



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103517918 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 15

(21) 申请号 201280011136. 1

(22) 申请日 2012. 03. 01

(30) 优先权数据

11156416. 7 2011. 03. 01 EP

61/448, 827 2011. 03. 03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 08. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/053539 2012. 03. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/117067 EN 2012. 09. 07

(71) 申请人 诺沃—诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 M. D. 安德森 P. L. 诺尔德拜

K. 克贾尔加尔德 S. N. 格雷尔

A. 格鲁勒 J. 布查尔特

H. S. 安德森 S. 帕德贾尔

J. 卡斯特鲁普 K. 哈亚坎斯森

L. 霍努姆 B. 弗里伊德里奇森

D. 鲍恩斯加尔德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 罗文锋 万雪松

(51) Int. Cl.

C07K 14/705 (2006. 01)

C07K 16/28 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 37/00 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书53页

序列表35页 附图10页

(54) 发明名称

拮抗性 DR3 配体

(57) 摘要

本公开内容涉及炎性疾病的治疗。具体地讲，本公开内容涉及可用于治疗炎性疾病的拮抗性 DR3 配体。

1. 一种单价拮抗性 DR3 抗体,其中所述单价抗体阻断 DR3 与 TL1A 结合,且其中呈其二价形式的所述单价抗体是阻断 DR3 与 TL1A 结合的激动性抗体。

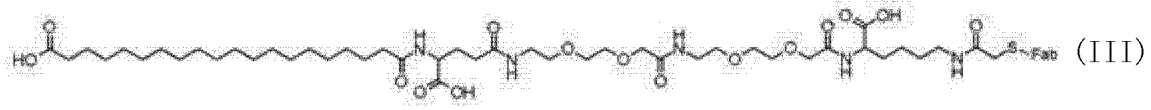
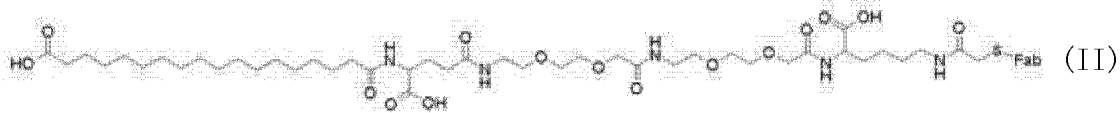
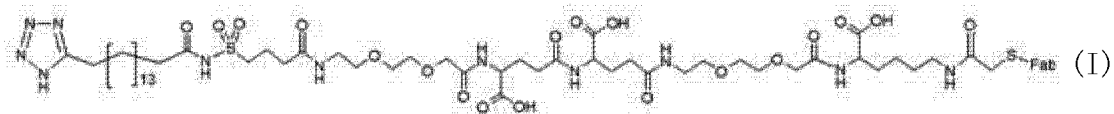
2. 权利要求 1 的单价抗体,其中所述单价抗体不是具有 W02011106707 所示 11H08 抗体的 CDR 序列 (SEQ ID NO 14+15) 的抗体。

3. 前述权利要求中任一项的单价抗体,其中所述单价抗体与亲脂部分缀合。

4. 权利要求 3 的单价抗体,其中所述亲脂部分包含 $-(CH_2)_n-CO-$ 脂肪酰基,其中 n 为 16-18。

5. 权利要求 3 的单价抗体,其中所述亲脂部分包含 $-(CH_2)_n-CO-$ 脂肪酰基,其中 n 为 15。

6. 权利要求 3-5 中任一项的单价抗体,其中所述抗体与选自以下式 (I)、(II)、(III)、(IV)、(V) 和 (VI) 的亲脂部分缀合:



7. 权利要求 3-6 中任一项的单价抗体,其中所述亲脂部分通过亲水间隔基与抗体重链中的天然存在的 C239 (Kabat 编号) 半胱氨酸残基连接。

8. 前述权利要求中任一项的单价抗体,其中所述抗体与 DR3 上的表位结合,其中所述表位包含 SEQ ID NO 1 的 I43 和 / 或 L45。

9. 前述权利要求中任一项的单价抗体,其中所述抗体与 DR3 上的表位结合,其中所述表位包含 SEQ ID NO 1 所示氨基酸 G37-L45 的至少一个和氨基酸 L57-A59 的至少一个。

10. 权利要求 9 的单价抗体,其中所述表位包含 SEQ ID NO 1 所示的氨基酸 G37-L45 和氨基酸 L57-A59。

11. 前述权利要求中任一项的单价抗体,其中所述配体是 Fab 片段。

12. 前述权利要求中任一项的单价抗体,其中所述单价抗体以低于 1 nM 的解离常数结合 DR3。

13. 前述权利要求中任一项的单价抗体,其中所述抗体与人 DR3 的 CRD1 结构域结合。
14. 一种单价抗体,其包含 SEQ ID NO 10 所示的 3 个 CDR 序列和 SEQ ID NO 11 所示的 3 个 CDR 序列。
15. 一种单价抗体,其中所述抗体包含人构架、SEQ ID NO 16 所示 CDR3 序列和 SEQ ID NO 17 所示 CDR3 序列以及重链的“S49A”回复突变。
16. 权利要求 15 的单价抗体,其中所述抗体包含 SEQ ID NO 16 所示的 3 个 CDR 序列和 SEQ ID NO 17 所示的 3 个 CDR 序列。
17. 前述权利要求中任一项的单价抗体,其中所述抗体与“0228”单价抗体竞争结合人 DR3,其中 0228 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 16 所示,0228 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 17 所示。
18. 前述权利要求中任一项的单价抗体,其中所述抗体降低 RA 患者滑液细胞中的 IFN- γ 释放,其中所述滑液细胞用 TL1A 共刺激。
19. 前述权利要求中任一项的单价抗体,其中所述抗体降低 CD 患者肠活检样品固有层单核细胞 (LPMC) 的一种或多种细胞因子的释放,其中所述细胞因子选自:TNF- α 、IL-6、GM-CSF 和 IFN- γ ,且其中所述 LPMC 用 TL1A、IL-12 和 IL-18 共刺激。
20. 前述权利要求中任一项的单价抗体,其中所述抗体降低 CD4+ T 细胞中一种或多种细胞因子的释放,其中所述细胞因子选自:TNF- α 、IL-6、GM-CSF 和 IFN- γ ,且其中所述 T 细胞用 TL1A 共刺激。
21. 前述权利要求中任一项的单价抗体,其中所述抗体是 IgG4 型抗体。
22. 一种药物组合物,其包含权利要求 1-21 中任一项的抗体。
23. 用于治疗炎性疾病的权利要求 1-21 中任一项的单价抗体或权利要求 22 的药物组合物的用途。
24. 用于治疗克罗恩病 (CD) 的权利要求 1-21 中任一项的单价抗体或权利要求 22 的药物组合物的用途。
25. 用于治疗类风湿性关节炎 (RA) 的权利要求 1-21 中任一项的单价抗体或权利要求 22 的药物组合物的用途。

拮抗性 DR3 配体

[0001] 背景

TL1A 是由内皮细胞、树突细胞、单核细胞和其它免疫细胞产生的 TNF 超家族成员。TL1A 通过 DR3（一种由活化 T 细胞和其它免疫细胞表达的 TNF 受体超家族成员）发出信号。通过 TL1A 的受体连接导致通过 T 辅助效应细胞的增殖和细胞因子产生增加。DR3 和 TL1A 涉及 RA 和 CD, 因此在治疗炎性疾病例如 RA（类风湿性关节炎）和 CD（克罗恩病 (Crohn's Disease)）时会需要拮抗 DR3 诱导的作用。

[0002] W02011106707 公开了 DR3 特异性抗体 (11H08) 及其包含插入不同抗体构架的 11H08 CDR 序列 (SEQ ID NO 14+15) 的变体。11H08 抗体以相对低的亲和力结合 DR3, 并且它不与 CRD1 结构域结合。因此, 本领域需要可用于治疗炎性疾病的 DR3 拮抗剂。

[0003] 概述

针对 DR3 产生的二价抗体具有激动作用。这些激动性 DR3 特异性抗体的几个具有阻断 DR3 与 TL1A 间的相互作用的能力。由于激动性抗体导致通过 T 辅助效应细胞的增殖和细胞因子产生增加, 因此在有关炎性病症治疗时不期望使用二价 DR3 抗体。

[0004] 本发明提供拮抗性 DR3 配体, 其中所述配体对 DR3 具有单价特异性, 且其中所述配体阻断 TL1A 与 DR3 结合。这类配体优选来源于二价激动性抗体, 并且任选与半寿期延长部分 (例如亲脂部分) 缀合。这类配体优选具有高亲和力, 和 / 或优选与 DR3 的 CRD1 结构域结合。本发明还涉及这类配体治疗炎性疾病的用途。本文表明本发明的 DR3 配体能够拮抗通过 DR3 诱导的作用。

[0005] 附图简述

图 1: 本文提及的序列。

[0006] 图 2: 通过 FCM 分析的 CHOK1SV 上的 DR3 表达。JD3 是市售可获得的 DR3 抗体。

[0007] 图 3: 用 100 μ M MSX 培养的 CHOK1SV 上的稳定 DR3 表达。通过 FCM 分析的表达。

[0008] 图 4: TNFR1 和 DR3 胞外域的序列比对。每一行表示富含半胱氨酸的结构域 (CRD), 该结构域可再被分成 A 和 B 亚结构域。突出显示了针对 TNFR1 测定的 CRD 中的保守二硫键模式。

[0009] 图 5: 针对阻断人 TL1A 与过量表达 DR3 的 CHO 细胞结合的能力预筛选的各个小鼠血清。右边条形柱 (黑色) 是抗 TL1A 对照 (MAB7441 RnD Biosystems)。

[0010] 图 6: 通过流式细胞术进行的阻断 TL1A:DR3 相互作用的抗体的实例。图 6A 显示与 6 种阳性 DR3 抗体的 DR3 细胞的特异性结合。图 6B 表示显示 4 种封闭性抗体和 2 种非封闭剂 (non-blocker) 的抑制研究。Y 轴表示平均强度荧光。

[0011] 图 7: 图 7A 3 种封闭性抗体和作为对照的非封闭 DR3 特异性 ab 的滴定曲线——用完全抗体和用 Fab 表示。

[0012] 图 8: 在有或没有抗 DR3 Fab 或 mAb 时用 IL12/IL18 +TL1A 刺激的 CD4+ T 细胞。T 细胞增殖在第 5 天测量。

