血			食蟹猴全血		
	平均值	SD	供体	平均值	SD	供体
14	0.30	0.15	3	0.28	0.04	3
23	0.64	0.21	3	0.72	0.16	3
34	0.24	0.03	3	0.21	0.06	3
53	0.59	0.11	3	1.32	0.23	3
1D1	0.27	0.12	3			
5C3D11				0.18	0.07	3

[0382] 这些实验确定了所有变体都是活性的且有效的,变体14和34在采用人血时通常显示出最大效力。所有变体都在使用食蟹猴血时有效。变体14、23和34对人和食蟹猴TL1A显示出相似的效力,而变体53对人TL1A显示出约2倍的效力。

[0383] 实施例9:竞争测定

[0384] 使用表面等离子体共振(SPR)进行结合竞争测定,以评价测试抗TL1A抗体是否与本文所述的任何抗TL1A抗体结合TL1A上的相同区域。

[0385] 使用Biacore 2000或3000仪器,通过胺偶联将参考抗体直接固定在羧甲基化葡聚糖传感器芯片表面(CMS)上。在8.1mM Na₂HPO₄, 1.47mM KF₂PO₄, pH 7.2, 237mM NaCl, 2.7mM KCl, 3.4mM EDTA和0.01%吐温20(PBS-NET)中稀释至10nM的重组可溶性人TL1A或鼠TL1A以10R1/分钟的流速注入约1分钟,以使固定的抗体上的结合水平达到至少100个响应单位(RU)。然后将参考抗体以30nM注入5分钟,以使TL1A上的所有潜在结合位点饱和。重复注入参考抗体以确认该饱和。接下来, PBS-NET中的测试抗体或作为对照的仅PBS-NET以30nM注入5分钟。如果测试抗体与被第一抗体饱和的TL1A结合,则表明与参考抗体相比,测试抗体与TL1A上的非竞争区结合。如果测试抗体不与饱和的TL1A结合,则表明这两种抗体与同一区域结合或竞争与TL1A的结合。可以采用固定的测试抗体和在测试抗体与TL1A结合后注入

的参考抗体重复此策略。每个循环可以重复进行。在每个循环结束时,固定的抗体表面通过3M $MgCl_2$ 的30秒脉冲或通过0.1% TFA以及随后的连续两个15秒PBS-NET脉冲再生。所有注入均在25℃下以10Hz的收集速率进行。通过使用控制表面和缓冲液注入,所有传感图均被双重参考。

[0386] 使用SPR进行另一种结合竞争测定,以评价测试抗TL1A抗体是否与本文所述的任何抗TL1A抗体结合TL1A上的相同区域。参考抗体通过以三种或四种不同的密度在阵列上偶联的胺固定在SPR芯片上。TL1A蛋白以递增浓度系列注射,以估算动力学参数和用于在竞争分箱(binching)实验期间注射的适当浓度。一旦确定了用于分箱实验的最佳抗原浓度,便评价再生条件(通常是短暂的低pH注入),以建立用于在分箱测定循环之间再生的最佳条件。

[0387] 使用预混合方法进行分箱,其中将单独的或以饱和抗体浓度(例如30-50 $\mu g/mL$)与测试抗体预先复合的中等浓度TL1A注入到整个阵列上。可以进行该测定,以使测试抗体得到固定,并且参考抗体与TL1A预先复合。与固定抗体的独特区域结合的克隆提供信号增强,而竞争性克隆则降低抗原结合信号。运行竞争测定,以使所有克隆均作为配体和分析物进行测试。

[0388] 实施例10:5C3D11与其他抗TL1A抗体的结合的比较

[0389] 进行了两次表位分箱研究,以比较5C3D11和12835所识别的表位与包括1D1、1681、1B4和1A9在内的其他TL1A抗体所识别的表位,如表26所示。

[0390] 表26. 用于表位分箱研究的抗体可变区序列

抗体	重链	轻链
5C3D11	SEQ ID NO 3	SEQ ID NO 6
12835	SEQ ID NO 26	SEQ ID NO 28
1D1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS GYDFTYYGISWVRQAPGQGLEWMG WISTYNGNTHYARMLQGRVTMTTDT STRTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREN YYGSGAYRGGMDVWGQGTITVTVSS	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISLPEPEFAVYYC QQRSNWPWTFGQGTKVEIK
[0391] 1681	EVQLLESGGGLVQPGKSLRLSCAVSG FTFSTYGMNWVRQAPGKGLEWVSSIS GTGRTTYHADSQGRFTVSRDNSKNI LYLQMNSLRADDTAVYFCTKERGDY YYGVFDYWGQGTITVTVSS	DIQMTQSPSTLSASVGRVTIT CRASQTISSWLAWYQQTPEKA PKLLIYAASNLSQGVPSRFSGS GSGTEFTLTISLQPDDEFATYY CQQYHRSWTFGQGTKVEIT
1B4	QVTLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGF SLSTSNMGVVWIRQPPGKALEWLAHI LWDDREYSNPALKSRLTISKDTSKNQ VVLMTNMDPVDATYFCARMSRNY YGSSYVMDYWGQGTITVTVSS	DIQLTQSPSFLSASVGRVTITC SASSSVNYMHWYQQKPGKAP KLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQPEDEFATYYCH QWNNYGTGFGQGTKVEIKR
1A9	QIQLVQSGPELKKPGETVKISKASGY TFTTYGMSWVKQAPGKGLKWMGWM NTYSGVTTYADDFKGRFAFSLETSAST AYMQIDNLKNEDTATYFCAREGYVFD DYYATDYWGQGTITVTVSS	DVLMTQTPSLPVS LGDQASIS CRSSQNIVHSDGNTYLEWYLQ KPGQSPKLLIYKVS NRFSGVDP RFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGIYYCFQGSHVPLTFGAGTKL ELK

[0392] 为了使亲和力效应最小化,在第一个研究中使用平面羧甲基葡聚糖表面传感器芯片(Xantec产品编号SPMXCMDP),而在第二个研究中使用HC30M传感器芯片(Xantec产品编号SPMXHC30M)。用于连续流动微量点样的运行缓冲液为HBS-EP+,流速为65 μ l/min。芯片在100mM MES,pH 5.5中用18mM EDC和4.5nM磺基-NHS活化7分钟。然后将抗体以两个重复的印刷物固定15min。在pH 4.5的10mM乙酸盐中将抗体稀释至10 μ g/ml。将抗体以3倍系列稀释度在板上的三处滴定,建立不同斑点密度的浓度系列。每种抗体点样8次——四个稀释度各两次。这创建了10x 8的阵列。剩余的活性基团使用1M乙醇胺(pH 8.5)用7分钟猝灭进行中和。由于抗原是同源三聚体蛋白质,而IgG是二价的,因此使用预混合条件进行表位分箱。

[0393] 第一个表位分箱研究-TL1A以50nM终浓度(3.3 μ g/ml)制备,并与333nM(50 μ g/ml)分析物(溶液相抗体)或运行缓冲液(对照)混合。对于IgG形式的样品,50 μ g/ml为333nM,而对于Fab形式的样品,50 μ g/ml为1 μ M。混合的样品在阵列上注入5min,并在每个循环后使用Pierce IgG洗脱缓冲液与5M NaCl(1M终浓度)的4:1混合物再生30秒。

[0394] 第二个表位分箱研究-TL1A以50nM终浓度(3.3 μ g/ml)制备,并与1 μ M(150 μ g/ml)IgG或2 μ M(200 μ g/ml)Fab分析物(溶液相抗体)或运行缓冲液(对照)混合。将抗体样品连续2倍稀释7次(对于IgG终浓度为7.8nM,对于Fab终浓度为15nM)。混合的样品在阵列上注入5min,并在每个循环后使用Pierce IgG洗脱缓冲液与5M NaCl(1M终浓度)的4:1混合物再生30秒。

[0395] 在表位分箱研究中,采用固定的5C3D11和12835观察到清晰的信号(夹心),所有对照抗体均作为分析物进行测试(表27,前两行)。这些结果证明,5C3D11和12835可以与其他抗体同时结合TL1A,因而识别不同的表位。

[0396] 表27. 抗体形成夹心结构(是)的能力的总结

表位箱元	配体	分析物					
		5C3D11	12835	1D1	1B4	1681	1A9
1	5C3D11	否	否	是	是	是	是
1	12835	否	否	是	是	是	是
2	1D1	是	是	否	否	是	是
2	1B4	是	是	否	否	是	是
3	1681	是	是	是	是	否	是
4	1A9	是	是	是	是	是	否

[0398] “是”表示抗体能够同时结合 TL1A 靶标。

[0399] 实施例11:抗TL1A功效的体内评估

[0400] 评估了抗TL1A抗体在结肠炎动物模型中的功效。在通过直肠内施用二硝基苯磺酸或三硝基苯磺酸(D/TNBS)或噁唑酮诱发的急性结肠炎的啮齿类动物模型中,以及通过在饮用水中施用DSS或转移CD45RB^{hi} T诱发的慢性结肠炎的啮齿类动物模型中,测试了抗TL1A抗体。DNBS和噁唑酮诱发局部溃疡和炎症。DSS施用诱发肠道强烈的全面炎症,其特征在于糜烂性病变和炎性浸润。所有这些模型的症状通常包括腹泻、潜血、体重减轻以及偶尔的直肠脱垂。在预防性模型中,抗体处理从开始施用诱发结肠炎的化合物开始。在治疗性模型中,抗体治疗在诱发开始后几天开始。确定该治疗对体重、大便稠度和潜血的影响,以及显微镜下所见的对上皮完整性和炎性浸润程度的影响。基于大便稠度和隐血的存在进行每天临床评分,给出疾病活动指数(DAI)评分。

[0401] 实施例12:1期临床试验

[0402] 进行了1期临床试验,以评价本文提供的抗TL1A抗体在克罗恩病受试者中的安全性、耐受性、药代动力学和药效学。

[0403] 单递增剂量(SAD)臂(arm):每组中的受试者(根据存在或不存在风险变体对受试者进行分组)接受单剂量的抗体或安慰剂。示例性剂量为1、3、10、30、100、300、600和800mg抗体,或5至30毫克/千克。在预定时间内进行行安全监测和PK评估。基于PK数据的评价,如果认为抗体耐受性良好,则在同一组受试者或另一组健康受试者中进行剂量递增。继续剂量递增,直至达到最大剂量,除非达到预定的最大暴露量或出现明显的不耐受副作用。

[0404] 多递增剂量(MAD)臂:每组中的受试者(根据存在或不存在风险变体对受试者进行分组)接受多剂量的抗体或安慰剂。剂量水平和给药间隔被选择为根据SAD数据预测为安全的剂量水平和给药间隔。选择剂量水平和给药频率,以在体循环中达到维持稳定状态数天的治疗药物水平,以允许监测合适的安全性参数。收集并分析样品,以确定PK谱。

[0405] 入组标准:年龄在18至55岁之间的无生育能力的健康受试者。健康被定义为没有通过详细的病史、全面体格检查(包括血压和脉搏率测量)、12导联ECG和临床实验室检验所发现的临床相关异常。无生育能力的女性受试者必须至少满足以下条件之一:(1)达到绝经后状态,定义为:连续至少12个月停止常规月经,无其他病理或生理原因;绝经后女性的血

清促卵泡激素 (FSH) 水平在实验室参考范围内; (2) 曾进行有记录的子宫切除术和/或双侧卵巢切除术; (3) 有医学上证实的卵巢功能衰竭。所有其他女性受试者 (包括输卵管结扎的女性和未进行有记录的子宫切除术、双侧卵巢切除术和/或卵巢功能衰竭的女性) 将被认为具有生育能力。身体质量指数 (BMI) 为 17.5 至 30.5 kg/m²; 体重 > 50 kg (110 磅)。亲笔签名并注明日期的知情同意书文件的证据, 表明已告知受试者 (或法定代表) 该研究的所有相关方面。

[0406] 选择两组健康受试者: 具有风险变体的受试者, 该风险变体的存在与对克罗恩病的易感性增加相关, 以及缺乏风险变体的受试者。

[0407] 排除标准: 临床上有意义的血液学、肾脏、内分泌、肺、胃肠、心血管、肝、精神病学、神经病学或变应性疾病 (包括药物变态反应, 但不包括未治疗的、无症状的、给药时的季节性变态反应) 的证据或历史。在历史上或当前具有以下任何血清学检验阳性结果的受试者: 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) 或人类免疫缺陷病毒 (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) 或对于生物制剂在之前 5 个半衰期或 180 天内, 采用研究药物进行治疗。妊娠女性; 哺乳期女性; 和具有生育能力的女性。

[0408] 主要结果评价指标: 剂量限制或不耐受性治疗相关不良事件 (AE) 的发生率 [时间范围: 12 周]。治疗紧急 AE (TEAE) 的发生率、严重程度和因果关系, 以及因治疗紧急不良事件而停药 [时间范围: 12 周]。实验室检查结果异常的发生率和严重程度 [时间范围: 12 周]。生命体征、血压 (BP) 和心电图 (ECG) 参数异常且临床相关的变化 [时间范围: 12 周]。

[0409] 次要结果评价指标: 单递增剂量: 最大观察血浆浓度 (C_{max}) [时间范围: 12 周]。单递增剂量: 达到最大观察血浆浓度的时间 (T_{max}) [时间范围: 12 周]。单递增剂量: 从时间零到 14 天的血浆浓度-时间曲线下面积 (AUC_{14d}) [时间范围: 12 周]。单递增剂量: 从时间零外推到无限远时间的血浆浓度-时间曲线下面积 (AUC_{inf}) [时间范围: 12 周]。单递增剂量: 从时间零到最后可量化浓度的血浆浓度-时间曲线下面积 (AUC_{last}) [时间范围: 12 周]。单递增剂量: 剂量归一化的最大血浆浓度 ($C_{max} [dn]$) [时间范围: 12 周]。单递增剂量: 剂量归一化的从时间零外推到无限远时间的血浆浓度-时间曲线下面积 ($AUC_{inf} [dn]$) [时间范围: 12 周]。单递增剂量: 剂量归一化的从时间零到最后可量化浓度的血浆浓度-时间曲线下面积 ($AUC_{last} [dn]$) [时间范围: 12 周]。单递增剂量: 血浆衰变半衰期 ($t_{1/2}$) [时间范围: 12 周]。血浆衰变半衰期是血浆浓度降低一半所测得的时间。单递增剂量: 平均停留时间 (MRT) [时间范围: 12 周]。单递增剂量: 稳态分布体积 (V_{ss}) [时间范围: 6 周]。分布体积被定义为药物总量需要均匀分布以产生所需血液药物浓度的理论体积。稳态分布体积 (V_{ss}) 是稳态下的表观分布体积。单递增剂量: 全身清除率 (CL) [时间范围: 6]。CL 是原料药从体内去除的速率的定量度量。

[0410] 多递增剂量首次剂量: 最大观察血浆浓度 (C_{max}) [时间范围: 12 周]。多递增剂量首次剂量: 达到最大观察血浆浓度的时间 (T_{max}) [时间范围: 12 周]。多递增剂量首次剂量: 从时间零到时间 τ (给药间期, 其中 $\tau = 2$ 周) 的血浆浓度-时间曲线下面积 (AUC_{τ}) [时间范围: 12 周]。多递增剂量首次剂量: 剂量归一化的最大血浆浓度 ($C_{max} [dn]$) [时间范围: 12 周]。多递增剂量首次剂量: 剂量归一化的从时间零到时间 τ (给药间期, 其中 $\tau = 2$ 周) 的血浆浓度-时间曲线下面积 ($AUC_{\tau} [dn]$) [时间范围: 12 周]。血浆衰变半衰期 ($t_{1/2}$) [时间范围: 12 周]。血

浆衰变半衰期是血浆浓度降低一半所测得的时间。多递增剂量首次剂量：平均停留时间 (MRT) [时间范围：12周]。表观分布体积 (V_z/F) [时间范围：12周]。分布体积被定义为药物总量需要均匀分布以产生所需血液药物浓度的理论体积。口服剂量后的表观分布体积 (V_z/F) 受吸收分数的影响。多递增剂量首次剂量：稳态分布体积 (V_{ss}) [时间范围：12周]。分布体积被定义为药物总量需要均匀分布以产生所需血液药物浓度的理论体积。稳态分布体积 (V_{ss}) 是稳态下的表观分布体积。多递增剂量首次剂量：表观口服清除率 (CL/F) [时间范围：12周]。药物的清除率是药物通过正常生物学过程代谢或消除的速率的度量。口服剂量后获得的清除率 (表观口服清除率) 受所吸收的剂量分数的影响。清除率是通过群体药代动力学 (PK) 建模估算的。药物清除率是原料药从血液中去掉的速率的定量度量。多递增剂量首次剂量：全身清除率 (CL) [时间范围：12周]。 CL 是原料药从体内去除的速率的定量量度。

[0411] 多递增剂量多剂量：最大观察血浆浓度 (C_{max}) [时间范围：12周]。多递增剂量多剂量：达到最大观察血浆浓度的时间 (T_{max}) [时间范围：12周]。多递增剂量多剂量：从时间零到时间 τ (给药间期, 其中 $\tau=2$ 周) 的血浆浓度-时间曲线下面积 (AUC_{τ}) [时间范围：12周]。多递增剂量多剂量：剂量归一化的最大血浆浓度 ($C_{max} [dn]$) [时间范围：12周]。多递增剂量多剂量：剂量归一化的从时间零到时间 τ (给药间期, 其中 $\tau=2$ 周) 的血浆浓度-时间曲线下面积 ($AUC_{\tau} [dn]$) [时间范围：12周]。多递增剂量多剂量：血浆衰变半衰期 ($t_{1/2}$) [时间范围：12周]。血浆衰变半衰期是血浆浓度降低一半所测得的时间。多递增剂量多剂量：表观分布体积 (V_z/F) [时间范围：12周]。分布体积被定义为药物总量需要均匀分布以产生所需血液药物浓度的理论体积。口服剂量后的表观分布体积 (V_z/F) 受吸收分数的影响。多递增剂量多剂量：稳态分布体积 (V_{ss}) [时间范围：12周]。分布体积被定义为药物总量需要均匀分布以产生所需血液药物浓度的理论体积。稳态分布体积 (V_{ss}) 是稳态下的表观分布体积。

[0412] 多递增剂量多剂量：表观口服清除率 (CL/F) [时间范围：12周]。药物的清除率是药物通过正常生物学过程代谢或消除的速率的度量。口服剂量后获得的清除率 (表观口服清除率) 受所吸收的剂量分数的影响。清除率是通过群体药代动力学 (PK) 建模估算的。药物清除率是原料药从血液中去掉的速率的定量度量。多递增剂量多剂量：全身清除率 (CL) [时间范围：12周]。 CL 是原料药从体内去除的速率的定量量度。多递增剂量多剂量：最小观察血浆谷浓度 (C_{min}) [时间范围：12周]。多递增剂量多剂量：稳态下的平均浓度 (C_{av}) [时间范围：12周]。多递增剂量多剂量：观察到的累积比率 (Rac) [时间范围：12周]。多递增剂量多剂量：峰谷波动 (PTF) [时间范围：12周]。多递增剂量附加参数：在相应静脉内剂量下皮下给药的生物利用度的估计值 (F) [时间范围：12周]。单递增剂量和多递增剂量的免疫原性：抗药物抗体 (ADA) 的产生 [时间范围：12周]。

[0413] 实施例13:1b期临床试验

[0414] 进行1b期开放标签临床试验, 以评价本文提供的抗TL1A抗体对具有与克罗恩病相关的风险变体的患者的功效。

[0415] 臂: 向10名风险变体阳性患者施用抗体, 该风险变体的存在与对克罗恩病的易感性增加相关。向5-10名风险变体阴性患者施用抗体。实时监测患者。采用集中准备的内窥镜检查 and 活检, 读取者不了解治疗的时间点和终点。

[0416] 入组标准: 选择了两组受试者: 具有风险变体的受试者, 该风险变体的存在与对克罗恩病的易感性增加相关, 以及缺乏风险变体的受试者。

[0417] 主要结果评价指标:罗恩病的简单内窥镜检查评分(SESCD)、克罗恩病活动指数(CDAI)和患者报告的结果(PRO)。如果风险变体阳性组显示出比基线降低50%,则进行2a期临床试验。

[0418] 入组标准:PRO进入标准:腹痛评分为2或更高,和/或大便频率评分为4或更高。主要结果为疼痛评分为0或1,大便频率评分为3或更低,并且与基线相比没有恶化。内窥镜检查进入标准:如果累及结肠,则SESCD回肠仅在评分为4和6时进入。主要内窥镜检查结果为平均SESCD的40-50%差异。

