



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109219620 B

(45) 授权公告日 2023.01.31

(21) 申请号 201780034593.5

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

(22) 申请日 2017.06.09

专利代理人 郭名悦 屈小春

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109219620 A

(51) Int.CI.

C07K 16/28 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.01.15

(56) 对比文件

WO 2016081455 A1, 2016.05.26

(30) 优先权数据

CN 101253199 A, 2008.08.27

62/348,009 2016.06.09 US

CN 103592439 A, 2014.02.19

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

CN 102770455 A, 2012.11.07

2018.12.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/036817 2017.06.09

M Chodorge, et al. A series of Fas receptor agonist antibodies that demonstrate an inverse correlation between affinity and potency.《Cell Death Differ.》.2012, 第19卷(第7期),

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/214547 EN 2017.12.14

李树华等. Livin与胱天蛋白酶-3在中耳胆脂瘤中的表达及临床意义.《华西医学》.2015, 第30卷(第6期),

(73) 专利权人 派立卡恩治疗公司

审查员 李雪莹

地址 美国北卡罗来纳州

权利要求书1页 说明书24页

(72) 发明人 T·H·施瑞博 J·T·哈特池恩斯

序列表19页 附图16页

(54) 发明名称

抗-TNFRSF25抗体

(57) 摘要

公开了抗-TNFRSF25抗体及其变体,包括与氨基酸48-71区域中的表位结合的那些。还设想了所述抗体在研究、诊断和治疗应用中的用途。

1. 一种抗TNFRSF25抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

(i) 重链可变区,其中重链可变区序列为SEQ ID NO:5,或在SEQ ID NO:5的基础上,将重链CDR3序列DPPYSGLYALDF (SEQ ID NO:16) 替换为DPAYTGLYALDF (SEQ ID NO:26);和

(ii) 轻链可变区,其中轻链可变区序列为在SEQ ID NO:6的基础上,将轻链CDR1序列TLSSELSSYTIV (SEQ ID NO:19) 替换为TLSSELSWYTIV (SEQ ID NO:25)。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其还包含根据式FW1-CDR1-FW2-CDR2-FW3-CDR3-FW4并置在CDR之间的可变区框架(FW)序列,其中所述重链可变区中的可变区FW序列是重链可变区FW序列,并且其中所述轻链可变区中的可变区FW序列是轻链可变区FW序列。

3. 根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述可变区FW序列是人源化的。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其还包含人重链和轻链恒定区。

5. 根据权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述恒定区选自由以下组成的组:人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

6. 根据权利要求5所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述恒定区是IgG1。

7. 根据权利要求5所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述恒定区是IgG4。

8. 一种药物组合物,其包含药学上可接受的载体和权利要求1至7中任一项的抗体或其抗原结合片段。

9. 一种制品,其包含权利要求8的药物组合物和至少一种用于治疗癌症的另外的剂,其中所述至少一种另外的剂是靶向CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、Tim-3、TNFRSF4、TNFRSF9、TNFRSF18、CD27、CD39、CD47、CD73或CD278的剂,或是A2A受体拮抗剂或TGF-β拮抗剂。

10. 根据权利要求9所述的制品,其中所述至少一种另外的剂是B7家族共刺激分子、TNF受体超家族共刺激分子、疫苗组合物或化学治疗剂。

11. 根据权利要求9所述的制品,其中所述至少一种另外的剂包括用于体外或受试者中的过继T细胞疗法的嵌合抗原受体转染的T细胞或扩增的肿瘤浸润性淋巴细胞。

12. 根据权利要求9所述的制品,其中可在自体T细胞疗法的体外制造过程中使用所述至少一种另外的剂。

抗-TNFRSF25抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年6月9日提交的美国临时申请序列号62/348,009的优先权的权益。

技术领域

[0003] 该文献涉及抗TNFRSF25抗体,及其在研究、治疗和诊断目的中的用途。

背景技术

[0004] 肿瘤坏死因子受体超家族成员25 (TNFRSF25) 是TNF-受体超家族成员,其优先由活化和经历抗原的T淋巴细胞表达。TNFRSF25被其配体TL1A (也称为TNFSF15) 活化,其在抗原呈递细胞中和Toll样受体或Fc受体活化后的一些内皮细胞中被快速上调。TNFRSF25可刺激NF- κ B活性,并且还可刺激胱天蛋白酶活化以调节细胞凋亡 (Bodmer等, *Immunity* 6 (1) :79-88, 1997和Kitson等, *Nature* 384 (6607) :372-375, 1996)。393个氨基酸长的人TNFRSF25蛋白的结构组织与TNF受体1 (TNFR1) 最同源。TNFRSF25的细胞外结构域包括四个富含半胱氨酸的结构域,并且细胞质区域含有已知凋亡信号的死亡结构域。选择性剪接产生多种不同的TNFRSF25同种型,其中大多数是潜在的分泌分子。TNFRSF25基因在B细胞和T细胞中的选择性剪接在T细胞活化时遇到程序改变,其主要产生全长的膜结合同种型,并且被认为参与控制由T细胞活化诱导的淋巴细胞增殖。

[0005] TNFRSF25的活化依赖于T细胞受体的先前接合。在TNFRSF25与TL1A结合后, TNFRSF25信号传导增加T细胞对内源性IL-2的敏感性,并增强T细胞增殖。由于TNFRSF25的活化是T细胞受体依赖性的,TNFRSF25的体内活性对遇到同源抗原的T细胞是特异性的。在静止时,并且当没有潜在的自身免疫时,大多数经常遇到同源抗原的T细胞是FoxP3+调节性T细胞。在没有任何其它外源信号的情况下刺激TNFRSF25,在5天内刺激FoxP3+调节性T细胞从所有CD4+T细胞的8-10%的基线至所有CD4+T细胞的35-40%的高度特异性增殖 (Schreiber等, *J Clin Invest* 120 (10) :3629-3640, 2010)。TNFRSF25的治疗性激动剂可以用于刺激Treg扩增,其可在哮喘、同种异体实体器官移植和眼角膜炎的实验模型中减轻炎症 (Schreiber等, 同上, Reddy等, *J Virol* 86 (19) :10606-10620, 2012; 和Wolf等, *Transplantation* 94 (6) :569-574, 2012)。类似地,因为TNFRSF25活化是抗原依赖性的, TNFRSF25与自身抗原或疫苗抗原的共刺激可分别导致免疫病理学恶化或增强的疫苗刺激免疫 (Schreiber等, *J Immunol* 189 (7) :3311-3318, 2010)。

发明内容

[0006] 本文至少部分基于靶向TNFSF25内特定表位的抗体的开发。在一些实施方案中,抗体可以在物种之间交叉反应。例如,在一些实施方案中,本文提供了可以在彼此的100倍以内(例如,10倍以内)的K_d值与啮齿类动物和人TNFRSF25多肽结合的抗体。在一些情况下,本文描述的抗体能够引发与TL1A(例如,啮齿类动物或人TL1A)与TNFRSF25结合的信号传导

活性一致的信号传导事件。在一些实施方案中,抗体能够与人TNFRSF25的氨基酸C48-L71区域中的表位结合。例如,抗体可以与氨基酸P64-T69区域中的表位特异性结合。

[0007] 本文还至少部分地基于靶向TNFRSF25的亲和力成熟抗体的开发。与亲本抗-TNFRSF25抗体相比,亲和力成熟的抗体对TNFRSF25具有增强的亲和力,或者与亲本抗-TNFRSF25抗体相比,亲和力成熟抗体可具有增强的活性,或者与亲本抗-TNFRSF25抗体相比,亲和力成熟抗体可具有增强的TNFRSF25亲和力和增强的活性。

[0008] 因此,在第一方面,本文的特征在于抗-TNFRSF25抗体或其抗原结合片段。抗体或抗体片段可包括(i)含有重链CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,其中重链CDR1序列为GFTFSNHDLN (SEQ ID NO:12),重链CDR2序列为YISSASGLISYADAVRG (SEQ ID NO:14);以及重链CDR3序列为DPAYTGLYALDF (SEQ ID NO:26);和(ii)含有轻链CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区,其中轻链CDR1序列为TLSSELSWYTIV (SEQ ID NO.25),轻链CDR2序列为LKSDGSHSKGD (SEQ ID NO:21)以及轻链CDR3序列为CGAGYTLAGQYGVW (SEQ ID NO:23)。

[0009] 抗体或抗体片段可包括(i)含有重链CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,其中重链CDR1序列为GFTFSNHDLN (SEQ ID NO:12),重链CDR2序列为YISSASGLISYADAVRG (SEQ ID NO:14);以及重链CDR3序列为DPPYSGLYALDF (SEQ ID NO:16);和(ii)含有轻链CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区,其中轻链CDR1序列为TLSSELSWYTIV (SEQ ID NO:25),轻链CDR2序列为LKSDGSHSKGD (SEQ ID NO:21),以及轻链CDR3序列为CGAGYTLAGQYGVW (SEQ ID NO:23)。

[0010] 抗体或抗体片段可包括(i)包含重链CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,其中重链CDR1序列为GFTFSNHDLN (SEQ ID NO:12),重链CDR2序列为YISSASGLISYADAVRG (SEQ ID NO:14);以及重链CDR3序列为DPAYTGLYALDF (SEQ ID NO:26);和(ii)包含轻链CDR1,CDR2和CDR3序列的轻链可变区,其中轻链CDR1序列为TLSSELSGFTIV (SEQ ID NO:27),轻链CDR2序列为LKSDGSHSKGD (SEQ ID NO:21),以及轻链CDR3序列为CGAGYTLANQYGVW (SEQ ID NO:28)。

[0011] 抗体或抗原结合片段还可包含根据式(FW1)-(CDR1)-(FW2)-(CDR2)-(FW3)-(CDR3)-(FW4)并置在CDR之间的可变区框架(FW)序列,其中重链可变区中的可变区FW序列是重链可变区FW序列,并且其中轻链可变区中的可变区FW序列是轻链可变区FW序列。可变区FW序列可以是人。抗体或抗原结合片段还可含有人重链和轻链恒定区。恒定区可选自由人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组。恒定区是IgG1或IgG4。在以约0.1mg/kg至约50mg/kg的剂量向受试者施用抗体或抗原结合片段后,可以增加受试者中的肿瘤细胞凋亡。

[0012] 在另一方面,本文的特征在于含有药学上可接受的载体和本文公开的抗体或抗原结合片段的药物组合物。

[0013] 在另一方面,本文的特征在于含有上述药物组合物和至少一种用于治疗癌症的另外的剂的制品。所述至少一种另外的剂可以是靶向CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、Tim-3、TNFRSF4、TNFRSF9、TNFRSF18、CD27、CD39、CD47、CD73或CD278的剂,或者可以是A2A受体拮抗剂或TGF-β拮抗剂。所述至少一种另外的剂可以是B7家族共刺激分子、TNF受体超家族共刺激分子、疫苗组合物或化学治疗剂中的一种或多种。所述至少一种另外的剂可包括用于体外或受试者中的过继T细胞疗法的嵌合抗原受体转染的T细胞或扩增的肿瘤浸润淋巴细胞。可在自体T细胞疗法的体外制造过程中使用所述至少一种另外的剂。

[0014] 在另一个方面,本文的特征在于用于治疗受试者的肿瘤的方法,其中所述方法包括向受试者施用一定量的本文所述的组合物,所述组合物可有效诱导肿瘤中表达TNFRSF25

的肿瘤细胞的凋亡。

[0015] 本文还的特征在于用于刺激受试者中CD8+T细胞增殖的方法,其中所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文所述的组合物。如通过抗原特异性CD8+T细胞的流式细胞术分析所测定的,与施用前的基线增殖水平相比,CD8+T细胞的增殖可以增加至少约20%。

[0016] 另外,本文的特征在于在受试者中引发免疫应答的方法,其中所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文所述的组合物。

[0017] 本文还的特征在于用于刺激受试者中CD4+FoxP3+调节性T细胞增殖的方法,其中所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文所述的组合物。

[0018] 在另一个方面中,本文的特征在于特异性结合人TNFRSF25的分离的单克隆抗体或其Fab片段,其中所述抗体或其Fab片段在结合TNFRSF25后引发信号传导事件,所述信号传导事件与通过TL1A与TNFRSF25的结合所引发的信号传导事件一致,并且其中抗体与人TNFRSF25的氨基酸C48-L71区域中的表位结合。所述抗体或片段可与含有TNFRSF25的以下残基中的至少一个的表位结合:SEQ ID N0:1的C48、R49、G50、C51、P52、A53、G54、H55、Y56、L57、K58、A59、P60、C61、T62、E63、P64、C65、G66、N67、S68、T69、C70或L71。抗体或片段与TNFRSF25的结合可以阻断TL1A与TNFRSF25的结合。抗体可以是人源化抗体或人抗体。抗体可以是任何亚型的IgG抗体。抗体或片段能够在另一者的100倍以内的K_d值与小鼠TNFRSF25、非人灵长类动物TNFRSF25和人TNFRSF25结合。

[0019] 在另一个方面,本文的特征在于特异性结合人TNFRSF25的分离的单克隆抗体或其Fab片段,其中所述抗体或其Fab片段在与TNFRSF25结合后引发信号传导事件,所述信号传导事件的特征是甚至通过TL1A与TNFRSF25的结合引发的信号传导事件,并且其中抗体与人TNFRSF25的氨基酸P64-T69区域中的表位结合。抗体或片段可与含有TNFRSF25的以下残基中的至少一个的表位结合:SEQ ID N0:1的P64、C65、G66、N67、S68或T69。抗体或片段与TNFRSF25的结合可以阻断TL1A与TNFRSF25的结合。抗体可以是人源化抗体或人抗体。抗体可以是任何亚型的IgG抗体。抗体或片段能够在另一者的100倍以内的K_d值与小鼠TNFRSF25、非人灵长类动物TNFRSF25和人TNFRSF25结合。

[0020] 在另一方面,本文的特征在于特异性结合人TNFRSF25的分离的单克隆抗体或其Fab片段,其中所述抗体与表位结合,所述表位具有与SEQ ID N0:1的C48-L71中所示的序列有至少80%同一性的序列。在一些实施方案中,抗体可与表位结合,所述表位具有与SEQ ID N0:1的C48-L71中所示的序列有至少90%同一性的序列,或具有与SEQ ID N0:1的C48-L71中所示的序列有至少95%、至少98%、或至少99%同一性的序列。

[0021] 在另一个方面,本文的特征在于特异性结合人TNFRSF25的分离的单克隆抗体或其Fab片段,其中所述抗体与表位结合,所述表位具有与SEQ ID N0:1的P64-T69中所示的序列有至少85%、至少90%或至少95%同一性的序列。

[0022] 本文的特征还在于特异性结合人TNFRSF25的分离的单克隆抗体或其Fab片段,其中抗体与具有SEQ ID N0:1的C48-L71中所示的序列但具有4个或更少的氨基酸取代的表位结合。在一些实施方案中,抗体可与具有SEQ ID N0:1的C48-L71中所示的序列但具有三个或更少的氨基酸取代,具有两个或更少的氨基酸取代,或具有一个氨基酸取代的表位结合。

[0023] 在另一方面,本文的特征在于特异性结合人TNFRSF25的分离的单克隆抗体或其

Fab片段,其中所述抗体与具有SEQ ID NO:1的P64-T69中所示的序列但具有一个氨基酸取代的表位结合。

[0024] 在另一方面,本文的特征在于用于抑制哺乳动物中的肿瘤生长的方法。所述方法可包括向哺乳动物施用含有药学上可接受的载体和特异性结合人TNFRSF25的单克隆抗体或其Fab片段的组合物,其中所述抗体或其Fab片段能够模拟通过TL1A与TNFRSF25的结合刺激的信号传导事件,并且其中所述抗体与人TNFRSF25的氨基酸C48-L71区域中的表位结合。抗体或片段可与含有TNFRSF25的以下残基中的至少一个的表位结合:SEQ ID NO:1的C48、R49、G50、C51、P52、A53、G54、H55、Y56、L57、K58、A59、P60、C61、T62、E63、P64、C65、G66、N67、S68、T69、C70或L71。抗体或片段可与含有TNFRSF25的以下残基中的至少一个的表位结合:SEQ ID NO:1的P64、C65、G66、N67、S68或T69。抗体或片段与TNFRSF25的结合可以阻断TL1A与TNFRSF25的结合。抗体可以是人源化抗体或人抗体。抗体可以是任何亚型的IgG抗体。抗体或片段能够在另一者的100倍以内的 K_d 值与小鼠TNFRSF25、非人灵长类动物TNFRSF25和人TNFRSF25结合。

[0025] 在另一方面,本文的特征在于含有药学上可接受的载体和如本文所述的分离的单克隆抗体或Fab片段的药物组合物。另外,本文的特征在于药物组合物用于治疗患者的癌症、传染性疾病或组织移植的用途。

[0026] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属的领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管可以使用与本文描述的那些类似或等同的方法和材料来实施本发明,但是下面描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献都通过引用整体并入。如果发生冲突,则以本说明书(包括定义)为准。另外,材料、方法和实施例仅是说明性的而不旨在是限制性的。

[0027] 在附图和以下描述中阐述了本发明的一个或多个实施方案的细节。根据说明书和附图以及权利要求,本发明的其它特征、目的和有利方面将显而易见。

附图说明

[0028] 图1A是人TNFRSF25 (SEQ ID NO:2) 与人TNFR1 (SEQ ID NO:3) 和人Fas (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列比对,TNFRSF25与人TNFR1和人Fas共有一定的同源性。序列编号始于预测的成熟蛋白质的N末端。指示了富含半胱氨酸的区域I-IV、跨膜结构域(TM) 和死亡结构域(DD) 的位置。在至少两个序列之间相同的残基用粗体和下划线标示。

[0029] 图1B显示来自人的两个代表性TNFRSF25氨基酸序列 (SEQ ID NO:1和7),以及来自小鼠 (SEQ ID NO:8)、恒河猴 (SEQ ID NO:9) 和食蟹猴 (Cynomolgus Macaque) (SEQ ID NO:10) 的代表性TNFRSF25氨基酸序列。

[0030] 图2是描述用于评估各种重组TNFRSF25多肽的表达的方法中的步骤的图。

[0031] 图3是绘制六种重组TNFRSF25多肽的表达水平的图。

[0032] 图4是描述用于评估嵌合抗-TNFRSF25抗体与重组TNFRSF25多肽的结合的方法中的步骤的图。

[0033] 图5是绘制递增量的重组TNFRSF25多肽与嵌合抗TNFRSF25抗体的结合的图。

[0034] 图6是绘制各种TNFRSF25丙氨酸突变体与抗-TNFRSF25抗体的结合的倍数变化的图。

[0035] 图7是TNFRSF25的结构图,显示了被鉴定为涉及或可能涉及抗体结合的残基的位置。

[0036] 图8是从两侧观察的TNFRSF25结构的空间填充图,并且指示了被鉴定为参与抗体结合的氨基酸的位置。“热点”残基被鉴定为位于氨基酸48与71之间的结构域中。

[0037] 图9是绘制在TL1A-Ig融合蛋白存在或不存在的情况下抗-TNFRSF25抗体与TNFRSF25结合的抑制,或在抗-TNFRSF25抗体存在或不存在的情况下TL1A-Ig与TNFRSF25的结合的抑制的图。左栏:在TL1A-Ig存在的情况下,抗-TNFRSF25抗体(“仓鼠亲本”)与重组人TNFRSF25的结合被完全抑制。中间栏:在亲本抗-TNFRSF25抗体存在的情况下,TL1A-Ig融合物与重组人TNFRSF25的结合被完全抑制。右栏:在TL1A-Ig存在的情况下,人源化抗-TNFRSF25抗体与重组人TNFRSF25的结合被完全抑制。

[0038] 图10是绘制亲本人源化抗-TNFRSF25抗体和亲和力成熟克隆与TNFRSF25-Fc融合蛋白的结合的图。

[0039] 图11A和11B是绘制亲本抗TNFRSF25抗体、TL1A和所示的亲和力成熟克隆的半胱天冬酶活性的图。亲和力成熟克隆呈IgG1形式。

[0040] 图12是绘制亲本抗-TNFRSF25抗体、TL1A和所示的亲和力成熟克隆的半胱天冬酶活性的图。如所示,亲和力成熟克隆呈IgG1或IgG4形式。

[0041] 图13A是绘制竞争性测定中的荧光水平的图,其中将ALEXAFLUOR® 647标记的TL1A和各种抗体竞争者(4C12亲本和M3、M4和M5亲和力成熟克隆)与表达TNFRSF25(DR3)的p815细胞一起孵育。图13B是绘制竞争性测定中的荧光水平的图,其中将ALEXAFLUOR® 647-标记的4C12和各种抗体竞争者(4C12亲本、hIgG1和M3、M4和M5亲和力成熟克隆)与表达TNFRSF25(DR3)的p815细胞一起孵育。