[0013] 发明详述

本发明的发明人认识到 DR3 抗原——其可溶形式及细胞表面表达的形式——的产生被

证实是困难的,因为传统方法无一成功。人细胞系中 DR3 胞外域的重组表达通常导致含有大量寡聚体和高分子量复合物的可溶性蛋白质分泌(另见实施例 3)。据推测这些寡聚化蛋白质批次对于免疫而已并不是最优的。与可溶性蛋白质表达最优化(如实施例 3 所述)的同时,小鼠用过量表达膜结合的 DR3 的细胞免疫。然而,过量表达 DR3 的稳定细胞系的产生并不简单。全长 DR3 中的死亡结构域在稳定转染的过量表达 DR3 的细胞系中导致细胞死亡,因此必须对全长 DR3 进行修饰(参见实施例 2 和 5)。已在不同的小鼠品系(BALB/C、RBF 和 NMRCF1)中进行了免疫以提高抗体库多样性和产生中和性抗 DR3 Ab 的可能性。

[0014] 鉴定出几百个 DR3 结合抗体;这些中仅少数(~2%)能够阻断/抑制 DR3:TL1A 结合。因此推断具有阻断 DR3:TL1A 结合的能力的 DR3 抗体具有拮抗 DR3 诱导作用的能力。然而,结果的确是所有 DR3 抗体——不论它们是否具有阻断 DR3:TL1A 结合的能力——在 TL1A 存在和不存在时均是激动的(agonistic),它们显然的确在某种程度上模拟 TL1A 结合诱导的对 DR3 的作用。

[0015] 根据这些出人意料的观察结果,本发明人假设,对通过所有 DR3 抗体发挥的激动作用的解释可能是任何二价 DR3 抗体可导致 DR3 群聚,和 DR3 群聚可能具有诱导胞内 DR3 信号转导的潜力。这种设想还在有关 TNFR 家族成员 Fas (CD95) 和 TNFR2 的最新出版物(Wang 等(2010) *Nature Struc. Mol. Biol.* 17,1324-1328;Mukai 等(2010) *Sci. Signal.* 3, ra83) 中得到支持。Wang 等人提供了结构数据和解析数据两者,表明了胞内信号转导复合物具有高级次,并含有至少 5-7 拷贝的受体。类似地,Mukai 等人表明受体胞外部分的群聚由配体结合诱导。因此,两种出版物指出,这些 TNFR 家族成员的高级次群聚可能是信号转导的先决条件。

[0016] 为了检验该假设,在功能测定法中测定了用木瓜蛋白酶裂解 mAb 所产生的 Fab 片段(单价 DR3 抗体)。来自这些测定法的出人意料的结果是,单价 DR3 抗体(根据具有阻断/抑制 DR3:TL1A 结合的能力的 DR3 抗体制备)在功能测定法中是拮抗性的,即它们具有抑制 DR3 诱导的作用的能力。因此单价 DR3 配体/抗体不促进 DR3 群聚,因此它们不具有激动作用。

[0017] 不阻止 TL1A:DR3 相互作用的抗体被用作阴性对照。这种抗体类型在不存在 TL1A 时在极高浓度下是激动性的,但仅作为 mAb。来自这些抗体的相应的 Fab 不能够阻止 TL1A 诱导的作用。

[0018] 定义:

“炎症”是血管组织对有害刺激(例如病原体、受损细胞或刺激物)的复杂的生物反应。炎症是生物消除有害刺激以及启动组织愈合过程的保护性尝试。炎症不是感染的同义词——感染是由外源病原体引起的,而炎症是生物的免疫系统对病原体的反应。

[0019] 通常,免疫系统能够区分机体正常细胞或“自身”和外来病原体或异常细胞或“异物”。免疫系统丧失识别“自身”为正常的能力并且针对组织或细胞的后续反应的过程,导致耐受性丧失(一种“自身免疫”的状态)。由自身免疫所致病理常常具有严重的临床后果,并且是全世界,尤其是发达国家的主要健康问题之一。

[0020] 目前可获得生物治疗剂用于治疗某些自身免疫病和/或癌症。例如,类风湿性关节炎患者可用利妥昔单抗(抗 CD20)治疗,克罗恩病(Crohn's disease)患者可用英利昔单抗或那他珠单抗治疗。遗憾的是,接受这些生物制剂任一种的治疗的患者,还会遇到各种

副作用和 / 或是无应答者和 / 或形成抑制剂。仍然需要特异性靶向病理组织和 / 或不影响健康组织和 / 或产生较不严重的副作用和 / 或产生较少副作用和 / 或可长期使用和 / 或不会导致抑制剂形成的备选生物药物。本发明涉及自身免疫病患者和慢性炎症性疾病患者中的这些未被满足的需要。

[0021] 本发明的配体因此适用于治疗炎症性疾病和病况例如银屑病、I 型糖尿病、格雷夫斯病 (Grave's disease)、炎症肠病 (IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、肠易激综合征、多发性硬化、类风湿性关节炎 (RA)、自身免疫性心肌炎、川崎病 (Kawasaki disease)、冠状动脉疾病、慢性阻塞性肺病、间质性肺疾病、自身免疫性甲状腺炎、系统性红斑狼疮 (SLE)、硬皮病、全身性硬皮病、银屑病性关节炎、骨关节炎、特应性皮炎、白斑、移植物抗宿主病、斯耶格伦综合征 (Sjögren's syndrome)、自身免疫性肾炎、古德帕斯彻综合征 (Goodpasture's syndrome)、慢性炎症性脱髓鞘性多神经病、变态反应、哮喘和其它自身免疫病。

[0022] 克罗恩病 (CD/ 肉芽肿性 / 结肠炎) 是肠的炎症性疾病, 可影响胃肠道从口到肛门的任何部位, 引起各种症状。其主要引起腹痛、腹泻 (其可有血)、呕吐或体重减轻, 但还可引起胃肠道以外的并发症例如皮疹、关节炎、眼部炎症、疲劳和注意力缺乏。对于克罗恩病尚无已知的药物或手术疗法。治疗选择局限于控制症状、保持缓解和防止复发。

[0023] 类风湿性关节炎 (RA): RA 是累及整个身体的全身性疾病, 并且是最普通的关节炎形式之一。其特征在于内衬关节的膜的炎症, 它引起疼痛、僵硬、发热、发红和肿胀。炎症细胞释放可消化骨和软骨的酶。由于类风湿性关节炎, 发炎的关节内衬滑膜可侵入和损害骨和软骨, 导致除其它生理作用以外的关节退化和严重疼痛。受累关节可能失去其形状和排列, 导致疼痛和运动丧失。

[0024] 有若干本领域已知的类风湿性关节炎动物模型。例如, 在胶原诱发性关节炎 (CIA) 模型中, 小鼠出现十分类似于人类类风湿性关节炎的慢性炎症性关节炎。由于 CIA 与 RA 共享类似的免疫学和病理学特征, 因此这使之成为筛选潜在人抗炎化合物的理想模型。

[0025] “DR3”有时称为死亡受体 3、TRAMP、TNFRSF12、TNFR25、TNFRS25、APO-3、DDR3、LARD、TR3、WSL-1 或 WSL-LR。人 DR3 是 TNF 受体 (TNFR) 超家族的成员, 在胞外域包含 4 个富含半胱氨酸的基序, 在胞质结构域包含“死亡结构域”。人 DR3 包含 SEQ ID 1 中规定的氨基酸序列。DR3 的胞外域 (残基 25-199) 包含 4 个富含半胱氨酸的结构域 (CRD1、CRD2、CRD3 和 CRD4)。各 CRD 通常含有形成 3 个二硫键的 6 个半胱氨酸残基。另外, 每个 CRD 可再分为组件 A1 和 B2, 其通常在 TNFR 超家族的常见成员中观察到。

[0026] “阻断 / 抑制 / 减少 DR3 与 TL1A 结合”。本发明的单价配体 / 抗体具有抑制 / 阻断 / 减少 DR3:TL1A 结合的能力。其可在基于高通量成像的测定法中进行测定。这通过筛选结合 DR3 转染的 CHO 细胞的能力和针对野生型细胞的反筛选而在 FMAT 系统中进行 (更多详情描述于实施例 4)。如该测定法中测量的一样, 如果 DR3:TL1A 结合降低至少 10%、优选至少 20%、优选至少 25%、优选至少 30%、优选至少 40%、优选至少 50%、优选至少 60%、优选至少 70%、优选至少 75%、优选至少 80%、优选至少 90%、优选至少 95%, 最优选约 100%, 则本发明的单价配体 / 抗体具有阻断或抑制或减少 DR3:TL1A 结合的能力。

[0027] “延长基团 (protracting group)” / “半寿期延长部分”在本文理解为这样的一个或多个化学基团, 其与一个或多个氨基酸侧链官能团 (例如 -SH、-OH、-COOH、-CONH₂、-NH₂) 或者一个或多个 N- 和 / 或 O- 聚糖结构连接并且当与多种治疗性蛋白质 / 肽缀合时, 可延长

这些蛋白质 / 肽的体内循环半寿期。延长基团 / 半寿期延长部分的实例包括但不限于：生物相容性脂肪酸及其衍生物、羟烷基淀粉 (HAS) 例如羟乙基淀粉 (HES)、聚乙二醇 (Poly Ethylen Glycol, PEG)、聚 (Gly_x-Ser_y)_n (HAP)、透明质酸 (HA)、Heparosan 聚合物 (HEP)、基于磷酸胆碱的聚合物 (PC 聚合物)、Fleximer、葡聚糖、多聚唾液酸 (PSA)、Fc 结构域、运铁蛋白、白蛋白、弹性蛋白样肽、XTEN 聚合物、白蛋白结合肽、CTP 肽及其任何组合。

[0028] 本发明的“聚乙二醇化 DR3 配体变体”可具有与 DR3 配体多肽的任何部分 (包括 DR3 配体多肽的任何氨基酸残基或糖部分) 连接的一个或多个 PEG 分子。可采用化学和 / 或酶促方法使 PEG 或其它延长基团与本发明的单价 DR3 配体上的聚糖缀合。酶促缀合方法的实例描述于例如 W003031464。聚糖可以是天然存在的, 或可通过采用本领域众所周知的方法例如插入 N 联糖基化位点而被插入。本发明“半胱氨酸 - 聚乙二醇化 DR3 配体变体”具有与存在于 DR3 配体中的半胱氨酸的巯基缀合的一个或多个 PEG 分子。本发明的“半胱氨酸 - 酰化 DR3 配体变体”或“半胱氨酸 - 烷基化 DR3 配体变体”具有与引入 DR3 配体的半胱氨酸的巯基缀合的一个或多个疏水半寿期延长部分。此外, 有可能使延长性半寿期延长部分与其它氨基酸残基连接。