[0419] 实施例14:2a期临床试验

[0420] 进行2a期临床试验,以评价本文提供的抗TL1A抗体在患有克罗恩病的受试者中的功效。

[0421] 臂:每个臂(抗体和安慰剂臂)中有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名患者后进行期中分析,以寻找安慰剂与治疗组之间在主要结果(SESCD、CDAI和PRO相对于基线降低50%)方面的40-50%差异。

[0422] 主要结果评价指标:罗恩病的简单内窥镜检查评分(SESCD)、克罗恩病活动指数(CDAI)和患者报告的结果(PRO)。

[0423] 入组标准:PRO进入标准:腹痛评分为2或更高,和/或大便频率评分为4或更高。主要结果为疼痛评分为0或1,大便频率评分为3或更低,并且与基线相比没有恶化。内窥镜检查进入标准:如果累及结肠,则SESCD回肠仅在评分为4和6时进入。主要内窥镜检查结果为平均SESCD的40-50%差异。

[0424] 以上在具体实施方式中描述了各个实施方案。虽然这些描述直接描述了上述实施方案,但应当理解,本领域技术人员可以想到对本文示出和描述的具体实施方案的修改和/或改变。落入该描述的范围内的任何这类修改或改变也旨在包括于其中。除非特别指出,否则发明人的意图是,本说明书和权利要求书中的词语和短语具有对于适用领域的普通技术人员而言普通且惯用的含义。

[0425] 已经呈现了本申请人在提交本申请时已知的各个实施方案的以上描述,并且旨在用于说明和描述的目的。本发明的描述并非穷尽性的,也并非局限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改变。所描述的实施方案用于解释原理及实际应用,并且使本领域的其他技术人员能够利用各个实施方案,任选地具有各种修改,并适合于预期的特定用途。因此,意为本公开不限于所公开的特定实施方案。

[0426] 虽然已经示出并描述了特定实施方案,但对于本领域技术人员来说明显的是,基于本文的教导,在不脱离本公开内容及其更广泛的方面的情况下可以进行改变和修改,因此所附权利要求书旨在将所有这些改变和修改都涵盖在其范围内,并涵盖在本公开的真实精神和范围内。本领域技术人员将会理解,通常,本文使用的术语一般意指“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“包括”应被解释为“包括但不限于”,等等)。

[0427] 序列

[0428]

SEQ ID NO	描述	序列
1	鼠mAb 5C3D11重链可变区	gaagttcagctgcaacagctctggcgccgagctggftaa g c c t g g c g c t t c t g t g a a g c t g a g c t g t a c c g c c t c t g g c t t c g a c a t c c a a g a c a c c t a c a t g c a c t g g g t c a a g c a g a g g c c t g a g c a g g g a c t c g a g t g g a t c g g c a g a a t t g a t c t g c c a g c g g c c a c a c c a a a t a c g a c c c c a a g t c c a a g t g a a g g c c a c c a t c a c c a c c g a c a c c a g c a g a a t a c c g c t a c c t g c a g c t g a g c a g c c t g a c c t c t g a a g a t a c c g c c g t g t a c t a c t g c a g c a g a t c t g g c g g a c t g c c c g a t g t t g g g g a g c c g g a a c a a c c g t g a c a g t g t c c a g c
2	鼠mAb 5C3D11重链可变区- 针对大肠杆菌密码子优化的	g a g g t t c a a c t t c a a c a a t c g g g g g c c g a g c t g g f t a a g c c c g g c g c t t c t g t a a a t t g t c t t g c a c t g c c t c t g g g t t g a c a t c c a a g a t a c a t a t a t g c a t t g g g t g a a a c a g c g t c c c g a g c a g g g c t t g g a g t g g a t t g g a c g t a t t g a c c c g c c t c t g g g c a c a c g a a a t a t g a t c c t a a g t t c c a g g t a a a g c g a c t a t c a a a c g g a c a c c t c c a g c a a t a c g g c t t a t t a c a g t t a t c t c g c t g a c c t c t g a g g a t a c t g a g t a c t a c t g c t c g c t c t g g t g g t c t g c c a g a c g t g t g g g t g c a g g a a c t a c a g t a c t g t g t c t t c a
3	鼠mAb 5C3D11重链可变区- 氨基酸	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFDIQDITYMHWVKQRPEQGLEWIGRIDPASGHTKYDPKFQVKATITTTDTSNTAYLQLSSLTSEDTAIVYYCSRSGGLPDVWGAGTTVTVSS
4	鼠mAb 5C3D11轻链可变区	caaattgtgctgtctcagagccccgccatcctgagtgcttctccaggcagaaagtaccatgacctgcagagccagcagcagcgtgtctctacatgtactggatcagcagaaagccggcagcagccccaaagccttggatctaccgccaaagcaatctggccagcggcgtgccgatagatttctggctctggcagcggcaccagctacagcctgacaatctctagaaggaaagccgaggatgccgccacctactactgtcaacagtggaagcggcaacccagaaccttggcggaggcaccaagctggaaatcaag
5	鼠mAb 5C3D11轻链可变区- 针对大肠杆菌密码子优化的	caaatgtcctgtcacagtcccccggcgatccttctgcttaccaggagagaaggtaacatgacatgtcgcgcctcttctcagtttctacatgtactggtaccagcagaaaccaggatcatccccaaacctggatctacgctacatcaaacctgcatctggcgtgccagaccgttttcagggtcgggctcggggacttctattcattaccattctcgcgtagaagcggaaagaccgccca cgtattattgcagcagtggtcaggaaatcgcgcacattcggaggcggaacgaaattggagatcaaa
6	鼠mAb 5C3D11轻链可变区- 氨基酸	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSVSYMYWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPDRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSGNPRTFGGGTKLEIK
7	5C3D11 HCDR1	ggcttcgacatccaagacacctacatgcac
8	5C3D11 HCDR1 - 针对大肠杆菌密码子优化的	gggtttgacatccaagatacatatgcat
9	5C3D11 HCDR1 - 氨基酸	GFDIQDITYMH
10	5C3D11 HCDR2	agaattgatctgccagcggccacaccaaatagacccccagttccaagtg
11	5C3D11 HCDR2 - 针对大肠杆菌密码子优化的	cgtattgaccccgctctgggcacacgaaatatgatctaagttccaggtt
12	5C3D11 HCDR2 - 氨基酸	RIDPASGHTKYDPKFQV
13	5C3D11 HCDR3	tctggcggactgccgatgtt

[0429]

14	5C3D11 HCDR3 – 针对大肠杆菌密码子优化的	tctggtggctgccagacgtg
15	5C3D11 HCDR3 – 氨基酸	SGGLPDV
16	5C3D11 LCDR1	agagccagcagcagcgtgtcctacatgtac
17	5C3D11 LCDR1 – 针对大肠杆菌密码子优化的	cgcgcctcttccctcagtttctacatgtac
18	5C3D11 LCDR1 – 氨基酸	RASSSVSYMY
19	5C3D11 LCDR2	gccacaagcaatctggccagc
20	5C3D11 LCDR2 – 针对大肠杆菌密码子优化的	gctacatcaaaccttgcacat
21	5C3D11 LCDR2 – 氨基酸	ATSNLAS
22	5C3D11 LCDR3	caacagtggagcggcaacccagaacc
23	5C3D11 LCDR3 – 针对大肠杆菌密码子优化的	cagcagtggtcaggaaatccgcgcaca
24	5C3D11 LCDR3 – 氨基酸	QQWSGNPRT
25	12835 (人源化 5C3D11 重链可变区) – 针对大肠杆菌密码子优化的	caagtacaattagtcacgtcgggtgccggtaaaaaaacctggagcatccgtaaaactgtcttgcaaaagcatcggggttgacatccaggacacctacatgcactgggtgcgtcaagctccaggacagggattagatggatgggtcgcacgcaccccgcgagcggacacacgaaatagaccctaaattcaagtacgtgtcagatgactaccgacactagtagcagcactgtttataggaattgtcctcgttacgctcagaggatagcggcagctattatgcagccgtccggaggcttaccgacgtctggggacaggggaactactgtaacagtcagtagt
26	12835 (人源化 5C3D11 重链可变区) – 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQVRVTMTTDTSTSTVYMEISSLRSEDYAVYYCSRSGGLPDVWVGQTTVTVSS
27	12835 (人源化 5C3D11 轻链可变区) – 针对大肠杆菌密码子优化的	gagattgtgtaacgcaatcaccggggactttatcgtgtcgcgggggagcgcgtacaatgtcttgcgcgtctcctctcggttcatacatgtattggtatacaaaaaaccgggacaggctccacgccctggatttacgctactagcaattggcctcggcggtcccgaccgctcagcgggtcagggagcggcaccgattacacgttgacctctcgtctggaacctgaagacttcgcggtctattactgtcaacaatgctcgggaaatccccgtacattggcggaggacgaagttggaatataa
28	12835 (人源化 5C3D11 轻链可变区) – 氨基酸	EIVLTQSPGTLSPGERVTMSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRPWIYATSNLASGVPDRFSGSGSDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSGNPRTFGGGTKLEIK
29	12835 HCDR1 – 针对大肠杆菌密码子优化的	gggtttgacatccaggacacctacatgcac
30	12835 HCDR2 – 针对大肠杆菌密码子	cgcacgaccccgagcggacacacgaaatagaccctaaattcaagta

[0430]

	优化的	
31	12835 HCDR3 - 针对大肠杆菌密码子优化的	tccggaggcttaccgacgctc
32	12835 LCDR1 - 针对大肠杆菌密码子优化的	cgcgcttcctctcggtttcatacatgtattggtat
33	12835 LCDR2 - 针对大肠杆菌密码子优化的	gctactagcaatttggcctcg
34	12835 LCDR3 - 针对大肠杆菌密码子优化的	caacaatggcgggaaatccccgtaca
35	18-7 (CDR-移植的轻链) 重链可变区	caagtacaattagtcacgctgggtgccgaggtataaaaaaacctggagcatccgtaaaactgtctgcaaaagcatcggggttgacatccaggacacctacatgcactgggtgctcaagctccaggacaggattagatggatgggtcgcacgcaccccgagcggacacacgaaatacgaccctaaattcaagtacgtgtcagatgactcgtgacactagtagcagcactgtttataggaattgtcctcgttacgctcagaggatagggcagctctattattgacgccgttccggaggcttaccgacgtctggggacagggaaactactgtaacagtcagtagt
36	18-7 (CDR-移植的轻链) 重链可变区 - 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQVRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCSRSGLPDVWGQTTVTVSS
37	18-7 (CDR-移植的轻链) 轻链可变区	gagattgtgtaacgcaatcaccggggactttatcgtctgcccggggagcgcgcgacactgtcttctcgcgcttctctcggtttcatacatgtattggtatcaaaaaaacgggacaggctccacgcctgctgatttacgctactagcaatttggcctcgggcacccccgaccgcttcagcgggtcagggagcggcaccgattttacgttgaccatctctgcttggaaacctgaagacttcgggtctattactgtcaacaatggcgggaaatccccgtacatttggcggaggacgaagttggaattaaa
38	18-7 (CDR-移植的轻链) 轻链可变区 - 氨基酸	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSGNPRTFGGGTKLEIK
39	21-3 (CDR-移植的重链) 重链可变区	caagtacaattagtcacgctgggtgccgaggtataaaaaaacctggagcatccgtaaaagtctctgcaaaagcatcggggttgacatccaggacacctacatgcactgggtgctcaagctccaggacaggattagatggatgggtcgcacgcaccccgagcggacacacgaaatacgaccctaaattcaagtacgtgtcagatgactcgtgacactagtagcagcactgtttataggaattgtcctcgttacgctcagaggatagggcagctctattattgcccacgttccggaggcttaccgacgtctggggacagggaaactactgtaacagtcagtagt
40	21-3 (CDR-移植的重链) 重链可变区 - 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQVRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARSGLPDVWGQTTVTVSS
41	21-3 (CDR-移植的重链) 轻链可变区	gagattgtgtaacgcaatcaccggggactttatcgtctgcccggggagcgcgcgacactgtcttctcgcgcttctctcggtttcatacatgtattggtatcaaaaaaacgggacaggctccacgcctgctgatttacgctactagcaatttggcctcgggcgttcccgaccgcttcagcgggtcagggagcggcaccgattacaggtgaccatctctgcttggaaacctgaagacttcgggtctattactgtcaacaatggcgggaaatccccgtacatttggcggaggacgaagttggaattaaa

[0431]

42	21-3 (CDR-移植的重链) 轻链可变区 - 氨基酸	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGVDPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWWSGNPRTFGGGTKLEIK
43	21-3 V102K (CDR-移植的重链) 重链可变区 - 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQVRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARSGLPDKWGQGT TTVTS S
44	21-3 V102M (CDR-移植的重链) 重链可变区 - 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQVRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARSGLPDMWGQGT TTVTV SS
45	21-3 V102Q (CDR-移植的重链) 重链可变区 - 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQVRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARSGLPDQWGQGT TTVTS S
46	21-3 V102W (CDR-移植的重链) 重链可变区 - 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQVRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARSGLPDWWGQGT TTVTV SS
47	18-7 S92D (CDR-移植的轻链) 轻链可变区 - 氨基酸	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWDGNPRTFGGGTKLEIK
48	18-7 S92E (CDR-移植的轻链) 轻链可变区 - 氨基酸	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWEGNPRTFGGGTKLEIK
49	18-7 S92H (CDR-移植的轻链) 轻链可变区 - 氨基酸	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWHGNPRTFGGGTKLEIK
50	18-7 S92N (CDR-移植的轻链) 轻链可变区 - 氨基酸	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNGNPRTFGGGTKLEIK
51	18-7 S92Q (CDR-移植的轻链) 轻链可变区 - 氨基酸	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWQGNPRTFGGGTKLEIK
52	21-3 CDRv (CDR-移植的重链) 重链可变区 - 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFX ₁ X ₂ X ₃ DTX ₄ X ₅ H WVRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQVRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARSGLX ₆ PDX ₇ WGQGT TTVTVSS X ₁ = D 或 E X ₂ = I、P 或 V X ₃ = G、Q、S 或 V X ₄ = F 或 Y X ₅ = I 或 M X ₆ = L 或 M X ₇ = E、I、K、L、M、Q、T、V、W 或 Y

[0432]

53	18-7 CDR _v (CDR-移植的轻链) 轻链可变区 - 氨基酸	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCX ₁ QWX ₂ X ₃ X ₄ PRTFGGGTKLEIK X ₁ = Q 或 N X ₂ = D、E、H、N、Q 或 S X ₃ = A 或 G X ₄ = D、F、K、N、R、S 或 T
54	21-3 CDR _v (重链含有鼠S93) 重链可变区 - 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFX ₁ X ₂ X ₃ DTX ₄ X ₅ HWVRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQVRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCSRSGGX ₆ PDX ₇ WGQGT VTVSS X ₁ = D 或 E X ₂ = I、P 或 V X ₃ = G、Q、S 或 V X ₄ = F 或 Y X ₅ = I 或 M X ₆ = L 或 M X ₇ = E、I、K、L、M、Q、T、V、W 或 Y
76	QQWSGTPRT	
78	QQWSGDPRT	
80	QQWSGFPRT	
82	QQWSGKPRRT	
84	QQWSGRPRT	
86	QQWSGSPRT	

[0433] SEQ ID NO: 490 (L8; VL)

[0434] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWGNPRTFGGGTKLEIK

[0435] SEQ ID NO: 491 (L8; VH)

[0436] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQVRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSGLPDVWGQGT VTVSS

[0437] SEQ ID NO: 492 (克隆34; VL)

[0438] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWEGNPRTFGGGTKLEIK

[0439] SEQ ID NO: 493 (克隆34; VH)

[0440] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIEPASGHIKYDPKFQVRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSGLPDVWGQGT VTVSS

[0441] SEQ ID NO: 494 (克隆2; VL)

[0442] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWEGNPRTFGGGTKLEIK

[0443] SEQ ID NO: 495 (克隆2; VH)

[0444] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIEPASGHIKYSKPFQVRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSGLPDVWGQGT VTVSS

- [0445] SEQ ID NO:496 (克隆52;VL)
[0446] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCGASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWEGNPRTFGGGTKLEIK
[0447] SEQ ID NO:497 (克隆52;VH)
[0448] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIEPASGHIKYSPKFQGRVT
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARSGLPDWWGQGTTVTVSS
[0449] SEQ ID NO:498 (克隆46;VL)
[0450] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWEGNPRTFGGGTKLEIK
[0451] SEQ ID NO:499 (克隆46;VH)
[0452] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIEPASGHVKYSPKFQVRVT
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARSGLPDWWGQGTTVTVSS
[0453] SEQ ID NO:500 (克隆47;VL)
[0454] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWEGNPRTFGGGTKLEIK
[0455] SEQ ID NO:501 (克隆47;VH)
[0456] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIEPASGHVKYDPKFQTRVT
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARSGLPDWWGQGTTVTVSS
[0457] SEQ ID NO:502 (克隆14;VL)
[0458] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWQGNPRTFGGGTKLEIK
[0459] SEQ ID NO:503 (克隆14;VH)
[0460] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPASGH_iKYDPKFQ_kRV
TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARSGLPDMWGQGTTVTVSS
[0461] SEQ ID NO:504 (克隆16L;VL)
[0462] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWQGNPRTFGGGTKLEIK
[0463] SEQ ID NO:505 (克隆16L;VH)
[0464] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPASGH_vKiDPKFQVRV
TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARSGLPDMWGQGTTVTVSS
[0465] SEQ ID NO:506 (克隆17L;VL)
[0466] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWQGNPRTFGGGTKLEIK
[0467] SEQ ID NO:507 (克隆17L;VH)
[0468] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPASGHLKYDPKFQVRVT
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARSGLPDMWGQGTTVTVSS
[0469] SEQ ID NO:508 (克隆17L-1;VL)
[0470] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWQGNPRTFGGGTKLEIK

[0471] SEQ ID NO:509 (克隆17L-1;VH)
[0472] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPASGHLKYDPKFQRRVT
MTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARSGLPDMWGQGTTVTVSS
[0473] SEQ ID NO:510 (克隆23;VL)
[0474] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWEGNPRTFGGGTKLEIK
[0475] SEQ ID NO:511 (克隆23;VH)
[0476] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPASGHLKYDPKFQNRVT
MTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARSGLPDKWGQGTTVTVSS
[0477] SEQ ID NO:512 (克隆A1;VL)
[0478] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCGASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWEGNPRTFGGGTKLEIK
[0479] SEQ ID NO:513 (克隆A1;VH)
[0480] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPASGHLKYDPKFQNRVT
MTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARSGLPDKWGQGTTVTVSS
[0481] SEQ ID NO:514 (克隆53;VL)
[0482] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWEGNPRTFGGGTKLEIK
[0483] SEQ ID NO:515 (克隆53;VH)
[0484] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIEPASGHLKYDPKFQERVT
MTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARSGLPDKWGQGTTVTVSS
[0485] SEQ ID NO:516 (克隆E1;VL)
[0486] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCGASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWEGNPRTFGGGTKLEIK
[0487] SEQ ID NO:517 (克隆E1;VH)
[0488] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIEPASGHLKYDPKFQERVT
MTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARSGLPDKWGQGTTVTVSS
[0489] SEQ ID NO:518 (克隆3-17L V-A;VL)
[0490] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWQGNPRTFGGGTKLEIK
[0491] SEQ ID NO:519 (克隆3-17L V-A;VH)
[0492] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPASGHLKYDPKFQGRVT
ITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGLPDMWGQGTTVTVSS
[0493] SEQ ID NO:520 (克隆3-17L;VL)
[0494] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWQGNPRTFGGGTKLEIK
[0495] SEQ ID NO:521 (克隆3-17L;VH)
[0496] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFDIQDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPASGHLKYDPKFQGRVT
ITRDTASTVYMESSLRSEDTAVYYCARSGLPDMWGQGTTVTVSS