具体实施方式

[0042] 本文至少部分基于靶向TNFSF25内特定表位的抗体的开发。例如,本文提供了可与人TNFRSF25的氨基酸C48-L71区域中的表位结合的抗体。在一些实施方案中,抗体可以在彼此的100倍以内(例如,10倍以内)的Kd值与啮齿类动物和人TNFRSF25多肽结合,并且能够模拟啮齿类动物或人TL1A与TNFRSF25结合的信号传导活性。在一些实施方案中,所述抗体可与氨基酸P64-T69区域(其是胎盘哺乳动物中多肽的保守区域)中的表位结合。本文还提供了使用本文提供的一种或多种抗体或含有一种或多种抗体的组合物刺激T细胞(例如,人T细胞、鼠T细胞或猕猴T细胞)增殖的方法,以及使用一种或多种抗体或组合物治疗(例如,通过施用一定量的有效刺激CD8+T细胞增殖的抗-TNFRSF25抗体)人癌症患者的方法。

[0043] 本文还提供了亲和力成熟人源化TNFRSF25特异性单克隆抗体,以及亲和力成熟抗体的抗原结合片段。本文还提供了使用亲和力成熟抗体以尤其刺激T细胞(例如,人T细胞,包括天然存在的肿瘤反应性CD8+T细胞或CD4+FoxP3+调节性T细胞,以及小鼠T细胞或猕猴T细胞)增殖的方法,以及使用亲和力成熟抗体治疗其中T细胞的扩增可具有益效果的癌症和其它疾病状态(例如,传染性疾病、移植物抗宿主病和自身免疫疾病)的方法。该方法可包括,例如,施用一定量的有效刺激CD8+T细胞或适当的调节性T细胞群的增殖的亲和力成熟抗体。

[0044] 图1中显示了与人TNFR1和FA的氨基酸序列比对的人TNFRSF25的部分氨基酸序列。

人TNFRSF25的代表性全长氨基酸序列是: **MEQRPRGCAAVAAALLLVLLGARA**

OGGTRSPRCDCAGDFHKIGLFCRGCPAGHYLKAPCTEPGNSTCLVCPOTIFLA
WENHHNSECARCOACDEOASQALENSAVADTRCGCKPGWFVECQVSOCVSSSPF
YCOPCLDCGALHRHTRLLCSRRDTDCGTCLPGFYEHGDGCVSCPTSTLGSCPERCA
AVCGWRQMFWVQVLLAGLVVPLLGATLTYTYRHCWPHKPLVTADEAGMEAL
[0045] TPPPATHLSPLDSAHTLLAPPDSSEKICTVQLVGNSTPGYPETQEALCPQVTWS
WDQLPSRALGPAAAPTLSPEPAGSPAMMLQPGPQLYDVMADAVPARRWKEFVR
TLGLREAEIEAVEVEIGRFRDQQYEMLKRWRQQPAGLGAVYAALEMRMGLDGC
VEDLRSRLQRGP (SEQ ID NO:1)。

[0046] 如本文中所用,术语“抗体”是指与抗原特异性结合的任何免疫球蛋白或抗体(例如,人、仓鼠、猫、小鼠、软骨鱼或骆驼科动物抗体),及其任何衍生物或缀合物。本领域技术人员已知多种抗体。抗体的非限制性实例包括单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、单链抗体(例如,单结构域抗体、骆驼科动物抗体和软骨鱼抗体)、嵌合抗体、猫科动物抗体和猫源化抗体。单克隆抗体是针对抗原的特定表位的同源抗体群。多克隆抗体是包含在被免疫的动物血清中的异质抗体分子群。术语“抗体”还包括抗体衍生物和缀合物(例如,与稳定化蛋白、可检测部分或治疗剂缀合的抗体)。

[0047] 关于多肽(例如,抗体或其片段)的“分离的”或“纯化的”,意指多肽在一定程度上与通常与其一起天然存在的细胞组分(例如,其它多肽、脂质、碳水化合物和核酸)分离。在一些实施方案中,“分离的”多肽是在除其中多肽天然表达和产生的环境外的环境中表达和产生的多肽。例如,当在细菌或真菌中表达和产生时,植物多肽是分离的。类似地,当其基因编码序列与嵌合调控元件可操作地连接并在多肽不是天然表达的组织中表达时,植物多肽是分离的。

[0048] 分离的多肽可在非还原性聚丙烯酰胺凝胶上产生单一主要条带。分离的多肽的纯度可为至少约75% (例如,纯度为至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%)。分离的多肽可以通过例如从天然来源提取,通过化学合成,或通过在宿主细胞或转基因植物中重组生产来获得,并且可以使用例如亲和层析、免疫沉淀、尺寸排阻色谱和离子交换色谱进行纯化。纯化程度可使用任何合适的方法(包括但不限于柱色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱)来测量。

[0049] “抗原结合片段”是含有至少一个能够与抗原特异性结合的可变结构域(例如,哺乳动物(例如,猫、人、仓鼠或小鼠)重链或轻链免疫球蛋白的可变结构域、骆驼科动物可变抗原结合结构域(VHH)或软骨鱼免疫球蛋白新抗原受体(Ig-NAR)结构域)的全长抗体的任何部分。抗体片段的非限制性实例包括Fab、Fab'、F(ab')2和Fv片段、双抗体、线性抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。含有至少一个骆驼科动物VHH结构域或至少一个软骨鱼Ig-NAR结构域的另外的抗体片段包括迷你抗体(mini-body)、微型抗体(micro-antibody)、亚纳米抗体(subnano-antibody)和纳米抗体,以及例如在美国公开号2010/0092470中所描述的抗体的另外形式中的任何形式。

[0050] “Fv片段”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该区域由紧密的非共价缔合的一个重链可变结构域与一个轻链可变结构域的二聚体组成。在该构型中,每个可

变结构域的三个互补决定区 (CDR) 相互作用以在VH-VL二聚体的表面上限定抗原结合部位。术语“互补决定区”或“CDR”是指免疫球蛋白(重链或轻链免疫球蛋白)内的区域,其形成抗体或其抗原结合片段中抗原结合部位的一部分。如本领域中所已知的,重链和轻链免疫球蛋白各自含有三个CDR,称为CDR1、CDR2和CDR3。在任何抗体或抗原结合片段中,来自重链免疫球蛋白的三个CDR和来自轻链免疫球蛋白的三个CDR一起在抗体或其抗原结合片段中形成抗原结合部位。Kabat数据库是在本领域中用于对存在于轻链免疫球蛋白或重链免疫球蛋白中的CDR序列进行编号的一个系统。

[0051] 六个CDR一起赋予抗体抗原结合特异性。然而,即使单个可变结构域(或仅包含三个对抗原特异的CDR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管通常具有比完整结合部位低的亲和力。“Fab片段”还含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。“Fab片段”与“Fab’片段”相异在于在重链C_H1结构域的羧基末端添加了一些残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。“F(ab’)₂片段”最初被产生为一对“Fab’片段”,它们之间具有铰链半胱氨酸。制备此类抗体片段的方法(诸如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化)是本领域技术人员已知的。例如,可通过胃蛋白酶消化抗体分子产生F(ab’)₂片段,并且可通过还原F(ab’)₂片段的二硫键产生Fab片段。在某些情况下,可构建Fab表达文库。参见,例如,Huse等,Science,246:1275,1989。一旦产生,可使用标准免疫测定方法诸如ELISA技术、放射免疫测定和蛋白质印迹来测试抗体或其片段对TNFRSF25多肽的识别。参见,Short Protocols in Molecular Biology,第11章,Green Publishing Associates and John Wiley&Sons,Ed.Ausubel等,1992。

[0052] 抗体可具有IgA-型、IgD-型、IgE-型、IgG-型、或IgM-型,包括IgG-型或IgM-型,例如但不限于IgG1-型、IgG2-型、IgG3-型、IgG4-型、IgM1-型和IgM2-型。例如,在一些情况下,抗体是IgG1-型、IgG2-型或IgG4-型。

[0053] 在一些实施方案中,如本文提供的抗体可以是完全人抗体或人源化抗体。“人抗体”是指由存在于人基因组中的核酸(例如,重排的人免疫球蛋白重链或轻链基因座)编码的抗体。在一些实施方案中,可在人细胞培养物(例如,猫杂交瘤细胞)中产生人抗体。在一些实施方案中,可在非人细胞(例如,小鼠或仓鼠细胞系)中产生人抗体。在一些实施方案中,可在细菌或酵母细胞中产生人抗体。

[0054] 人抗体可避免与异种抗体(诸如具有鼠或大鼠可变区和/或恒定区的抗体)相关的某些问题。例如,因为效应部分是人,其可更好地与人免疫系统的其它部分相互作用,例如,通过补体依赖性细胞毒性或抗体依赖性细胞毒性更高效地破坏靶细胞。此外,人免疫系统不应该将抗体识别为外来的。另外,人体循环中的半衰期与天然存在的人抗体相似,允许给予更小和更少频率的剂量。制备人抗体的方法是本领域已知的。

[0055] 如本文中所用,术语“人源化抗体”是指含有衍生自非人(例如,小鼠、仓鼠、大鼠、兔或山羊)免疫球蛋白的最小序列的人抗体。人源化抗体通常是来自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或其它物种的嵌合或突变型单克隆抗体,其携带人恒定区和/或可变区或特异性变化。在非限制性实例中,人源化抗体是人抗体(受体抗体),其中受体抗体的高变区(HVR)残基被来自非人物种(供体)抗体(诸如具有所需特异性、亲和力和容量的小鼠、大鼠、兔或山羊抗体)的HVR残基替换。在一些实施方案中,人免疫球蛋白的Fv框架残基可以被相应的非人残基替换。在一些实施方案中,人源化抗体可含有不存在于受体抗体或供体抗体中的残基。例如,

可以进行这样的修饰以改善抗体性能。

[0056] 在一些实施方案中,人源化抗体可包含基本上全部、至少一个以及通常两个可变结构域,其中全部或基本上全部高变环(CDR)对应于非人免疫球蛋白的那些高变环,而全部或者基本上全部框架区是人免疫球蛋白序列的那些框架区。人源化抗体还可含有免疫球蛋白恒定(Fc)区的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的区域。

[0057] 在一些实施方案中,如本文提供的人源化抗体或抗原结合片段可具有降低的或最小的效应子功能(例如,如与相应的非人源化抗体相比),使得其不会刺激效应细胞作用至与相应的非人源化抗体会产生的程度相同的程度。

[0058] 产生人源化抗体的技术是本领域技术人员熟知的。在一些实施方案中,可利用通过蛋白质二硫键连接(以形成新的人工蛋白质分子或“嵌合”抗体)的抗体结构域的受控重排(Konieczny等,Haematologia (Budap.) 14:95,1981)。重组DNA技术可用于构建编码小鼠抗体可变轻链和重链结构域与人抗体轻链和重链恒定结构域的DNA序列之间的基因融合物(Morrison等,Proc Natl Acad Sci USA 81:6851,1984)。例如,编码鼠单克隆抗体的抗原结合部分或CDR的DNA序列可以通过分子方法移植到编码人抗体重链和轻链框架的DNA序列中(Jones等,Nature 321:522,1986;和Riechmann等,Nature 332:323,1988)。表达的重组产物称为“重塑过的(reshaped)”或人源化的抗体,并含有人抗体轻链或重链的框架和鼠单克隆抗体的抗原识别部分CDR。

[0059] 用于设计重链和轻链以及用于产生人源化抗体的其它方法描述于,例如,美国专利第5,530,101号、第5,565,332号、第5,585,089号、第5,639,641号、第5,693,761号、第5,693,762号和第5,733,743号中。用于对抗体进行人源化的另外的方法描述于例如美国专利第4,816,567号、第4,935,496号、第5,502,167号、第5,558,864号、第5,693,493号、第5,698,417号、第5,705,154号、第5,750,078号和第5,770,403号中。

[0060] 术语“单链抗体”是指含有至少一个能够特异性结合抗原的可变结合结构域(例如,哺乳动物重链或轻链免疫球蛋白的可变结构域、骆驼科动物VHH或软骨鱼(例如,鲨鱼)Ig-NAR结构域)的单个多肽。单链抗体的非限制性实例包括单结构域抗体。

[0061] 如本文中所用,术语“单结构域抗体”是指含有一个骆驼科动物VHH或至少一个能够特异性结合抗原的软骨鱼Ig-NAR结构域的多肽。单结构域抗体的非限制性实例描述于例如美国公开第2010/0092470号中。

[0062] 抗体或其抗原结合片段“特异性结合”特定抗原,例如TNFRFS25,当其与样品中的该抗原结合时,并且不识别和结合样品中的其它分子,或在较低程度上识别并结合所述其他分子。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以在磷酸缓冲盐溶液中以等于或小于例如约 1×10^{-6} M(例如,等于或小于约 1×10^{-9} M,等于或小于约 1×10^{-10} M,等于或小于约 1×10^{-11} M,等于或小于约 1×10^{-12} M)的亲和力(Kd)选择性地结合表位。抗体或抗原结合片段特异性结合蛋白质表位的能力可使用本领域已知的任何方法或本文所述的那些方法(例如,通过Biacore/表面等离子体共振)来测定。这可以包括,例如,与活细胞上的TNFRSF25结合(如刺激活的转化细胞中的胱天蛋白酶活化的方法)、与固定的靶底物(包括人TNFRSF25融合蛋白)结合(如使用ELISA方法检测的)、与活细胞上的TNFRSF25结合(如通过流式细胞术检测的),或与固定的底物结合(通过表面等离子体共振(包括ProteOn)检测的)。

[0063] 可使用标准方法产生对TNFRSF25具有特异性结合亲和力的抗体。例如,可重组产

生TNFRSF25多肽(例如,具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2中所示的序列,或长度为至少6至10个氨基酸的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的片段),从生物样品(例如,异源表达系统)纯化所述多肽,或化学合成所述多肽,并将其用于免疫宿主动物,包括兔、鸡、小鼠、豚鼠或大鼠。可用于增加免疫应答的各种佐剂取决于宿主物种,其包括弗氏佐剂(完全和不完全)、矿物凝胶诸如氢氧化铝、表面活性物质诸如溶血卵磷脂、复合多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔戚血蓝蛋白和二硝基酚。可使用TNFRSF25多肽和标准杂交瘤技术制备单克隆抗体。具体地,单克隆抗体可以通过任何技术获得,所述技术通过培养中的连续细胞系(诸如由Kohler等(Nature 256: 495, 1975)所述的)、Kosbor等(Immunology Today, 4: 72, 1983)或Cote等(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2026, 1983)的人B细胞杂交瘤技术和由Cole等(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 第77-96页, 1983)描述的EBV-杂交瘤技术提供抗体分子的产生。此类抗体可以是任何免疫球蛋白种类,包括IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及其任何亚类。可以在体外和体内培养产生单克隆抗体的杂交瘤。

[0064] 在一些实施方案中,如本文提供的单克隆抗-TNFRSF25抗体具有重链可变区,其含有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列,但具有1至24个修饰(例如,取代、添加或缺失),使得氨基酸序列与SEQ ID NO:5有80%至99.5%同一性。在一些实施方案中,如本文提供的单克隆抗-TNFRSF25抗体具有轻链可变区,其含有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,但具有1至23个修饰(例如,取代、添加或缺失),使得氨基酸序列与SEQ ID NO:6有80%至99.9%同一性。SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的序列如下:

EVQLVESGGGLSQPGNSLQLSCEASGFTFSNHDLNWVRQAPGKGLEWVAYISSAS
GLISYADAVRGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLKSEDTAMYCCARDPPYSGLYALDF
WGQGTQTVSS (SEQ ID NO:5)

[0065]

QPVLTQSPSASASLSGSVKLTCTLSSSELSSYTIVWYQQRPDKAPKYVVMYLKSDGS
HSKGDGIPDRFSGSSSGAHRYLSISNVQSEDDATYFCGAGYTLAGQYGVVFGSG
TKVTVL (SEQ ID NO:6)

[0066] 因此,本文提供了含有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列或其抗原结合片段但具有1-24个序列修饰的重链可变区多肽,以及与SEQ ID NO:5或其抗原结合片段有至少约80%(例如,约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)的氨基酸序列同一性的多肽。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:5或其抗原结合片段相比,重链可变区多肽可含有24个或更少(例如,24个、23个、22个、21个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个或1个)氨基酸取代。

[0067] 本文还提供了含有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列或其抗原结合片段但具有1至23个序列修饰的轻链可变区多肽,以及与SEQ ID NO:6或其抗原结合片段有至少约80%(例如,约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)氨基酸序列同一性的多肽。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:6或其抗原结合片段相比,轻链可变区多肽可含有23个或更少(例如,23个、22个、21个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)氨基酸取代。

[0068] 本文还提供了含有本文公开的重链可变区多肽和轻链可变区多肽的抗体和抗原结合片段。在一些实施方案中,例如,抗体或抗原结合片段可含有重链可变区序列和轻链可

变区序列,所述重链可变区序列包含SEQ ID NQ:5中所示的氨基酸序列,具有1至24个氨基酸取代(例如,总共1至5个,5至10个,10至15个,15或20个,或20至24个氨基酸取代),所述轻链可变区序列包含SEQ ID NQ:6的氨基酸序列,具有1至23个氨基酸取代(例如,总共1至5个,5至10个,10至15个,15至20个或20至23个氨基酸取代)。氨基酸取代是指肽序列中一个氨基酸残基被另一个氨基酸残基替换。

[0069] 在一些实施方案中,如本文提供的抗TNFRSF25抗体或其抗原结合片段可与TNFRSF25的表位结合,所述表位具有与SEQ ID N0:1的C48-L71中所示的序列有至少80%同一性(例如,至少85%、至少90%或至少95%同一性)的氨基酸序列。例如,在一些情况下,抗体或其抗原结合片段可与TNFRSF25的表位结合,所述表位具有SEQ ID N0:1的C48-L71中所示的序列,但具有4个或更少(例如,3个或更少,或两个或更少)的氨基酸取代,或具有一个氨基酸取代。

[0070] 在一些实施方案中,如本文提供的抗-TNFRSF25抗体或其抗原结合片段可结合TNFRSF25的表位,所述表位具有与SEQ ID N0:1的P64-T769中所示的序列有至少85%同一性的氨基酸序列。例如,在一些情况下,抗体或其抗原结合片段可与TNFRSF25的表位结合,所述表位具有SEQ ID N0:1的P64-T69中所示的序列,但具有一个氨基酸取代。

[0071] 如本文中所述,将如在别处(参见,WO 2016/081455)所述产生的针对TNFRSF25的人源化单克隆抗体用于亲和力成熟研究,导致鉴定出似乎与增强的亲和力和/或活性相关的几个重链和轻链可变区CDR修饰。然而,有趣地以及如本文实施例3中所讨论的,显示对TNFRSF25具有最大结合亲和力的克隆并不总是具有高于亲本抗体的最大活性的克隆。例如,通过胱天蛋白酶-3释放测定所测定的,在本文中被鉴定为“M5”的克隆显示出增强的激动活性,但令人惊讶的是,其与TNFRSF25-Fc融合蛋白的结合显著弱于大多数通过组合文库筛选鉴定的其他克隆。该发现的例外是鉴定为“M4”的克隆,其与亲本抗体相比表现出对TNFRSF25-Fc的增强的结合和增强的激动活性。

[0072] 因此,在一些情况下,与亲本人源化4C12抗体相比,本文提供的抗体可具有对TNFRSF25的增强的结合亲和力、增强的激动活性(例如,如通过胱天蛋白酶-3测定所测定的),或者增强的亲和力和活性两者。“增强的”亲和力或活性意指与人源化4C12的亲和力或激动活性相比至少5%(例如,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或超过100%)的增强。4C12重链和轻链的可变区的序列在本文中分别如SEQ ID N0:5和6中所示。抗体的激动活性可使用例如本文所述的胱天蛋白酶-3测定或如别处(参见,例如,Bu等,Bone 33 (5) :760-770,2003)所述的TNFRSF25受体信号传导测定来评估。

[0073] 因此,在一些实施方案中,本文提供了含有SEQ ID N0:12所示的CDR1序列、SEQ ID N0:14所示的CDR2序列和SEQ ID N0:16、26和32所示的CDR3序列的重链可变区多肽。例如,根据式(FW1) - (CDR1) - (FW2) - (CDR2) - (FW3) - (CDR3) - (FW4),多肽还可包括并置在CDR之间的可变区重链框架(FW)序列。在一些实施方案中,FW序列可以是人序列。在一些实施方案中,重链可变区多肽可包括SEQ ID N0:11中所示的FW1序列、SEQ ID N0:13中所示的FW2序列、SEQ ID N0:15中所示的FW3序列和SEQ ID N0:17所示的FW4序列。

[0074] 本文还提供了含有SEQ ID N0:25、27和29中任一个所示的CDR1序列、SEQ ID N0:21所示的CDR2序列和SEQ ID N0:23、28和30中任一个所示的CDR3序列的轻链可变区多肽。根据式(FW1) - (CDR1) - (FW2) - (CDR2) - (FW3) - (CDR3) - (FW4),多肽还可以包括并置在CDR之