[0029] 哺乳动物物种循环血中最丰富的蛋白质组分是血清白蛋白, 通常以约 3-4.5 克 / 100 毫升全血的浓度存在。血清白蛋白是约 65, 000 道尔顿的血液蛋白质, 在循环系统中具有若干重要功能。它起血液中的各种有机分子的转运蛋白的作用、起整个血液中各种代谢物 (例如脂肪酸和胆红素) 的主要转运蛋白的作用, 并且由于其丰度而起循环血的渗透调节剂的作用。血清白蛋白具有一周以上的半寿期, 延长蛋白质的血浆半寿期的一种方法是使蛋白质与结合血清白蛋白的部分缀合。可按 *J. Med. Chem.*, 43, 1986, (2000) (其通过引用结合到本文中) 所述来测定白蛋白结合性质。

[0030] 疏水 / 亲脂半寿期延长部分: 本发明的配体优选与性质上主要是亲脂 / 疏水的半寿期延长部分缀合。在一个优选的实施方案中, 疏水半寿期延长部分能够与白蛋白形成非共价复合物 (“白蛋白结合剂”), 因此促进衍生物随血流循环, 还具有延长衍生物的作用时间的作用。因此, 整体来看, 优选的取代基或部分可称为白蛋白结合部分。

[0031] 与其与本发明的 DR3 配体的连接点相比, 半寿期延长部分优选位于白蛋白结合部分的相对端或接近白蛋白结合部分的相对端。白蛋白结合部分的其它部分, 即半寿期延长部分与肽连接点中间的部分, 可称为接头部分、接头、间隔基等。然而, 接头的存在是任选的, 因此白蛋白结合部分可与半寿期延长部分相同。

[0032] 在具体的实施方案中, 白蛋白结合部分和 / 或半寿期延长部分是亲脂的, 和 / 或在生理 pH (7.4) 下带负电荷。

[0033] 白蛋白结合部分和 / 或半寿期延长部分可通过缀合化学法例如通过烷基化、酰化或酰胺形成与肽的氨基共价连接; 或者例如通过酯化、烷基化与羟基共价连接; 或通过脲化与其它基团共价连接。

[0034] 在一个优选的实施方案中, 白蛋白结合部分和 / 或半寿期延长部分的活性亲硫衍生物与抗 DR3 Fab 的半胱氨酸残基的巯基共价连接。这类亲硫基团包括但不限于马来酰亚胺、卤代 - 马来酰亚胺、卤化物 (尤其 α - 卤代乙酰基)、丙烯酰 - 衍生物 (例如丙烯酸酯和丙烯酰胺)、乙烯基砜、反应性二巯基 (例如 2- 吡啶基)。因此, 本发明的抗 DR3 Fab' 优选通过硫醚或二硫键与白蛋白结合部分连接。

[0035] 可设计本发明的单价抗体,例如 Fab' 片段,以含有来自构成完整抗体重链硫桥之一的部分的重链的天然存在半胱氨酸残基。该半胱氨酸残基称为 C239 (Kabat 编号)。半胱氨酸残基还可通过遗传工程插入,但是通过使用天然存在的半胱氨酸残基用于缀合目的,可能有相关安全优势。

[0036] 在一个优选的实施方案中,在酰胺键形成(该过程称为酰化)的情况下,白蛋白结合部分和/或疏水半寿期延长部分的活性酯与唾液酸残基或唾液酸衍生物的氨基共价连接。

[0037] 按照本发明十分优选的实施方案,采用酶促方法(例如包括使用唾液酸转移酶的方法),使白蛋白结合部分通过聚糖与配体连接。

[0038] 对于本发明的目的,术语“白蛋白结合部分”、“半寿期延长部分”和“接头”包括这些分子的未反应以及反应形式。不论是指一种形式还是另一种形式,从使用该术语的上下文来看都是清楚的。

[0039] 术语“脂肪酸”是指具有 4-28 个碳原子的脂族一元羧酸,它优选是无支链的,和/或是偶数的,且它可以是饱和的或不饱和的。

[0040] 术语“脂肪二酸”是指上述定义的但在 ω 位具有额外羧酸基的脂肪酸。因此,脂肪二酸是二羧酸。

[0041] 命名法是本领域常用的,例如 $-\text{COOH}$ 和 $\text{HOOC}-$ 是指羧基; $-\text{C}_6\text{H}_4-$ 是指亚苯基; $-\text{CO}-$ 和 $-\text{OC}-$ 是指羰基($\text{O}=\text{C} <$); $\text{C}_6\text{H}_5\text{-O}-$ 是指苯氧基;卤化物是指卤素 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 和 $-\text{At}$ 。

[0042] 在一个优选的实施方案中,本发明的白蛋白结合部分包含通过接头和唾液酸残基或唾液酸衍生物与肽或蛋白质连接的脂肪酰基($-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$,其中 $n=1, 2, 3, \dots, 40$)或 ω -羧基脂肪酰基($\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$,其中 $n=1, 2, 3, \dots, 40$)。

[0043] 在一个优选的实施方案中,本发明的白蛋白结合部分包含通过接头和半胱氨酸残基与肽或蛋白质连接的脂肪酰基($-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$,其中 $n=1, 2, 3, \dots, 40$)或 ω -羧基脂肪酰基($\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$,其中 $n=1, 2, 3, \dots, 40$)。在一个特别优选的实施方案中, n 为 16 或 18。

[0044] 在另一个优选的实施方案中,本发明的白蛋白结合部分包含通过接头和半胱氨酸残基与肽或蛋白质连接的 $\text{R}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ 类型的脂肪酰基,其中 $n=1, 2, 3, \dots, 40$ 。R 是包含酸性基团的基团,例如四唑-5-基或 $-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COOH}$ 。在一个特别优选的实施方案中, n 为 14 或 15。

[0045] 在本发明的情况下,具有 $-(\text{CH}_2)_{12}-$ 部分的化合物是可能的白蛋白结合剂。如果这类化合物与蛋白质或肽连接,并导致所述蛋白质或肽的血浆半寿期延长,则要了解白蛋白结合剂可促使血浆半寿期的总体延长。

[0046] 在一个优选的实施方案中,接头部分如果存在,则具有 2-80 个 C 原子,优选 5-70 个 C 原子。在其它优选的实施方案中,接头部分如果存在,则具有 4-20 个杂原子,优选 2-40 个杂原子,更优选 3-30 个杂原子。杂原子特别优选的实例为 N 和 O 原子。H 原子不是杂原子。

[0047] 在另一个实施方案中,接头包含至少一个 OEG 分子,和/或至少一个谷氨酸残基,更确切地说相应基团(OEG 称为 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸,即该基团: $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)$

2-O-CH₂-CO-)。

[0048] 在一个优选的实施方案中,接头部分包含二羧酰胺部分,接头通过硫醚键与半胱氨酸残基连接。在优选的实例中,二羧酰胺部分含有 2-30 个 C 原子,优选 4-20 个 C 原子,更优选 4-10 个 C 原子。

[0049] 在一个优选的实施方案中,接头部分包含通过酰胺键与唾液酸残基连接的二羧酰胺部分。在优选的实例中,二羧基残基具有 2-30 个 C 原子,优选 4-20 个 C 原子,更优选 4-10 个 C 原子。在其它优选的实例中,二羧基残基具有 0-10 个杂原子,优选 0-5 个杂原子。

[0050] 在另一个优选的实例中,接头部分 / 间隔基包含含有氨基和通过其远端羧基经由酰胺键与唾液酸残基连接的远端羧基两者的基团。在一个优选的实施方案中,该基团是 OEG 基团。本文所用术语“亲水间隔基”意指这样的间隔基,其将本发明的单价 DR3 抗体 / 配体与白蛋白结合残基用包含至少 5 个非氢原子 (其中 30-50% 既非 N 也非 O) 的化学部分分隔开。优选白蛋白结合残基通过亲水间隔基与 Cys 残基连接。

[0051] 氨基酸谷氨酸 (Glu) 包含 2 个羧基。其 γ -羧基优选用于与唾液酸残基或唾液酸衍生物的氨基,或与 OEG 分子的氨基 (如存在的话),或与另一 Glu 残基的氨基 (如存在的话) 形成酰胺键。Glu 的氨基进而与半寿期延长部分的羧基,或与 OEG 分子的羧基 (如存在的话),或与另一 Glu 的 γ -羧基 (如存在的话) 形成酰胺键。加入 Glu 的这种方法偶尔简称为“ γ -Glu”。

[0052] 具有突变的 Fc 结构域的“Fc 融合衍生物”或“Fc 融合蛋白”或 DR3 抗体在本文意指包括与可来源于任何抗体同种型的 Fc 结构域融合的本发明的 DR3 配体,但是 IgG Fc 结构域通常将是优选的,因为 IgG 抗体的循环半寿期相对较长,优选 IgG1 和 IgG4 同种型。此外可对 Fc 结构域进行修饰以调节某些效应子功能,例如补体结合和 / 或与某些 Fc 受体的结合。此外可调节 Fc 结构域以提高对新生儿 Fc 受体的亲和力。本发明的 DR3 配体与具有结合 FcRn 受体的能力的 Fc 结构域融合,一般将导致融合蛋白的循环半寿期延长。IgG1 Fc 结构域第 234、235 和 237 位上的突变一般可导致与 Fc γ RI 受体的结合减弱,与 Fc γ RIIa 和 Fc γ RIII 受体的结合也可能减弱。这些突变不改变与 FcRn 受体的结合,FcRn 受体通过胞吞再循环途径促进长的循环半寿期。优选本发明融合蛋白的修饰 IgG1 Fc 结构域包含一个或多个下列突变,其分别可导致对某些 Fc 受体的亲和力降低 (L234A、L235E 和 G237A),和导致 C1q 介导的补体结合减弱 (A330S 和 P331S)。或者,Fc 结构域可以是任选包含 S241P/S228P 突变的 IgG4 Fc 结构域。