- [0497] SEQ ID NO:522 (克隆L8mod;VL)
[0498] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSGNPRTFGGGTKLEIK
[0499] SEQ ID NO:523 (克隆L8mod;VH)
[0500] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQGRAT
ITTDTSASTAYLQLSSLRSEDVAVYYCARSGGLPDFWQGTTVTVSS
[0501] SEQ ID NO:524 (克隆X-V;VL)
[0502] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSGNPRTFGGGTKLEIK
[0503] SEQ ID NO:525 (克隆X-V;VH)
[0504] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQVRAT
ITTDTSASTAYLQLSSLRSEDVAVYYCARSGGLPDFWQGTTVTVSS
[0505] SEQ ID NO:526 (克隆X;VL)
[0506] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSGNPRTFGGGTKLEIK
[0507] SEQ ID NO:527 (克隆X;VH)
[0508] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQGRAT
ITTDTSASTAYLQLSSLRSEDVAVYYCARSGGLPDFWQGTTVTVSS
[0509] SEQ ID NO:528 (克隆H3-1;VL)
[0510] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSGNPRTFGGGTKLEIK
[0511] SEQ ID NO:529 (克隆H3-1;VH)
[0512] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQGRAT
ITTDTSASTAYLQLSSLRSEDVAVYYCARSGGLPDFWQGTTVTVSS
[0513] SEQ ID NO:530 (克隆XL3-6;VL)
[0514] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCSQWSGNPRTFGGGTKLEIK
[0515] SEQ ID NO:531 (克隆XL3-6;VH)
[0516] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQGRAT
ITTDTSASTAYLQLSSLRSEDVAVYYCARSGGLPDFWQGTTVTVSS
[0517] SEQ ID NO:532 (克隆XL3-10;VL)
[0518] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSGNPRFSGGGTKLEIK
[0519] SEQ ID NO:533 (克隆XL3-10;VH)
[0520] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQGRAT
ITTDTSASTAYLQLSSLRSEDVAVYYCARSGGLPDFWQGTTVTVSS
[0521] SEQ ID NO:534 (克隆XL3-15;VL)
[0522] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSRNPRTFGGGTKLEIK

- [0523] SEQ ID NO:535 (克隆XL3-15;VH)
- [0524] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQGRAT
ITTDTSASTAYLQLSSLRSEDTAVYYCARSGLPDFWGQGTITVTVSS
- [0525] SEQ ID NO:536 (克隆L3-13;VL)
- [0526] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWKNPRTFGGGTKLEIK
- [0527] SEQ ID NO:537 (克隆L3-13;VH)
- [0528] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPASGHTKYDPKFQGRAT
ITTDTSASTAYLQLSSLRSEDTAVYYCARSGLPDFWGQGTITVTVSS
- [0529] SEQ ID NO:538 (克隆H2-2;VL)
- [0530] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWGNPRTFGGGTKLEIK
- [0531] SEQ ID NO:539 (克隆H2-2;VH)
- [0532] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPASGHSKYDPKFQVRAT
ITTDTSASTAYLQLSSLRSEDTAVYYCARSGLPDFWGQGTITVTVSS
- [0533] SEQ ID NO:540 (克隆H2-5;VL)
- [0534] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQWGNPRTFGGGTKLEIK
- [0535] SEQ ID NO:541 (克隆H2-5;VH)
- [0536] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFDIQDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPASGHYKYDPKFQVRAT
ITTDTSASTAYLQLSSLRSEDTAVYYCARSGLPDFWGQGTITVTVSS
- [0537] SEQ ID NO:542修饰的G1
- [0538] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0539] SEQ ID NO:543G2恒定域
- [0540] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVSSNFGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SLEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0541] SEQ ID NO:544Kappa恒定域
- [0542] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLS
LSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0543] SEQ ID NO:545 (L8 HFR1)
- [0544] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKAS
- [0545] SEQ ID NO:546 (L8 HFR2)

[0546] WVRQAPGQGLEWMG
[0547] SEQ ID NO:547 (L8 HFR3)
[0548] RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYC
[0549] SEQ ID NO:548 (L8 HFR4)
[0550] WGQGTTVTVSS
[0551] SEQ ID NO:549 (L8 LFR1)
[0552] EIVLTQSPG TLSLSPGERATLSC
[0553] SEQ ID NO:550 (L8 LFR2)
[0554] WYQQKPGQAPRL LIY
[0555] SEQ ID NO:551 (L8 LFR3)
[0556] GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
[0557] SEQ ID NO:552 (L8 LFR4)
[0558] FGGGTKLEIK
[0559] SEQ ID NO:586 (VH FR3)
[0560] RATITTDTSASTAYLQLSSLRSED TAVYYC
[0561] SEQ ID NO:587 (VH FR3)
[0562] RVTITRDTSASTVYMELSSLRSED TAVYYC
[0563] SEQ ID NO:588 (VH FR3)
[0564] RVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYC

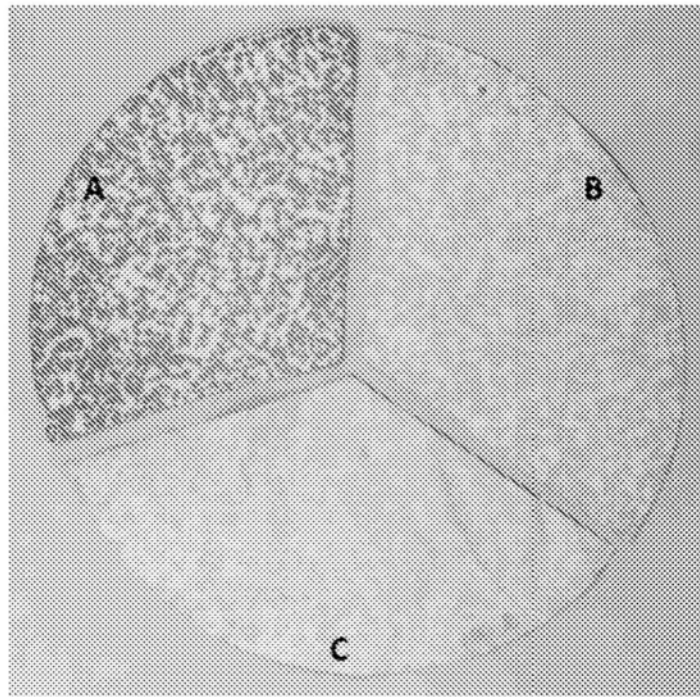


图1

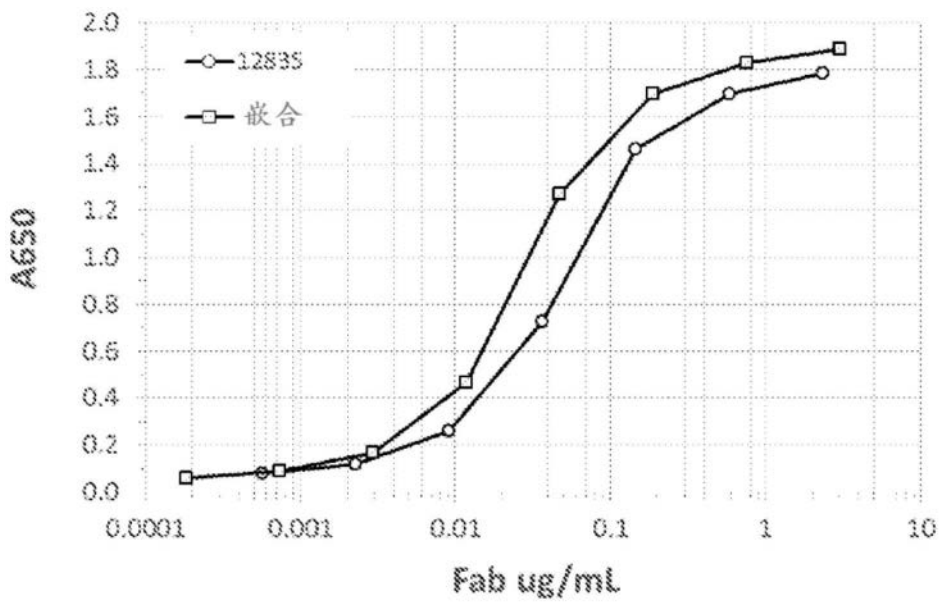


图2

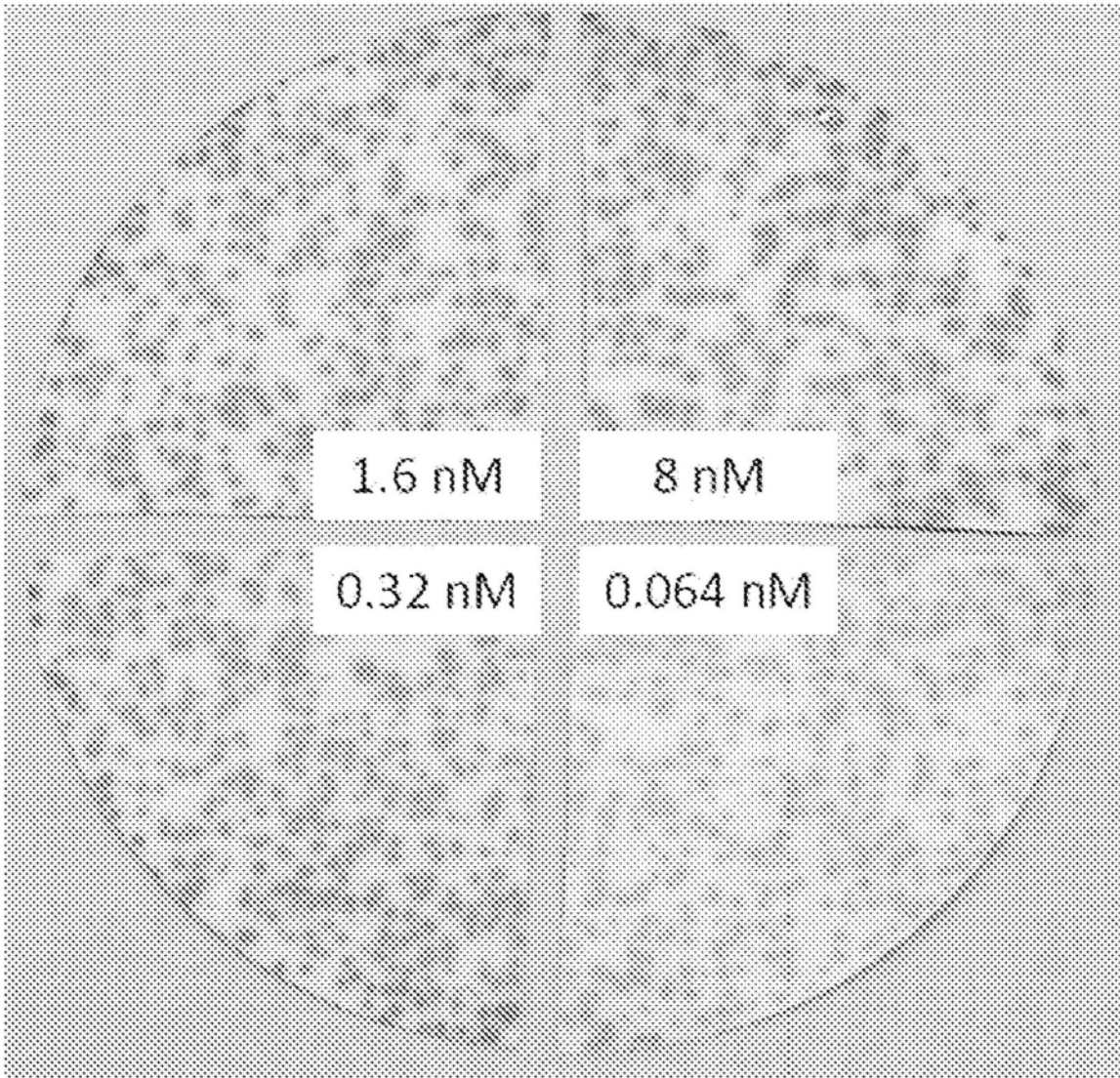


图3

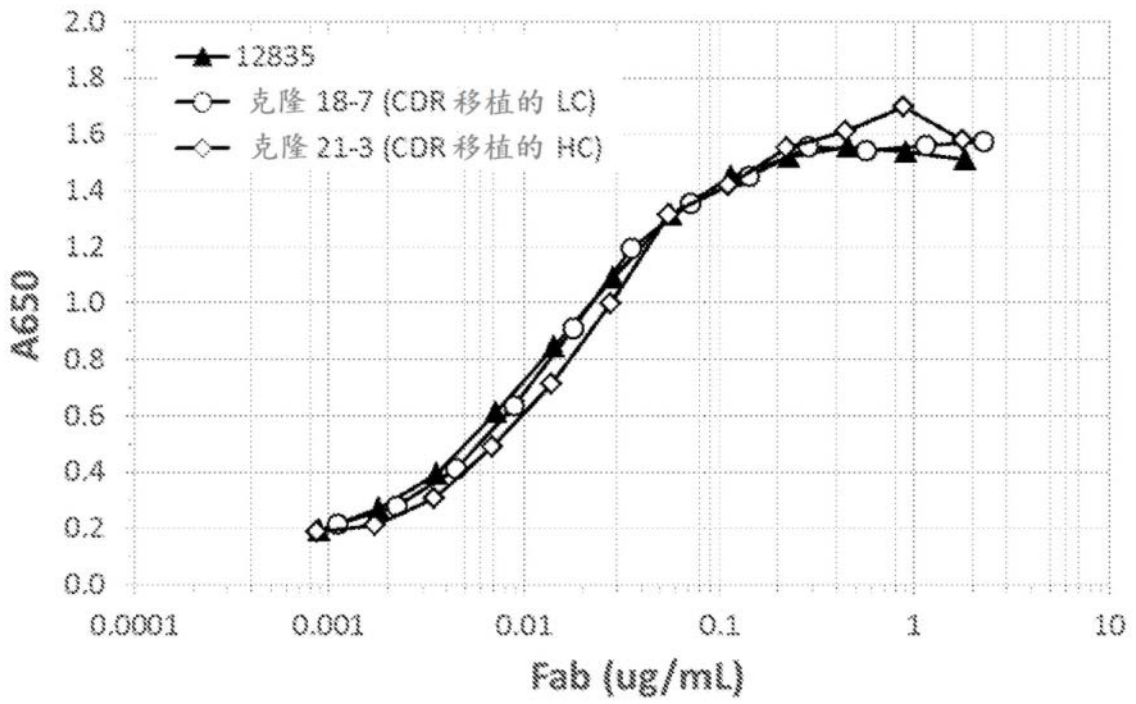


图4A

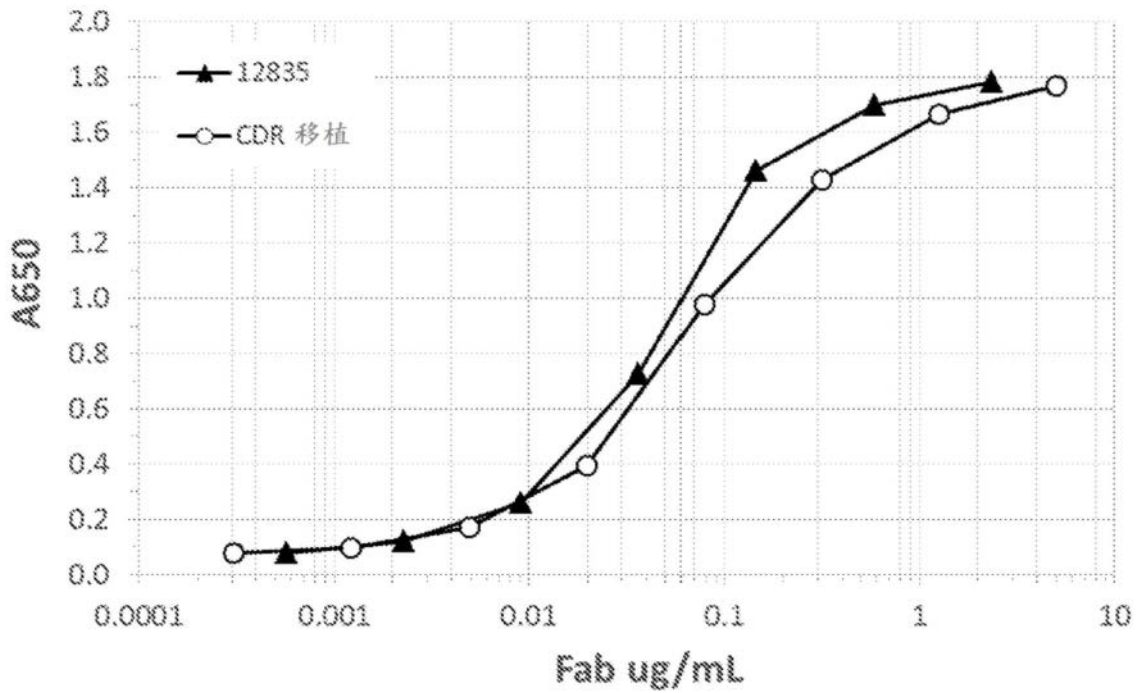


图4B

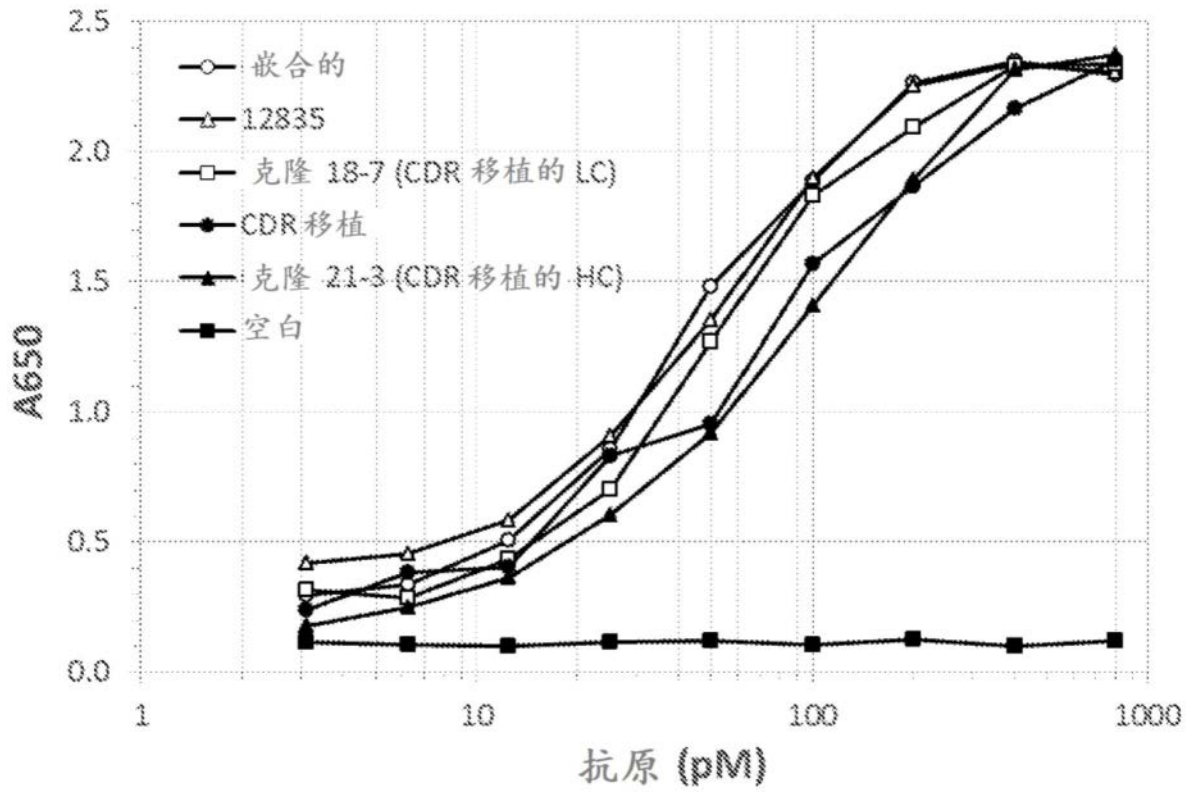


图5

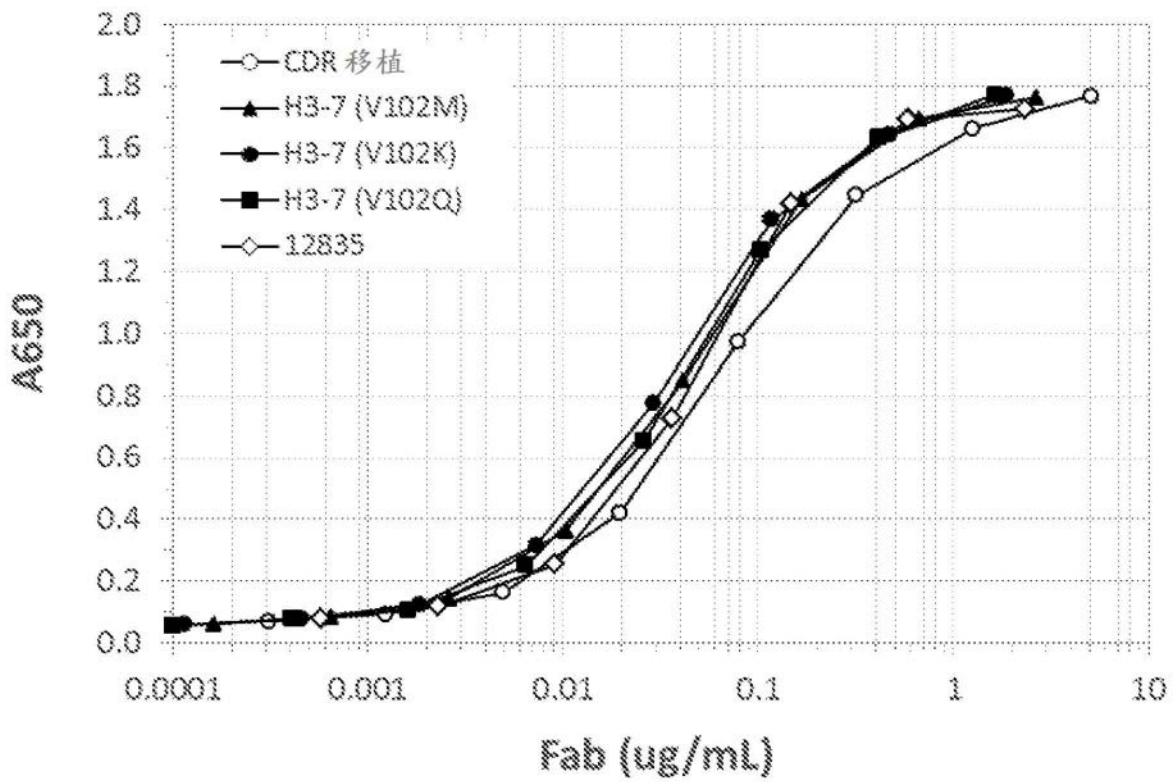


图6A

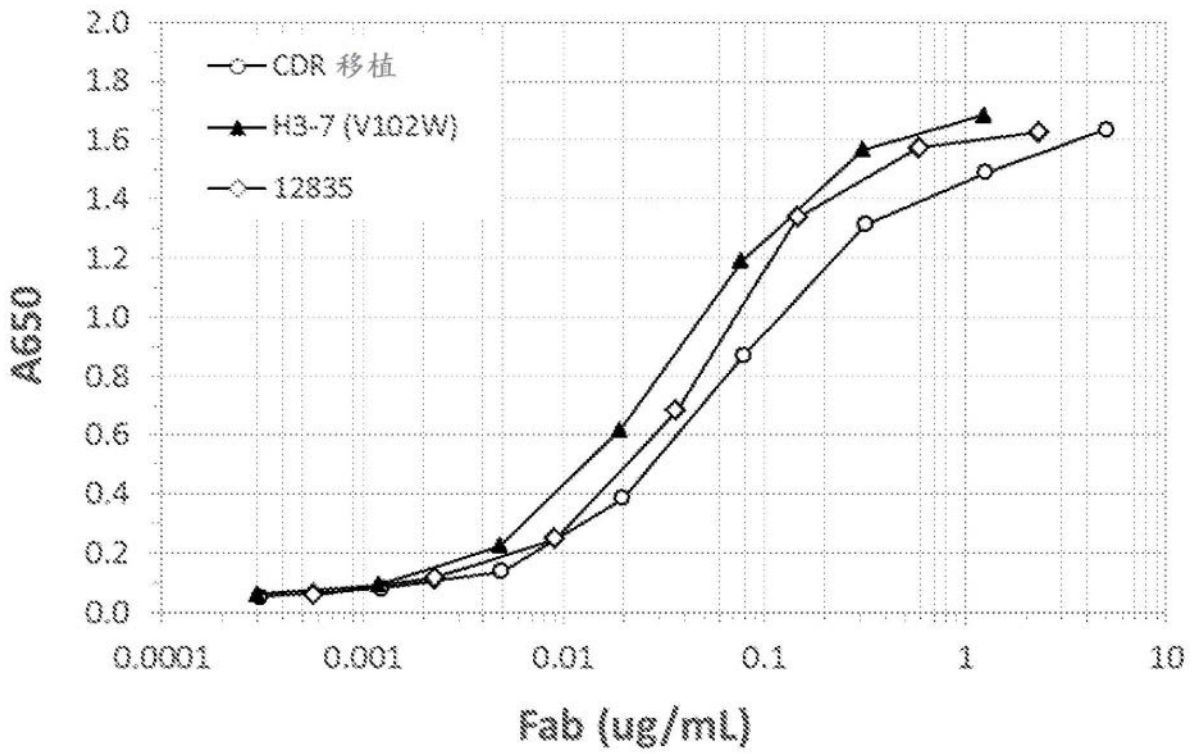


图6B

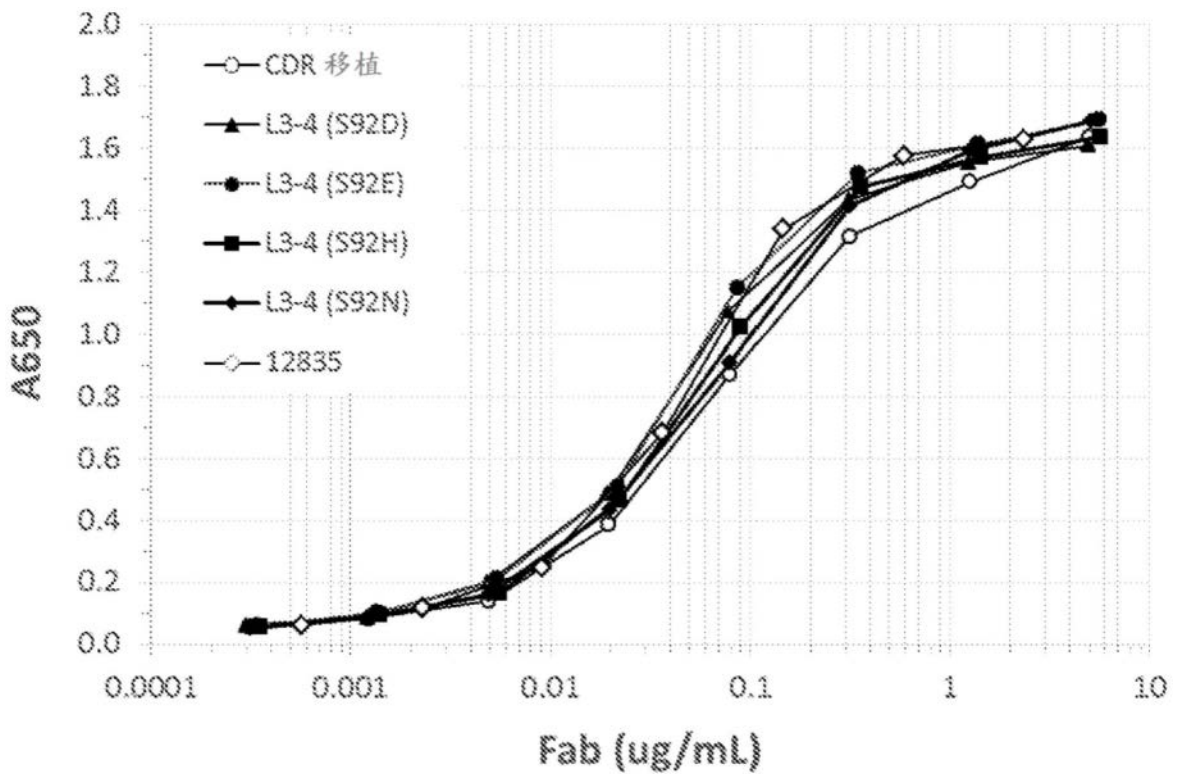


图7A

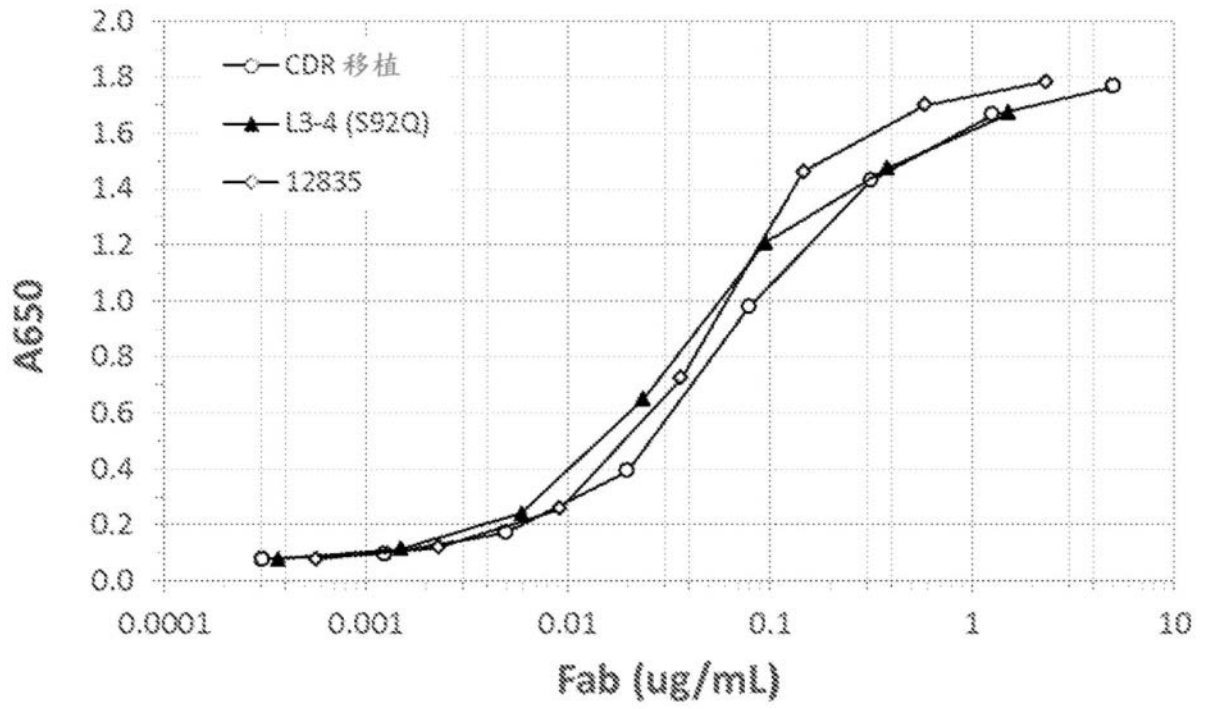


图7B

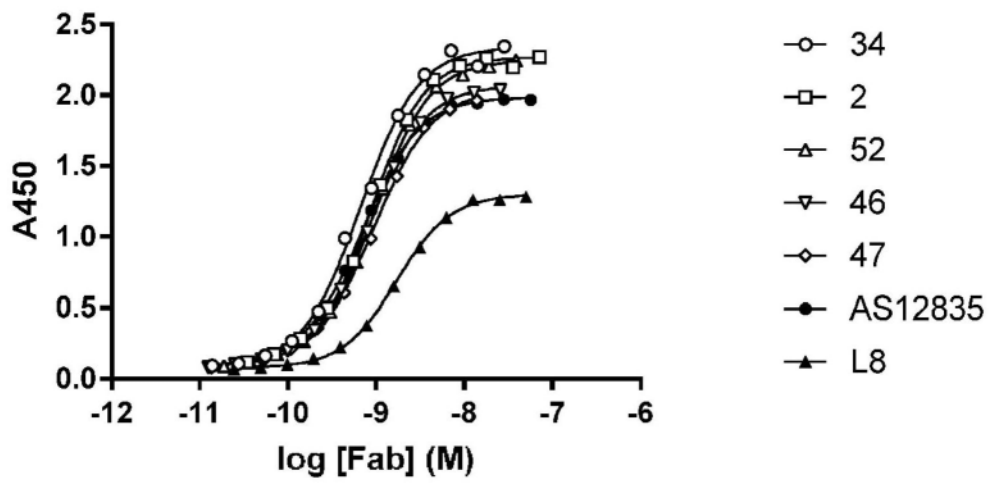


图8A

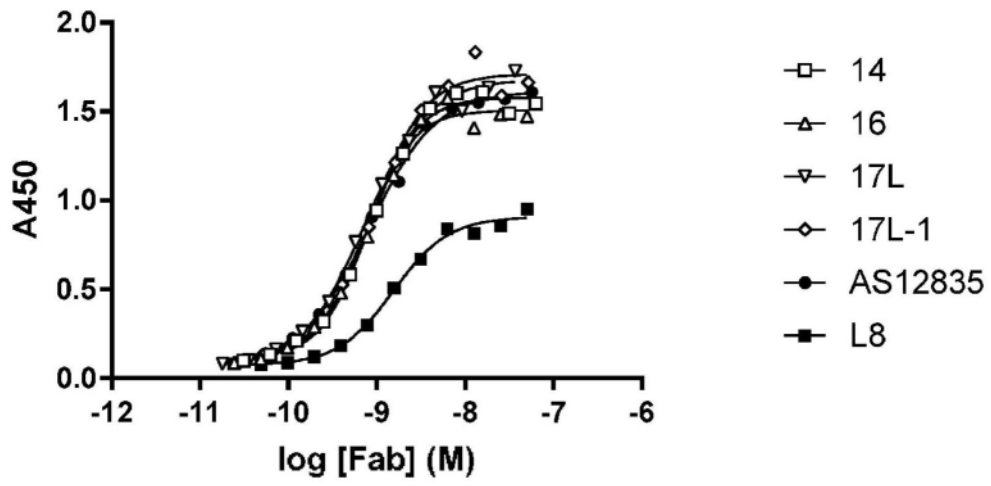


图8B