间的可变区轻链FW。在一些情况下,FW序列可以是人序列。在一些实施方案中,轻链可变区多肽可包括SEQ ID N0:18中所示的FW1序列、SEQ ID N0:20中所示的FW2序列、SEQ ID N0:22中所示的FW3序列和SEQ ID N0:24中所示的FW4序列。

[0075] 本文还提供了含有本文公开的重链可变区多肽和轻链可变区多肽的抗体和抗原结合片段。在一些实施方案中,例如,抗体或抗原结合片段可含有具有如本文公开的重链CDR序列的重链可变区序列和具有如本文公开的轻链CDR序列的轻链可变区序列。在一些情况下,抗体不是4C12抗体,使得其不含有如SEQ ID N0:12、14和16中所示的重链可变区CDR,并且不含有如SEQ ID N0:19、21和23中所示的轻链可变区CDR。

[0076] 在一些实施方案中,氨基酸取代可以通过选择保守取代来进行,所述保守取代在它们对下面的影响方面没有显著差异:维持(a)取代区域中肽骨架的结构,(b)靶部位的分子的电荷或疏水性,或(c)侧链体积。例如,可以基于侧链性质将天然存在的残基分成以下组:(1)疏水性氨基酸(正亮氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸);(2)中性亲水氨基酸(半胱氨酸、丝氨酸和苏氨酸);(3)酸性氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸);(4)碱性氨基酸(天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸和精氨酸);(5)影响链取向的氨基酸(甘氨酸和脯氨酸);和(6)芳香族氨基酸(色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸)。在这些组内进行的取代可以被认为是保守取代。保守取代的非限制性实例包括但不限于缬氨酸对丙氨酸的取代、赖氨酸对精氨酸的取代、谷氨酰胺对天冬氨酸的取代、谷氨酸对天冬氨酸的取代、丝氨酸对半胱氨酸的取代、天冬酰胺对谷氨酰胺的取代、天冬氨酸对谷氨酸的取代、脯氨酸对甘氨酸的取代、精氨酸对组氨酸的取代、亮氨酸对异亮氨酸的取代、异亮氨酸对亮氨酸的取代、精氨酸对赖氨酸的取代、亮氨酸对甲硫氨酸的取代、亮氨酸对苯丙氨酸的取代、甘氨酸对脯氨酸的取代、苏氨酸对丝氨酸的取代、丝氨酸对苏氨酸的取代、酪氨酸对色氨酸的取代、苯丙氨酸对酪氨酸的取代和/或亮氨酸对缬氨酸的取代。在一些实施方案中,氨基酸取代可以是非保守的,使得上述氨基酸种类之一的成员被交换为另一类的成员。

[0077] 特定核酸或氨基酸序列与特定序列识别号所指序列之间的百分比序列同一性如下确定。首先,使用来自含有BLASTN 2.0.14版和BLASTP 2.0.14版的BLASTZ的独立版本的BLAST 2Sequences (B12seq) 程序,将核酸或氨基酸序列与特定序列识别号中所示的序列进行比较。BLASTZ的该独立版可在fr.com/blast或在ncbi.nlm.nih.gov在线获得。解释如何使用B12seq程序的说明可见于BLASTZ随附的自述文件。B12seq使用BLASTN或BLASTP算法进行两个序列之间的比较。BLASTN用于比较核酸序列,而BLASTP用于比较氨基酸序列。为了比较两个核酸序列,选项设置如下:将-i设置为包含待比较的第一核酸序列的文件(例如,C:\seq1.txt),将-j设置为包含待比较的第二核酸序列(例如,C:\seq2.txt);将-p设置为blastn;将-o设置为任何所需的文件名(例如,C:\output.txt);将-q设置为-1;将-r设置为2;并且所有其它选项保留在它们的默认设置。例如,以下命令可用于生成包含两个序列之间的比较的输出文件:C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastn -o c:\output.txt -q -1 -r 2。为了比较两个氨基酸序列,如下设置B12seq的选项:将-i设置为包含待比较的第一个氨基酸序列的文件(例如,C:\seq1.txt);将-j设置为含有待比较的第二氨基酸序列的文件(例如,C:\seq2.txt);将-p设置为blastp;将-o设置为任何所需的文件名(例如,C:\output.txt);并且所有其它选项保留它们的默认设置。例如,以下命令可用于生成包含两个氨基酸序列之间的比较的输出文件:C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\

seq2.txt-p blastp-oc:\output.txt。如果两个比较的序列共有同源性，则指定的输出文件将那些具有同源性的区域呈现为比对序列。如果两个比较的序列不共有同源性，则指定的输出文件将不呈现比对序列。

[0078] 一旦比对，通过计数在两个序列中均呈现相同核苷酸或氨基酸残基的位置数来确定匹配数。通过将匹配数除以所标识的序列（例如，SEQ ID NO:1）中所示的序列的长度，或除以铰接长度（例如，来自所标识的序列中所示的序列的100个连续核苷酸或氨基酸残基），然后将所得值的值乘以100来测定百分比序列同一性。例如，当与SEQ ID NO:1中所示的序列比对时具有110个匹配的氨基酸序列与SEQ ID NO:1中所示的序列具有90.9%（即， $110 \div 121 \times 100 = 90.9$ ）百分比同一性。应注意，将百分比序列同一性值四舍五入到最接近的小数点后一位。例如，75.11、75.12、75.13和75.14向下舍入到75.1，而75.15、75.16、75.17、75.18和75.19向上舍入到75.2。还应注意，长度值将始终是整数。

[0079] 另外，本文还提供了药物组合物，其含有如本文所述的抗体或抗原结合片段与药学上可接受的载体的组合。“药学上可接受的载体”（也称为“赋形剂”或“载体”）是用于将一种或多种治疗性化合物递送至受试者（例如，哺乳动物，诸如人、非人灵长类动物、狗、猫、绵羊、猪、马、牛、小鼠、大鼠或兔子）的药学上可接受的溶剂、悬浮剂、稳定剂或任何其它药理学惰性载体，其在所使用的剂量和浓度下对暴露于其的细胞或受试者是无毒的。药学上可接受的载体可以是液体或固体，并且可根据计划的施用方式进行选择，以便当与给定的药物组合物的一种或多种治疗性化合物和任何其它组分组合时提供所需的体积、稠度和其它相关的运输和化学性质。不与氨基酸有害反应的典型的药学上可接受的载体包括，例如但不限于：水、盐溶液、粘合剂（例如，聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素）、填充剂（例如，乳糖和其它糖、明胶或硫酸钙）、润滑剂（例如，淀粉、聚乙二醇或乙酸钠）、崩解剂（例如，淀粉或羟基乙酸淀粉钠）和润湿剂（例如，月桂基硫酸钠）。药学上可接受的载体还包括pH缓冲水溶液或脂质体（由各种类型的脂质、磷脂和/或表面活性剂组成的小囊泡，其可用于将药物递送至哺乳动物）。药学上可接受的载体的其它实例包括缓冲剂诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸、抗氧化剂诸如抗坏血酸、低分子量（少于约10个残基）多肽、蛋白质诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白、亲水性聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮、氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸、单糖、二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精、螯合剂诸如EDTA、糖醇诸如甘露醇或山梨糖醇、成盐抗衡离子诸如钠和/或非离子表面活性剂如TWEENTM、聚乙二醇（PEG）和PLURONICSTM。

[0080] 药物组合物还可通过将一种或多种活性剂与一种或多种生理学上可接受的载体、稀释剂和/或佐剂以及任选的通常被掺入到制剂中以提供改善的转移、递送、耐受性等的其它剂混合来配制。可将药物组合物配制在例如冻干制剂、水溶液、分散体或固体制剂诸如片剂、锭剂或胶囊中。可在所有药物化学家已知的处方集：Remington's Pharmaceutical Sciences（第18版，Mack Publishing Company, Easton, PA (1990)）（特别是其中的由particularly Chapter 87 by Block, Lawrence编写的第87章）中找到许多合适的制剂。这些制剂包括例如粉剂、糊剂、软膏、凝胶、蜡、油、脂质、含有脂质（阳离子或阴离子的）囊泡（诸如LIPOFECTINTM）、DNA缀合物、无水吸收膏、水包油和油包水乳液、乳液聚乙二醇（各种分子量的聚乙二醇）、半固体凝胶和含有聚乙二醇的半固体混合物。任何前述混合物可适用于本文所述的治疗和疗法，条件是制剂中的活性剂不被制剂灭活，并且制剂在生理上是相容

的并且可对于施用途径是可耐受的。关于与药物化学家熟知的制剂、赋形剂和载体相关的其它信息,也参见Baldrick, *Regul Toxicol Pharmacol* 32:210-218, 2000; Wang, *Int J Pharm* 203:1-60, 2000; Charman *J Pharm Sci* 89:967-978, 2000; 和Powell等 *PDA J Pharm Sci Technol* 52:238-311, 1998) 以及其中的引文。

[0081] 药物组合物包括但不限于溶液、乳液、含水悬浮液和含脂质体的制剂。这些组合物可由多种组分产生,所述组分包括例如预先形成的液体、自乳化固体和自乳化半固体。乳液通常是双相体系,其由密切混合且彼此分散的两个不混溶的液相组成;一般而言,乳液是油包水(w/o)或水包油(o/w)种类。乳液制剂由于其配制的容易度和增溶、吸收和生物利用度的功效而已广泛用于口服递送治疗剂。

[0082] 组合物和制剂可含有无菌水溶液,其也可含有缓冲液、稀释剂和其它合适的添加剂(例如,渗透促进剂、载体化合物和其它药学上可接受的载体)。组合物可另外含有药物组合物中常规发现的其它辅助组分。因此,组合物还可包括相容的药物活性物质诸如,例如,止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或用于物理配制本文提供的组合物的各种剂型的其它物质,诸如染料、调味剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。此外,可将组合物与辅助剂混合,例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂、调味剂和芳香物质混合。然而,当添加时,此类物质不应过度干扰本文提供的组合物中的多肽组分的生物活性。如果需要,可以将制剂灭菌。

[0083] 在一些实施方案中,含有本文提供的抗体或抗原结合片段的组合物可呈具有或不具有稀释剂(以制备可注射的悬浮液)的溶液或粉剂的形式。所述组合物可含有其它成分,包括但不限于例如药学上可接受的媒介物诸如盐水、水、乳酸、甘露糖醇或其组合。

[0084] 可使用任何合适的方法向哺乳动物施用本文所述的抗体或抗原结合片段。施用可以是例如肠胃外(例如,通过皮下、鞘内、心室内、肌内或腹膜内注射,或通过静脉内滴注)。施用可以是快速的(例如,通过注射)或可在一段时间内进行(例如,通过缓慢输注或缓释制剂的施用)。在一些实施方案中,施用可以是局部的(例如,透皮、舌下、经眼或鼻内)、经肺的(例如,通过吸入或吹入粉剂或气溶胶)或口服的。另外,含有本文所述的抗体或抗原结合片段的组合物可在肿瘤的手术切除之前、之后施用或可被施用来代替肿瘤的手术切除。

[0085] 含有抗TNFRSF25抗体或抗原结合片段的组合物可以以任何适当的量,以任何适当的频率向哺乳动物施用,并持续有效达到所需结果的任何适当的持续时间。例如,可以以有效刺激体外或体内T细胞(例如,人、鼠、仓鼠或猕猴T细胞,包括CD8+T细胞和/或CD4+FoxP3+调节性T细胞)增殖的量向受试者施用抗-TNFRSF25抗体或抗原结合片段,以刺激表达TNFRSF25的肿瘤细胞的凋亡,减少肿瘤尺寸,或增加癌症患者的无进展存活期。在一些实施方案中,抗-TNFRSF25抗体或抗原结合片段可以约0.1mg/kg至约10mg/kg(例如,约0.1mg/kg至约1mg/kg,约1mg/kg至约5mg/kg,或约5mg/kg至约10mg/kg)的剂量进行施用,并且可以每一至三周施用一次(例如,每周、每10天、每两周或每三周一次)。

[0086] 向受试者施用本文提供的抗体或抗原结合片段可导致T细胞(例如,天然存在的肿瘤反应性CD8+T细胞或CD4+FoxP3+调节性T细胞)数量增加,所述T细胞可以发挥针对存在于哺乳动物内的癌细胞的抗癌作用。因此,本文还提供了通过向受试者施用本文公开的抗体、抗原结合片段或组合物来刺激受试者中T细胞增殖的方法。在一些情况下,可以有效地使T细胞增殖增加(例如,增加至少约10%、约20%、约25%、约50%、约60%、约70%、约75%、

约80%、约90%、约100%或超过100%) (如与在施用所述组合物之前的受试者中T细胞增殖的“基线”水平相比,或如与对照受试者或未向其施用所述组合物的受试者群体中的T细胞增殖的水平相比)的量向受试者施用含有如本文所述的抗-TNFRSF25抗体或抗原结合片段的组合物。T细胞可以是例如CD8+T细胞或CD4+FoxP3+调节性T细胞。可使用任何合适的方法来确定受试者中T细胞增殖水平是否增加。此类方法可包括但不限于抗原特异性T细胞的流式细胞术分析(例如,作为总CD8+T细胞库的一部分的抗原特异性CD8+T细胞的比例的流式细胞术分析)、CD8+T细胞中的细胞增殖标志物的分析(例如,Ki67的表达)、CD8+T细胞的计数增加或CD8+T细胞的特定克隆的单个TCR序列的比例增加。

[0087] 本文还提供了通过用本文所述的抗体、抗原结合片段或组合物治疗受试者来促进受试者中表达TNFRSF25的肿瘤细胞凋亡的方法。在一些情况下,如与在施用所述组合物之前的受试者中肿瘤细胞凋亡的“基线”水平相比,或如与对照受试者或未向其施用所述组合物的受试者群体中的肿瘤细胞凋亡的水平相比,可以有效地增加(例如,增加至少约10%、约20%、约25%、约50%、约60%、约70%、约75%、约80%、约90%、约100%或超过100%)表达TNFRSF25的肿瘤细胞凋亡的量向受试者(例如,癌症患者)施用含有本文提供的抗体或抗原结合片段的组合物。可使用任何合适的方法来确定受试者中肿瘤细胞凋亡的水平是否升高。这可包括,例如,放射学技术诸如CT或MRI(具有或不具有指示坏死或凋亡的肿瘤的存在的对比)、肿瘤样品的活组织检查(指示增加的肿瘤细胞死亡)、肿瘤细胞内的胱天蛋白酶诱导、通过放射学、手术或体格检查进行的可检测的肿瘤病变的消除。

[0088] 本文还提供了用于治疗患有癌症(包括实体瘤和白血病/淋巴瘤)的受试者(例如,人患者)的方法。在一些情况下,如与在施用所述组合物之前的受试者中癌症进展速率相比,或如与对照受试者或未向其施用所述组合物的受试者群体中的癌症进展速率相比,可以有效降低(例如,降低至少约10%、约20%、约25%、约50%、约60%、约70%、约75%、约80%、约90%或超过90%)癌症进展速率的量向患有癌症的受试者施用含有如本文所述的抗体或抗原结合片段的组合物。在一些实施方案中,可降低进展速率,使得未检测到额外的癌症进展。可使用任何适当的方法来确定癌症的进展速率是否降低。例如,对于皮肤癌(例如,黑素瘤),可通过在不同时间点对组织成像并测定存在的癌细胞的量来评估进展速率。可比较在不同时间在组织内测定的癌细胞的量以确定进展速率。在如本文所述的治疗之后,可在另一个时间间隔上再次确定进展速率。在一些情况下,可以确定治疗后的癌症分期并将其与治疗前的分期进行比较,以确定进展速率是否已被降低。

[0089] 如与具有未治疗的癌症的相应受试者的中位无进展存活期或患有癌症并用其它疗法(例如,单独的化学治疗剂)治疗的相应受试者的中位无进展存活期相比,还可在其中无进展存活期得以增加(例如,增加至少约10%、约20%、约25%、约50%、约60%、约70%、约75%、约80%、约90%、约100%或超过100%)的条件下向患有癌症的受试者施用含有如本文所述的抗体或抗原结合片段的组合物。可在任何时间长度(例如,一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月或更长时间)测量无进展存活期。

[0090] 含有本文提供的分子的组合物的有效量可以是具有所需缺陷(例如,刺激CD8+T细胞的增殖,刺激表达TNFRSF25的肿瘤细胞的凋亡,刺激或引发受试者的免疫应答,减少肿瘤尺寸,降低癌症的进展速度,增加癌症患者的无进展存活期,或增加进展的中位时间而不产生显著毒性)的任何量。最佳剂量可根据各个多肽(例如,抗体和抗原结合片段)的相对效力

而变化,并且通常可基于经发现在体外和体内动物模型中有效的EC₅₀来估计。通常,剂量为0.01μg至100g/kg体重。例如,抗体或抗原结合片段的有效量可以为约0.1mg/kg至约50mg/kg(例如,约0.4mg/kg、约2mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约20mg/kg、约30mg/kg、约40mg/kg或约50mg/kg)或其间的任何范围,诸如约0.1mg/kg至约10mg/kg、约0.4mg/kg至约20mg/kg、约2mg/kg至约30mg/kg或约5mg/kg至约40mg/kg。如果特定受试者对特定量不能响应,则可以使抗体或抗原结合片段的量增加例如两倍。在接受该较高浓度后,可以监测受试者对治疗的响应性和毒性症状,并相应地进行调整。有效量可以保持恒定,或者可根据受试者对治疗的响应按比例增减或可变剂量进行调整。各种因素可影响用于特定应用的实际有效量。例如,施用频率、治疗持续时间、多种治疗剂的使用、施用途径和癌症的严重程度可能需要增加或减少施用的实际有效量。

[0091] 施用频率可以是例如刺激CD8+T细胞的增殖,刺激表达TNFRSF25的肿瘤细胞凋亡,减小肿瘤尺寸,降低癌症的进展速率,增加癌症患者的无进展存活期,或增加中位进展时间而不产生显著毒性的任何频率。例如,施用频率可以是每日一次或多次、每两周一次、每周一次、每月一次或甚至更少。施用频率在治疗期间可以保持不变或可以变化。治疗过程可以包括休息期。例如,含有本文提供的抗体或抗原结合片段的组合物可以在两周的时期内施用,然后是两周的休息期,并且这种方案可以重复多次。与有效量一样,各种因素可影响用于特定应用的实际施用频率。例如,有效量、治疗持续时间、多种治疗剂的使用、施用途径和癌症的严重程度可能需要增加或减少施用频率。

[0092] 施用本文提供的组合物的有效持续时间可以是刺激CD8+T细胞增殖,刺激表达TNFRSF25的肿瘤细胞凋亡,减小肿瘤尺寸,降低癌症进展速率,增加癌症患者的无进展存活期,或增加中位进展时间而不产生显著毒性的任何持续时间。因此,有效持续时间可以从数天至数周、数月或数年变化。通常,治疗癌症的有效持续时间可在数周至数月的持续时间内变化。在某些情况下,有效持续时间与个体受试者活着的时间一样长。多种因素可影响用于特定治疗的实际有效持续时间。例如,有效持续时间可随施用频率、有效量、多种治疗剂的使用、施用途径和癌症的严重程度而变化。

[0093] 在向癌症患者施用本文提供的组合物后,可监测患者以确定癌症是否已被治疗。例如,可在治疗后评估受试者以确定癌症的进展速率是否已经降低(例如,停止)。任何方法,包括本领域中标准的方法,都可用于评估进展和存活率。

[0094] 可将使用本文提供的抗体或抗原结合片段的方法与已知的癌症治疗方法组合,例如,作为组合或另外的治疗步骤,或作为治疗制剂的其它组分。例如,增强宿主的免疫功能可用于对抗肿瘤。方法可包括但不限于APC增强,诸如通过将编码外源MHC抗原(包括肿瘤抗原、突变衍生的抗原或其它抗原)的DNA注射到肿瘤中,或用增加肿瘤的免疫抗原识别的概率的基因(例如,免疫刺激细胞因子、GM-CSF或共刺激分子B7.1、B7.2)转染活检肿瘤细胞。其它方法可包括,例如,将特定肿瘤抗原溶解于长效制剂或持续释放制剂中,用佐剂蛋白或抗原载体蛋白转染同种异体肿瘤细胞,用免疫刺激蛋白诸如α半乳糖神经酰胺转染同种异体肿瘤细胞,将特定肿瘤抗原掺入病毒衍生的疫苗方案,将特定肿瘤抗原掺入李斯特菌属(Listeria)衍生的疫苗方案,过继细胞免疫疗法(包括嵌合抗原受体转染的T细胞),或利用活化的肿瘤特异性T细胞(包括离体扩增的肿瘤浸润淋巴细胞)的治疗。过继细胞免疫疗法可包括分离肿瘤浸润性宿主T淋巴细胞并在体外扩增群体(例如,通过用IL-2刺激)。然后可