[0053] 本文所用术语“抗体”、“单克隆抗体”和“mAb”欲指免疫球蛋白分子及其具有与抗原特异性结合的能力的片段。全长抗体包含 4 条多肽链,即通过二硫键相互连接的 2 条重 (H) 链和 2 条轻 (L) 链。每条重链由重链可变区 (本文简称为 HCVR 或 VH) 和重链恒定区组成。重链恒定区由 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每条轻链由轻链可变区 (本文简称为 LCVR 或 VL) 和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。VH 和 VL 区还可再分成超变区,称为互补决定区 (CDR),其散布在更保守的称为构架区 (FR) 的区域内。每个 VH 和 VL 由 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成,按以下顺序从氨基端到羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。抗体可呈不同同种型的形式;例如 IgG (例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgGA1、IgA2、IgD 和 IgE。全长抗体通常是二价的 (bi-valent/di-valent),即它具有以两个“臂”与抗原结合的能力。相比之下,本发明的单价抗体只包含一个对抗原 /DR3 有特异

性的结合部位。

[0054] “Fab 区”/“Fab 结构域”/“Fab 片段”/“Fab”含有界定抗体可结合的特定靶的可变部分。Fab 片段是本发明的单特异性 / 单价 DR3 配体 / DR3 抗体的实例。

[0055] 本发明的单价 DR3 配体 / 抗体的实例包括：Fab 片段，由 VL、VH、CL 和 CH I 结构域组成的单价片段；二价片段，其包含例如通过铰链区的二硫桥连接的两个 Fab 片段，其中这些 Fab 片段中仅一个对 DR3 有特异性；(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段，(v) dAb 片段 (Ward 等 (1989) Nature 341:544-546)，其由 VH 结构域组成；(vi) 分离的互补决定区 (CDR)；和 (v) 对 DR3 是单价的双特异性抗体。此外，虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由不同的基因编码，但可采用重组方法通过使之能够作为单一蛋白质链制备的合成接头将它们连接，其中 VL 区和 VH 区配对形成单价分子（称为单链 Fv (scFv)；参见例如 Bird 等 (1988) Science 242:423-426；以及 Huston 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。单链抗体的其它形式（例如双抗体）也包括在术语“单价 DR3 配体 / 抗体”内。

[0056] “双抗体”是二价双特异性抗体，其中 VH 和 VL 结构域在单一多肽链上表达，但使用太短以致于不允许同一链上的两个结构域间配对的接头，从而迫使结构域与另一链的互补结构域配对，并产生两个抗原结合部位（参见例如 Hol-liger, P. 等 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448；Poljak, R. J. 等 (1994) Structure 2:1121-1123)。

[0057] 本文所用术语“人抗体”意指具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的本发明的单价 DR3 抗体。本发明的人抗体可例如在 CDR 中，特别在 CDR3 中包括非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如通过体外随机诱变或位点专一诱变或通过体内体细胞突变引入的突变）。

[0058] 然而，本文所用术语“人抗体”无意包括这样的抗体，其中来源于另一种哺乳动物物种（例如小鼠）种系的 CDR 序列被移植到人构架序列中，例如所谓的“人源化抗体”或人 / 小鼠嵌合抗体。人源化单价 DR3 抗体也是本发明的组成部分。

[0059] 术语“嵌合单价抗体”是指本发明的单价 DR3 抗体，其轻链和重链基因通常通过遗传工程从属于不同物种的免疫球蛋白可变区和恒定区基因构建。例如，可将来自小鼠单克隆抗体的基因的可变区段与人恒定区段连接。

[0060] 本文所用术语“表位”意指单价抗体与之结合的抗原上的任何抗原决定簇。表位决定簇通常由分子（例如氨基酸或糖部分）的化学活性表面群聚组成，常常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。用于表征表位的方法的实例包括 HX-MS、NMR、X 射线、肽步查 (peptide walking)、测定法等。术语“抗原互补位”是指识别抗原的抗体的部分。

[0061] 可根据它们识别或特异性结合的 DR3 的一个或多个表位或部分，来描述或指定本发明的单价 DR3 抗体。例如可通过 N 端和 C 端位置，或通过连续氨基酸残基的大小来指定一个或多个表位或多肽部分。还可根据其交叉反应性来描述或指定本发明的单价 DR3 抗体。本文包括不结合多肽的任何其它类似物、直向同源物 (ortholog) 或同源物的抗体。

[0062] “表位框并法 (epitope binning)”/“竞争结合测定法”是指利用竞争结合测定法鉴定能够或不能够同时结合 DR3 的配体 / 抗体对，从而鉴定结合 DR3 蛋白上的相同表位或重叠表位（参见实施例 10），或因位阻所致不能同时结合的本发明的配体 / 抗体。框并法 (Binning) 实验提供存在抗原上完全不同的表位的证据。然而，靠它们自身，它们无法鉴定

表位或对表位“作图”至 DR3 蛋白的特定氨基酸序列或位置。可针对任何配体 / 抗体或片段对,对结合的竞争进行评价。通常,配体 / 抗体家族 (或框 (bin)) 的有利性质可与由抗体框 / 竞争基团界定的特定表位的结合相关联。

[0063] 本文所用术语“免疫反应”或“免疫反应性”意指解离常数 K_d 低于 10^{-4} M 的配体 / 抗体与其表位的任何结合。适当时,术语“免疫反应”或“免疫反应性”与术语“特异性结合”互换使用。

[0064] 本文所用术语“亲和力”意指本发明的配体 / 抗体与表位结合的程度。抗体 / 配体的亲和力用解离常数 K_d 测量,解离常数定义为 $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$,其中 $[Ab-Ag]$ 是抗体 - 抗原复合物的摩尔浓度, $[Ab]$ 是未结合抗体的摩尔浓度, $[Ag]$ 是未结合抗原的摩尔浓度。亲和常数 K_a 用 $1/K_d$ 定义。通过竞争抑制确定抗体特异性和亲和力的优选方法可参见 Harlow 等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988); Colligan 等主编, *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993); 以及 Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983)。

[0065] 可按本文所述,测量“降低 RA 患者滑液细胞中的 IFN- γ 释放”。要了解,在约 0.1、0.5、1 或 5 μ g 单价抗体 /ml 的浓度下,采用本文描述的测定条件,RA 患者滑液 T 细胞中的 IFN- γ 释放降低达至少 15%、更优选达至少 20%、更优选达至少 25%、更优选达至少 30%、更优选达至少 35%、更优选达至少 40%、更优选达至少 45%、更优选达至少 50%、最优选达至少 60%、更优选达至少 70%、更优选达至少 75%、更优选达至少 80%、最优选达至少 95%。在反应性患者材料中,本发明的抗体降低 RA 以及 CD 患者材料中的干扰素释放 (例如 IFN- γ)。

[0066] 可按本文所述,测量“降低来自 CD 患者肠活检样品的固有层单核细胞 (LPMC) 中一种或多种细胞因子的释放”。要了解,在约 0.1、0.5、1 或 5 μ g 单价抗体 /ml 的浓度下,采用本文描述的测定条件,CD 患者 LPMC 中的细胞因子释放降低达至少 15%、更优选达至少 20%、更优选达至少 25%、更优选达至少 30%、更优选达至少 35%、更优选达至少 40%、更优选达至少 45%、更优选达至少 50%、最优选达至少 60%、更优选达至少 70%、更优选达至少 75%、更优选达至少 80%、最优选达至少 95%。在反应性患者材料中,本发明的抗体降低 RA 以及 CD 患者材料中的干扰素释放 (例如 IFN- γ)。

[0067] 可按本文所述,测量“降低 $CD4^+$ T 细胞中一种或多种细胞因子的释放”。要了解,在约 0.1、0.16、0.5、1 或 5 μ g 单价抗体 /ml 的浓度下,采用本文描述的测定条件, $CD4^+$ T 细胞中的细胞因子释放降低达至少 15%、更优选达至少 20%、更优选达至少 25%、更优选达至少 30%、更优选达至少 35%、更优选达至少 40%、更优选达至少 45%、更优选达至少 50%、最优选达至少 60%、更优选达至少 70%、更优选达至少 75%、更优选达至少 80%、最优选达至少 95%。

[0068] 包含本发明的 DR3 配体的“药物组合物”可以药盒提供,药盒装有包括本发明的配体的容器。治疗性多肽可以用于单剂量或多剂量的注射溶液的形式提供,或作为可在注射前复溶的无菌粉针剂提供。包含本发明配体的药物组合物适于皮下和 / 或 IV 给药。本发明的药物组合物可包含一种或多种药学上可接受的载体。

[0069] 本文所用术语“治疗”是指有需要的任何人或其它动物受试者的药物疗法。预期医学或兽医学从业人员已对所述受试者进行了身体检查,所述从业人员给出了表明采用所述具体治疗有益于所述人或其它动物受试者的健康的试验性或决定性诊断。根据受试者的

健康现状,所述治疗的时机和目的可在一个个体与另一个间变化。因此,所述治疗可以是预防性的、治标性的、针对症状的和 / 或治疗性的。

[0070] 就本发明而言,预防性、治标性、针对症状的和 / 或治疗性治疗可代表本发明的各个方面。

[0071] 本发明的配体可连同其它药物(例如甲氨蝶呤、地塞米松和泼尼松)和 / 或其它生物药物一起给予。

[0072] 单价 DR3 抗体 / 配体可用重组技术产生。通常将编码本发明的单价 DR3 抗体 / 配体的 DNA 序列插入重组载体。载体优选为表达载体,其中 DNA 序列与 DNA 转录所需要的额外区段以及能够指导克隆基因或 cDNA 在所需宿主细胞中转录的启动子有效连接。

[0073] 在细胞摄取 DNA 后,使它们在合适的生长培养基中生长,通常为 1-2 天,以开始表达目标基因。向其中导入编码单价 DR3 抗体 / 配体的 DNA 序列的宿主细胞可以是任何细胞,包括酵母、真菌、细菌和高级真核细胞。用于本发明的哺乳动物细胞系的实例为 COS-1、幼仓鼠肾 (BHK) 和 293。优选的 BHK 细胞系为 tk-ts13 BHK 细胞系,其可称为 BHK 570 细胞。另外,本发明内可使用多种其它细胞系,包括大鼠 Hep I、大鼠 Hep II、TCMK、NCTC 1469、CHO 和 DUKX 细胞。