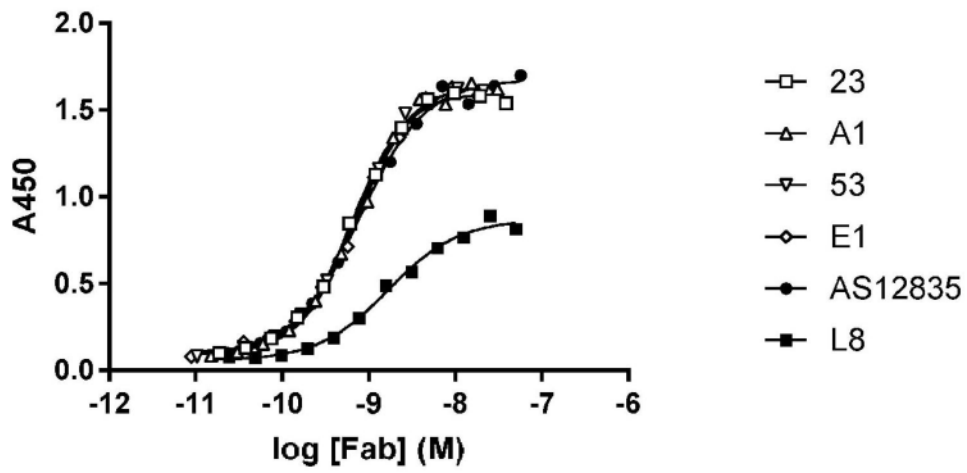


图8C

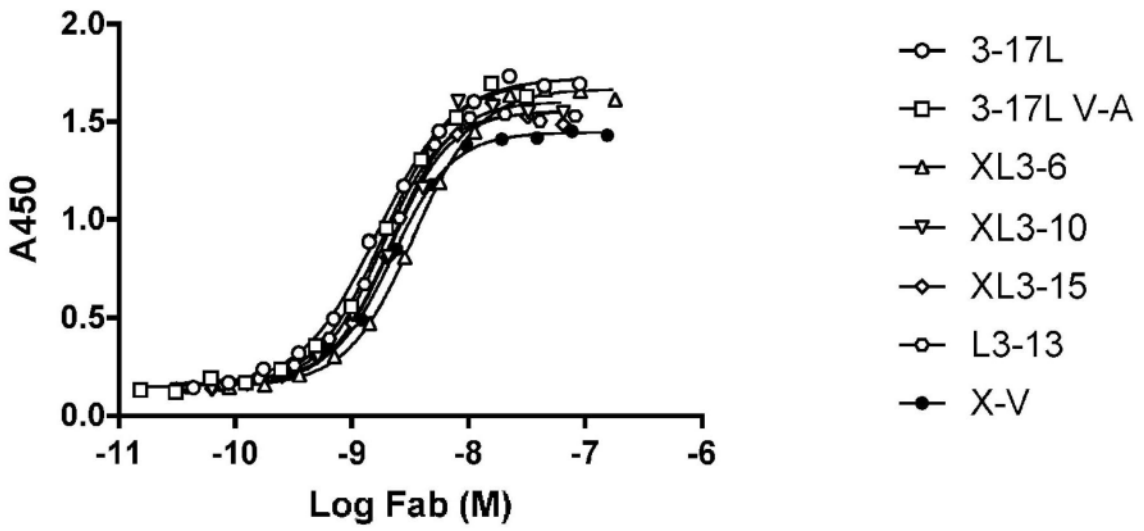


图9A

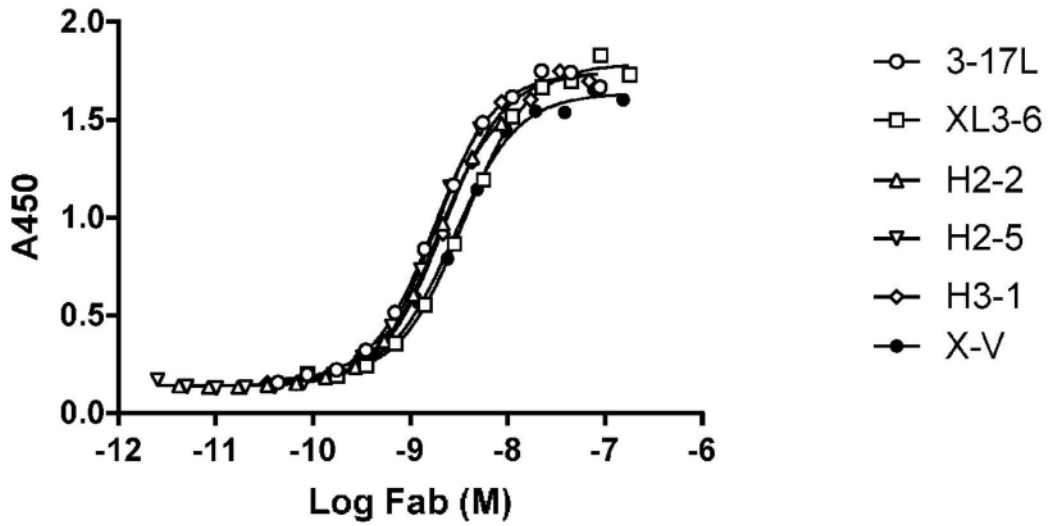


图9B

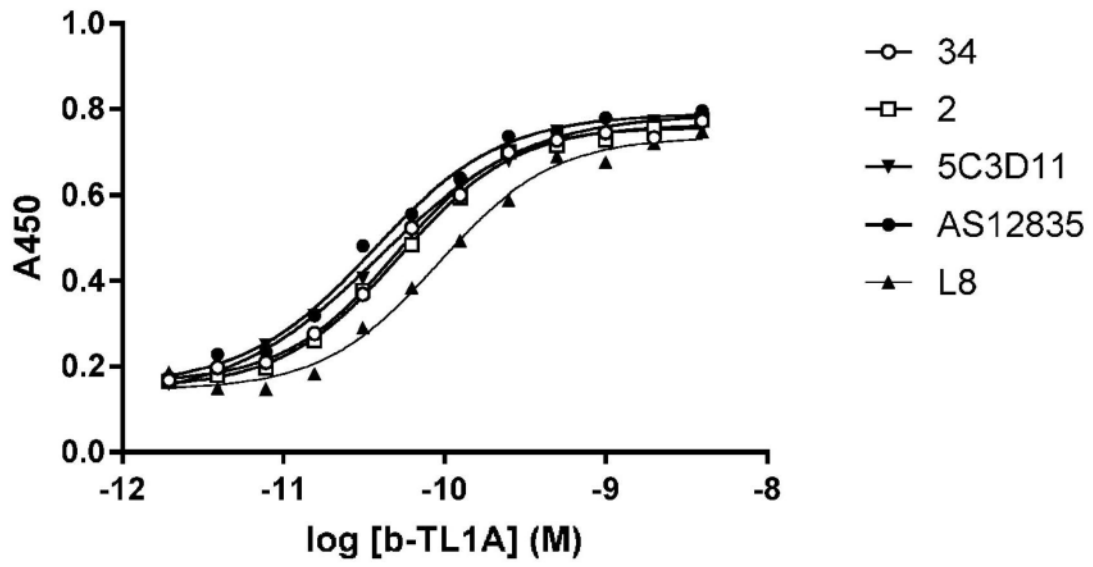


图10A

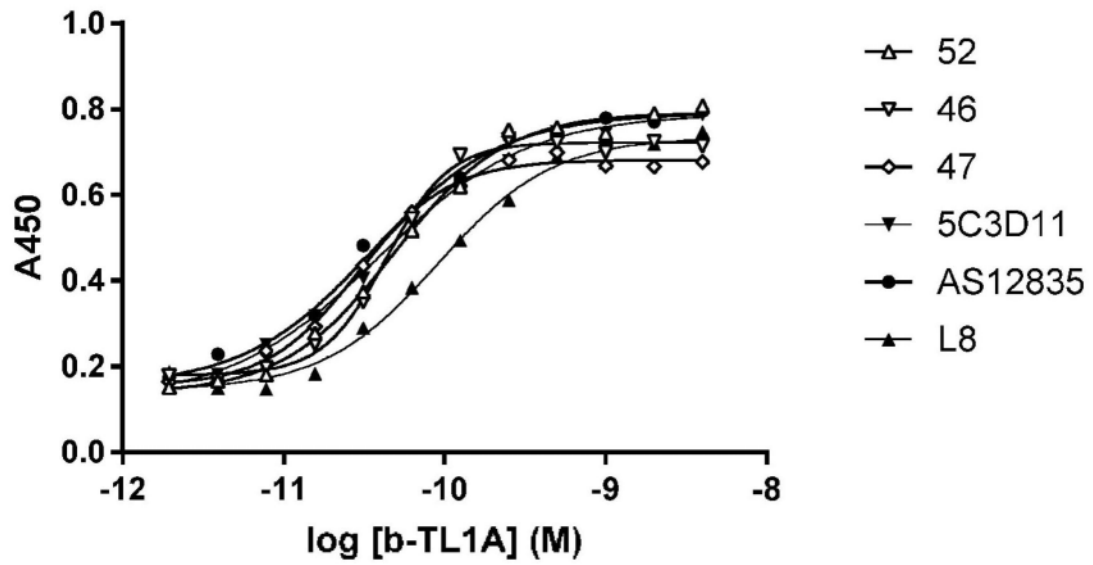


图10B

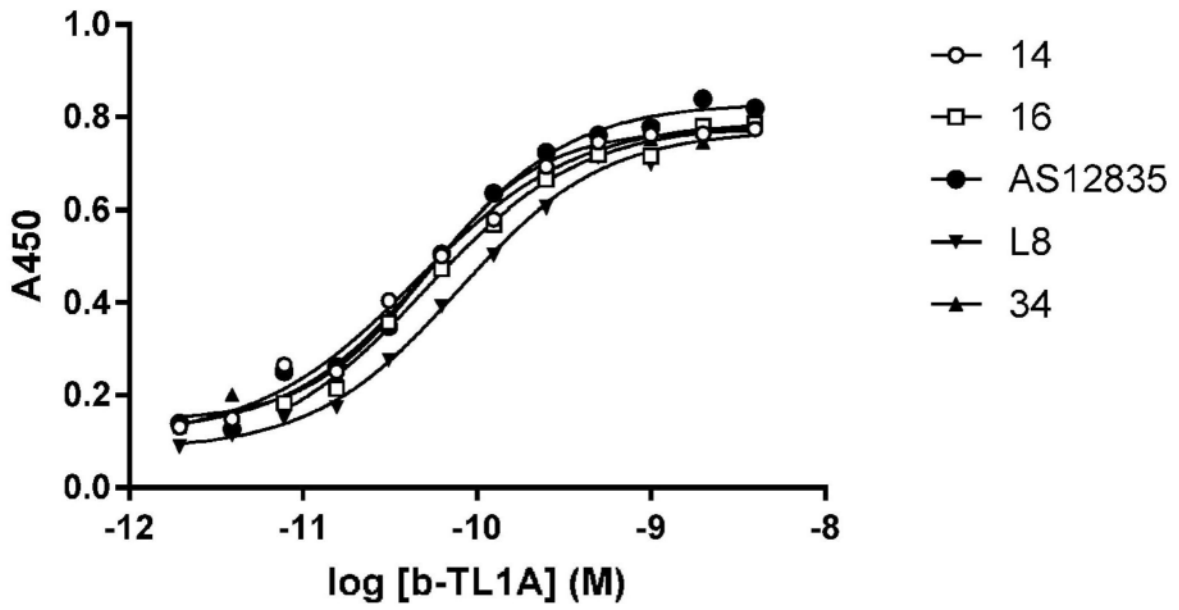


图11A

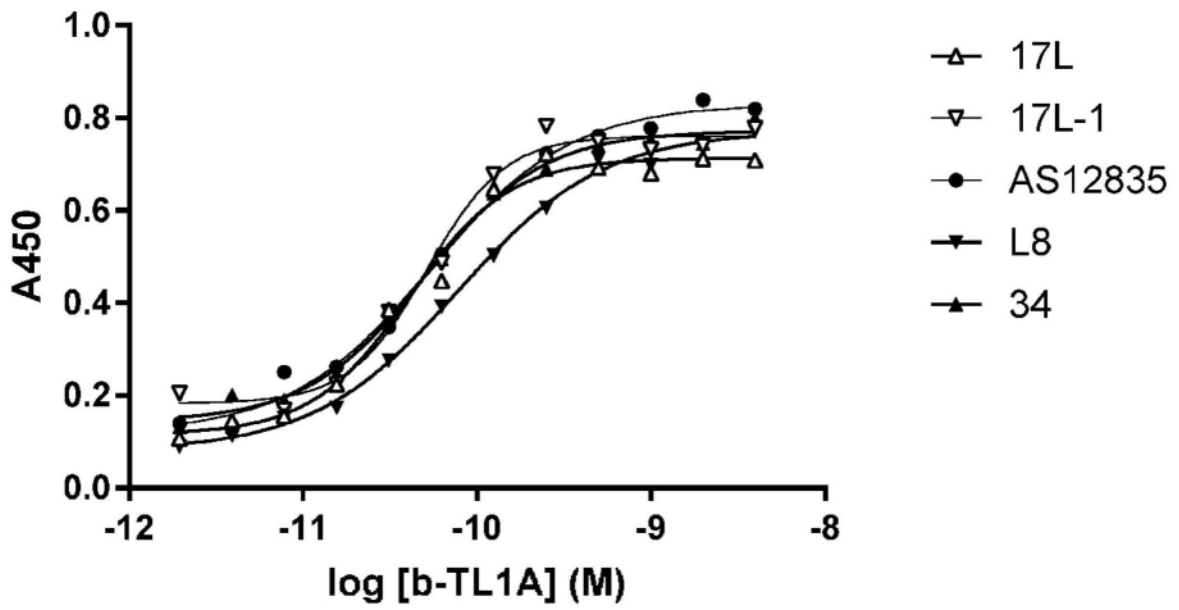


图11B

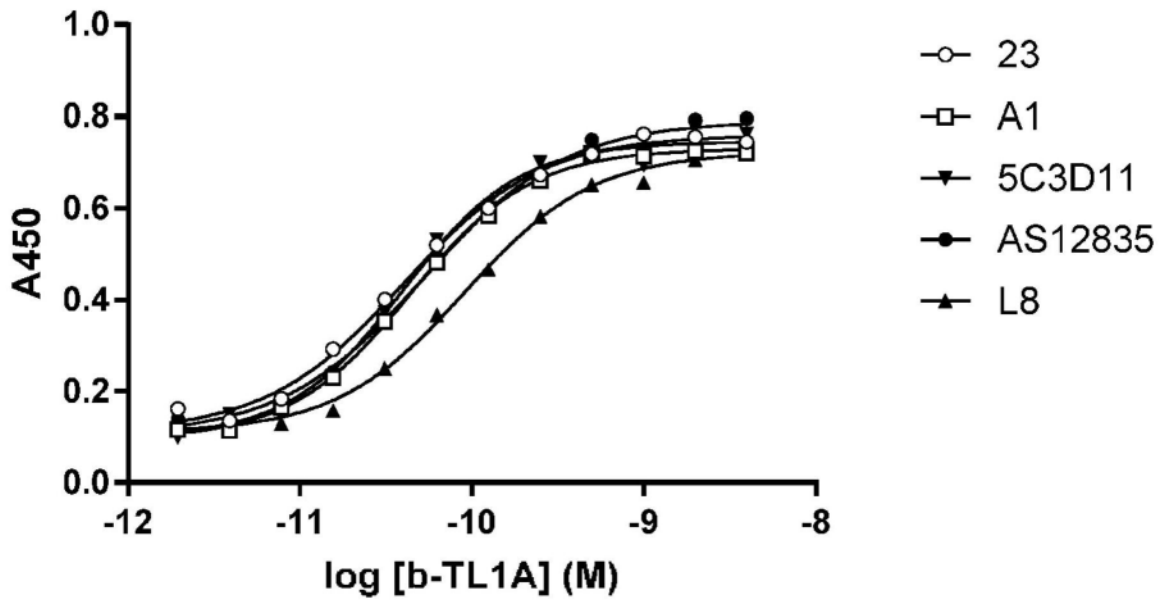


图12A

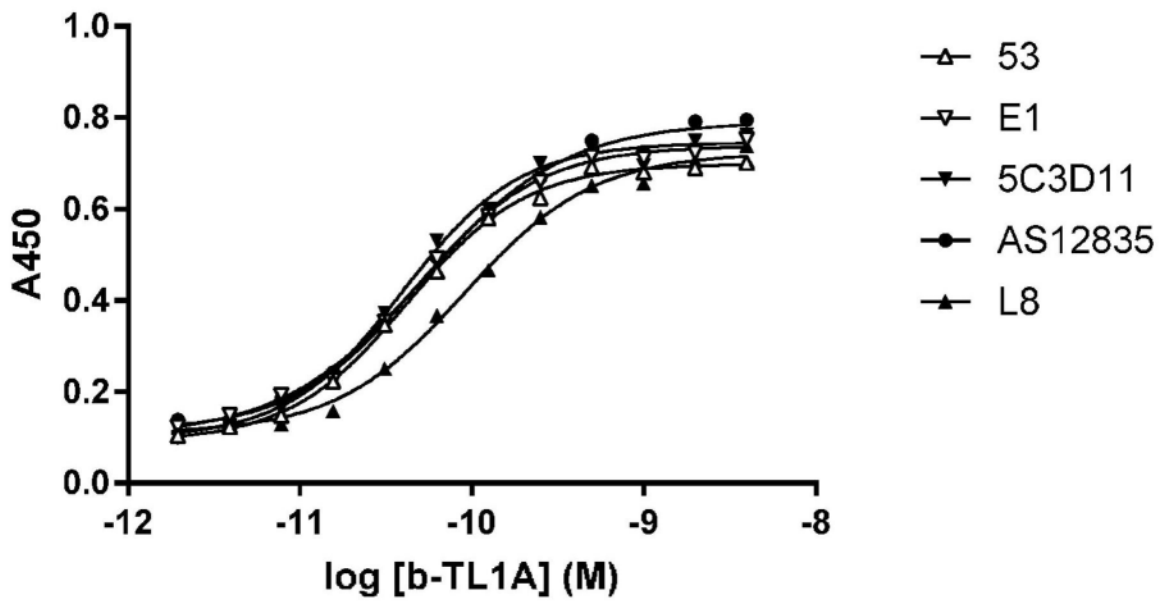


图12B

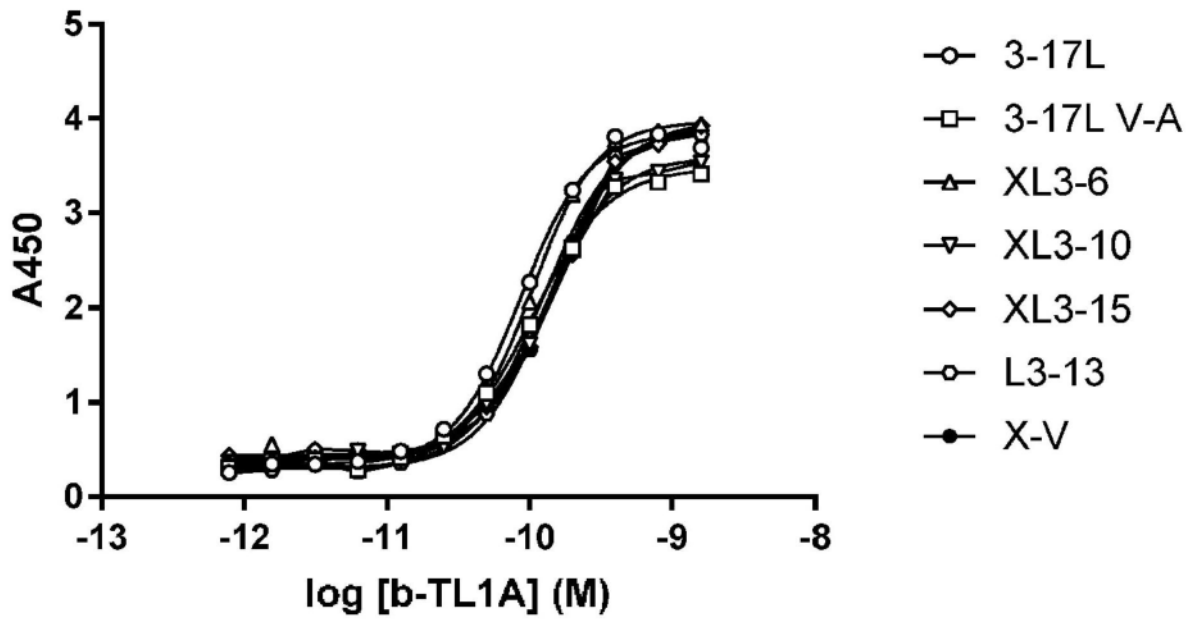


图13A

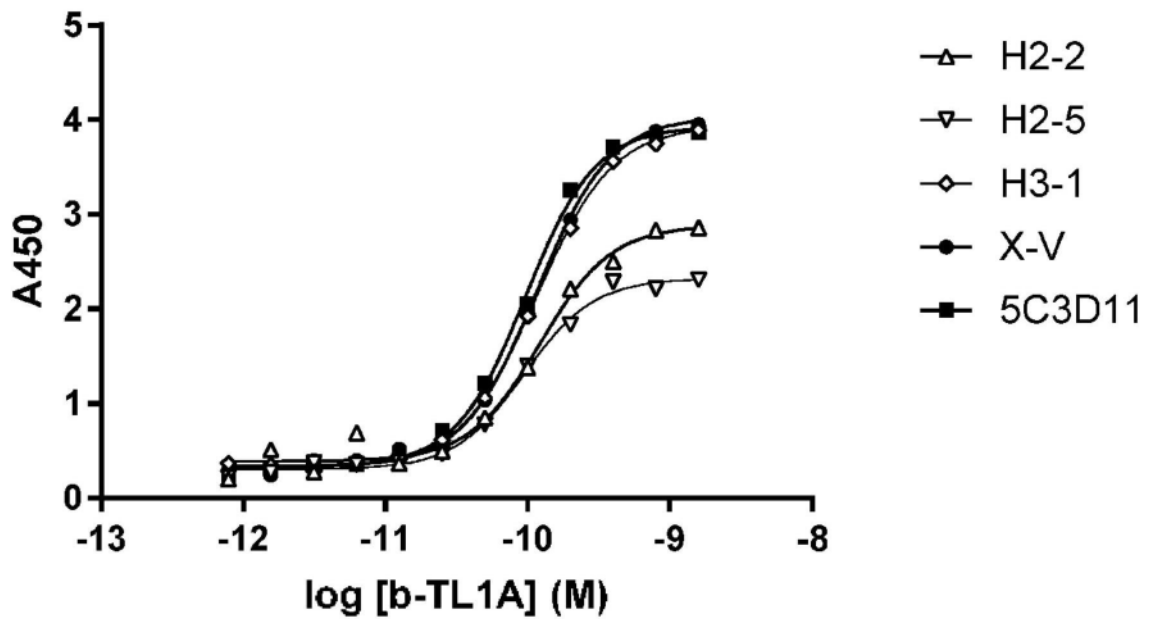


图13B

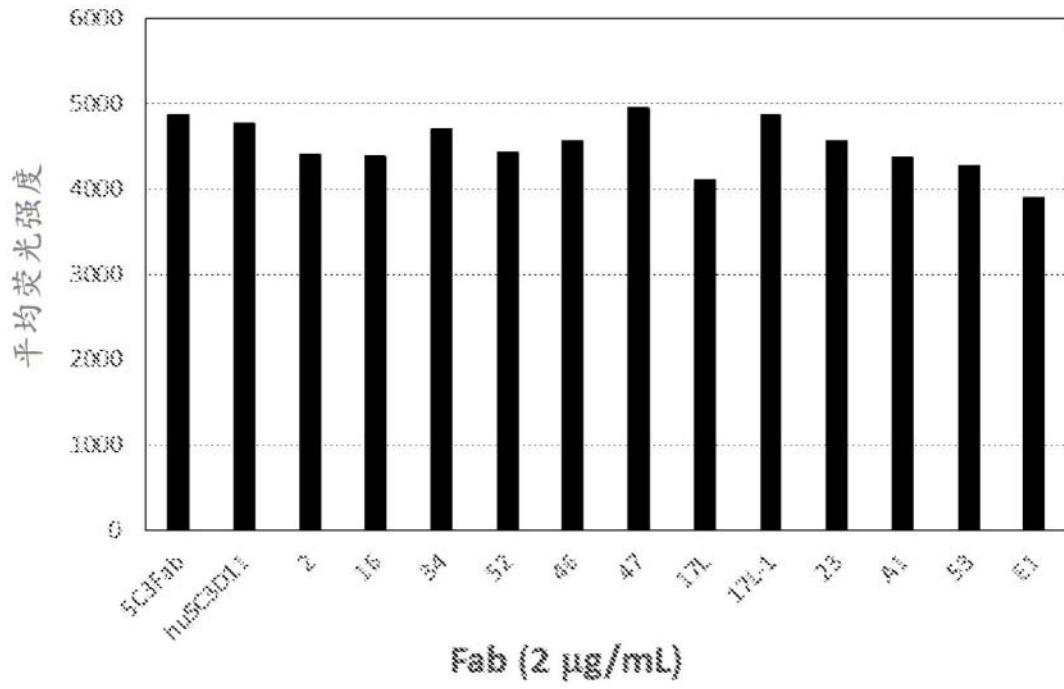


图14A