向宿主重新施用所述T细胞。可与本文提供的抗体或抗原结合片段组合使用的其它治疗包括例如放射疗法、化学疗法、激素疗法和血管生成抑制剂的使用。可能有用的其它组合伴侣包括检查点抑制剂(例如,抗-PD1/L1、抗-CTLA-4、抗-LAG3、抗-B7-H3、抗-B7-H4、抗-TIM3、抗-TIGIT、抗-CD47、抗-TMIGD2、抗-BTLA、抗-CEACAM或抗GARP)、其它共刺激抗体(例如,抗-OX40、抗-ICOS、抗-CD137、抗-GITR或抗-CD40)、癌症疫苗(例如,基于病毒的疫苗、肽疫苗、全细胞疫苗或基于RNA的疫苗)和靶向剂[例如, HERCEPTIN®(曲妥珠单抗)、TARCEVA®(厄洛替尼)、AVASTIN®(贝伐单抗)或IMBRUVICA®(依鲁替尼)]。

[0095] 因此,在一些实施方案中,可将抗-TNFRSF25抗体或抗原结合片段与一种或多种另外的单克隆抗体组合使用,所述单克隆抗体例如抑制PD-L1与PD-1的结合,抑制CTLA-4与CD80或CD86的结合,或通过TNFRSF4、TNFRSF9或TNFRSF18途径活化信号传导。这还可包括与结合肿瘤细胞上的特定靶标的另一种抗体、融合蛋白或小分子一起施用(例如,与结合靶标诸如CD20、Her2、EGFRvIII、DR4、DR5、VEGF、CD39和CD73的单克隆抗体的组合)。还可将抗-TNFRSF25抗体或抗原结合片段与癌症疫苗方法组合使用,以增强癌症患者中肿瘤抗原特异性T细胞的活化。另外,可在施用自体或同种异体T或NK细胞后使用抗-TNFRSF25抗体或抗原结合片段,所述T或NK细胞经工程改造以表达识别特定肿瘤抗原的嵌合T细胞受体。另外,可将抗-TNFRSF25抗体或抗原结合片段与特定化学疗法或放射疗法策略组合使用,作为扩增肿瘤特异性T细胞和增强任一种方法作为癌症患者的单一疗法的活性的方法。

[0096] 当将一种或多种常规疗法与使用本文提供的抗-TNFRSF25抗体或抗原结合片段治疗癌症的治疗组合时,例如,可以在施用所述抗-TNFRSF25抗体或抗原结合片段之前、之后或与施用所述抗-TNFRSF25抗体或抗原结合片的同时施用所述常规疗法。例如,可在施用TNFRSF25激动剂抗体之前向患者施用PD-1阻断性抗体。例如,可以在数周、数月或数年的时间内循环这种方案。或者,可在施用TNFRSF25激动剂抗体的同时或之后施用PD-1阻断性抗体。也可以在数周、数月或数年的时间内循环这种方案。在一些实施方案中,在一段时间内重复施用的组合疗法可包括两种或更多种上述施用策略。

[0097] 在一些实施方案中,本文提供的抗-TNFRSF25抗体或抗原结合片段可以在体外测定或制造过程期间用作用于刺激从癌症患者分离的肿瘤浸润性淋巴细胞的增殖或刺激表达嵌合抗原受体的T细胞增殖的方法,所述T细胞被体外扩增并意欲用于随后的输注以治疗癌症患者。

[0098] 本文还提供了含有如本文所述的抗体或抗原结合片段的制品,或含有所述抗体或抗原结合片段的药物组合物。抗体或药物组合物可在容器(例如,瓶子、小瓶或注射器)内。制品还可包括具有用于重构和/或使用抗体、抗原结合片段或组合物的说明的标签。在一些实施方案中,制品可包括一种或多种另外的物品(例如,一种或多种缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器和/或带有使用说明的包装说明书)。制品还可包括至少一种用于治疗癌症的另外的剂。例如,本文提供的制品可含有靶向CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、Tim-3、TNFRSF4、TNFRSF9、TNFRSF18、CD27、CD39、CD47、CD73或CD278的剂。在一些实施方案中,制品可含有A2A受体拮抗剂或TGF-β拮抗剂。在一些实施方案中,制品可包括B7家族共刺激分子(例如,CD28或CD278)或TNF受体超家族共刺激分子(例如,TNFRSF4、TNFRSF9或TNFRSF18)、化学治疗剂或抗肿瘤疫苗成合物。

[0099] 在以下实施例中将进一步描述本发明,所述实施例不限制权利要求中描述的本发

明的范围。

[0100] 实施例

[0101] 实施例1-表位作图

[0102] 制备了几种TNFRSF25表达构建体。这些构建体包含从位置25处的Gln (Q25) 延伸至位置201处的Phe (F201) 的整个细胞外结构域 (ECD) , 或从Q25延伸至位置181处的Thr (T181) 的可溶性剪接变体。构建体还包括各种标签, 包括6His、hFc-6His和mFc-His。将六种构建体 (表1) 转染到293F细胞中, 并如图2中所示测量它们的表达水平。

[0103] 表1

样品	蛋白质
Whis	W381-hPro1.ECD-W.His
[0104]	WmFcHis
	W381-hPro1.ECD-W.mFcHis
	WhFcHis
	W381-hPro1.ECD-W.hFcHis
	MHis
[0105]	W381-hPro1.ECD-M.His
	MmFcHis
[0105]	W381-hPro1.ECD-M.hFcHis
	NC

[0106] W=细胞外结构域 (QGGT.....) GWRQMF)

[0107] M=可溶性剪接变体 (QGGT.....) SCPT)

[0108] 在测试的构建体中, W381-hPro1.ECD-M.mFcHis 表现出最高的表达 (图3)。因此选择该形式的TNFRSF25作为用于基于丙氨酸扫描的表位作图的骨架。

[0109] 产生73个丙氨酸突变体, 并如上所述测量它们的表达。基于其表达水平将突变体分成五组 (表2A和2B), 并用于结合活性分析。

[0110] 表2A

表达水平	突变体数目
>1500	27
1000-1500	14
600-1000	17
300-600	14
<300	1
总计	73

[0112] 为了鉴定抗体识别的TNFRSF25的表位, 然后使用图4中描绘的步骤评估抗体与TNFRSF25突变蛋白的结合。具体地, 进行研究以评估嵌合抗体W330-cAb1.hIgG1 (35783) (与人 IgFc 嵌合的亲本仓鼠抗-TNFRSF25抗体) 与以大于1500ng/ml表达的WBP330-hPro1.ECD.hFcHis的丙氨酸突变体的结合。将对每种突变蛋白的结合亲和力与对未突变的WBP330-hPro1.ECD.hFcHis的结合亲和力进行比较 (图5)。将表现出信号变化超过25% (倍数变化<0.75; 表3和图6) 的突变蛋白用于结构建模 (图7和8)。

[0113] 另外,进行研究以确定抗体是否可以抑制TL1A与TNFRSF25的结合,反之亦然。如图9中所示,抗-TNFRSF25抗体(“仓鼠亲本”)与重组人TNFRSF25的结合被TL1A-Ig(左边一对条柱)阻断。相反,TL1A-Ig融合物与重组人TNFRSF25的结合被亲本抗-TNFRSF25抗体(中间一对条柱)阻断。另外,人源化抗-TNFRSF25抗体(源自“仓鼠亲本”抗体)与重组人TNFRSF25的结合被TL1A-Ig(右边一对条柱)阻断。

[0114] 表2B

AA#	ng/ml	AA#	ng/ml	AA#	ng/ml	AA#	ng/ml	AA#	ng/ml
99	2770.3	74	1483	63	937.7	33	566.9	154	189
41	2759.8	58	1407.6	51	878.1	121	561.8	NC	189.4
64	2617.6	78	1369.9	55	861.2	91	520		
60	2576.9	67	1360	73	845.5	140	482.6		
47	2515.3	34	1315.4	136	825.2	123	478.8		
84	2513.1	112	1255.8	133	824.7	32	477.5		
54	2431.3	61	1176.1	108	765.3	95	474.6		
97	2401.9	92	1166.2	104	735	117	473.7		
65	2289.6	70	1138.2	138	709.9	116	470.7		
89	2230.1	49	1133.5	35	693.9	130	463.1		
36	2215.5	76	1062.6	107	688.1	148	456.9		
59	2195.3	56	1033.5	50	686.3	106	373.7		
[0115]	69	2158.1	52	1028.1	120	671	141	370.4	
	77	2143.1	71	1024.9	93	668.9	135	326.8	
	44	2082.3			115	649.9			
	101	2080.7			125	629.3			
	102	2017			83	608.1			
	109	1811.1							
	46	1809.2							
	96	1796.5							
	79	1788.2							
	113	1739.1							
[0116]	105	1672.4							
	66	1661.7							
	68	1643.4							
	48	1622.4							
	134	1562.6							

[0117] NC=阴性对照(仅293F细胞)

[0118] 表3

鉴定的表位	倍数变化
G66	0.33
T69	0.37
C65	0.37
P64	0.40
可能的表位	倍数变化
P60	0.54
G44	0.54
A109	0.59
F46	0.62
H84	0.63
K41	0.63
A36	0.65
D96	0.66

[0120] 实施例2-亲和力成熟和表征方法

[0121] W3153-P8R32-H6抗体的亲和力优化:使用杂交诱变方法(Kunkel, Proc Natl Acad Sci USA 82 (2):488-492, 1985)将亲本克隆的三个CDR中的每个氨基酸单独突变为所有20种氨基酸。将含有编码20种氨基酸的NNS密码子的DNA引物用于在每个靶向CDR位置引入突变。将各个简并引物用于杂交诱变反应。简言之,将每个简并引物磷酸化,然后以10:1的比率与尿苷化的ssDNA一起使用。将混合物加热至85℃保持5分钟,然后在1小时内冷却至55℃。此后,添加T4连接酶和T4DNA聚合酶,并将混合物在37℃下孵育1.5小时。分别汇集用于VH和VL CDR的合成产物。通常,将200ng汇集的文库DNA电穿孔到BL21中以在BL21细菌菌苔上形成噬菌斑或用于产生scFv片段。

[0122] 亲本重链和轻链的序列及其CDR和FW区如下:

[0123] 重链可变区:EVQLVESGGGLSQQGNQLQLSCEASGFTFSNH

DLNWVRQAPGKGLEWVAYISSASGLISYADAVRGRFTISRDNAKNSLFLQMNNL

KSEDTAMYCARDPYSGLYALDFWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5)

FW1: EVQLVESGGGLSQQGNQLQLSCEAS (SEQ ID NO:11)

CDR1: GFTFSNHDLN (SEQ ID NO:12)

[0124] FW2: WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:13)

CDR2: YISSASGLISYADAVRG (SEQ ID NO:14)

FW3: RFTISRDNAKNSLFLQMNNLKSEDTAMYCAR (SEQ ID NO:15)

CDR3: DPPYSGLYALDF (SEQ ID NO:16)

FW4: WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:17)

[0125] 轻链可变区: QPVLTQSPSASASLSGSVKLTCTLSELSSYT
 IVWYQQRPDKAPKYVMYLKSDGSHSKGDGIPDRFSGSSGAHRYLSISNVQSED
 DATYFCGAGYTLAGQYGVFGSGTKVTVL (SEQ ID NO:6)

FW1: QPVLTQSPSASASLSGSVKLTC (SEQ ID NO:18)

CDR1: TLSSELSSYTIV (SEQ ID NO:19)

[0126] FW2: WYQQRPDKAPKYVMY (SEQ ID NO:20)

CDR2: LKSDGSHSKGD (SEQ ID NO:21)

FW3: GIPDRFSGSSGAHRYLSISNVQSEDDATYF (SEQ ID NO:22)

CDR3: CGAGYTLAGQYGVW (SEQ ID NO:23)

FW4: FGSGTKVTVL (SEQ ID NO:24)

[0127] scFv文库的初步筛选:初步筛选由单点ELISA (SPE) 测定组成,其使用在96孔(深孔)平板中生长的细菌的周质提取物(PE)进行。简言之,该捕获ELISA涉及在4°C下用pH 9.2的包被缓冲液(200mM Na₂CO₃/NaHCO₃)中的抗c-myc抗体包被96孔Maxisorp Immunoplate的各个孔过夜。第二天,将板用酪蛋白在室温下封闭1小时。然后将scFv PE添加到板中并在室温下孵育1小时。洗涤后,将生物素化的抗原蛋白添加到孔中,并将混合物在室温下孵育1小时。然后在室温下与链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶(HRP)缀合物一起孵育1小时。用四甲基-联苯胺(TMB)底物检测HRP活性,并用2M HCl淬灭反应。在450nm处读取平板。挑选表现出450nm处的光密度(OD)信号大于亲本克隆的OD信号的克隆,并通过ELISA(如上所述)一式两份重新测定,以确认阳性结果。对重复表现出大于亲本抗体的信号的克隆进行测序。然后通过定量scFv ELISA测定具有CDR变化的每个克隆的scFv蛋白浓度,其中使用具有已知浓度的scFv作为参照。通过将ELISA信号与参考scFv产生的信号进行比较来确定scFv蛋白浓度。对于标准化scFv浓度下的所有阳性变体,再次重复结合测定,以确定突变型scFv和亲本抗体的相对结合亲和力。将显示增强的结合的选定scFv命中物重新配制成IgG1,并如下所述在胱天蛋白酶-3测定中进行测试。

[0128] scFv文库的组合筛选:将经确定有益于对抗原的结合的VH和VL链中的点突变组合以确定是否获得了额外的结合协同作用。组合突变体表达为scFv并使用捕获ELISA筛选。对表现出450nm处的OD信号大于亲本克隆的OD信号的克隆进行测序,并通过如上所述的结合ELISA对克隆进一步分级。如上所述,选择前11个分级的克隆用于IgG4重新格式化和进一步表征。

[0129] 具有增强的亲和力的4C12突变体的重新格式化、瞬时表达和纯化:通过PCR扩增从初步和组合筛选鉴定的top-rScFv克隆的V基因,并将其克隆入WuXi Biologics的专有表达载体中,并从293F细胞表达。收获含有抗体的培养物上清液,并使用蛋白A色谱法纯化。

[0130] 半胱天冬酶释放测定:将表达TNFRSF25的P815细胞与各种浓度的抗体(1μg/ml至1ng/ml)在37°C下于96孔板中孵育5小时。使用Homogeneous Caspase Assay试剂盒(Roche: 005372001)测定胱天蛋白酶活性。使用Molecular Devices SPECTRAMAX® M5e读板仪读取荧光。

[0131] 竞争测定:将亲代p815细胞和表达人TNFRSF25的p815细胞(也称为p815-hDR3)在

IMDM+10%FBS中悬浮培养。在收获时对细胞进行计数,沉淀细胞并将其以300,000个细胞/100μL的浓度重悬浮于无血清培养基中。将100μL等份的细胞悬浮液置于Eppendorf管中。

[0132] 根据制造商的说明,使用Molecular Probes ALEXA FLUOR®标记试剂盒(RL#170512)产生缀合有ALEXA FLUOR® 647(AF647)-的4C12和hTL1A-Ig(AKTA纯化,第1轮)。4C12-AF647的标记程度为5.98摩尔染料对抗体,对于hTL1A-Ig-AF647,标记程度为4.55摩尔的染料对蛋白质(均被认为在可接受的范围内)。

[0133] 将hTL1A-Ig-AF647或4C12-AF647以0.5μg/mL的浓度添加至Eppendorf管中。然后立即以2μg/mL至0.0078μg/mL的浓度添加未标记的4C12、亲和力成熟4C12(hIgG1亚型)或同种型对照hIgG1。将混合物在37°C下于具有5%CO₂的潮湿培养箱中孵育1小时。将细胞在微量离心机中沉淀,并用FACS缓冲液洗涤1次。将沉淀重悬于300μL FACS缓冲液中,并通过Sony SH800流式细胞仪进行分析。对活的单个细胞进行门控,并确定每个样品的AF647的MFI。

[0134] 实施例3-亲和力成熟和表征结果

[0135] 初步筛选在7个CDR位置产生11个突变体,所述突变体显示为野生型的捕获ELISA信号至少2倍的捕获ELISA信号(表4)。轻链CDR1中位置42处的多个突变始终显示与TNFRSF25-Fc蛋白的结合增强。该位置处Ser对Trp的取代导致ELISA信号增强至超过10倍。两个其它突变(重链CDR3中位置27处的Ala至Thr的突变和轻链CDR1中位置43处的Tyr至Phe的突变)也显示出显著的结合增强。将这些突变体转化为IgG1并使用半胱天冬酶-3测定测试其活性(表5)。只有位置42处的突变体在胱天蛋白酶-3释放测定中显示出提高的效力。一个特定的IgG克隆W3072-z4C12-R1-42G2-uIgG1L(其在轻链CDR1中含有Ser至Trp的突变)显示出胱天蛋白酶-3激动活性的最高增加。

[0136] 表4

[0137] 初步筛选命中物

CDR	样品 ID	OD ₄₅₀	突变	WT* OD ₄₅₀	BMK [†] OD ₄₅₀	NC [‡] OD ₄₅₀	PC [‡] OD ₄₅₀
VHCDR2	10C3	0.70	A→D	0.28	0.13	0.12	0.35
VHCDR2	12F7	0.85	G→Q	0.26	0.10	0.10	0.41

[0138]	VHCDR3	27A3	1.61	S→T	0.29	0.12	0.08	0.53
	VLCDR1	42F2	0.83	S→G	0.27	0.13	0.09	0.34
		42G2	3.19	S→W	0.27	0.13	0.09	0.34
		42H4	1.21	S→N	0.27	0.13	0.09	0.34
		42H8	1.67	S→Y	0.27	0.13	0.09	0.34
		42F9	2.33	S→F	0.27	0.13	0.09	0.34
		43F11	1.60	Y→F	0.22	0.10	0.09	0.45
[0139]	VHCDR3	60E8	0.44	A→M	0.11	0.07	0.05	0.16
	VHCDR3	66B8	0.40	G→N	0.15	0.07	0.06	0.20

[0140] *W3072-z4C12-scFv

[0141] [†]W381-1H11-scFv

[0142] [‡]非特异性对照

[0143] [‡]W3072-z4C12亲本克隆

[0144] 表5

[0145] 脲天蛋白酶释放结果

Ab	EC50
W3072-z4C12-R1-60H10-uIgG1L	0.085
W3072-z4C12-R1-66B8-uIgG1L	0.071
W330-cAb1.hIgG1 (35783)	0.065
W330-hpro1L1 (TL1A)	~0.334
W330-hAb.35816	0.115
W3343-P6R31-1B2-uIgG1L	1.771
W3072-z4C12-R1-27A4-uIgG1L	0.142
W3072-z4C12-R1-42F2-uIgG1L	0.057
W3072-z4C12-R1-42G2-uIgG1L	0.018
W3072-z4C12-R1-42H8-uIgG1L	0.032
W3072-z4C12-R1-42F9-uIgG1L	0.043
W3072-z4C12-R1-43F11-uIgG1L	~0.1

[0147] 将在初步筛选中鉴定的所有单个亲和力增强突变用于设计和构建组合突变体文库。筛选该文库以鉴定对结合增强具有协同作用的突变的组合。将单突变体克隆42G2用作基准。鉴定了具有显著增强的与TNFRSF25-Fc蛋白的结合的多个组合突变体克隆(图10)。然而,仅一种组合突变体9G2包括轻链CDR1中的Ser至Trp突变。选择该克隆以及显示与TNFRSF25-Fc蛋白最强结合的三个另外的克隆(9A5、1F10和5A6)用于IgG转化和进一步测试(表6)。

[0148] 表6

孔位 置	VHCDR3 (SEQ ID)	VLCDR1 (SEQ ID)	VLCDR3 (SEQ ID)	Bmax	Kd
z4C12	DPPY <u>S</u> GLYA LDF (16)	TLSSEL <u>S</u> SYTIV (19)	CG <u>A</u> GYTL <u>A</u> QY <u>Y</u> GWV (23)	0.100 2	0.0000 8994
42G2(16)W...(25)(23)	0.446 8	0.0367 5
9A5A...T....(26)GF...(27)N.....(28)	1.811	0.0768 8
1F10A...T....(26)NF...(29)S.....(30)	1.731	0.1177
10B8A.....(31)NF...(29)(23)	1.486	0.1621
5A6T....(32)NF...(29)N.....(28)	1.887	0.1602
4B6A...T....(26)N....(33)N.....(28)	1.263	0.1488
3G4A...T....(26)GF...(27)R.....(34)	1.527	0.1464
2A5A...T....(26)NF...(29)M.....N.....(35)	1.282	0.0910 8
5E1A...T....(26)N....(33)M.....N.....(35)	1.322	0.1303
6G11(16)NF...(29)(23)	1.325	0.1172
9G2A...T....(26)W...(25)(23)	1.038	0.0506 8