[0074] 然后在允许单价 DR3 抗体 / 配体表达的条件下,将上述转化或转染的宿主细胞在合适的营养培养基中培养,之后可从培养物中回收所得肽的全部或部分。然后可通过常规方法(包括通过离心或过滤从培养基中分离宿主细胞;通过盐(例如硫酸铵)沉淀上清液或滤液的蛋白质性组分;根据所述多肽的类型,通过多种层析法(例如离子交换层析法、凝胶过滤层析法、亲和层析法等)纯化),从培养基中回收由细胞产生的单价 DR3 抗体 / 配体。

[0075] 可采用转基因动物技术以产生本发明的单价 DR3 抗体 / 配体。优选在宿主雌性哺乳动物(优选绵羊、山羊或牛)乳腺内产生蛋白质。也可采用在转基因植物中的产生。表达可定向于特定器官,例如结节。

[0076] 还可在上述产生的二价抗体的基础上获得单价 DR3 抗体,随后进行肽酶消化和所得 Fab 片段的分离。

[0077] 随后可对单价 DR3 抗体 / 配体进行翻译后修饰以获得体内循环半寿期延长的蛋白质。

[0078] 实施方案列表:

以下是本发明实施方案的列表。该实施方案列表并非限制性的,要了解本发明包括下列实施方案的任何组合。

[0079] 实施方案 1:一种单价拮抗性 DR3 抗体,其中所述单价抗体阻断 DR3 与 TL1A 结合,其中呈其二价形式的所述单价抗体是阻断 DR3 与 TL1A 结合的激动性抗体。

[0080] 实施方案 2:实施方案 1 的单价抗体,其中所述单价抗体不是具有 W02011106707 所示 11H08 抗体的 CDR 序列 (SEQ ID NO 14-15) 的抗体。

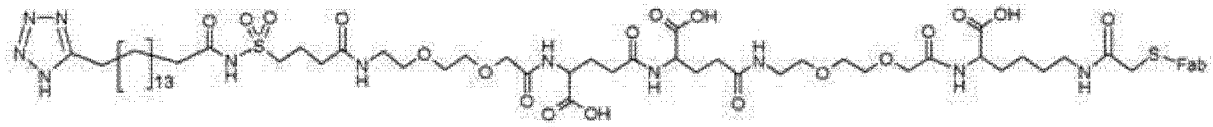
[0081] 实施方案 3:实施方案 1-2 中任一个的单价抗体,其中所述单价抗体与亲脂部分缀合。

[0082] 实施方案 4:实施方案 3 的单价抗体,其中所述亲脂部分包含 $-(CH_2)_n-CO-$ 脂肪酰基,其中 n 为 16-18。

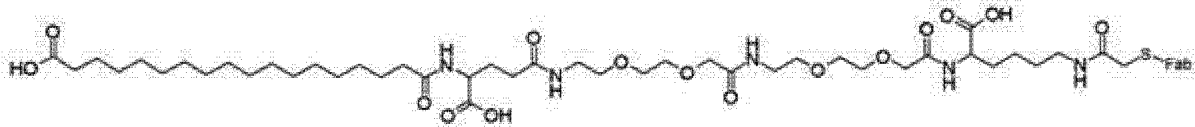
[0083] 实施方案 5:实施方案 3 的单价抗体,其中所述亲脂部分包含 $-(CH_2)_n-CO-$ 脂肪酰

基,其中 n 为 15。

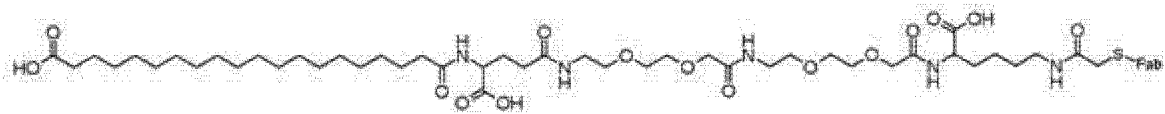
[0084] 实施方案 6: 实施方案 3-5 中任一个的单价抗体,其中所述抗体与选自以下式 (I)、(II)、(III)、(IV)、(V) 和 (VI) 的亲脂部分缀合:



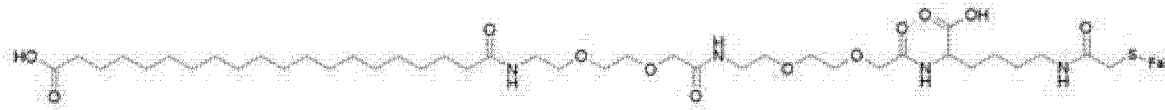
(I)



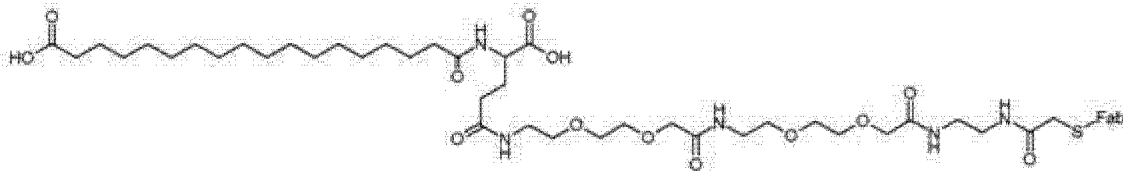
(II)



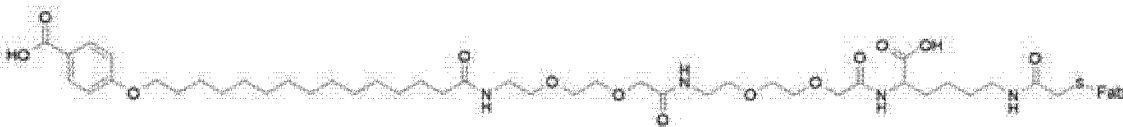
(III)



(IV)



(V)



(VI)

实施方案 7: 实施方案 3-6 中任一个的单价抗体,其中所述亲脂部分通过亲水间隔基与抗体重链中的天然存在的半胱氨酸残基、优选 C239 (Kabat 编号) 半胱氨酸残基连接。

[0085] 实施方案 8: 前述实施方案中任一个的单价抗体,其中所述抗体与 DR3 上的表位结合,其中所述表位包含 SEQ ID NO 1 的 I43 和 / 或 L45。

[0086] 实施方案 9: 前述实施方案中任一个的单价抗体,其中所述抗体与 DR3 上的表位结合,其中所述表位包含 SEQ ID NO 1 所示氨基酸 G37-L45 的至少一个和氨基酸 L57-A59 的至少一个。

[0087] 实施方案 10: 实施方案 9 的单价抗体,其中所述表位包含 SEQ ID NO 1 所示的氨基酸 G37-L45 和氨基酸 L57-A59。

[0088] 实施方案 11: 前述实施方案中任一个的单价抗体,其中所述配体是 Fab 片段。

[0089] 实施方案 12: 前述实施方案中任一个的单价抗体,其中所述单价抗体以低于 1 nM

的解离常数结合 DR3。

[0090] 实施方案 13 : 实施方案 12 的单价抗体, 其中所述单价抗体以低于 500 pM、优选低于 300 pM、优选低于 100 pM、最优选低于 30 pM 的解离常数结合 DR3。

[0091] 实施方案 14 : 前述实施方案中任一个的单价抗体, 其中所述抗体与人 DR3 的 CRD1 结构域结合。

[0092] 实施方案 15 : 一种单价抗体, 或者二价抗体, 其包含 SEQ ID NO 16 所示的 3 个 CDR 序列和 SEQ ID NO 17 所示的 3 个 CDR 序列。在另一个实施方案中, 本发明的单价抗体包含 SEQ ID NO 10 所示的 3 个 CDR 序列和 SEQ ID NO 11 所示的 3 个 CDR 序列。

[0093] 实施方案 16 : 一种单价抗体或者二价抗体, 其中所述抗体包含人构架、SEQ ID NO 16 所示 CDR3 序列和 SEQ ID NO 17 所示 CDR3 序列以及重链中的“S49A”回复突变。

[0094] 实施方案 17 : 实施方案 16 的单价抗体, 其中所述抗体包含 SEQ ID NO 16 所示的 3 个 CDR 序列和 SEQ ID NO 17 所示的 3 个 CDR 序列。在另一个实施方案中, 本发明的单价抗体包含分别由 SEQ ID NO 16 和 17 所示的重链和轻链。

[0095] 实施方案 18 : 实施方案 15-17 中任一个的单价抗体, 其中所述抗体是 IgG4 同种型。

[0096] 实施方案 19 : 前述实施方案中任一个的单价抗体, 其中所述抗体与单价抗体“0228”竞争结合人 DR3, 其中 0228 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 16 所示, 0228 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 17 所示。在另一个实施方案中, 抗体与 0228 抗体结合相同的表位。

[0097] 实施方案 20 : 实施方案 1-14 中任一个的单价抗体, 其中所述抗体包含 SEQ ID NO 12 所示的 3 个 CDR 序列和 SEQ ID NO 13 所示的 3 个 CDR 序列。

[0098] 实施方案 21 : 本发明的单价抗体, 其中所述抗体与单价抗体 0124 竞争结合人 DR3, 其中 0124 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 12 所示, 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 13 所示。在另一个实施方案中, 抗体与 0124 抗体结合相同的表位。

[0099] 实施方案 22 : 一种单价抗体或者二价抗体, 其中所述抗体包含 SEQ ID NO 18 所示的 3 个 CDR 序列和 SEQ ID NO 19 所示的 3 个 CDR 序列。

[0100] 实施方案 23 : 本发明的单价抗体, 其中所述抗体与单价抗体 0130 竞争结合人 DR3, 其中 0130 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 18 所示, 0130 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 19 所示。在另一个实施方案中, 抗体与 0130 抗体结合相同的表位。

[0101] 实施方案 24 : 一种单价抗体或者二价抗体, 其中所述抗体包含 SEQ ID NO 20 所示的 3 个 CDR 序列和 SEQ ID NO 21 所示的 3 个 CDR 序列。(0143)。

[0102] 实施方案 25 : 本发明的单价抗体, 其中所述抗体与单价抗体 0143 竞争结合人 DR3, 其中 0143 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 20 所示, 0143 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 21 所示。在另一个实施方案中, 所述抗体与 0143 抗体结合相同的表位。

[0103] 实施方案 26 : 一种单价抗体或者二价抗体, 其中所述抗体包含 SEQ ID NO 22 所示的 3 个 CDR 序列和 SEQ ID NO 23 所示的 3 个 CDR 序列。(0152)。