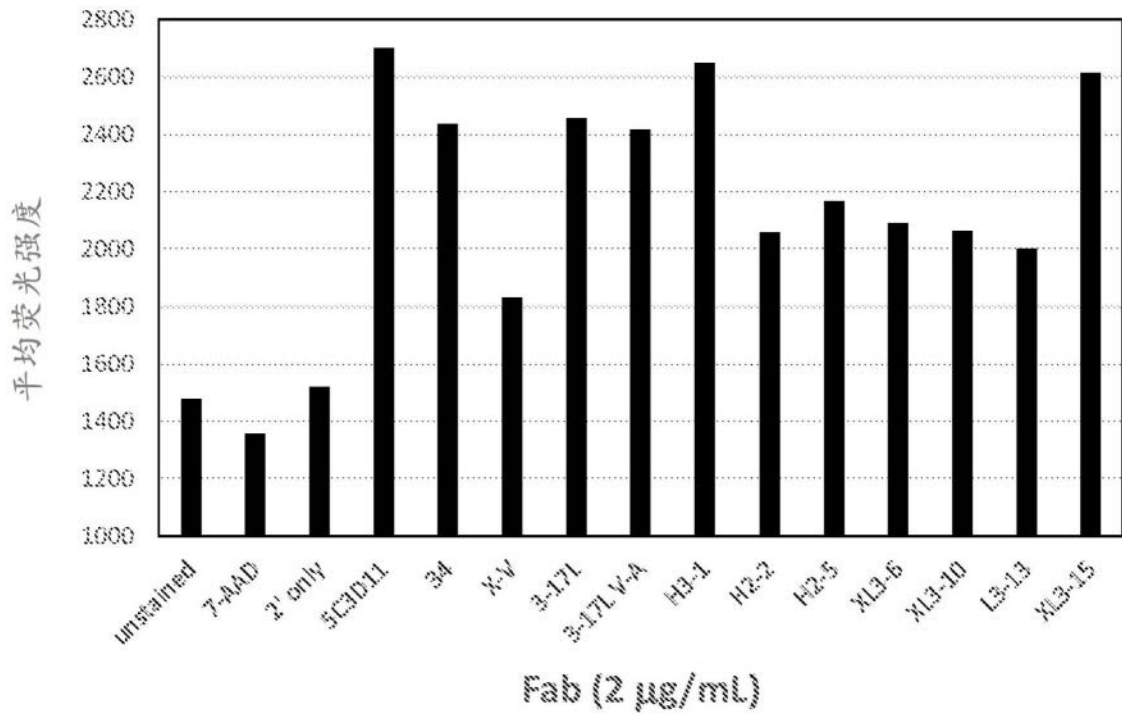


图14B

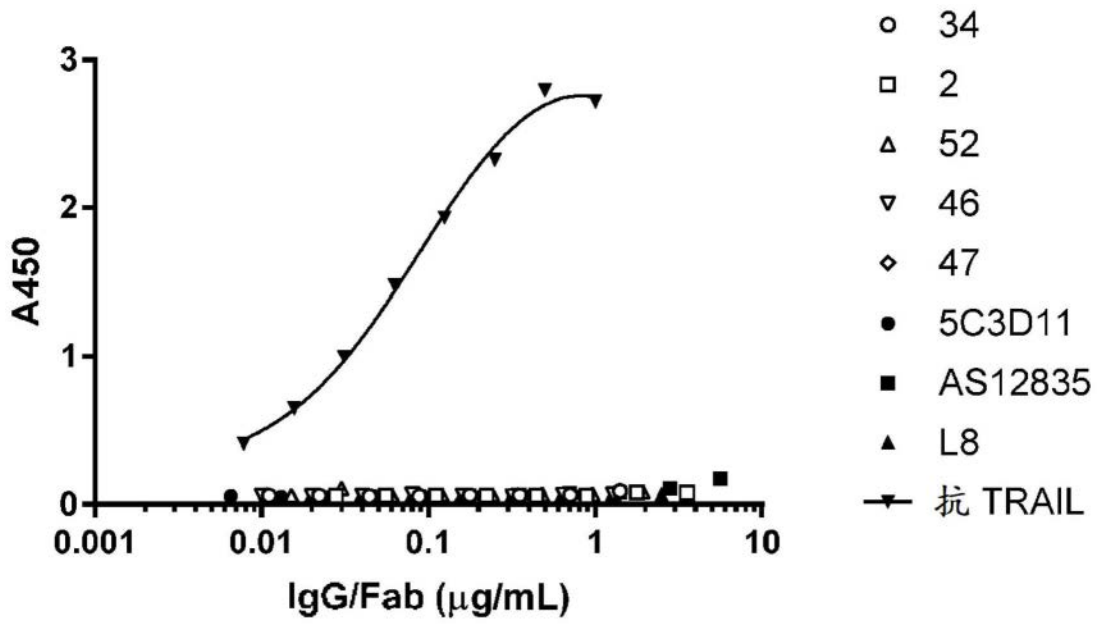


图15A

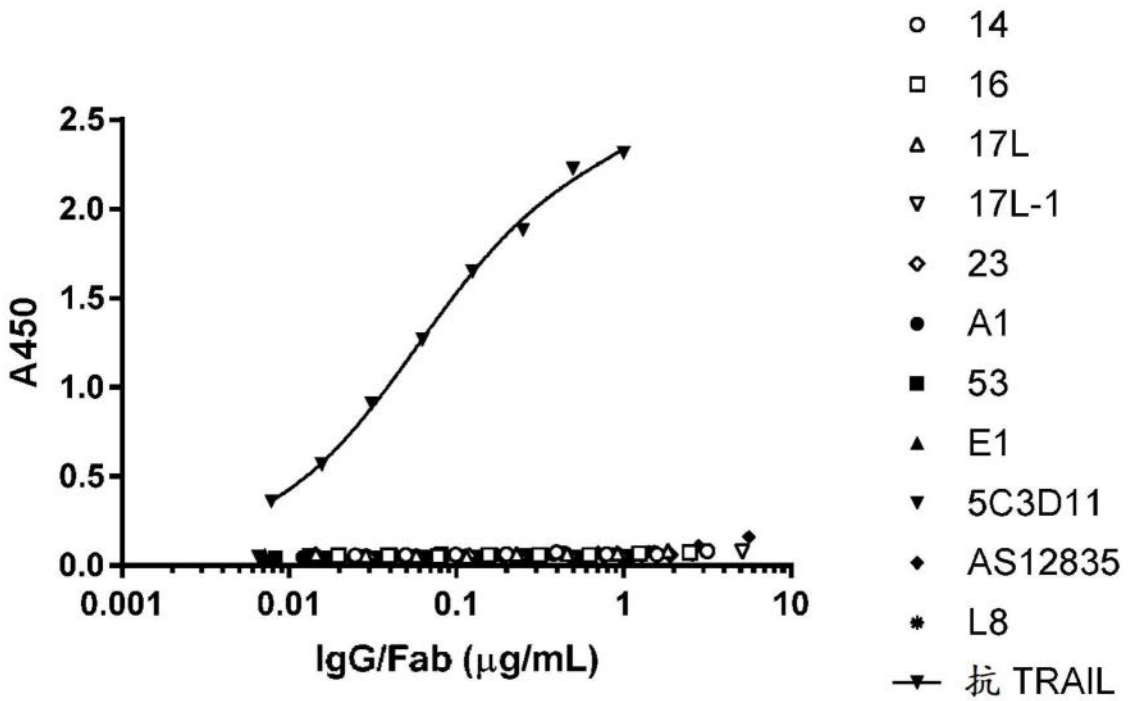


图15B

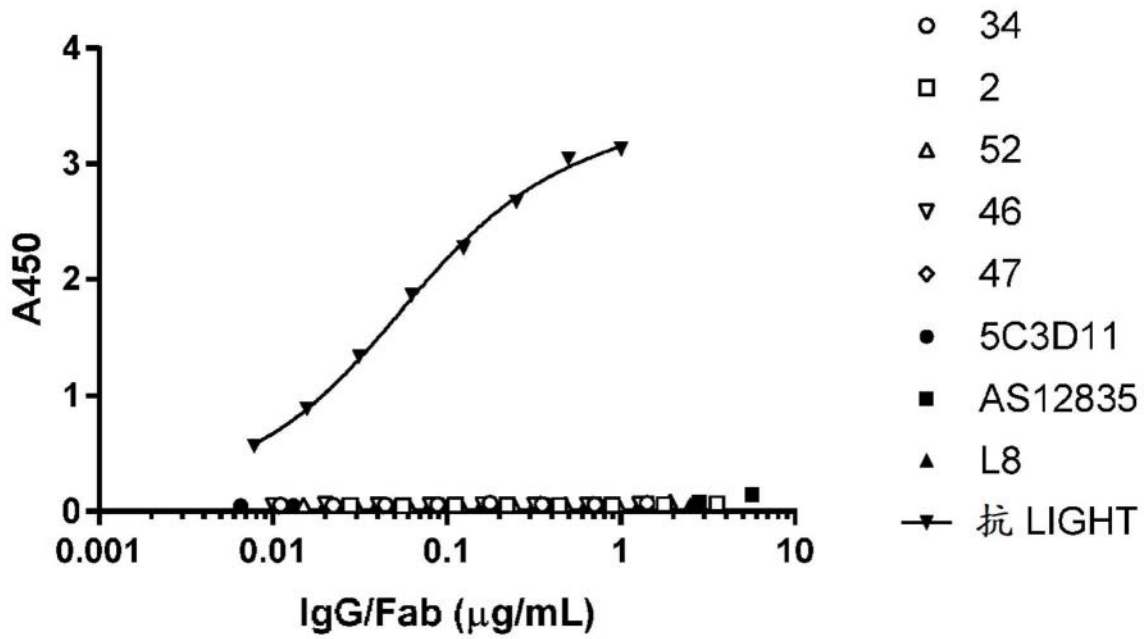


图16A

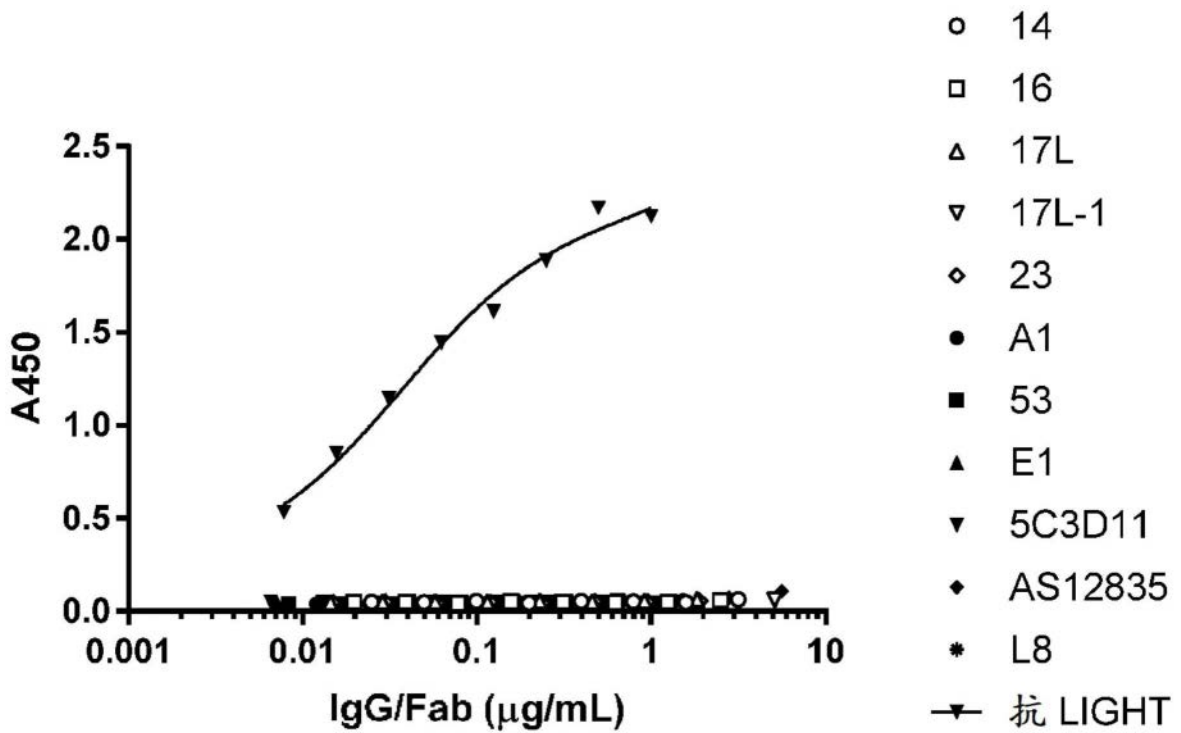


图16B

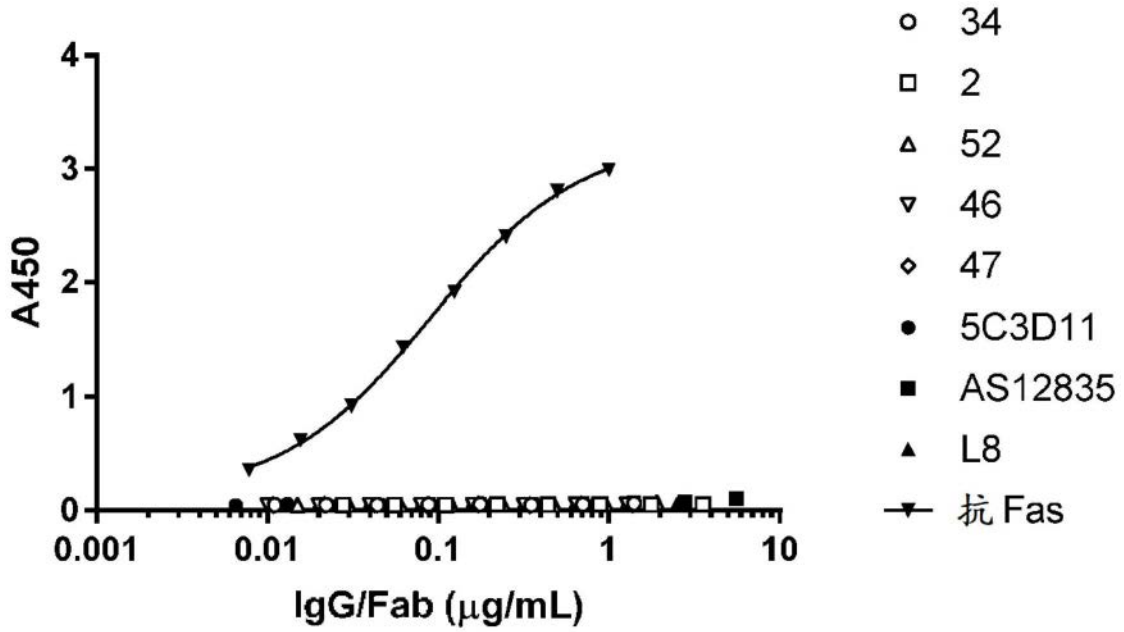


图17A

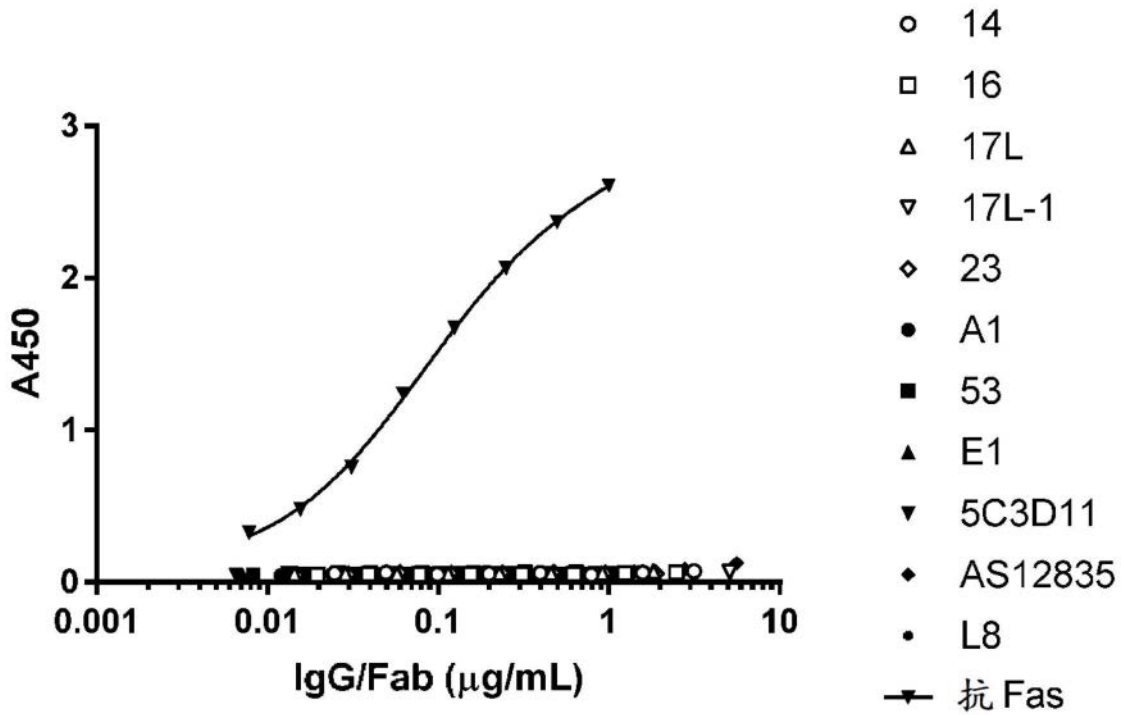


图17B

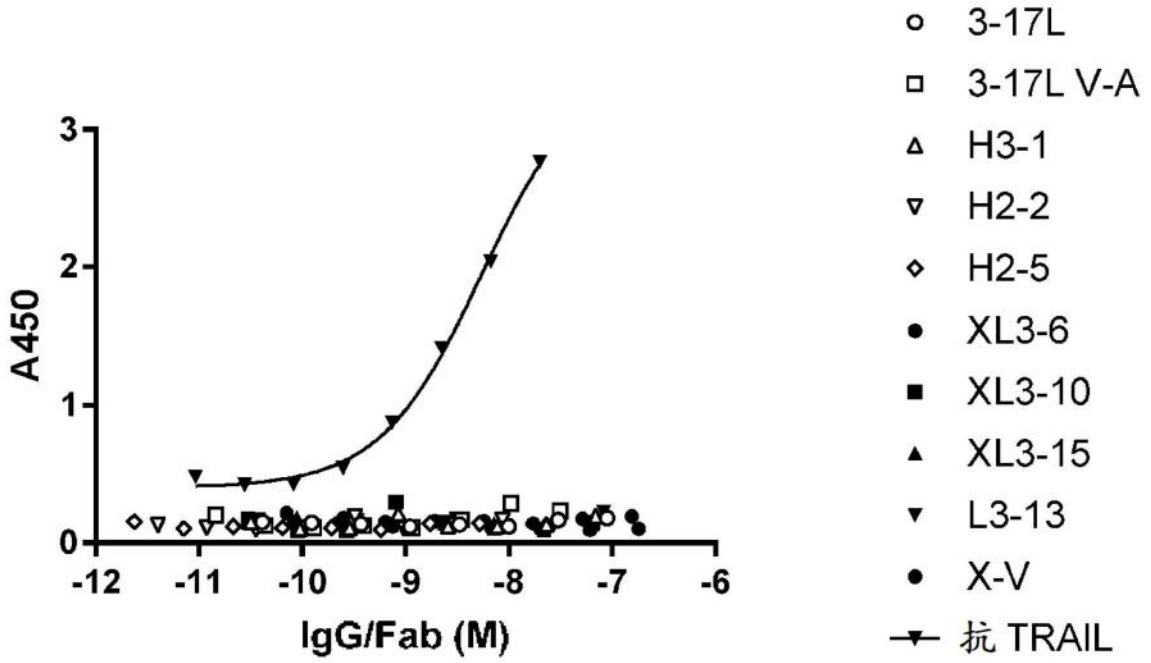


图18

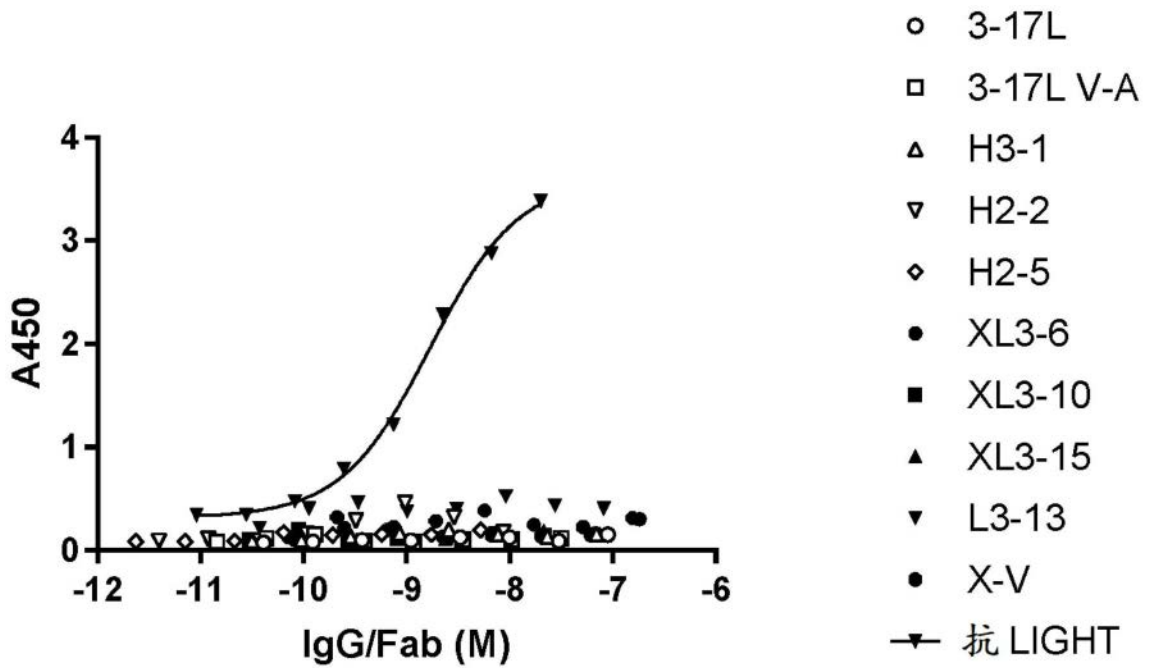


图19

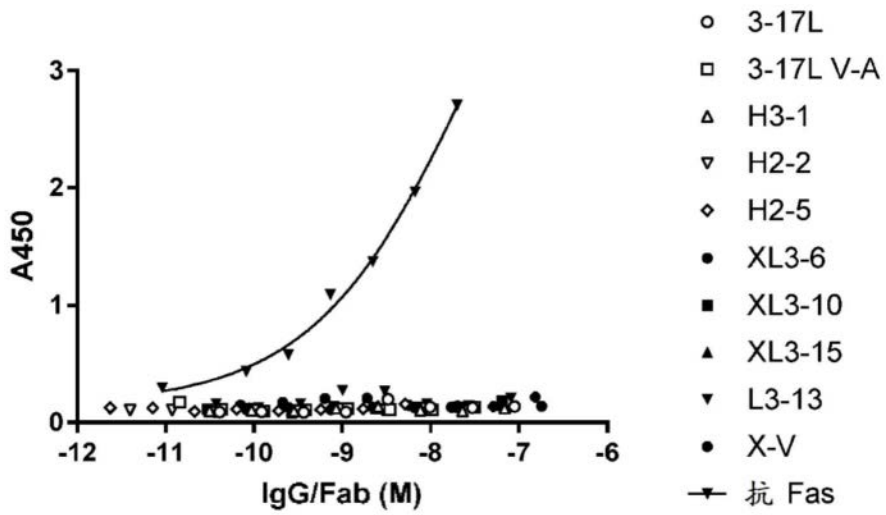


图20

	14	17L	23	34	47	53
EC50	1.781e-010	2.049e-010	1.351e-010	2.279e-010	1.153e-010	2.318e-010