[0150] IgG转化后,如下命名具有增强的与TNFRSF25-Fc蛋白的结合的克隆:

[0151] 1F10→W3072-z4C12-m1(在本文中也称为M1)

[0152] 5A6→W3072-z4C12-m2(在本文中也称为M2)

[0153] 9A5→W3072-z4C12-m3(在本文中也称为M3)

[0154] 9G2→W3072-z4C12-m4(在本文中也称为M4)

[0155] 42G2→W3072-z4C12-m5(在本文中也称为M5)

[0156] 脱天蛋白酶-3释放测定显示,与亲本人源化克隆(通过CDR移植产生的W330-hAb35816)和天然配体TL1A相比,仅M5和M4(均在轻链CDR1中含有Ser→Trp取代)显示出增强的激动活性,而其它三种突变体显示出较低的激动活性(图11A和11B,表6),但比亲本抗体高的与TNFRSF25的亲和力结合(图10)。有趣的是,M4较高亲和力克隆具有比M5克隆高的响应幅度(图11B)。最高亲和力克隆M3具有次于亲本人源化抗体和嵌合克隆的激动剂活性(图11A)。令人惊讶的是,与嵌合亲本抗体相比,人源化亲本具有显著优异的响应幅度(图11A)。

[0157] 将M5和M4重新格式化为IgG4,并且在脱天蛋白酶-3释放测定中测试IgG1和IgG4形式。这些研究揭示,与亲本人源化4C12IgG1(W330-hAb35816;表7)相比,IgG1格式化的抗体始终显示出增强的激动活性。

[0158] 表7

Ab	EC50
W330-cAb1.hIgG1 (35783)	0.088
W330-hproL1 (TL1A)	0.706
W330-hAb.35816	0.095
W3343-P6R31-1B2-uIgG1L	NA
M1-uIgG1L	1.839
M2-uIgG1L	0.656
M3-uIgG1L	0.17
M4-uIgG1L	0.07
M5-uIgG1L	0.08
M4-uIgG4L	0.1
M5-uIgG4L	0.1

[0160] 进行竞争研究以确定亲和力成熟抗体是否可与4C12或TL1A竞争与TNFRSF25的结合。在第一个实验中,所有样品都接受0.5μg/mLhTL1A-Ig-AF647,其被未标记的4C12-M3、4C12-M4、4C12-M5和4C12竞争掉。如图13A中所示,M4和M5抗体表现出比4C12亲本抗体强的针对TL1A的竞争。因此,尽管M4和M5显示出比M3(9A5;图10)弱的与TNFRSF25-Fc的结合但比亲本抗体(WT;图10)强的结合,它们似乎是TL1A与细胞表面表达的TNFRSF25结合的更强竞争者。未接受hTL1A-Ig-AF647的样品具有约1000的MFI,接受hIgG1同种型的样品具有约3320的MFI。

[0161] 进行进一步的竞争测定,其中所有样品接受0.5μg/mL4C12-AF647,其在高达8μg/mL(以完成结合曲线)的扩大范围的未标记的抗体浓度下被未标记的4C12-M3、4C12-M4和4C12-M5竞争掉。如图13B中所示,未标记的4C12亲本竞争掉标记的4C12,而同种型hIgG1没

有竞争作用。未接受4C12-AF647的样品具有约1400的MFI。4C12、M4和M5亲和力成熟抗体表现出相似的对标记的4C12的竞争,而M3是最弱的竞争抑制剂。

[0162] 因此,当对人源化4C12抗体进行亲和力成熟时,初步筛选(通过抗体CDR的饱和诱变)鉴定出多个具有增强的与TNFRSF25-Fc蛋白结合的突变体。具体地,如通过胱天蛋白酶-3释放测定所测定的,在轻链CDR1中含有Ser→Trp突变的克隆M5显示出增强的激动活性。组合文库筛选产生多个具有比M5显著强的与TNFRSF25-Fc蛋白结合的突变体,但令人惊讶的是,与亲本抗体相比,这些突变体中的大多数显示出较差的激动活性。对此例外的是M4,其与M5相同,在轻链CDR1中含有Ser→Trp突变。只有M5和M4在胱天蛋白酶-3释放测定中显示出增强的激动活性,以及与TNFRSF25-Fc融合蛋白的增强的结合。另外,与4C12亲本相比,这些克隆还表示出针对TL1A更强的对细胞表达的TNFRSF25的竞争结合(图13A),同时保持相当的针对4C12的对TNFRSF25的竞争结合(图13B)。

[0163] 其它实施方案

[0164] 应当理解,虽然已经结合其详细描述描述了本发明,但前面的描述旨在说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其它方面、有利方面和修改在以下权利要求的范围内。

[0001]	序列表			
[0002]	<110> Pelican Therapeutics, Inc.			
[0003]	<120> 抗-TNFRSF25抗体			
[0004]	<130> 37405-0012W01			
[0005]	<150> US 62/348,009			
[0006]	<151> 2016-06-09			
[0007]	<160> 35			
[0008]	<170> PatentIn 3.5版			
[0009]	<210> 1			
[0010]	<211> 417			
[0011]	<212> PRT			
[0012]	<213> 智人			
[0013]	<400> 1			
[0014]	Met Glu Gln Arg Pro Arg Gly Cys Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Leu			
[0015]	1	5	10	15
[0016]	Leu Val Leu Leu Gly Ala Arg Ala Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg			
[0017]	20	25	30	
[0018]	Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys			
[0019]	35	40	45	
[0020]	Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro			
[0021]	50	55	60	
[0022]	Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala			
[0023]	65	70	75	80
[0024]	Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp			
[0025]	85	90	95	
[0026]	Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp			
[0027]	100	105	110	
[0028]	Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser			
[0029]	115	120	125	
[0030]	Gln Cys Val Ser Ser Pro Phe Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys			
[0031]	130	135	140	
[0032]	Gly Ala Leu His Arg His Thr Arg Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr			
[0033]	145	150	155	160
[0034]	Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Glu His Gly Asp Gly Cys			
[0035]	165	170	175	
[0036]	Val Ser Cys Pro Thr Ser Thr Leu Gly Ser Cys Pro Glu Arg Cys Ala			
[0037]	180	185	190	
[0038]	Ala Val Cys Gly Trp Arg Gln Met Phe Trp Val Gln Val Leu Leu Ala			

[0039]	195	200	205
[0040]	Gly Leu Val Val Pro Leu Leu Leu Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Thr Tyr		
[0041]	210	215	220
[0042]	Arg His Cys Trp Pro His Lys Pro Leu Val Thr Ala Asp Glu Ala Gly		
[0043]	225	230	235
[0044]	Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro Pro Ala Thr His Leu Ser Pro Leu Asp		
[0045]	245	250	255
[0046]	Ser Ala His Thr Leu Leu Ala Pro Pro Asp Ser Ser Glu Lys Ile Cys		
[0047]	260	265	270
[0048]	Thr Val Gln Leu Val Gly Asn Ser Trp Thr Pro Gly Tyr Pro Glu Thr		
[0049]	275	280	285
[0050]	Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln Val Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro		
[0051]	290	295	300
[0052]	Ser Arg Ala Leu Gly Pro Ala Ala Ala Pro Thr Leu Ser Pro Glu Ser		
[0053]	305	310	315
[0054]	Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met Met Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr		
[0055]	325	330	335
[0056]	Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg		
[0057]	340	345	350
[0058]	Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile		
[0059]	355	360	365
[0060]	Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln		
[0061]	370	375	380
[0062]	Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met		
[0063]	385	390	395
[0064]	Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu Asp Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly		
[0065]	405	410	415
[0066]	Pro		
[0067]	<210> 2		
[0068]	<211> 393		
[0069]	<212> PRT		
[0070]	<213> 智人		
[0071]	<400> 2		
[0072]	Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His		
[0073]	1	5	10
[0074]	Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr		
[0075]	20	25	30
[0076]	Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val		
[0077]	35	40	45

[0078]	Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu			
[0079]	50	55	60	
[0080]	Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu			
[0081]	65	70	75	80
[0082]	Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly			
[0083]	85	90	95	
[0084]	Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser Gln Cys Val Ser Ser Pro Phe			
[0085]	100	105	110	
[0086]	Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys Gly Ala Leu His Arg His Thr Arg			
[0087]	115	120	125	
[0088]	Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr Asp Cys Gly Thr Cys Leu Leu Gly			
[0089]	130	135	140	
[0090]	Phe Tyr Glu His Gly Asp Gly Cys Val Ser Cys Pro Thr Ser Thr Leu			
[0091]	145	150	155	160
[0092]	Gly Ser Cys Pro Glu Arg Cys Ala Ala Val Cys Gly Trp Arg Gln Met			
[0093]	165	170	175	
[0094]	Phe Trp Val Gln Val Leu Leu Ala Gly Leu Val Val Pro Leu Leu Leu			
[0095]	180	185	190	
[0096]	Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Thr Tyr Arg His Cys Trp Pro His Lys Pro			
[0097]	195	200	205	
[0098]	Leu Val Thr Ala Asp Glu Ala Gly Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro Pro			
[0099]	210	215	220	
[0100]	Ala Thr His Leu Ser Pro Leu Asp Ser Ala His Thr Leu Leu Ala Pro			
[0101]	225	230	235	240
[0102]	Pro Asp Ser Ser Glu Lys Ile Cys Thr Val Gln Leu Val Gly Asn Ser			
[0103]	245	250	255	
[0104]	Trp Thr Pro Gly Tyr Pro Glu Thr Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln Val			
[0105]	260	265	270	
[0106]	Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro Ser Arg Ala Leu Gly Pro Ala Ala			
[0107]	275	280	285	
[0108]	Ala Pro Thr Leu Ser Pro Glu Ser Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met Met			
[0109]	290	295	300	
[0110]	Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala			
[0111]	305	310	315	320
[0112]	Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu			
[0113]	325	330	335	
[0114]	Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr			
[0115]	340	345	350	
[0116]	Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala			

[0117]	355	360	365
[0118]	Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu Asp		
[0119]	370	375	380
[0120]	Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly Pro		
[0121]	385	390	
[0122]	<210> 3		
[0123]	<211> 433		
[0124]	<212> PRT		
[0125]	<213> 智人		
[0126]	<400> 3		
[0127]	Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu		
[0128]	1 5 10 15		
[0129]	Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn		
[0130]	20 25 30		
[0131]	Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn		
[0132]	35 40 45		
[0133]	Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser		
[0134]	50 55 60		
[0135]	Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys		
[0136]	65 70 75 80		
[0137]	Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr		
[0138]	85 90 95		
[0139]	Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His		
[0140]	100 105 110		
[0141]	Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu		
[0142]	115 120 125		
[0143]	Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys		
[0144]	130 135 140		
[0145]	Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys		
[0146]	145 150 155 160		
[0147]	Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln		
[0148]	165 170 175		
[0149]	Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr Val Leu Leu		
[0150]	180 185 190		
[0151]	Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu Phe Ile		
[0152]	195 200 205		
[0153]	Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys Ser Lys Leu Tyr Ser Ile		
[0154]	210 215 220		
[0155]	Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu Gly Glu Leu Glu Gly Thr		

[0156]	225	230	235	240												
[0157]	Thr	Thr	Lys	Pro	Leu	Ala	Pro	Asn	Pro	Ser	Phe	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly
[0158]				245					250						255	
[0159]	Phe	Thr	Pro	Thr	Leu	Gly	Phe	Ser	Pro	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Phe	Thr
[0160]					260				265					270		
[0161]	Ser	Ser	Ser	Thr	Tyr	Thr	Pro	Gly	Asp	Cys	Pro	Asn	Phe	Ala	Ala	Pro
[0162]					275			280				285				
[0163]	Arg	Arg	Glu	Val	Ala	Pro	Pro	Tyr	Gln	Gly	Ala	Asp	Pro	Ile	Leu	Ala
[0164]				290			295				300					
[0165]	Thr	Ala	Leu	Ala	Ser	Asp	Pro	Ile	Pro	Asn	Pro	Leu	Gln	Lys	Trp	Glu
[0166]	305				310				315				320			
[0167]	Asp	Ser	Ala	His	Lys	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp	Thr	Asp	Asp	Pro	Ala	Thr
[0168]					325				330			335				
[0169]	Leu	Tyr	Ala	Val	Val	Glu	Asn	Val	Pro	Pro	Leu	Arg	Trp	Lys	Glu	Phe
[0170]					340			345			350					
[0171]	Val	Arg	Arg	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	His	Glu	Ile	Asp	Arg	Leu	Glu	Leu
[0172]					355			360			365					
[0173]	Gln	Asn	Gly	Arg	Cys	Leu	Arg	Glu	Ala	Gln	Tyr	Ser	Met	Leu	Ala	Thr
[0174]					370			375			380					
[0175]	Trp	Arg	Arg	Arg	Thr	Pro	Arg	Arg	Glu	Ala	Thr	Leu	Glu	Leu	Leu	Gly
[0176]	385				390				395			400				
[0177]	Arg	Val	Leu	Arg	Asp	Met	Asp	Leu	Leu	Gly	Cys	Leu	Glu	Asp	Ile	Glu
[0178]					405			410			415					
[0179]	Glu	Ala	Leu	Cys	Gly	Pro	Ala	Ala	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Ser	Leu	Leu
[0180]					420			425			430					
[0181]	Arg															
[0182]	<210>	4														
[0183]	<211>	319														
[0184]	<212>	PRT														
[0185]	<213>	智人														
[0186]	<400>	4														
[0187]	Arg	Leu	Ser	Ser	Lys	Ser	Val	Asn	Ala	Gln	Val	Thr	Asp	Ile	Asn	Ser
[0188]	1				5				10			15				
[0189]	Lys	Gly	Leu	Glu	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Thr	Thr	Val	Glu	Thr	Gln	Asn
[0190]					20				25			30				
[0191]	Leu	Glu	Gly	Leu	His	His	Asp	Gly	Gln	Phe	Cys	His	Lys	Pro	Cys	Pro
[0192]					35			40			45					
[0193]	Pro	Gly	Glu	Arg	Lys	Ala	Arg	Asp	Cys	Thr	Val	Asn	Gly	Asp	Glu	Pro
[0194]					50			55			60					

[0195]	Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His			
[0196]	65	70	75	80
[0197]	Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly			
[0198]	85	90	95	
[0199]	Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg			
[0200]	100	105	110	
[0201]	Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp			
[0202]	115	120	125	
[0203]	Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr			
[0204]	130	135	140	
[0205]	Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn Leu Gly Trp			
[0206]	145	150	155	160
[0207]	Leu Cys Leu Leu Leu Pro Ile Pro Leu Ile Val Trp Val Lys Arg			
[0208]	165	170	175	
[0209]	Lys Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys His Arg Lys Glu Asn Gln Gly			
[0210]	180	185	190	
[0211]	Ser His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro Glu Thr Val Ala Ile Asn Leu			
[0212]	195	200	205	
[0213]	Ser Asp Val Asp Leu Ser Lys Tyr Ile Thr Thr Ile Ala Gly Val Met			
[0214]	210	215	220	
[0215]	Thr Leu Ser Gln Val Lys Gly Phe Val Arg Lys Asn Gly Val Asn Glu			
[0216]	225	230	235	240
[0217]	Ala Lys Ile Asp Glu Ile Lys Asn Asp Asn Val Gln Asp Thr Ala Glu			
[0218]	245	250	255	
[0219]	Gln Lys Val Gln Leu Leu Arg Asn Trp His Gln Leu His Gly Lys Lys			
[0220]	260	265	270	
[0221]	Glu Ala Tyr Asp Thr Leu Ile Lys Asp Leu Lys Lys Ala Asn Leu Cys			
[0222]	275	280	285	
[0223]	Thr Leu Ala Glu Lys Ile Gln Thr Ile Ile Leu Lys Asp Ile Thr Ser			
[0224]	290	295	300	
[0225]	Asp Ser Glu Asn Ser Asn Phe Arg Asn Glu Ile Gln Ser Leu Val			
[0226]	305	310	315	
[0227]	<210> 5			
[0228]	<211> 121			
[0229]	<212> PRT			
[0230]	<213> 亚美尼亚仓鼠			
[0231]	<400> 5			
[0232]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Ser Gln Pro Gly Asn			
[0233]	1	5	10	15

[0234]	Ser Leu Gln Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn His			
[0235]	20	25	30	
[0236]	Asp Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0237]	35	40	45	
[0238]	Ala Tyr Ile Ser Ser Ala Ser Gly Leu Ile Ser Tyr Ala Asp Ala Val			
[0239]	50	55	60	
[0240]	Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe			
[0241]	65	70	75	80
[0242]	Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys			
[0243]	85	90	95	
[0244]	Ala Arg Asp Pro Pro Tyr Ser Gly Leu Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly			
[0245]	100	105	110	
[0246]	Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser			
[0247]	115	120		
[0248]	<210>	6		
[0249]	<211>	115		
[0250]	<212>	PRT		
[0251]	<213>	亚美尼亚仓鼠		
[0252]	<400>	6		
[0253]	Gln Pro Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Ser Gly			
[0254]	1	5	10	15
[0255]	Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Glu Leu Ser Ser Tyr Thr			
[0256]	20	25	30	
[0257]	Ile Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Lys Ala Pro Lys Tyr Val Met			
[0258]	35	40	45	
[0259]	Tyr Leu Lys Ser Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp			
[0260]	50	55	60	
[0261]	Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala His Arg Tyr Leu Ser Ile Ser			
[0262]	65	70	75	80
[0263]	Asn Val Gln Ser Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Ala Gly Tyr			
[0264]	85	90	95	
[0265]	Thr Leu Ala Gly Gln Tyr Gly Trp Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val			
[0266]	100	105	110	
[0267]	Thr Val Leu			
[0268]	115			
[0269]	<210>	7		
[0270]	<211>	426		
[0271]	<212>	PRT		
[0272]	<213>	智人		

[0273]	<400> 7		
[0274]	Met Glu Gln Arg Pro Arg Gly Cys Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Leu		
[0275]	1	5	10 15
[0276]	Leu Val Leu Leu Gly Ala Arg Ala Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg		
[0277]	20	25	30
[0278]	Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys		
[0279]	35	40	45
[0280]	Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro		
[0281]	50	55	60
[0282]	Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala		
[0283]	65	70	75 80
[0284]	Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp		
[0285]	85	90	95
[0286]	Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp		
[0287]	100	105	110
[0288]	Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser		
[0289]	115	120	125
[0290]	Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys		
[0291]	130	135	140
[0292]	Gly Ala Leu His Arg His Thr Arg Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr		
[0293]	145	150	155 160
[0294]	Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Glu His Gly Asp Gly Cys		
[0295]	165	170	175
[0296]	Val Ser Cys Pro Thr Pro Pro Pro Ser Leu Ala Gly Ala Pro Trp Gly		
[0297]	180	185	190
[0298]	Ala Val Gln Ser Ala Val Pro Leu Ser Val Ala Gly Gly Arg Val Gly		
[0299]	195	200	205
[0300]	Val Phe Trp Val Gln Val Leu Leu Ala Gly Leu Val Val Pro Leu Leu		
[0301]	210	215	220
[0302]	Leu Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Thr Tyr Arg His Cys Trp Pro His Lys		
[0303]	225	230	235 240
[0304]	Pro Leu Val Thr Ala Asp Glu Ala Gly Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro		
[0305]	245	250	255
[0306]	Pro Ala Thr His Leu Ser Pro Leu Asp Ser Ala His Thr Leu Leu Ala		
[0307]	260	265	270
[0308]	Pro Pro Asp Ser Ser Glu Lys Ile Cys Thr Val Gln Leu Val Gly Asn		
[0309]	275	280	285
[0310]	Ser Trp Thr Pro Gly Tyr Pro Glu Thr Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln		
[0311]	290	295	300

[0312]	Val Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro Ser Arg Ala Leu Gly Pro Ala			
[0313]	305	310	315	320
[0314]	Ala Ala Pro Thr Leu Ser Pro Glu Ser Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met			
[0315]	325	330	335	
[0316]	Met Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr Asp Val Met Asp Ala Val Pro			
[0317]	340	345	350	
[0318]	Ala Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala			
[0319]	355	360	365	
[0320]	Glu Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln			
[0321]	370	375	380	
[0322]	Tyr Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly			
[0323]	385	390	395	400
[0324]	Ala Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu			
[0325]	405	410	415	
[0326]	Asp Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly Pro			
[0327]	420	425		
[0328]	<210> 8			
[0329]	<211> 387			
[0330]	<212> PRT			
[0331]	<213> 小家鼠			
[0332]	<400> 8			
[0333]	Met Glu Glu Leu Pro Arg Arg Glu Arg Ser Pro Pro Gly Ala Ala Thr			
[0334]	1	5	10	15
[0335]	Pro Gly Ser Thr Ala Arg Val Leu Gln Pro Leu Phe Leu Pro Leu Leu			
[0336]	20	25	30	
[0337]	Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Gly Gln Gly Gln Gly Met Ser			
[0338]	35	40	45	
[0339]	Gly Arg Cys Asp Cys Ala Ser Glu Ser Gln Lys Arg Tyr Gly Pro Phe			
[0340]	50	55	60	
[0341]	Cys Cys Arg Gly Cys Pro Lys Gly His Tyr Met Lys Ala Pro Cys Ala			
[0342]	65	70	75	80
[0343]	Glu Pro Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Pro Cys Pro Ser Asp Thr Phe			
[0344]	85	90	95	
[0345]	Leu Thr Arg Asp Asn His Phe Lys Thr Asp Cys Thr Arg Cys Gln Val			
[0346]	100	105	110	
[0347]	Cys Asp Glu Glu Ala Leu Gln Val Thr Leu Glu Asn Cys Ser Ala Lys			
[0348]	115	120	125	
[0349]	Ser Asp Thr His Cys Gly Cys Gln Ser Gly Trp Cys Val Asp Cys Ser			
[0350]	130	135	140	