[0104] 实施方案 27 : 本发明的单价抗体, 其中所述抗体与单价抗体 0152 竞争结合人 DR3, 其中 0152 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 22 所示, 0152 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 23 所示。在另一个实施方案中, 所述抗体与 0152 抗体结合相同的表位。

[0105] 实施方案 28 : 本发明的单价抗体, 其中所述抗体降低 RA 患者滑液细胞中的 IFN- γ

释放,其中所述滑液细胞用 TL1A 共刺激。优选细胞是 IL-12/IL-18 活化的。

[0106] 实施方案 29:本发明的单价抗体,其中所述抗体降低 CD 患者肠活检样品固有层单核细胞 (LPMC) 的一种或多种细胞因子的释放,其中所述细胞因子选自:IL-6、TNF- α 、GM-CSF 和 IFN- γ ,且其中所述 LPMC 用 TL1A、IL-12 和 IL-18 共刺激。优选细胞是 IL-12/IL-18 活化的。

[0107] 实施方案 30:本发明的单价抗体,其中所述抗体降低 CD4⁺ T 细胞中一种或多种细胞因子的释放,其中所述细胞因子选自:TNF- α 、IL-6、GM-CSF 和 IFN- γ ,且其中所述 T 细胞用 TL1A 共刺激。优选细胞是 IL-12/IL-18 活化的。

[0108] 实施方案 31:前述实施方案中任一个的单价抗体,其中所述抗体是 IgG4 型抗体。

[0109] 实施方案 32:前述实施方案中任一个的单价抗体,其中所述抗体与选自以下一种或多种的一个或多个半寿期延长部分缀合:脂肪酸及其衍生物、羟乙基淀粉 (HES)、聚乙二醇 (PEG)、透明质酸 (HA)、heparosan 聚合物、基于磷酸胆碱的聚合物、fleximer、葡聚糖、多聚唾液酸 (PSA)、Fc 结构域、运铁蛋白、白蛋白、弹性蛋白样肽、XTEN 聚合物、白蛋白结合肽及其任何组合。由此得出结论,本发明的单价抗体可与两种或更多种不同类型的半寿期延长部分缀合。

[0110] 实施方案 33:本发明的单价抗体,其中所述单价抗体包含效应子功能降低的 Fc 结构域或稳定性提高的 Fc 结构域。优选 Fc 结构域是包含 1、2、3、4 个或所有下列突变的 IgG1 Fc 结构域:L234A、L235E、G237A、A330S 和 P331S)。或者,Fc 结构域可以是优选包含 S241P/S228P 突变的 IgG4 Fc 结构域。

[0111] 实施方案 34:本发明的单价抗体,其中所述单价抗体通过聚糖、优选通过唾液酸与半寿期延长部分缀合。

[0112] 实施方案 35:本发明的单价抗体,其中所述抗体是人抗体。

[0113] 实施方案 36:本发明的单价抗体,其中所述抗体是人源化抗体。

[0114] 实施方案 37:本发明的单价抗体,其中所述抗体阻断一个或多个 DR3 配体的结合。似乎可能的是 DR3 与 TL1A 以外的其它配体结合。然而,尚未鉴定出这类配体。

[0115] 实施方案 38:本发明的单价抗体(优选包含与 27F16A1 抗体基本相同的抗原互补位),其中所述抗体包含 SEQ ID NO 8 中的 CDR 序列的至少一个和 SEQ ID NO 9 所示 CDR 序列的至少一个。优选所述抗体包含 SEQ ID NO 8 所示 CDR 序列的 2 个和 SEQ ID NO 9 所示 CDR 序列的 1 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 8 所示 CDR 序列的 3 个和 SEQ ID NO 9 所示 CDR 序列的 1 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 8 所示 CDR 序列的至少一个和 SEQ ID NO 9 所示 CDR 序列的 2 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 8 所示 CDR 序列的至少一个和 SEQ ID NO 9 所示 CDR 序列的 3 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 8 所示 CDR 序列的 1 个和 SEQ ID NO 9 所示 CDR 序列的 1 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 8 所示 CDR 序列的 2 个和 SEQ ID NO 9 所示 CDR 序列的 2 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 8 所示 CDR 序列的 3 个和 SEQ ID NO 9 所示 CDR 序列的 3 个。本发明的这类抗体的任一种可包含这类 CDR 序列的 1、2、3、4、5 或 6 个,其中该 CDR 序列或这些 CDR 序列的一个或两个氨基酸已缺失或添加,或突变成不同的氨基酸残基——因此导致与 SEQ ID NO 8 和 SEQ ID NO 9 所示 CDR 序列相比,在一个或多个位置上不同的一个或多个 CDR 序列。

[0116] 实施方案 39:本发明的单价抗体,其中所述抗体与单价抗体 27F16A1 竞争结合人

DR3,其中 27F16A1 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 8 所示,27F16A1 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 9 所示。在另一个实施方案中,本发明涉及与 27F16A1 抗体结合相同表位的抗体。

[0117] 实施方案 40:本发明的单价抗体(优选包含与 27F44A2 抗体基本相同的抗原互补位),其中所述抗体包含 SEQ ID NO 10 中 CDR 序列的至少一个和 SEQ ID NO 11 所示 CDR 序列的至少一个。优选所述抗体包含 SEQ ID NO 10 所示 CDR 序列的 2 个和 SEQ ID NO 11 所示 CDR 序列的 1 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 10 所示 CDR 序列的 3 个和 SEQ ID NO 11 所示 CDR 序列的 1 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 10 所示 CDR 序列的至少一个和 SEQ ID NO 11 所示 CDR 序列的 2 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 10 所示 CDR 序列的至少一个和 SEQ ID NO 11 所示的 3 个 CDR 序列。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 10 所示 CDR 序列的 1 个和 SEQ ID NO 11 所示 CDR 序列的 1 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 10 所示 CDR 序列的 2 个和 SEQ ID NO 11 所示 CDR 序列的 2 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 10 所示 CDR 序列的 3 个和 SEQ ID NO 11 所示 CDR 序列的 3 个。本发明的这类抗体的任一种可包含这类 CDR 序列的 1、2、3、4、5 或 6 个,其中该 CDR 序列或这些 CDR 序列的一个或两个氨基酸已缺失或添加,或突变成不同的氨基酸残基——因此导致与 SEQ ID NO 10 和 SEQ ID NO 11 所示 CDR 序列相比,在一个或多个位置上不同的一个或多个 CDR 序列。

[0118] 实施方案 41:本发明的单价抗体,其中所述抗体与单价抗体 27F44A2 竞争结合人 DR3,其中 27F44A2 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 10 所示,轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 11 所示。在另一个实施方案中,本发明的抗体与 27F44A2 抗体结合相同的表位。

[0119] 实施方案 42:本发明的单价抗体(优选包含与 28F26A3 抗体基本相同的抗原互补位),其中所述抗体包含 SEQ ID NO 12 中 CDR 序列的至少一个和 SEQ ID NO 13 所示 CDR 序列的至少一个。优选所述抗体包含 SEQ ID NO 12 所示 CDR 序列的 2 个和 SEQ ID NO 13 所示 CDR 序列的 1 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 12 所示 CDR 序列的 3 个和 SEQ ID NO 13 所示 CDR 序列的 1 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 12 所示 CDR 序列的至少一个和 SEQ ID NO 13 所示 CDR 序列的 2 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 12 所示 CDR 序列的至少一个和 SEQ ID NO 13 所示的 3 个 CDR 序列。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 12 所示 CDR 序列的 1 个和 SEQ ID NO 13 所示 CDR 序列的 1 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 12 所示 CDR 序列的 2 个和 SEQ ID NO 13 所示 CDR 序列的 2 个。更优选所述抗体包含 SEQ ID NO 12 所示 CDR 序列的 3 个和 SEQ ID NO 13 所示 CDR 序列的 3 个。本发明的这类抗体的任一种可包含这类 CDR 序列的 1、2、3、4、5 或 6 个,其中该 CDR 序列或这些 CDR 序列的一个或两个氨基酸——因此导致与 SEQ ID NO 12 和 SEQ ID NO 13 所示 CDR 序列相比,在一个或多个位置上不同的一个或多个 CDR 序列。

[0120] 实施方案 43:本发明的单价抗体,其中所述抗体与单价抗体 28F26A3 竞争结合人 DR3,其中 28F26A3 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 12 所示,28F26A3 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO 13 所示。在另一个实施方案中,抗体与 28F26A3 抗体结合相同的表位。

[0121] 实施方案 44:一种编码本发明的单价抗体或配体的 DNA 分子。

[0122] 实施方案 45:一种表达载体,其包含实施方案 44 的 DNA 分子。

[0123] 实施方案 46:一种宿主细胞,其包含实施方案 45 的表达载体或实施方案 44 的 DNA 分子。

[0124] 实施方案 47 :一种用于制备本发明的配体或抗体的方法,其中所述方法包括实施方案 46 的宿主细胞的温育。

[0125] 实施方案 48 :一种药物组合物,其包含本发明的化合物。所述组合物任选包含至少一种药学上可接受的载体 / 赋形剂。

[0126] 实施方案 49 :本发明的配体或本发明的药物组合物作为药物的用途。

[0127] 实施方案 50 :用于治疗炎性疾病的本发明的配体或本发明的药物组合物的用途。

[0128] 实施方案 51 :用于治疗 RA 的本发明的配体或本发明的药物组合物的用途。

[0129] 实施方案 52 :用于治疗克罗恩病 (CD) 的本发明的配体或本发明的药物组合物的用途。

[0130] 实施方案 53 :用于治疗溃疡性结肠炎 (UC) 的本发明的配体或本发明的药物组合物的用途。

[0131] 实施方案 54 :一种治疗炎性疾病的方法,其中所述方法包括将本发明的配体或本发明的药物组合物给予有需要的人。炎性疾病优选为 RA、克罗恩病或溃疡性结肠炎。

[0132] 虽然本文举例说明和描述了本发明的某些特征,但是本领域普通技术人员可以马上想起许多修改、取代、变化和等同内容。因此要了解,随附权利要求书欲涵盖落入本发明真实精神内的所有这类修改和变化。