IgG1 结合

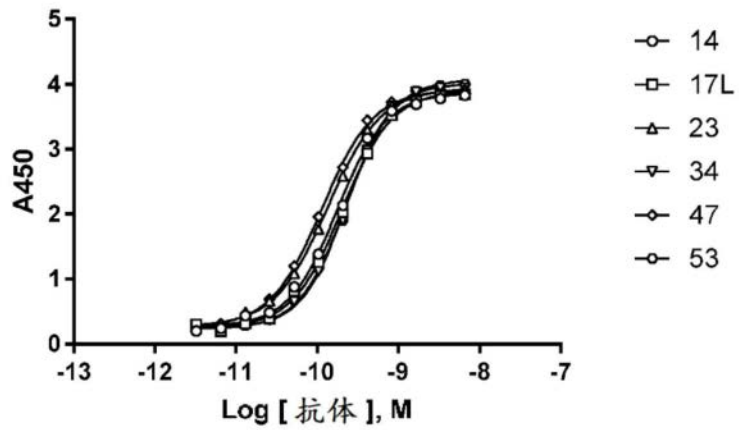


图21A

	14	17L	23	34	47	53
EC50	3.778e-010	5.849e-010	4.055e-010	2.751e-010	4.733e-010	3.551e-010

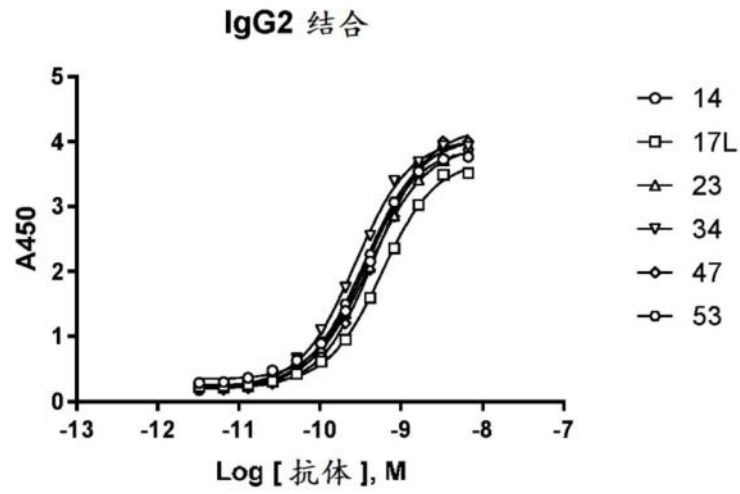


图21B

	14	17L	23	34	47	53
EC50	1.131e-010	9.976e-011	1.138e-010	9.025e-011	1.129e-010	9.686e-011

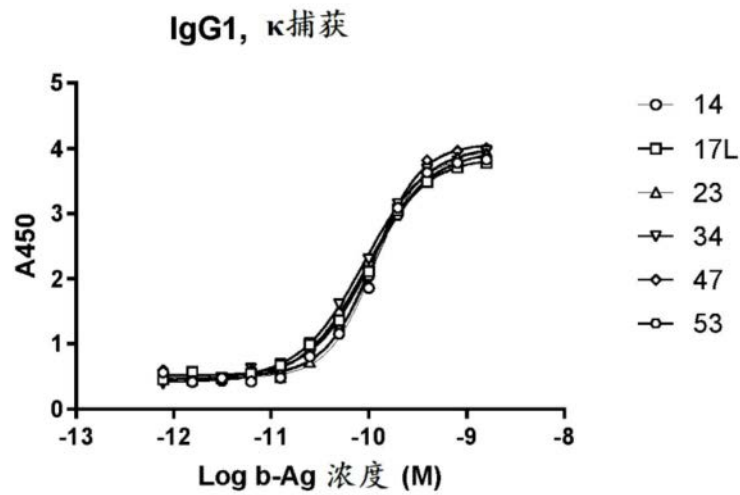


图22A

	14	17L	23	34	47	53
EC50	7.772e-011	8.611e-011	7.862e-011	1.025e-010	9.535e-011	8.95e-011