[0351]	Thr Glu Pro Cys Gly Lys Ser Ser Pro Phe Ser Cys Val Pro Cys Gly			
[0352]	145	150	155	160
[0353]	Ala Thr Thr Pro Val His Glu Ala Pro Thr Pro Leu Phe Trp Val Gln			
[0354]	165	170	175	
[0355]	Val Leu Leu Gly Val Ala Phe Leu Phe Gly Ala Ile Leu Ile Cys Ala			
[0356]	180	185	190	
[0357]	Tyr Cys Arg Trp Gln Pro Cys Lys Ala Val Val Thr Ala Asp Thr Ala			
[0358]	195	200	205	
[0359]	Gly Thr Glu Thr Leu Ala Ser Pro Gln Thr Ala His Leu Ser Ala Ser			
[0360]	210	215	220	
[0361]	Asp Ser Ala His Thr Leu Leu Ala Pro Pro Ser Ser Thr Gly Lys Ile			
[0362]	225	230	235	240
[0363]	Cys Thr Thr Val Gln Leu Val Gly Asn Asn Trp Thr Pro Gly Leu Ser			
[0364]	245	250	255	
[0365]	Gln Thr Gln Glu Val Val Cys Gly Gln Ala Ser Gln Pro Trp Asp Gln			
[0366]	260	265	270	
[0367]	Leu Pro Asn Arg Thr Leu Gly Thr Pro Leu Ala Ser Pro Leu Ser Pro			
[0368]	275	280	285	
[0369]	Ala Pro Pro Ala Gly Ser Pro Ala Ala Val Leu Gln Pro Gly Pro Gln			
[0370]	290	295	300	
[0371]	Leu Tyr Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala Arg Arg Trp Lys Glu Phe			
[0372]	305	310	315	320
[0373]	Val Arg Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu Ile Glu Ala Val Glu Val			
[0374]	325	330	335	
[0375]	Glu Ile Cys Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr Glu Met Leu Lys Arg Trp			
[0376]	340	345	350	
[0377]	Arg Gln Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala Ile Tyr Ala Ala Leu Glu			
[0378]	355	360	365	
[0379]	Arg Met Gly Leu Glu Gly Cys Ala Glu Asp Leu Arg Ser Arg Leu Gln			
[0380]	370	375	380	
[0381]	Arg Gly Pro			
[0382]	385			
[0383]	<210> 9			
[0384]	<211> 420			
[0385]	<212> PRT			
[0386]	<213> 恒河猴			
[0387]	<400> 9			
[0388]	Met Glu Gln Arg Ser Arg Gly Ser Ala Ala Val Ala Val Ser Thr			
[0389]	1	5	10	15

[0390]	Ala Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Ala Arg Ala Gln Gly Gly Thr Gln			
[0391]	20	25	30	
[0392]	Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His Lys Lys Asn Gly Val			
[0393]	35	40	45	
[0394]	Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr Leu Lys Ala Pro Cys			
[0395]	50	55	60	
[0396]	Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Leu Cys Pro Gln Asp Thr			
[0397]	65	70	75	80
[0398]	Phe Leu Ala Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu Cys Ala Arg Cys Gln			
[0399]	85	90	95	
[0400]	Ala Cys Asp Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Cys Ser Ala			
[0401]	100	105	110	
[0402]	Val Ala Asp Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly Trp Phe Val Glu Cys			
[0403]	115	120	125	
[0404]	Gln Val Ser Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe Tyr Cys Gln Pro Cys			
[0405]	130	135	140	
[0406]	Leu Asp Cys Arg Ala Leu His Arg His Thr Arg Leu Leu Cys Ser Arg			
[0407]	145	150	155	160
[0408]	Arg Asp Thr Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Glu His Asp			
[0409]	165	170	175	
[0410]	Asp Gly Cys Val Ser Cys Pro Thr Ser Thr Leu Gly Ser Cys Pro Glu			
[0411]	180	185	190	
[0412]	Arg Cys Ala Ala Val Cys Gly Trp Arg Gln Met Phe Trp Val Gln Val			
[0413]	195	200	205	
[0414]	Leu Leu Ala Gly Leu Val Val Pro Leu Leu Leu Gly Ala Thr Leu Thr			
[0415]	210	215	220	
[0416]	Tyr Thr Tyr Arg His Cys Trp Pro His Lys Pro Met Val Thr Ala Asp			
[0417]	225	230	235	240
[0418]	Glu Ala Gly Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro Pro Ala Thr His Leu Ser			
[0419]	245	250	255	
[0420]	Pro Ser Asp Lys Ala His Thr Leu Leu Val Pro Pro Asp Ser Ser Glu			
[0421]	260	265	270	
[0422]	Lys Ile Cys Thr Val Gln Leu Val Asp Asn Ser Trp Thr Pro Gly Tyr			
[0423]	275	280	285	
[0424]	Pro His Thr Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln Met Thr Trp Ser Trp Asp			
[0425]	290	295	300	
[0426]	Gln Leu Pro Asn Arg Ala Leu Gly Pro Val Pro Ala Ser Thr Leu Leu			
[0427]	305	310	315	320
[0428]	Pro Glu Ser Pro Val Gly Ser Pro Thr Met Met Leu Gln Pro Gly Pro			

[0429]	325	330	335
[0430]	Gln Leu Tyr Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala Arg Arg Trp Lys Glu		
[0431]	340	345	350
[0432]	Phe Val Arg Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu Ile Glu Ala Val Glu		
[0433]	355	360	365
[0434]	Val Glu Ile Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr Glu Met Leu Lys Arg		
[0435]	370	375	380
[0436]	Trp Arg Gln Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala Val Tyr Ala Ala Leu		
[0437]	385	390	395
[0438]	Glu Arg Met Gly Leu Asp Gly Cys Ala Glu Asp Leu Arg Ser Arg Leu		
[0439]	405	410	415
[0440]	Gln Arg Gly Pro		
[0441]	420		
[0442]	<210> 10		
[0443]	<211> 417		
[0444]	<212> PRT		
[0445]	<213> 食蟹猕猴		
[0446]	<400> 10		
[0447]	Met Glu Gln Arg Ser Arg Gly Ser Ala Ala Val Ala Ala Leu Leu		
[0448]	1 5 10 15		
[0449]	Leu Val Leu Leu Gly Ala Arg Ala Gln Gly Gly Thr Gln Ser Pro Arg		
[0450]	20 25 30		
[0451]	Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His Lys Lys Asn Gly Val Phe Cys Cys		
[0452]	35 40 45		
[0453]	Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro		
[0454]	50 55 60		
[0455]	Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Leu Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala		
[0456]	65 70 75 80		
[0457]	Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp		
[0458]	85 90 95		
[0459]	Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp		
[0460]	100 105 110		
[0461]	Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser		
[0462]	115 120 125		
[0463]	Gln Cys Gly Ser Ser Ser Pro Phe Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys		
[0464]	130 135 140		
[0465]	Arg Ala Leu His Arg His Thr Arg Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr		
[0466]	145 150 155 160		
[0467]	Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Glu His Asp Asp Gly Cys		

[0468]	165	170	175
[0469]	Val Ser Cys Pro Thr Ser Thr Leu Gly Ser Cys Pro Glu Arg Cys Ala		
[0470]	180	185	190
[0471]	Ala Val Cys Gly Trp Arg Gln Met Phe Trp Val Gln Val Leu Leu Ala		
[0472]	195	200	205
[0473]	Gly Leu Val Val Pro Leu Leu Leu Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Thr Tyr		
[0474]	210	215	220
[0475]	Arg His Cys Trp Pro His Lys Pro Met Val Thr Ala Asp Glu Ala Gly		
[0476]	225	230	235
[0477]	Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro Pro Ala Thr His Leu Ser Pro Ser Asp		
[0478]	245	250	255
[0479]	Asn Ala His Thr Leu Leu Val Pro Pro Asp Ser Ser Glu Lys Ile Cys		
[0480]	260	265	270
[0481]	Thr Val Gln Leu Val Asp Asn Ser Trp Thr Pro Gly Tyr Pro His Thr		
[0482]	275	280	285
[0483]	Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln Met Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro		
[0484]	290	295	300
[0485]	Asn Arg Ala Leu Gly Pro Val Pro Ala Ser Thr Leu Leu Pro Glu Ser		
[0486]	305	310	315
[0487]	Pro Val Gly Ser Pro Thr Met Met Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr		
[0488]	325	330	335
[0489]	Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg		
[0490]	340	345	350
[0491]	Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile		
[0492]	355	360	365
[0493]	Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln		
[0494]	370	375	380
[0495]	Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met		
[0496]	385	390	395
[0497]	Gly Leu Asp Gly Cys Ala Glu Asp Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly		
[0498]	405	410	415
[0499]	Pro		
[0500]	<210> 11		
[0501]	<211> 25		
[0502]	<212> PRT		
[0503]	<213> 亚美尼亚仓鼠		
[0504]	<400> 11		
[0505]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Ser Gln Pro Gly Asn		
[0506]	1	5	10
			15

[0507]	Ser Leu Gln Leu Ser Cys Glu Ala Ser					
[0508]	20		25			
[0509]	<210> 12					
[0510]	<211> 10					
[0511]	<212> PRT					
[0512]	<213> 亚美尼亚仓鼠					
[0513]	<400> 12					
[0514]	Gly Phe Thr Phe Ser Asn His Asp Leu Asn					
[0515]	1	5	10			
[0516]	<210> 13					
[0517]	<211> 14					
[0518]	<212> PRT					
[0519]	<213> 亚美尼亚仓鼠					
[0520]	<400> 13					
[0521]	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala					
[0522]	1	5	10			
[0523]	<210> 14					
[0524]	<211> 17					
[0525]	<212> PRT					
[0526]	<213> 亚美尼亚仓鼠					
[0527]	<400> 14					
[0528]	Tyr Ile Ser Ser Ala Ser Gly Leu Ile Ser Tyr Ala Asp Ala Val Arg					
[0529]	1	5	10			
[0530]	15					
[0531]	Gly					
[0532]	<210> 15					
[0533]	<211> 32					
[0534]	<212> PRT					
[0535]	<213> 亚美尼亚仓鼠					
[0536]	<400> 15					
[0537]	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe Leu Gln					
[0538]	1	5	10			
[0539]	15		25			
[0540]	<210> 16					
[0541]	<211> 12					
[0542]	<212> PRT					
[0543]	<213> 亚美尼亚仓鼠					
[0544]	<400> 16					
[0545]	Asp Pro Pro Tyr Ser Gly Leu Tyr Ala Leu Asp Phe					

[0546]	1	5	10
[0547]	<210>	17	
[0548]	<211>	11	
[0549]	<212>	PRT	
[0550]	<213>	亚美尼亚仓鼠	
[0551]	<400>	17	
[0552]	Trp	Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser	
[0553]	1	5	10
[0554]	<210>	18	
[0555]	<211>	22	
[0556]	<212>	PRT	
[0557]	<213>	亚美尼亚仓鼠	
[0558]	<400>	18	
[0559]	Gln Pro Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Ser Gly		
[0560]	1	5	10
[0561]	Ser Val Lys Leu Thr Cys		15
[0562]		20	
[0563]	<210>	19	
[0564]	<211>	12	
[0565]	<212>	PRT	
[0566]	<213>	亚美尼亚仓鼠	
[0567]	<400>	19	
[0568]	Thr Leu Ser Ser Glu Leu Ser Ser Tyr Thr Ile Val		
[0569]	1	5	10
[0570]	<210>	20	
[0571]	<211>	15	
[0572]	<212>	PRT	
[0573]	<213>	亚美尼亚仓鼠	
[0574]	<400>	20	
[0575]	Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Lys Ala Pro Lys Tyr Val Met Tyr		
[0576]	1	5	10
[0577]		10	15
[0578]	<210>	21	
[0579]	<211>	11	
[0580]	<212>	PRT	
[0581]	<213>	亚美尼亚仓鼠	
[0582]	<400>	21	
[0583]	Leu Lys Ser Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp		
[0584]	1	5	10
[0585]	<210>	22	

- [0585] <211> 31
[0586] <212> PRT
[0587] <213> 亚美尼亚仓鼠
[0588] <400> 22
[0589] Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala His Arg Tyr
[0590] 1 5 10 15
[0591] Leu Ser Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Phe
[0592] 20 25 30
[0593] <210> 23
[0594] <211> 14
[0595] <212> PRT
[0596] <213> 亚美尼亚仓鼠
[0597] <400> 23
[0598] Cys Gly Ala Gly Tyr Thr Leu Ala Gly Gln Tyr Gly Trp Val
[0599] 1 5 10
[0600] <210> 24
[0601] <211> 10
[0602] <212> PRT
[0603] <213> 亚美尼亚仓鼠
[0604] <400> 24
[0605] Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
[0606] 1 5 10
[0607] <210> 25
[0608] <211> 12
[0609] <212> PRT
[0610] <213> 人工序列
[0611] <220>
[0612] <223> 合成
[0613] <400> 25
[0614] Thr Leu Ser Ser Glu Leu Ser Trp Tyr Thr Ile Val
[0615] 1 5 10
[0616] <210> 26
[0617] <211> 12
[0618] <212> PRT
[0619] <213> 人工序列
[0620] <220>
[0621] <223> 合成
[0622] <400> 26
[0623] Asp Pro Ala Tyr Thr Gly Leu Tyr Ala Leu Asp Phe

[0624]	1	5	10											
[0625]	<210>	27												
[0626]	<211>	12												
[0627]	<212>	PRT												
[0628]	<213>	人工序列												
[0629]	<220>													
[0630]	<223>	合成												
[0631]	<400>	27												
[0632]	Thr	Leu	Ser	Ser	Glu	Leu	Ser	Gly	Phe	Thr	Ile	Val		
[0633]	1		5									10		
[0634]	<210>	28												
[0635]	<211>	14												
[0636]	<212>	PRT												
[0637]	<213>	人工序列												
[0638]	<220>													
[0639]	<223>	合成												
[0640]	<400>	28												
[0641]	Cys	Gly	Ala	Gly	Tyr	Thr	Leu	Ala	Asn	Gln	Tyr	Gly	Trp	Val
[0642]	1		5										10	
[0643]	<210>	29												
[0644]	<211>	12												
[0645]	<212>	PRT												
[0646]	<213>	人工序列												
[0647]	<220>													
[0648]	<223>	合成												
[0649]	<400>	29												
[0650]	Thr	Leu	Ser	Ser	Glu	Leu	Ser	Asn	Phe	Thr	Ile	Val		
[0651]	1		5										10	
[0652]	<210>	30												
[0653]	<211>	14												
[0654]	<212>	PRT												
[0655]	<213>	人工序列												
[0656]	<220>													
[0657]	<223>	合成												
[0658]	<400>	30												
[0659]	Cys	Gly	Ala	Gly	Tyr	Thr	Leu	Ala	Ser	Gln	Tyr	Gly	Trp	Val
[0660]	1		5										10	
[0661]	<210>	31												
[0662]	<211>	12												

- [0663] <212> PRT
[0664] <213> 人工序列
[0665] <220>
[0666] <223> 合成
[0667] <400> 31
[0668] Asp Pro Ala Tyr Ser Gly Leu Tyr Ala Leu Asp Phe
[0669] 1 5 10
[0670] <210> 32
[0671] <211> 12
[0672] <212> PRT
[0673] <213> 人工序列
[0674] <220>
[0675] <223> 合成
[0676] <400> 32
[0677] Asp Pro Pro Tyr Thr Gly Leu Tyr Ala Leu Asp Phe
[0678] 1 5 10
[0679] <210> 33
[0680] <211> 12
[0681] <212> PRT
[0682] <213> 人工序列
[0683] <220>
[0684] <223> 合成
[0685] <400> 33
[0686] Thr Leu Ser Ser Glu Leu Ser Asn Tyr Thr Ile Val
[0687] 1 5 10
[0688] <210> 34
[0689] <211> 14
[0690] <212> PRT
[0691] <213> 人工序列
[0692] <220>
[0693] <223> 合成
[0694] <400> 34
[0695] Cys Gly Ala Gly Tyr Thr Leu Ala Arg Gln Tyr Gly Trp Val
[0696] 1 5 10
[0697] <210> 35
[0698] <211> 14
[0699] <212> PRT
[0700] <213> 人工序列
[0701] <220>

[0702] <223> 合成

[0703] <400> 35

[0704] Cys Gly Met Gly Tyr Thr Leu Ala Asn Gln Tyr Gly Trp Val

[0705] 1 5 10

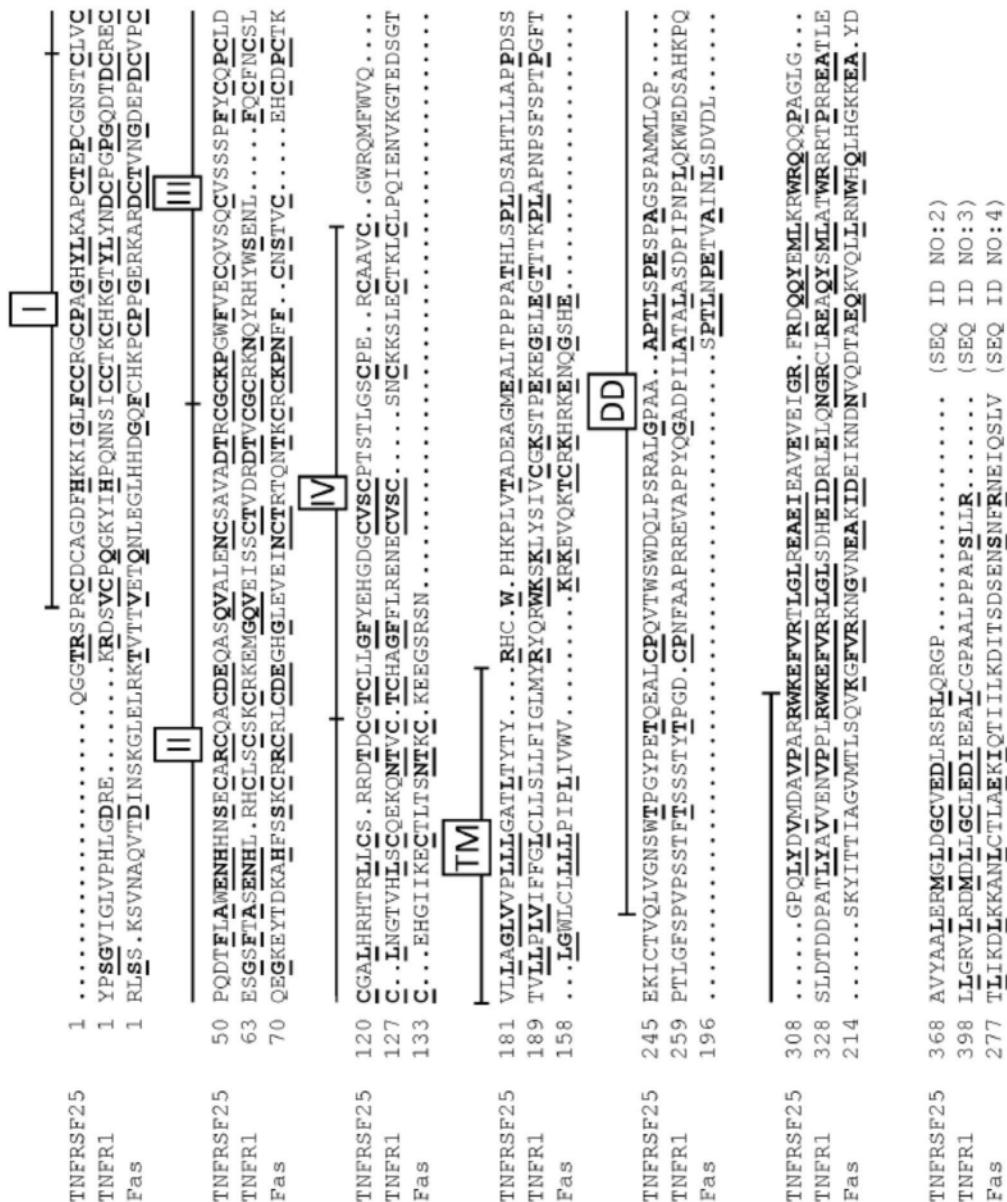


图1A

人TNFRSF25序列1

Bodmer等, Immunity 1997

```
MEQRPRGCAAVAAALLLVLLGARAQGGTSPRCDCAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTFLAN
ENHHHNSECARCOACDEQASQALENCSAVADTRCGCKPGWFVECQVSQCVSSSPFYCQPCLDCGALHRHTRLLCSRRDTDC
GTCCLPGFYEHDGCVSCPTSTLGSPERCAAVCGWROMFWVQVLLAGLVVPLLGATLTTYTYRHCWPHKPLVTADEAGMEA
LTPPPATHLSPDSAHTLLAPPDSSEKICTVQLVGNSWTPGPETQEALCPQVTWSWDQLPSRALGPAAPTLSPEPAGS
PAMMLQQPGPQLYDVMDAVPARWKEFVRTLGLREAEEEAVEIGRFRDQQYEMLKRWRQQQPAGLGAVYAALERMGLDG
VEDLRLSRLQRGP (SEQ ID NO:1)
```