实施例

[0133] 实施例 1

免疫和杂交瘤产生

如下列实施例所述,由于该蛋白质富含半胱氨酸的性质,因此难以产生高品质的可溶形式的全长 DR3。DR3 的可溶形式趋于高度聚集,这可能导致屏蔽重要的配体结合区,使之在免疫时难以产生所需要的抗体应答。使用可溶性全长 DR3 蛋白、仅含 DR3 的 ECD 的部分 (像例如仅用 CRD1 结构域免疫) 的 DR3 蛋白衍生物两者和 DR3 表达细胞 (如实施例 3 所述) 用于免疫,进行了全面的免疫方案以获得稳固的抗 DR3 抗体 (Ab) 血清效价。免疫在不同的小鼠品系 (BALB/C、RBF 和 NMRCF1) 中进行,以提高抗体库多样性和产生中和性抗 DR3 Ab 的可能性。在一个实例中,在有或没有不完全弗氏佐剂 (IFA) 的情况下,用 5×10^6 DR3 表达 CHO 细胞腹膜内 (IP) 给 BALB/C 小鼠免疫 8 次,接着用含纯化的 hDR3-Fc (参见实施例 3) 的 IFA IP 免疫 6 次。按实施例 4 所述,通过 FACS,针对 DR3/hTL1A 封闭性抗体,对小鼠血清进行筛选。具有 DR3/hTL1A 封闭性 Ab 效价的小鼠接受最终的加强免疫,加强免疫由使用 DR3-mFc 在尾静脉中的单次静脉内注射 (i. v.) 组成。加强免疫后 3 天,处死小鼠,通过标准电融合方法,使脾细胞与 X63Ag8653 骨髓瘤细胞融合。将融合细胞接种在 96 孔板中,并在补充 FCS (Hyclone) 的 DMEM (Invitrogen) 和 HAT 选择培养基中培养一周,然后筛选 DR3/hTL1A 封闭性 mAb。

[0134] 实施例 2

用于筛选和免疫的细胞

使过量表达跨膜 (TM) DR3 的细胞开发成用于基于细胞的筛选测定法和用于小鼠免疫的基本工具。

[0135] 过量表达 TM DR3 的稳定细胞系的产生并不简单。将包括 TM 和死亡结构域 (DD)

的最初的全长 DR3 (有关完整 AA 序列参见 SEQ ID NO 1) 克隆至 pcDNA3.1 表达载体 (Invitrogen), 使用该载体转染 Ba/F3 细胞。然而, 全长 DR3 中的 DD 导致稳定细胞系的细胞死亡。完全不可能表达具有活性 DD 的全长 DR3。为了使 DR3 中的 DD 钝化, 且仍能够表达跨膜 DR3 蛋白, 设计并开发出两种新的构建体。按照 Itoh 和 Nagata, JBC (268) 第 10932-10937 页, 1993 的 SEQ ID NO 1 中的突变 (L356N), Itoh 和 Nagata 描述了 CD95 的类似突变形式, 其中突变导致受体失活。SEQ ID NO 1 中 DD 的缺失 (Δ M339-P417) 按照 Screaton 等, PNAS (94) 第 4615-4619 页, 1997 来测定。将截短形式和突变形式两者克隆至 pcDNA3.1, 并在 Ba/F3 中表达。这产生过量表达表面 DR3 的两个稳定细胞系。从流式细胞术 (FCM) 分析来看, 发现 DR3 的表达水平在用 DR3 的截短形式开发的细胞系中最高。然而, 表达水平对用于筛选测定法的细胞系而言仍太低。因此决定研究来自 Lonza 的 GS-CHO 系统 (Basel, Switzerland) 是否可用于表达 DR3 的截短形式。将 pcDNA3.1 的编码 cDNA 转移至 Lonza 表达载体 pEE14.4 中。

[0136] 按照 Lonzas 生产商的方案, 建立稳定的 CHOK1SV 细胞。CHOK1SV 细胞通过电穿孔转染。在转染前, 通过用 AcII 限制性内切酶消化, 使 pEE14.4 质粒线性化。通过电穿孔, 使用 10 μ g 的 AcII 消化的 pEE14.4 质粒转染 1×10^7 个 CHOK1SV 细胞。将细胞接种至 T75 培养瓶中。转染后当天, 通过在不含 glutamax (Invitrogen) 的 CD-CHO 培养基中加入 L-甲硫氨酸亚砷亚胺 (MSX) 至 50 μ M 的最终浓度, 开始选择。转染后 3 周, 细胞通过使用 lympholyte-mammal (Cedarlane) 进行纯化, 转移至摇瓶中, 在 37 $^{\circ}$ C、8% CO₂ 和 125 rpm 下的培养箱振荡器中培养。选择压力从该点下降至 25 μ M MSX。通过 FCM 分析 DR3 表达。然而, DR3 表达水平极低, 决定通过荧光激活细胞分选法 (FACS) 分选该库以提高表达水平。FACS 后 4 天, 通过 FCM 针对 DR3 表达对该库进行测试, 首次 DR3 表达良好 (图 2)。遗憾的是, 在 2-3 周后, DR3 表达水平开始降低, 细胞不能再用于筛选。

[0137] 在提高 DR3 水平和使该库更稳定的尝试中, 通过提高至 50 μ M 和 100 μ M 来对 MSX 选择压力进行研究, 另外, 在 4 X 96W 板中用 $\frac{1}{2}$ 细胞 / 孔亚克隆该库。亚克隆产生通过 FCM 分析的具有高 DR3 表达水平的两种克隆。然而 1-3 周后, 克隆开始再次丧失表达并显得不稳定, 因此不能用于筛选。对于该库提高 MSX 选择至 100 μ M 导致极好的高表达水平, 另外这可随时间推移保持高的表达水平 (图 3)。

[0138] 因此, 用于筛选和免疫的所得细胞系是用截短的 DR3 转染并在 CD-CHO + 100 μ M MSX 中培养的 CHOK1SV。

[0139] 实施例 3

可溶性 DR3 的表达和纯化

人 DR3 是极富含半胱氨酸的蛋白质, 在胞外域 (ECD, 残基 25-199) 中包含 4 个富含半胱氨酸的结构域 (CRD1、CRD2、CRD3 和 CRD4), 在胞质结构域中包含“死亡结构域” (DD)。按照 Banner 等, Cell (73) 第 431-445 页, (1993), 各 CRD 通常含有形成 3 个二硫键的 6 个半胱氨酸残基。另外, 各 CRD 可再分成在 TNFR 超家族的常规成员中观察到的组件 A1 和 B2 (J. H. Naismith 等, Trends Biochem. Sci. (23) 第 74-79 页, 1998)。具有预测的 CRD 及组件 A1 和 B2 的 DR3 的序列见图 4。

[0140] 可溶性 DR3 的产生非常困难, 这可能是由于蛋白质的高半胱氨酸含量所致。由于分子间二硫键的形成, 人细胞系中 DR3 的 ECD 的重组表达通常导致含有大量寡聚体和高分

子量复合物的可溶性蛋白质的分泌。这些蛋白质批次不结合 TL1A,且在细胞测定中无活性。
[0141] 采取不同方法解决聚集问题。最初,使 DR3 的完整 ECD (25-199) 与小鼠 IgG1 或人 IgG4 的 Fc 结构融合。在 HEK293 中的瞬时产生导致低的产量 (<10 mg/L) 和高的聚集度。凝胶过滤允许富集预期的二聚体,但是由于低产量和高寡聚度,最初不可能获得纯流分。还测定了其它纯化标签例如生物素化、FLAG- 标签或三聚肽、生腱蛋白 C (TNC),但是未改进结果。

[0142] 另外,对仅含 DR3 ECD 的部分的 DR3-Fc 融合蛋白进行了改造,以确定负责寡聚化的蛋白质的部分。如下设计了 4 种蛋白质:

DR3 (CRD1)-Fc (SEQ ID NO 2)

DR3 (CRD1+ A1)-Fc (SEQ ID NO 3)

DR3 (CRD1+CRD2)-Fc (SEQ ID NO 4)

DR3 (CRD1+CRD2+A1)-Fc (SEQ ID NO 5)

分子间二硫键的形成和由此产生的错折叠与 DR3 ECD 长度增加相关,可能反映出半胱氨酸数增加。同时,蛋白质表达的收率随 DR3 EC 结构域长度增加而降低。对于所有的这些构建体,凝胶过滤允许主要二聚体部分的纯化;然而,蛋白质没有生物活性。除该构建体以外,还制备了多种截短和 cys 缺失构建体,以试图准确找出负责寡聚化的单个半胱氨酸或小区域。然而,无单一区域或特定的半胱氨酸似乎负有责任,整个 DR3 序列似乎难以按可溶性形式表达。

[0143] 另外,产生了谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 与 DR3 的 CRD1 间的融合蛋白,其是同基因的 (SEQ ID NO 6)。

[0144] DR3-Fc (其包含 DR3 的 ECD、含有 TEV 切割位点的接头和人 IgG4 的 Fc 部分),在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中的稳定表达提高表达水平,并允许主要二聚体的蛋白质 (SEQ ID NO 7) 分离。在测量 TL1A 诱导的 DR3 信号转导的报道基因测定法中,该部分可与 TL1A 竞争结合 DR3。

[0145] 使用多种这类蛋白质免疫小鼠。一些蛋白质批次被进一步纯化以分离出少量的非寡聚化 DR3。这些批次被用于表面等离子共振 (SPR) 结合测定法。

[0146] *HEK293 细胞中的瞬时表达*

载体:

通过使用基于 CMV 启动子的表达载体 (pTT 载体),表达了 DR3 蛋白的所有变体。制备 pTT 载体用于在 Yves Durocher (Durocher 等 *Nucleic Acid Research*,2002) 开发的基于 HEK293-6E EBNA 的表达系统中瞬时表达。

[0147] 细胞维持:

使 HEK293-6E 细胞在补充 25 μ g/ml 遗传霉素 (Gibco)、1% v/v 表面活性剂 Pluronic F-68 (Gibco) 和 1% v/v 青霉素-链霉素 (Gibco) 的 FreeStyle™ 293 表达培养基 (Gibco) 中悬浮生长。在振荡培养箱中在 37°C、8% CO₂ 和 125 rpm 下,将细胞在 Erlenmeyer 摇瓶中培养,保持细胞密度介于 0.1-1.5 $\times 10^6$ 个细胞/ml 之间。

[0148] DNA 转染:

- 用于转染的培养物的细胞密度为 0.9-1.1 $\times 10^6$ 细胞/ml。

[0149] • 每 ml 细胞培养物使用 1 μ g DNA。

[0150] • 将 DNA 在 Opti-MEM 培养基 (Gibco) 中稀释成 30 μ l 培养基 / μ g DNA, 混合, 并在室温 (23-25 $^{\circ}$ C) 温育 5 分钟。