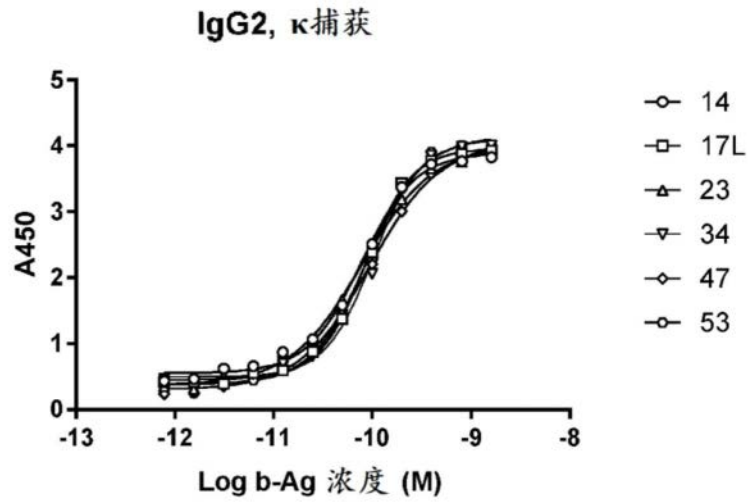


图22B

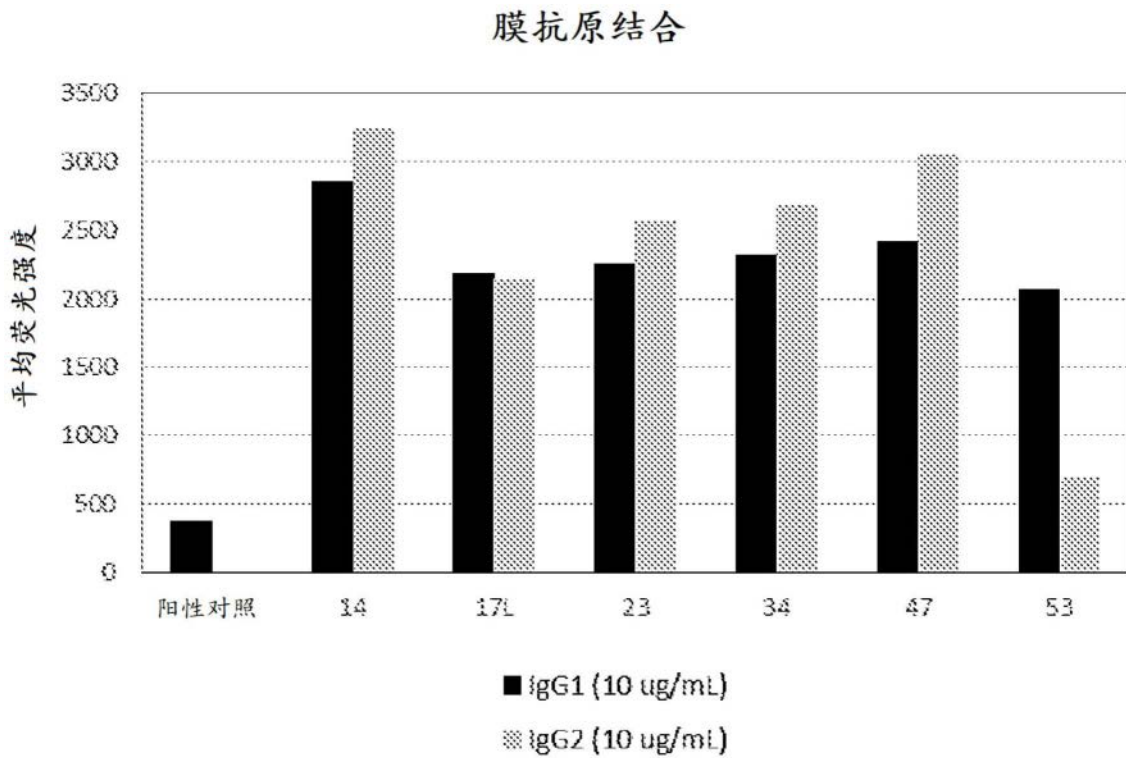


图23

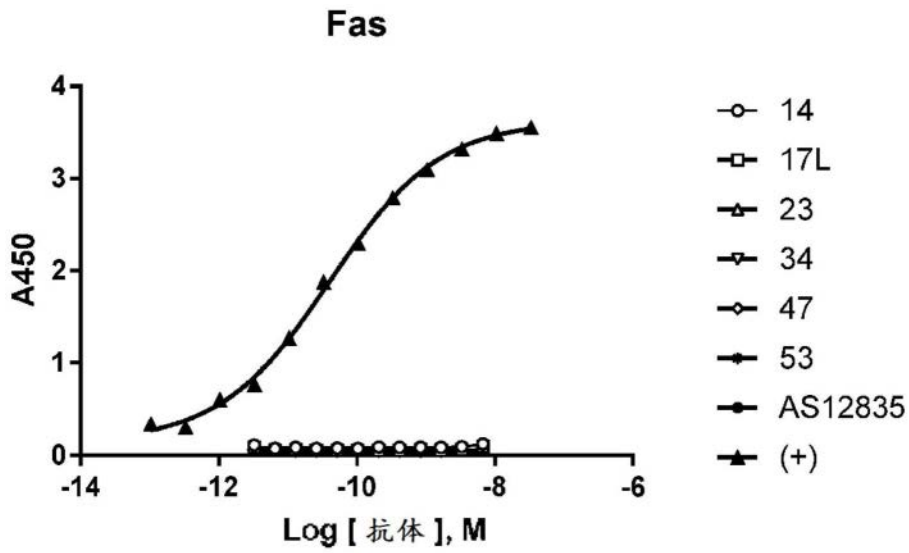


图24A

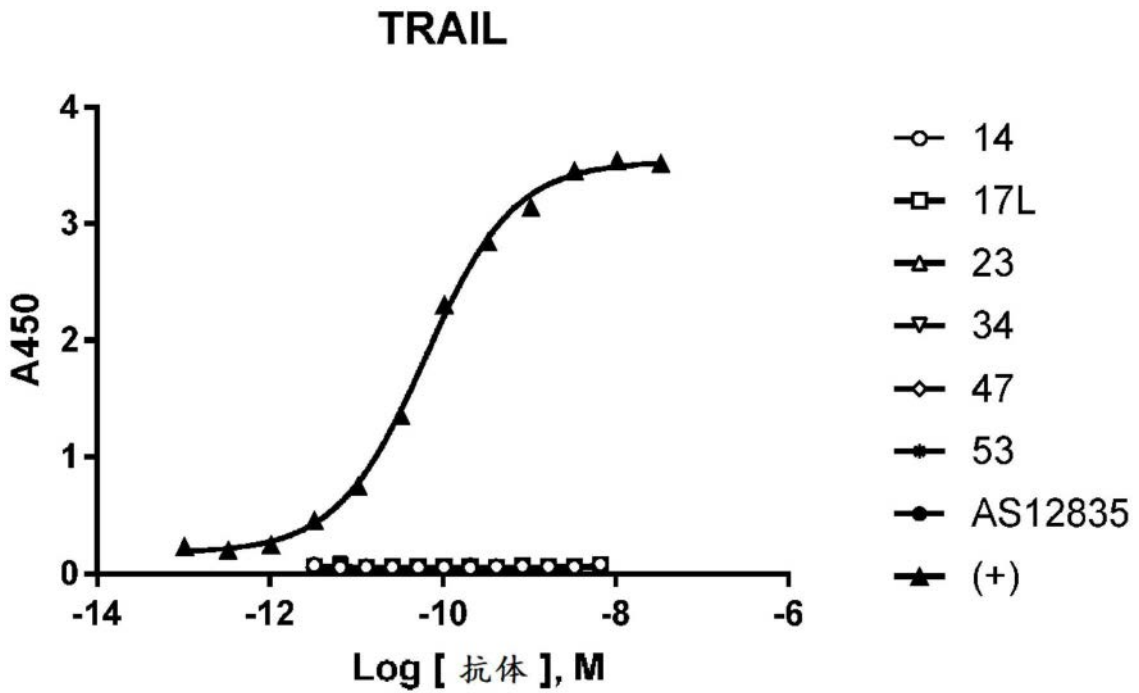


图24B

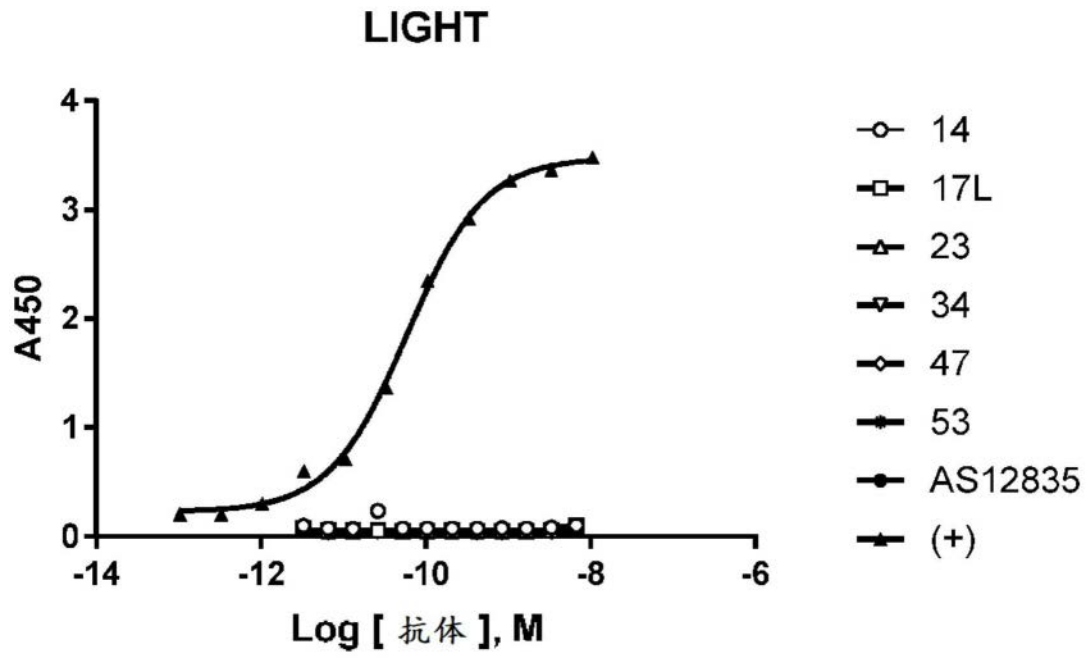


图24C

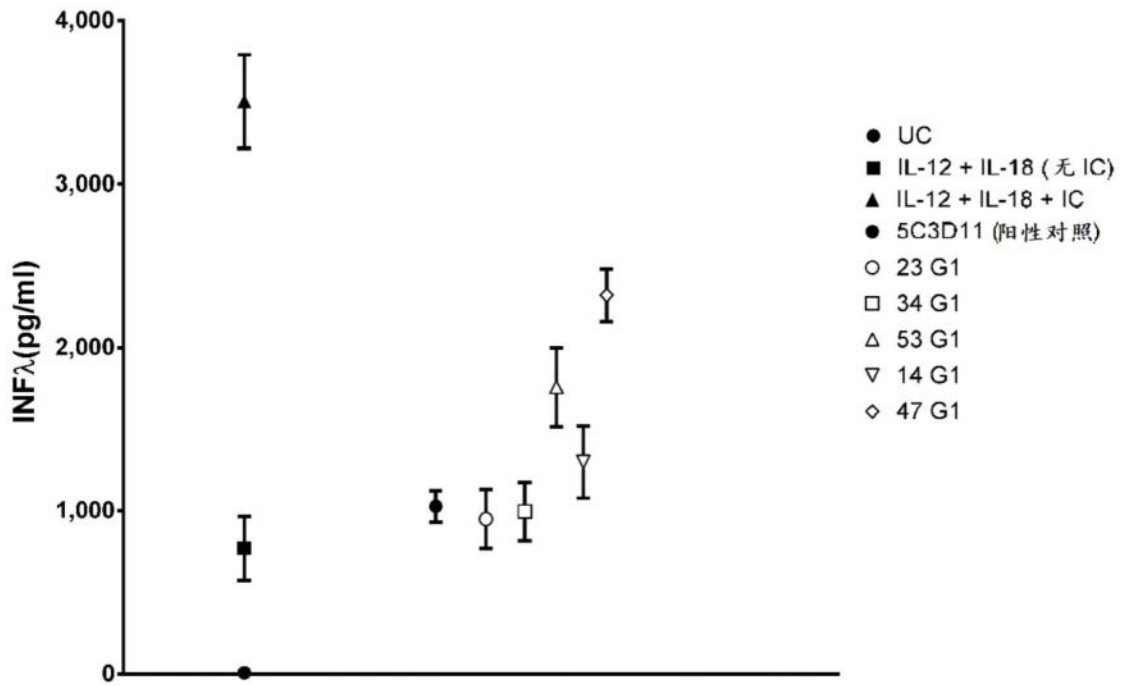


图25

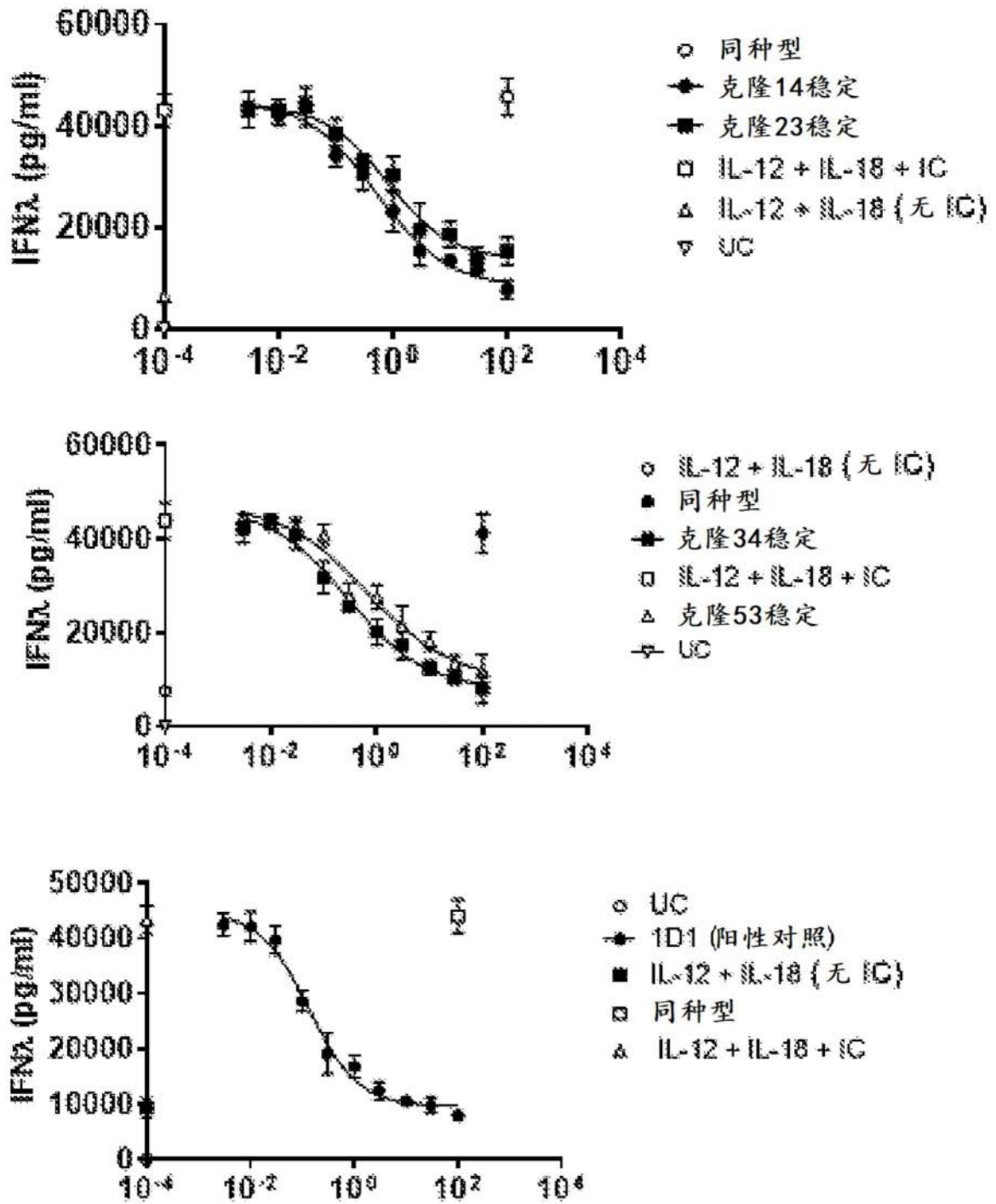


图26A

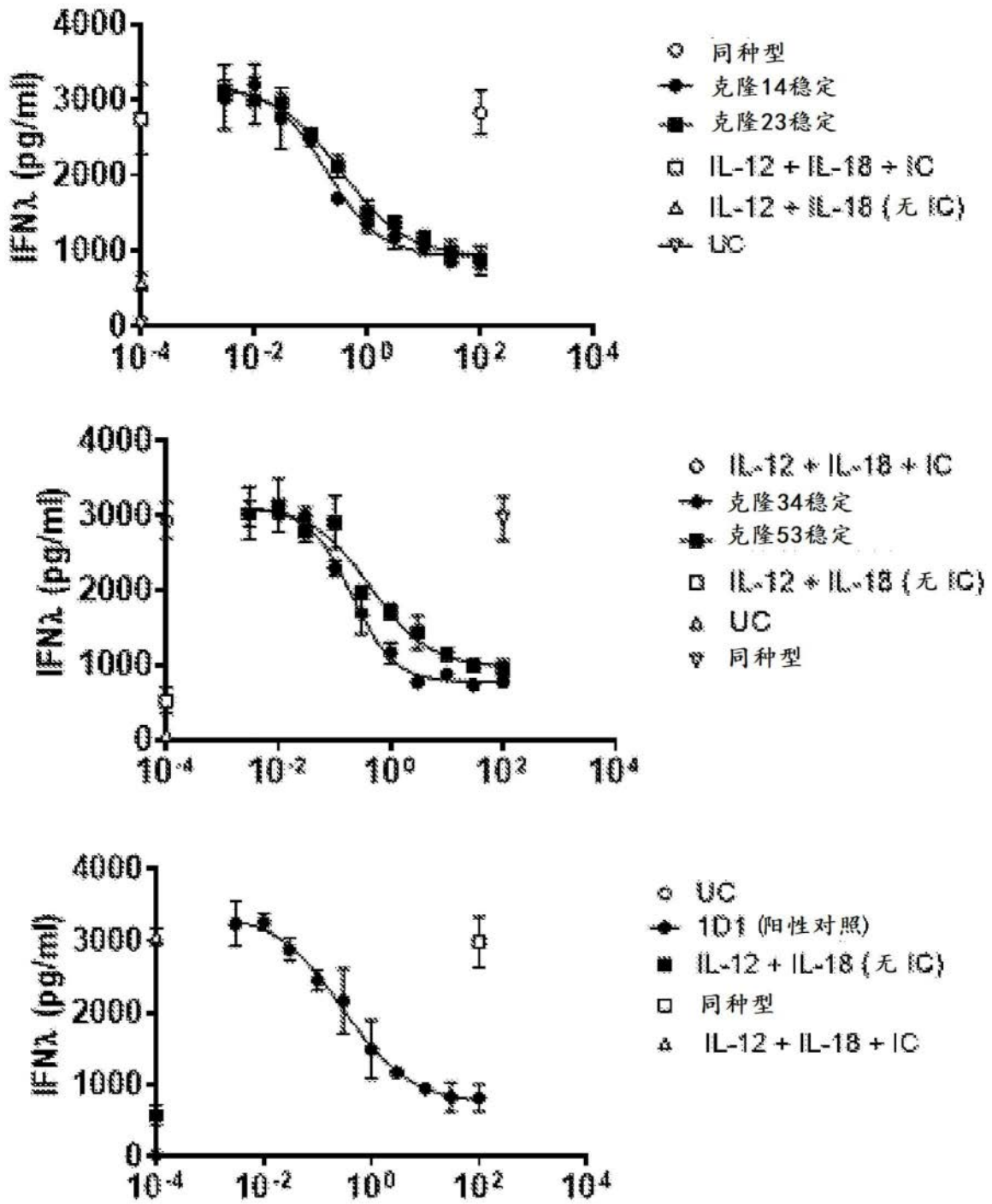


图26B

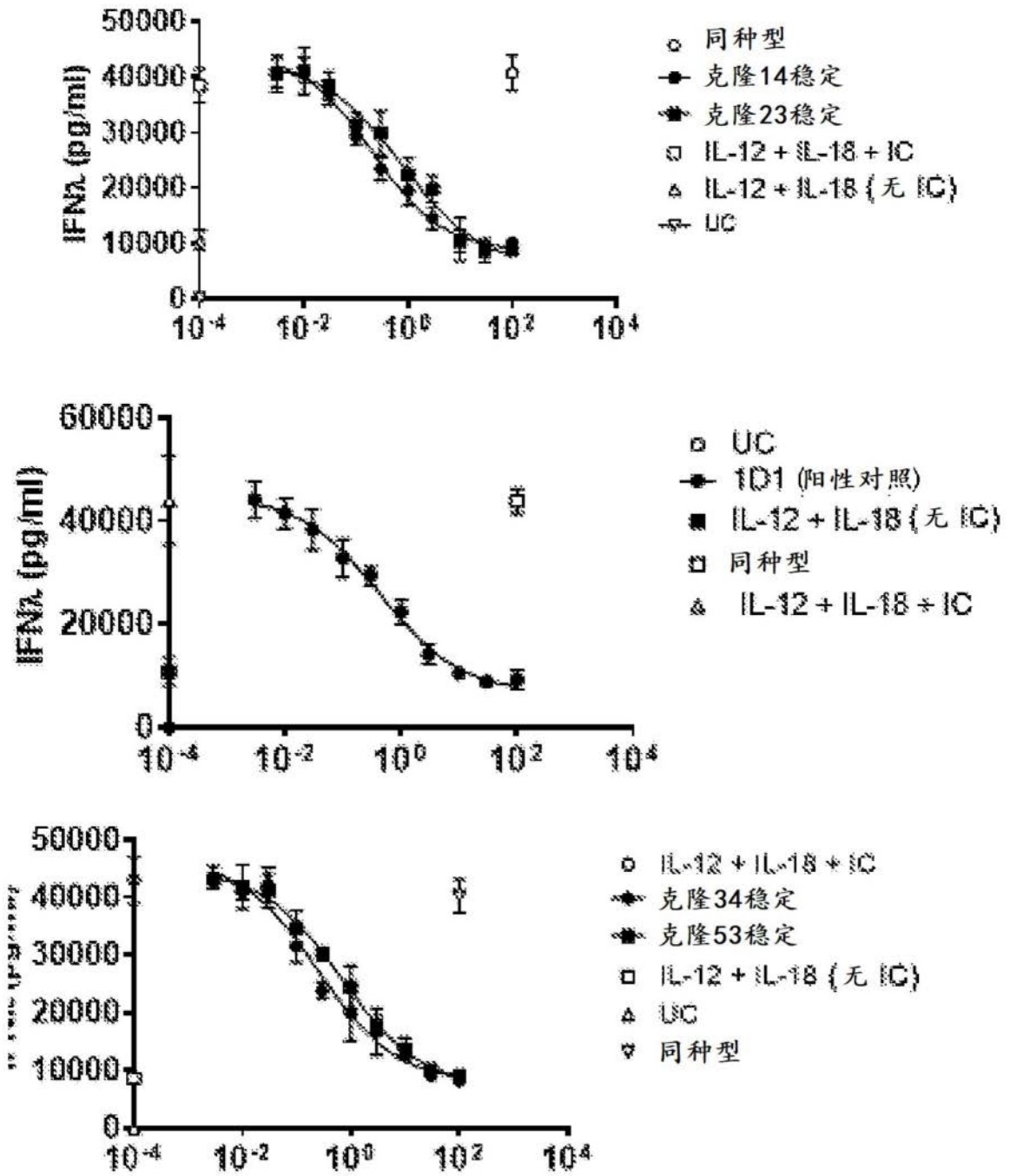


图26C

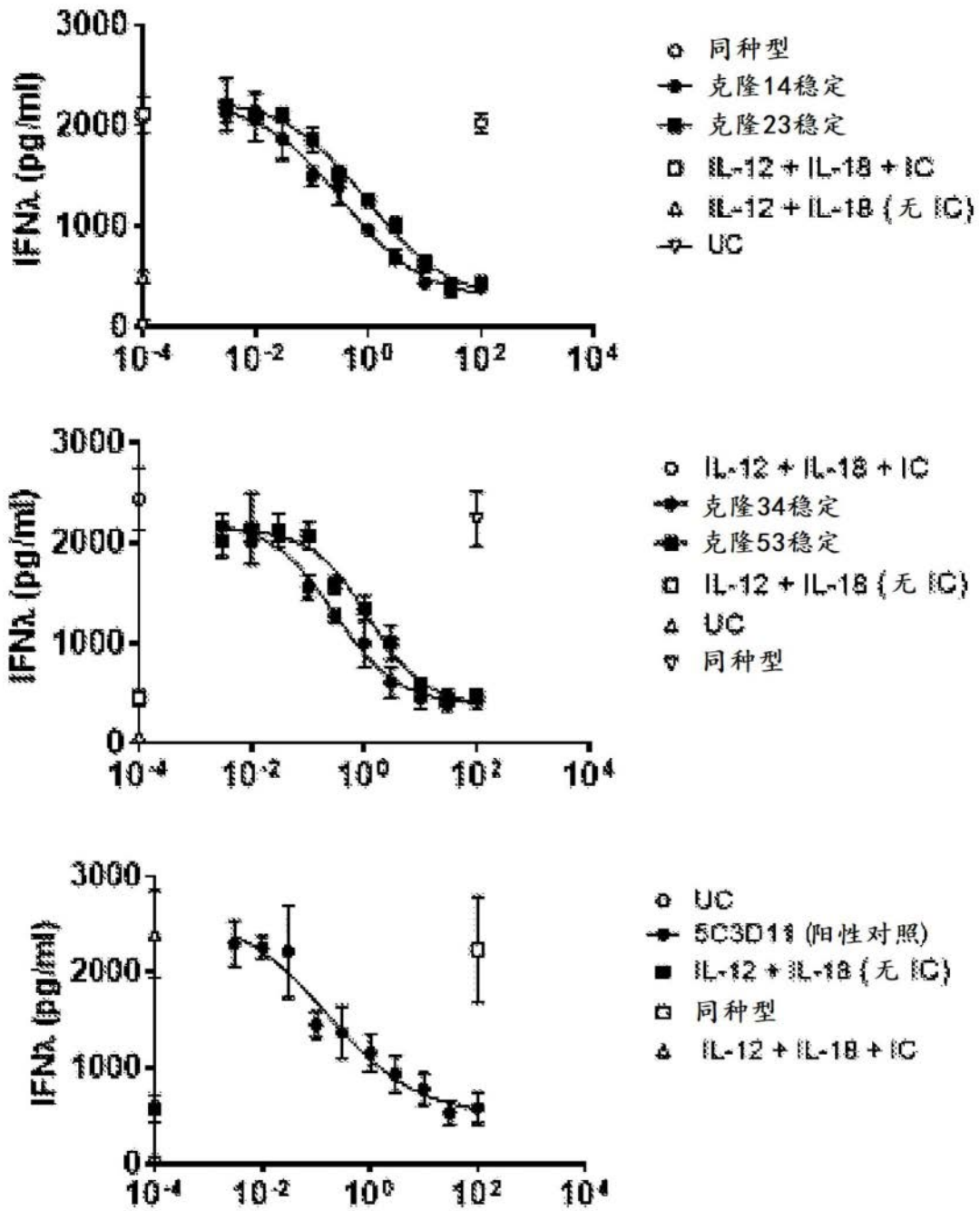


图27A

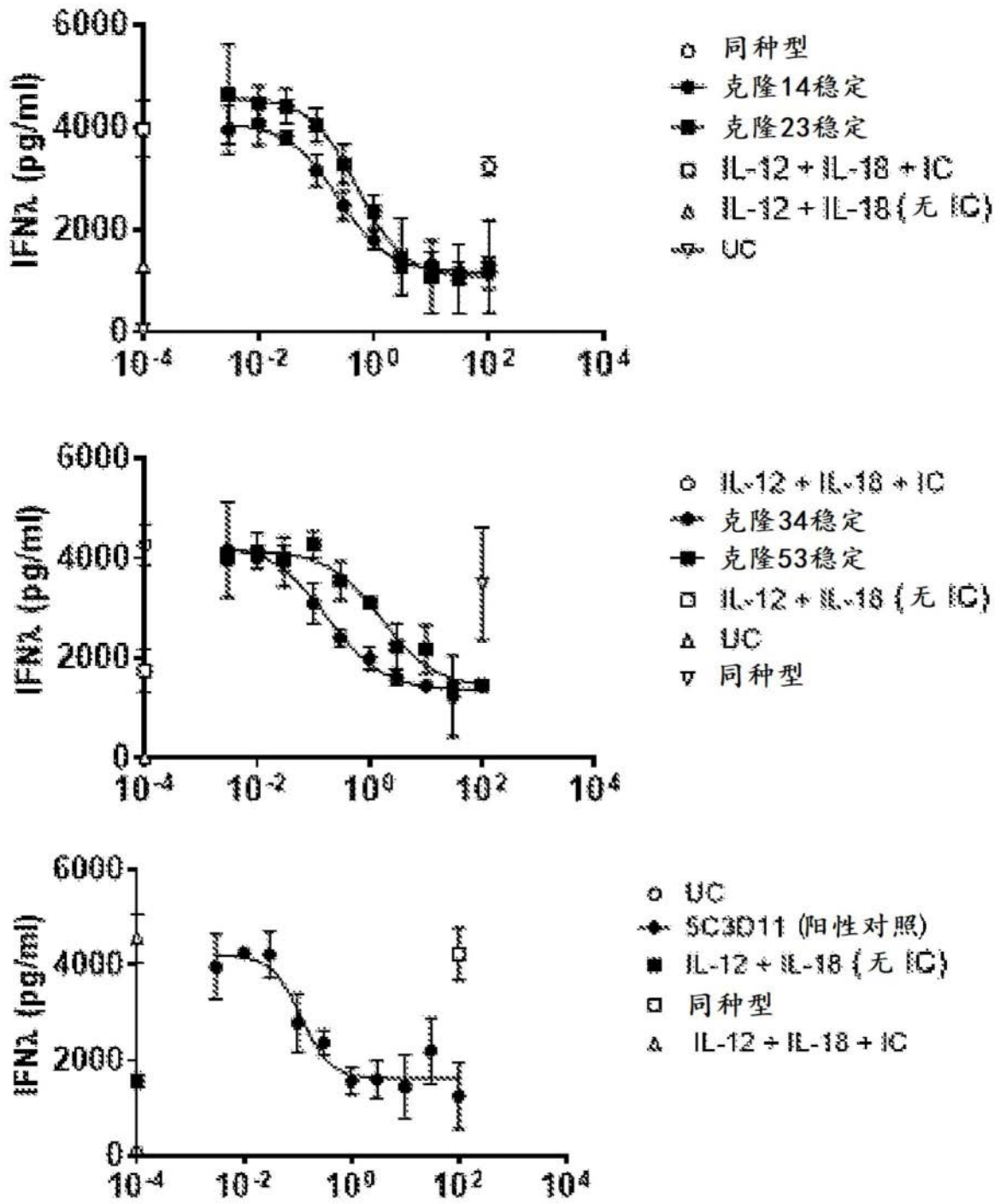


图27B

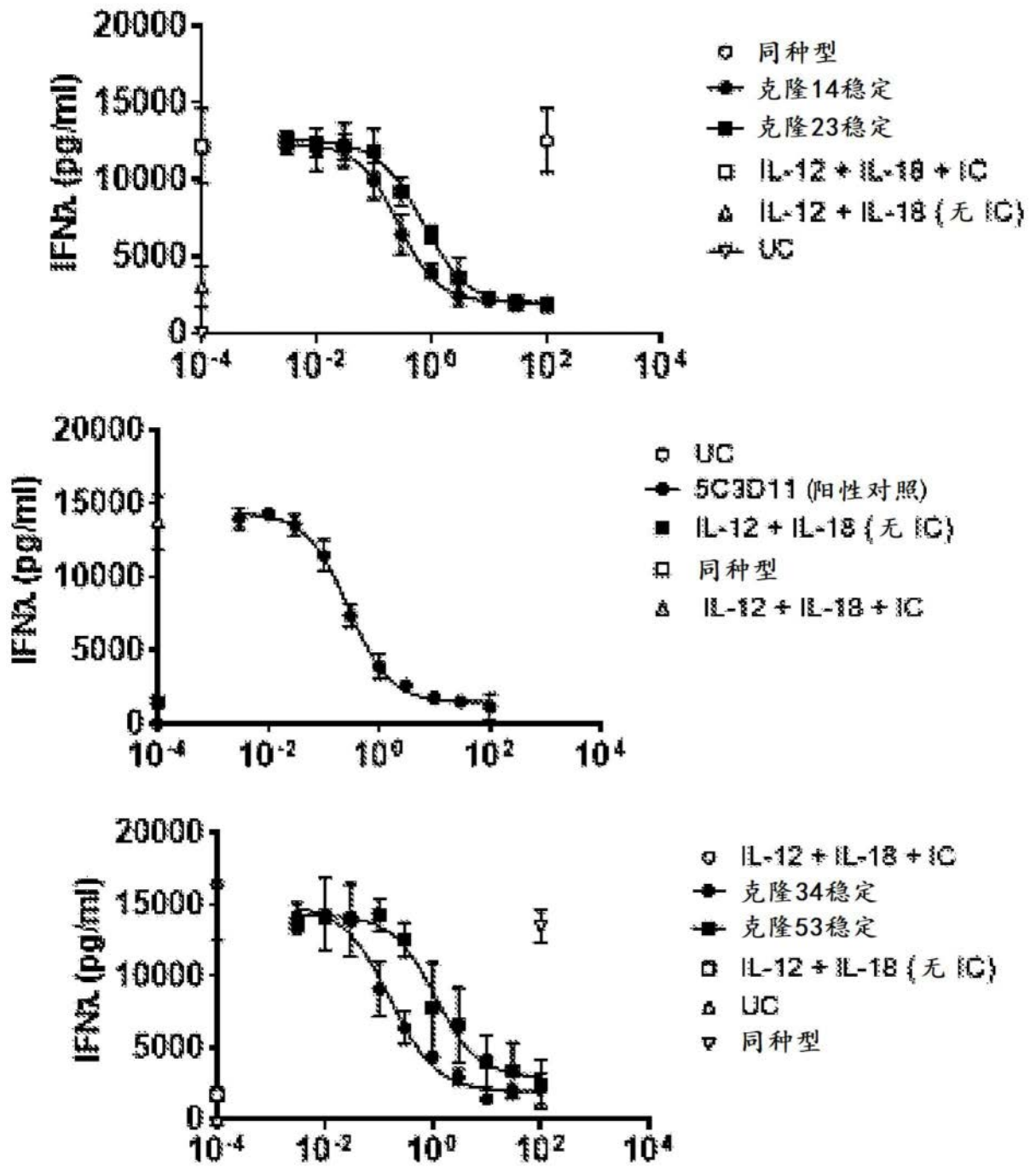


图27C