人TNFRSF25序列2

>gi|23200021|ref|NP_683866.1| 肿瘤坏死因子受体超家族成员25同种型1前体[智人]

```
MEQRPRGCAAVAAALLLVLLGARAQGGTSPRCDCAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTFLAN
ENHHHNSECARCOACDEQASQALENCSAVADTRCGCKPGWFVECQVSQCVSSSPFYCQPCLDCGALHRHTRLLCSRRDTDC
GTCCLPGFYEHDGCVSCPTPPPSIAGAPWGAVQSAVPLSVAGGRGVFWVQVLLAGLVVPLLGATLTTYTYRHCWPHKPLVT
TADEAGMEALTPPPATHLSPDSAHTLLAPPDSSEKICTVQLVGNSWTPGPETQEALCPQVTWSWDQLPSRALGPAAPTLSPEPAGS
PAMMLQQPGPQLYDVMDAVPARWKEFVRTLGLREAEEEAVEIGRFRDQQYEMLKRWRQQQPAGLGAVYAALERMGLDG
LERMGLDGCVEDLRLSRLQRGP (SEQ ID NO:7)
```

小鼠TNFRSF25序列

>uc008vz.k.1 (Tnfrsf25) 长度=387

```
MEELPRRRSPPGAATPGSSTARVLQPLFLPLLLLLLLLLGGQGQGGMSRCDCASESQKRYGFCCRGCPKGHYMKARCAE
PCGNSTCLPCSDTLTRDNHHTDCTCQVCDEEALQVTIENCSAKSDTTHGCGCQSWCVCDCSTEPCGKSPFSCVPCGAT
TPVHHEAPTPLFWVQVLLGVAFLFGAILICAYCRWQPCKAVVTADTAGTETLASPQTAHLSASDSAHTLAPPSSTGKICTT
VQLVGNNWTPGLSQTQEVVCGQASPWDQLPNRTLGTPLASPLSPAPGSPAAVLQPGPQLYDVMDAVPARWKEFVRTLGLREAEEEAVEIGRFRDQQYEMLKRWRQQQPAGLGAVYAALERMGLDG
(GLREAEEEAVEICRFRDQQYEMLKRWRQQQPAGLGAYAALERMGLECADLRSRLQRGP (SEQ ID NO:8)
```

恒河猴TNFRSF25序列

>gi|966914523|ref|XP_014998005.1| 肿瘤坏死因子受体超家族成员25同种型X1 [恒河猴]

```
MEQRSRGSAAVAAVASTALLVLLGARAQGGTQSPRCDCAGDFHKKNGVFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLLCPQDTFAN
LAWENHHNSECARCCQACDEQASQALENCSAVADTRCGCKPGWFVECQVSQCVSSSPFYCQPCLDCRALHRHTRLLCSRRDTDC
TDCGTCLPGFYEHDGCVSCPTSTLGSPERCAAVCGWROMFWVQVLLAGLVVPLLGATLTTYTYRHCWPHKPMVTADEAGMEA
MEALTPPPATHLSPDSDKAHTLVPPDSSEKICTVQLVDNSWTPGPHTQEALCPQMTWSWDQLPNRALGPVPASTLLPEPVGS
VGSPTMMLQQPGPQLYDVMDAVPARWKEFVRTLGLREAEEEAVEIGRFRDQQYEMLKRWRQQQPAGLGAVYAALERMGLDG
DGCAEDLRLSRLQRGP (SEQ ID NO:9)
```

食蟹猴TNFRSF25序列

>gi|544409321|ref|XP_005544974.1| 预测的: 肿瘤坏死因子受体超家族成员25同种型X2 [食蟹猴]

```
MEQRSRGSAAVAAVAAAALLVLLGARAQGGTQSPRCDCAGDFHKKNGVFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLLCPQDTFAN
ENHHHNSSECARCCQACDEQASQALENCSAVADTRCGCKPGWFVECQVSQCVSSSPFYCQPCLDCRALHRHTRLLCSRRDTDC
GTCCLPGFYEHDGCVSCPTSTLGSPERCAAVCGWROMFWVQVLLAGLVVPLLGATLTTYTYRHCWPHKPMVTADEAGMEA
LTPPPATHLSPDNAHTLVPPDSSEKICTVQLVDNSWTPGPHTQEALCPQMTWSWDQLPNRALGPVPASTLLPEPVGS
PTMMLQQPGPQLYDVMDAVPARWKEFVRTLGLREAEEEAVEIGRFRDQQYEMLKRWRQQQPAGLGAVYAALERMGLDG
AEDLRLSRLQRGP (SEQ ID NO:10)
```

加以下划线的 = 信号肽高亮突出显示的 = 细胞外结构域粗体 = 跨膜结构域加以双下划线的 = PTX25表位

图1B

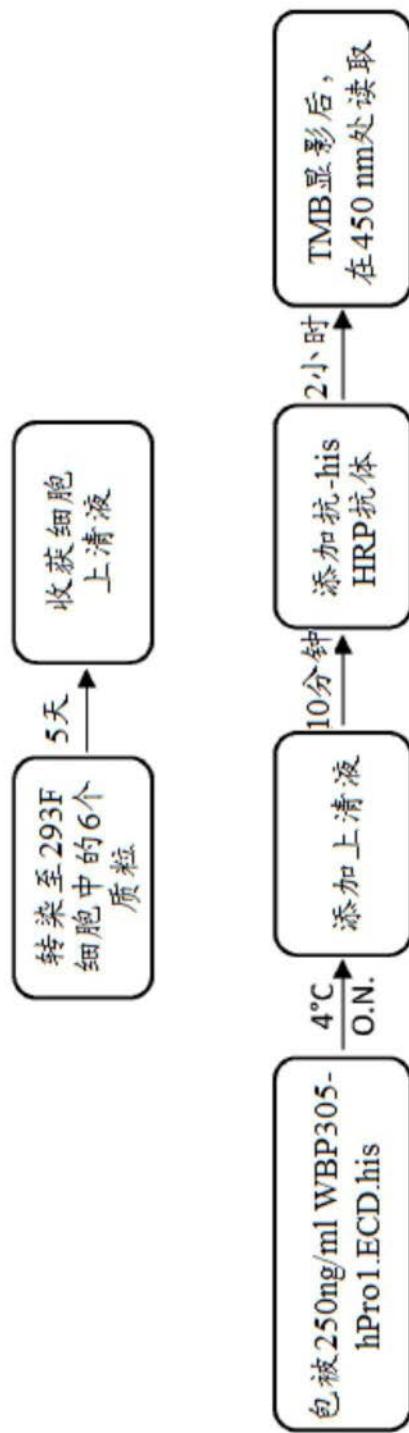


图2

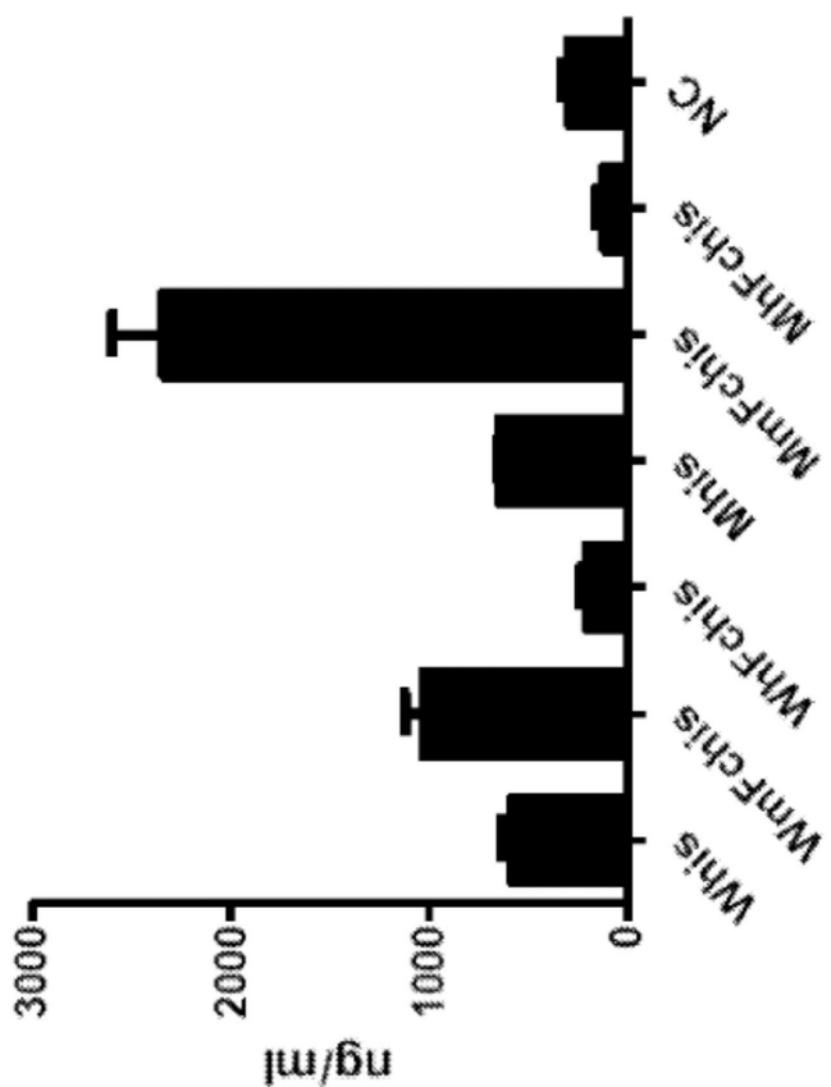


图3

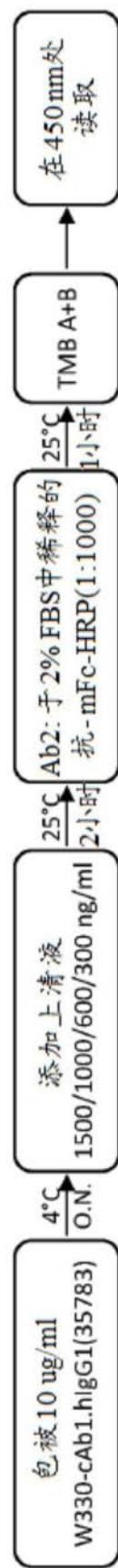


图4

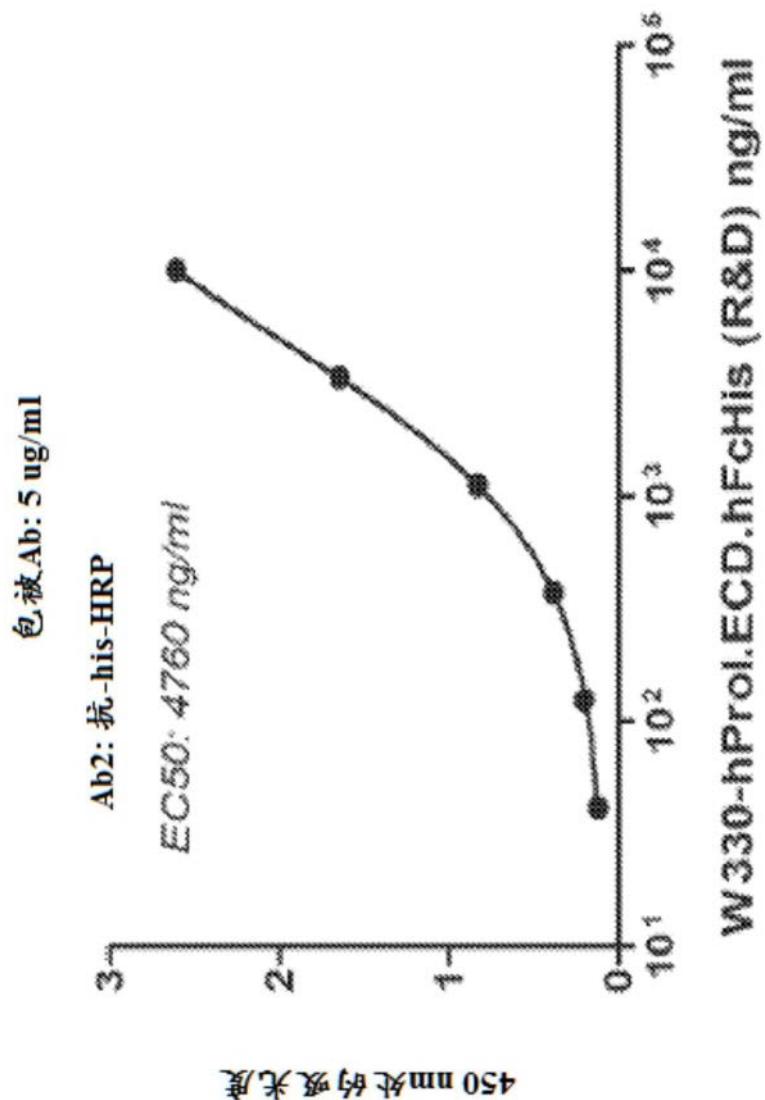


图5

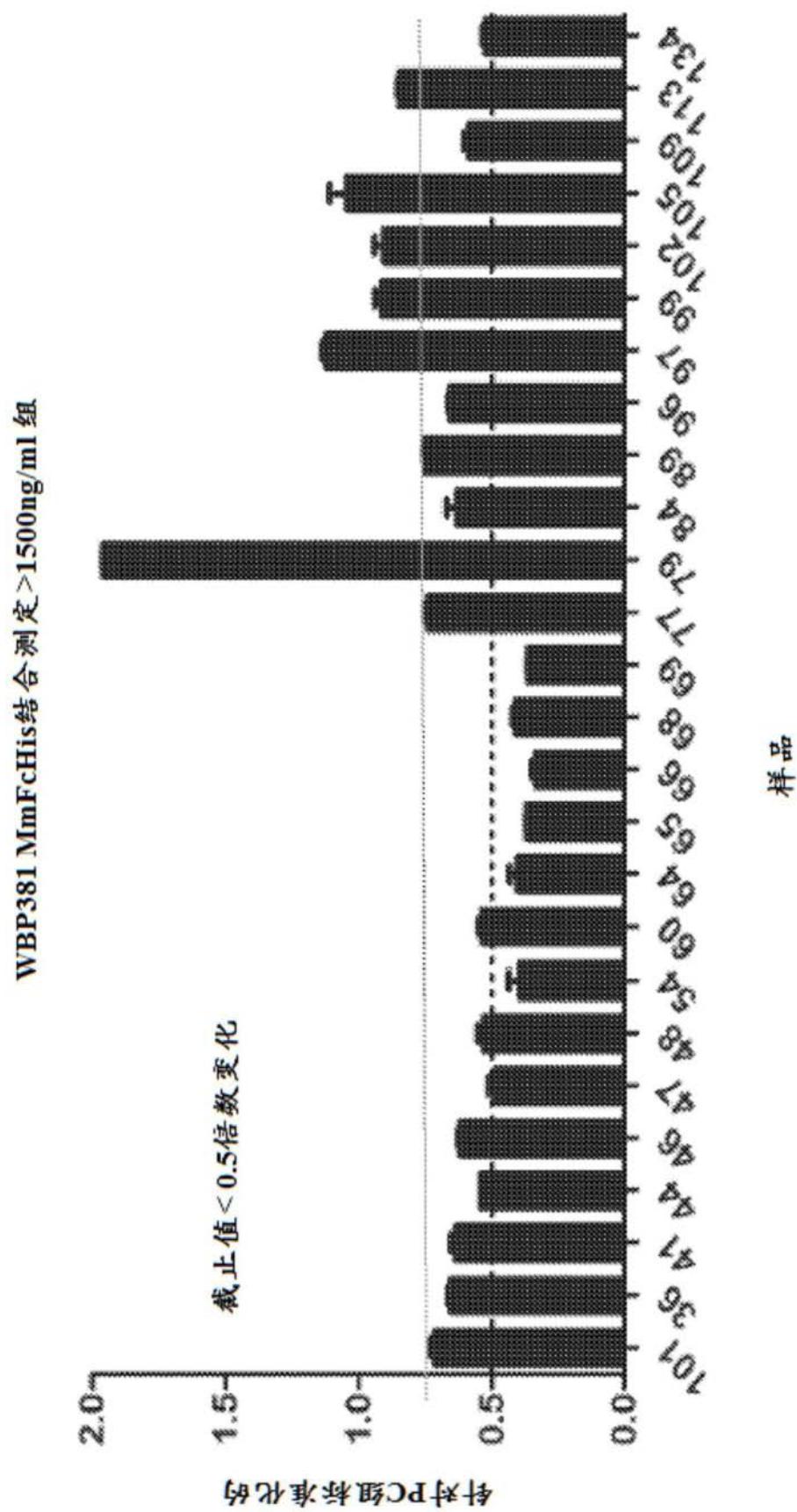


图6

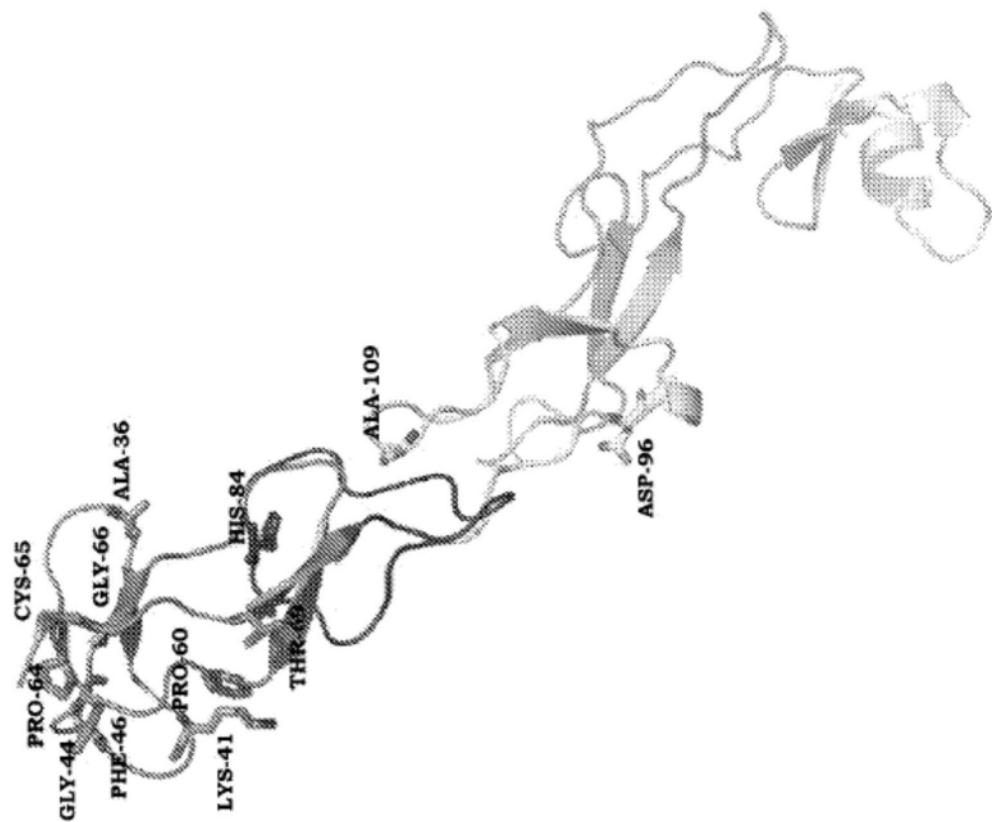


图7

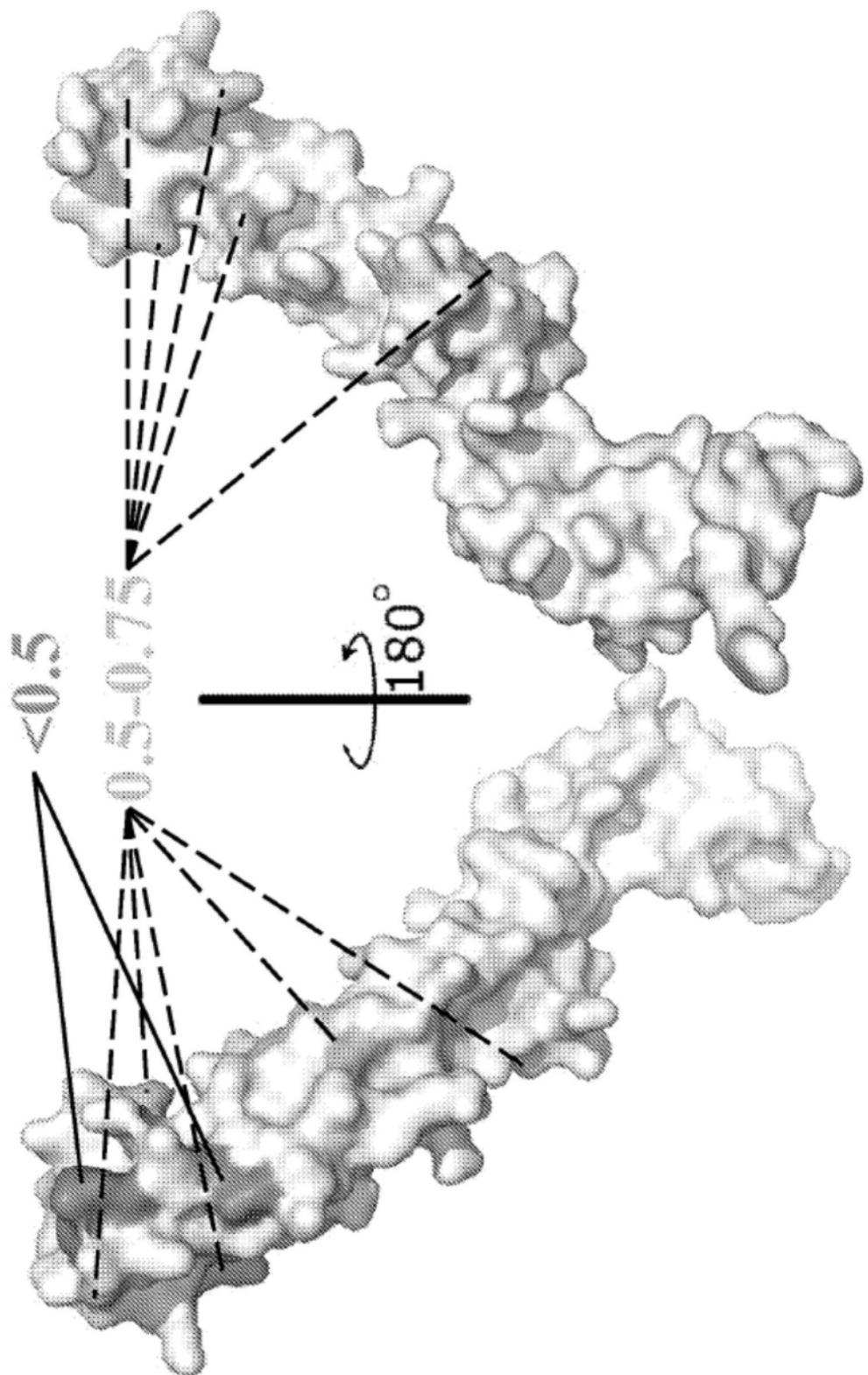


图8

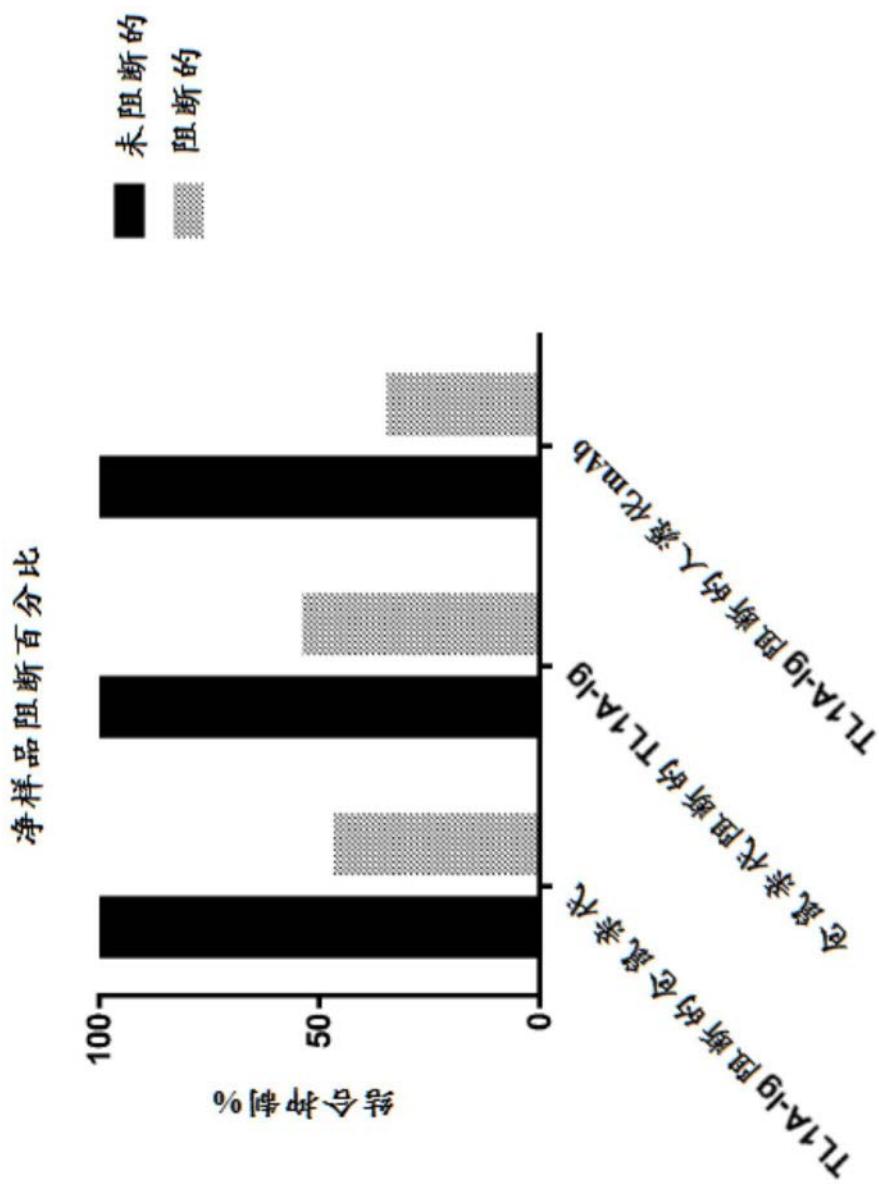
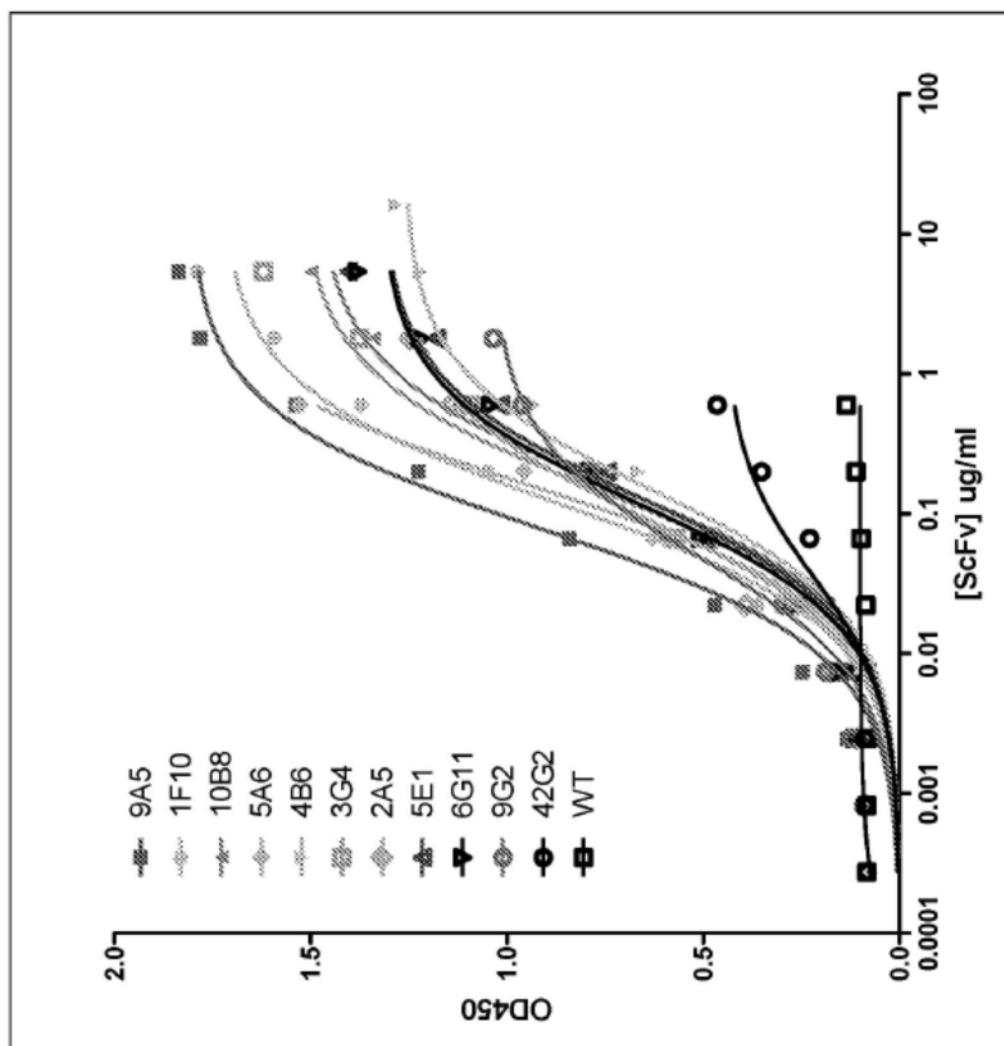
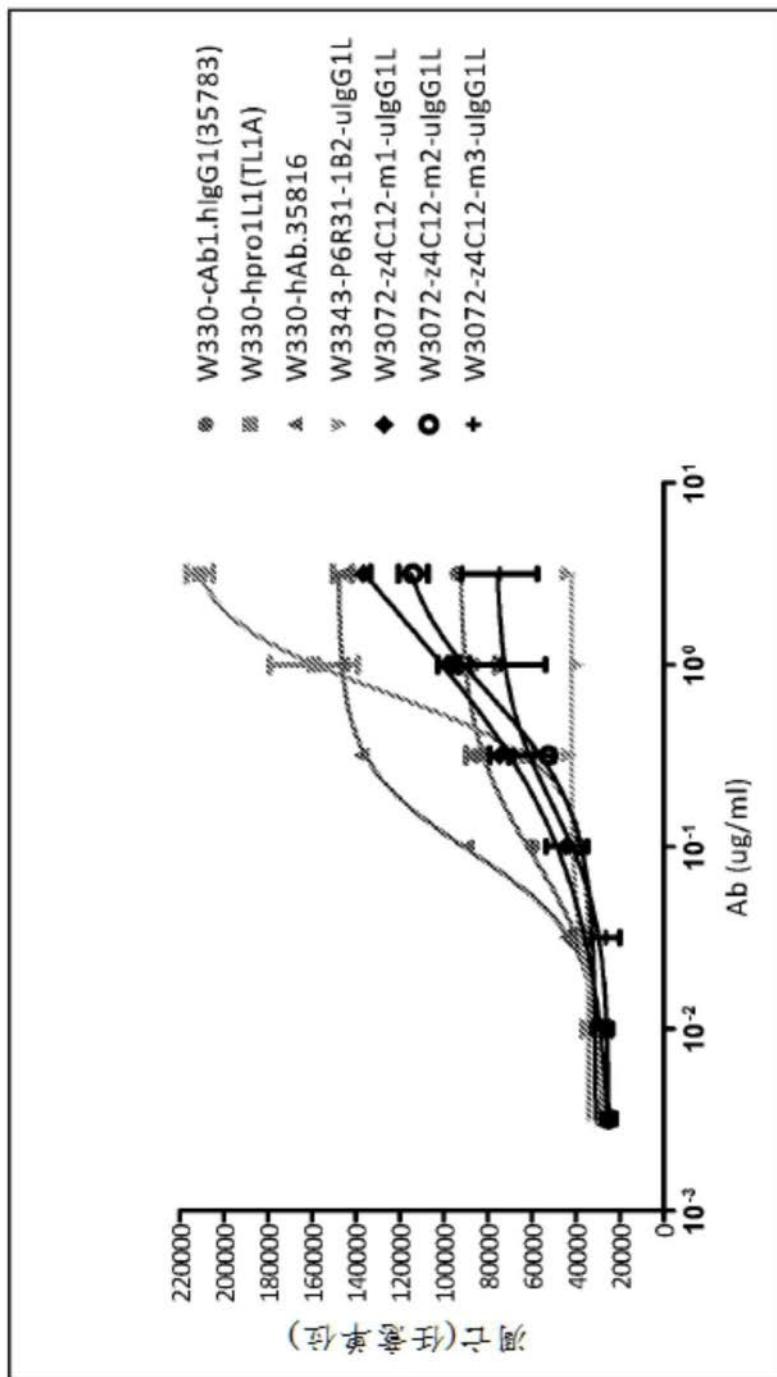


图9





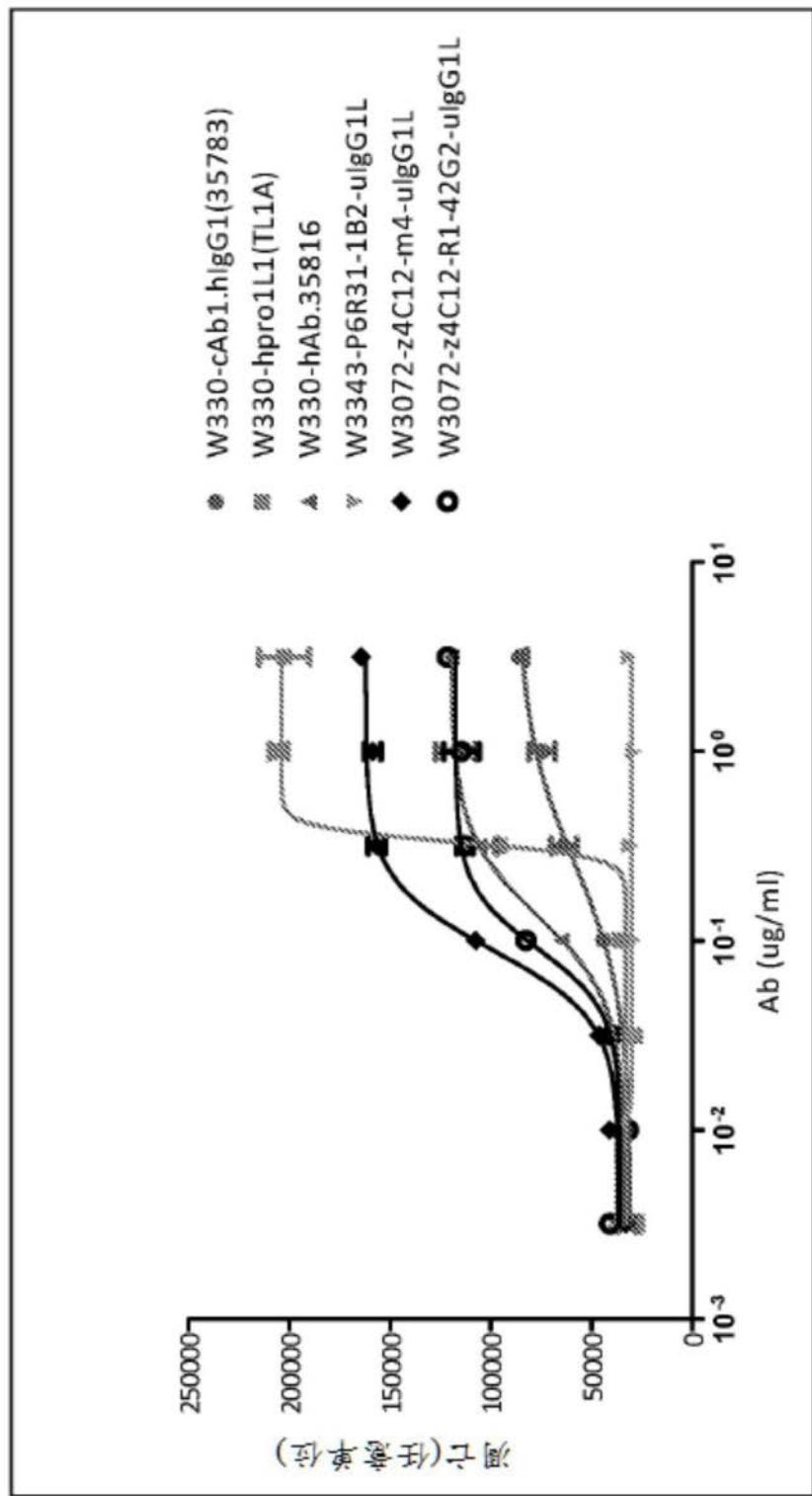


图11B

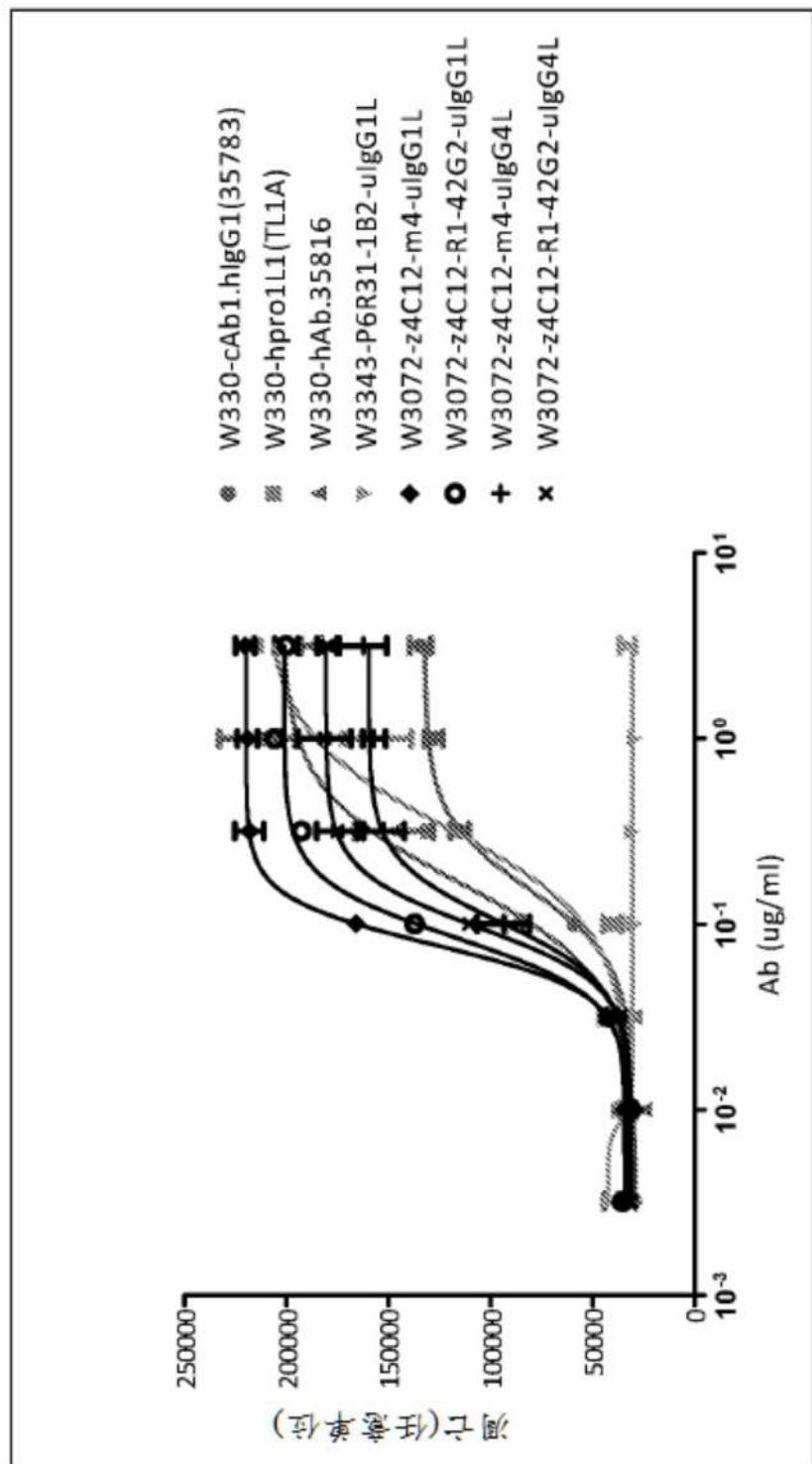


图12