[0151] • 浓度为 1 μ l / μ g DNA 的 293Fectin[™] (Invitrogen) 用作转染试剂。

[0152] • 将 293Fectin[™] 在 Opti-MEM 培养基 (Gibco) 中稀释 30X, 混合, 并在室温 (23-25 $^{\circ}$ C) 下温育 5 分钟。

[0153] • 将 DNA 和 293Fectin 溶液混合, 置于室温 (23-25 $^{\circ}$ C) 下温育 25 分钟。

[0154] • 然后将 DNA-293Fectin 混合物直接加入细胞培养物中。

[0155] • 将转染的细胞培养物转移至 37 $^{\circ}$ C、8% CO₂ 和 125 rpm 的振荡培养箱中。

[0156] • 转染后 5-6 天, 通过离心, 接着经 0.22 μ m PES 过滤器 (Corning) 过滤, 来收获细胞培养上清液。

[0157] • 如有可能, 采用 ForteBio Octet 系统和 A 蛋白生物传感器, 通过 Biolayer 干涉测量法, 对蛋白质产生进行定量分析。

[0158] *DR3-Fc 蛋白质的纯化*

将细胞上清液直接上样至具有 A 蛋白亲和珠粒 (MAbelect Sure ;GE Healthcare) 的柱上, 以 20mM Tris/HCl, pH 8.5 为缓冲液。结合的蛋白质用 10 mM、50 mM 和 100 mM 甲酸钠 (pH 3.5) 逐步洗脱。洗脱的流分经浓缩, 通过超滤转移至 PBS 缓冲液。凝胶过滤在 Superdex200 柱 (GE Healthcare) 中进行, 以 PBS 为缓冲液。合并含有二聚体蛋白质的流分, 通过超滤浓缩。所有层析步骤用 Äkta Explorer FPLC 仪器 (GE Healthcare) 进行。

[0159] 实施例 4

阻断 TL1A:DR3 相互作用的抗体的筛选

小鼠血清的预筛选

证明在进行融合前针对阻断作用对小鼠血清进行预筛选是必需的, 因为小鼠在血清中的阻断作用程度上具有极大的差异。

[0160] 小鼠用过表达 DR3 的细胞系和 DR3 蛋白两者免疫。进行了全面的免疫方案, 以获得具有不同抗体库的不同小鼠。与单一抗原免疫不同, 完整细胞免疫包括注射多种抗原。之前已表明, 当使用完整细胞免疫时, 需要更多的免疫优化, 因为不同的免疫方案产生不同的抗体库。针对阻断作用筛选小鼠血清已成为针对融合选择小鼠的重要工具 (图 5)。

[0161] *杂交瘤上清液的筛选*

为了选出具有阻断 TL1A 结合的能力的针对 DR3 的抗体, 筛选计划如下:

作为 DR3 特异性抗体的初步试验, 建立了基于高通量成像的测定法。这通过针对结合 DR3 转染的 CHO 细胞的能力进行筛选和针对野生型细胞进行反筛选在 FMAT 系统中进行 (有关 DR3 细胞系的产生参见实施例 2)。

[0162] 通过将 50 μ l 细胞制备物 (50000 个细胞 / 孔, 50 μ l) 与 25 μ l 滴定中稀释的单克隆抗体或未稀释的杂交瘤上清液一起在 96 孔板 (Greiner, 目录号 65021) 中标记, 并在 4 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时来进行测定。温育和洗涤 (含 5% 胎牛血清的 PBS 缓冲液, 在 200g 下离心 5 分钟) 后, 每孔加入 50 μ l 第二抗体 (在 PBS 缓冲液中 1:400 稀释), 在 4 $^{\circ}$ C 下另温育 1 小时。当从 RBF 小鼠或 Balb/c 小鼠 Jacksons # 115-136-071 1:400 筛选时, 使用 APC 抗小鼠。

[0163] 最后, 细胞经洗涤, 并转移到黑色 FMAT 板中, 在测量荧光的 PerkinElmer Envision

Turbo (FMAT) 上读数。

[0164] 初始筛选的下一部分是测定阻断 DR3 配体 (TL1A) 结合的能力。这通过针对阻断 TL1A-flag 标签结合 DR3 转染细胞的能力筛选阳性杂交瘤上清液,而在选定的 DR3 特异性杂交瘤上清液中进行。作为对照,使用未转染细胞无关抗体或上清液。

[0165] 通过将 50 μ l 在滴定中稀释的单克隆抗体或未稀释的杂交瘤上清液加入 DR3 阳性细胞 (50000 个细胞 / 孔) 中,并在 4°C 下温育 1 小时,来进行基于 FCM 的抑制测定。在温育和洗涤 (含 5% 胎牛血清的 PBS 缓冲液,在 200g 下离心 5 分钟) 后,将 TL1A-flag 标签 (浓缩,总体积为 50 μ l) 加入 96 孔板 (Greiner, 目录号 65021) 中。再次在温育和洗涤后,加入第二抗体 (APC 抗 FLAG 标签 ab, 得自 Perkin Elmer, 最终浓度 5 μ g/ml) (在 PBS 缓冲液中 1:400 稀释),在 4°C 下另温育 1 小时。

[0166] 平行地,如实施例 5 中所述进行报道基因测定,以检测抗体的激动或拮抗功能性。

[0167] 内部产生的 TL1A 是 TL1A 的成熟胞外域。TL1A 含有 N 端 FLAG-HIS-TEV 标签。在 FACS/FMAT 中,FLAG- 标签用于检测,HIS- 标签用于纯化,而 TEV 位点允许任选的 TEV 切割并除去标签。在大肠杆菌中产生的 TL1A 是市售的,可获自 R&D Systems。内部 TL1A 在 HEK 细胞中产生,含有两个 N \rightarrow Q 点突变以破坏可能的 N-糖基化位点。类似地产生重组猕猴 TL1A。

[0168] 实施例 5

DR3 报道基因测定

Chinnaiyan 等人 1996 (Science 1996 年, 第 274 卷, 第 5289 期第 990-992 页) 报告了 DR3 通过 NF κ B 发出信号,并且当 DR3 在 MCF7 细胞中异位表达时诱导细胞凋亡。我们希望利用 NF κ B 信号转导作为报道分子,并使用降低的 DR3 表达以避免凋亡的细胞。

[0169] HEK293 细胞系用人 DR3 表达质粒和 NF κ B- 萤光素酶报道质粒稳定转染。DR3 表达质粒以 pcDNA3.1 (hygro)+ 为基础,并且含有受 SV40 启动子调节的潮霉素抗性基因,除去 CMV 启动子,插入 2 个热激元件 (HSE),最小 c-fos 启动子和人 DR3 编码序列。报道分子以 pGL3-basic 为基础,Luc+ 反应受 3 个 NF κ B 位点和最小干扰素启动子调节。将受 SV40 启动子调节的新霉素抗性基因插入载体。

[0170] 在 40 ng/ml TL1A (R&D Systems) 刺激时,名为 I5 的 DR3/HEK293 报道基因细胞,在萤光素酶活性方面产生 20-25 倍反应。检测 TL1A、激动抗体和拮抗抗体 / Fab 的作用的方法如下。以 20,000 个细胞 / 孔将 I5 细胞接种在聚 D- 赖氨酸包被的黑色视野 96 孔板中。次日,将 TL1A 或培养基加入各孔中,在 4 小时温育后,使用 Steady-GLO 试剂盒 (Promega),通过 TopCount NXT (Perkin Elmer) 仪器监测发光。为了测定中和作用,将抗体或 Fab 与细胞一起预孵育 15 分钟后,加入 TL1A。

[0171] 对于杂交瘤上清液的筛选,至少一式两份,并使用 0 ng/ml、10 ng/ml TL1A 和 50 ng/ml TL1A,来测定所有样品。

[0172] 实施例 6

阻断 TL1A:DR3 相互作用的抗体和 Fab

鉴定出对 DR3 有特异性且对于阻断 TL1A 与 DR3 相互作用被测定为阳性的单克隆抗体 (mAb)。在至少 50 次融合后,从主要用表达 DR3 的细胞免疫的小鼠中,选出总共几百个特异性 DR3 mAb。针对 TL1A 抑制 / 阻断进一步测定 DR3 特异性克隆得到 74 个克隆。图 6 显示一些阻断 DR3 抗体的阳性抗体。还包括 2 个没有这种阻断作用的阳性 DR3 特异性克隆。

[0173] 选出所有 mAb 以及 mAb 的 Fab 形式用于进一步的研究。表 1 概括了所进行的研究，并提供 mAb 和 Fab 编号与杂交瘤克隆编号间的关联性。

[0174] 表 1. 选择用于进一步研究的 mAb 和 Fab 列表及 mAb 和 Fab 编号与杂交瘤克隆编号间的关联性。

化合物	形式	制备来源	克隆名称	序列 (参见 实施例 9)	报道基因测 定(参见实施 例 7)	阻断 TL1A 与 DR3 结合 (参见实施例 6)	TL1A 诱导的 CD4+ T-细胞增 殖测定 (参见实施例 8)
0070	mAb	杂交瘤上清液	27F16A1	+	激动性	是	n. d.
0071	mAb	杂交瘤上清液	27F38	n. d.	弱激动性	否	n. d.
0072	mAb	杂交瘤上清液	27F44A2	+	激动性	是	参见实施例 8
0073	mAb	杂交瘤上清液	28F26A3	+	激动性	是	参见实施例 8
0074	mAb	杂交瘤上清液	28F69	n. d.	弱激动性	否	n. d.
0075	mAb	杂交瘤上清液	29F6	n. d.	弱激动性	否	n. d.
0076	mAb	杂交瘤上清液	29F8	n. d.	激动性	是	n. d.
0077	mAb	杂交瘤上清液	30F1	n. d.	弱激动性	否	参见实施例 8
0087	Fab	木瓜蛋白酶剪切的 mAb 0072	n. a.	+	拮抗性	是	参见实施例 8
0088	Fab	木瓜蛋白酶剪切的 mAb 0073	n. a.	+	拮抗性	是	参见实施例 8
0089	Fab	木瓜蛋白酶剪切的 mAb 0076	n. a.	n. d.	拮抗性	是	n. d.
0091	Fab	木瓜蛋白酶剪切的 mAb 0077	n. a.	n. d.	无作用	否	参见实施例 8

n. a.: 不适用

n. d.: 未测定

[0175] 发现抗体 0072、0073 和 0076 以剂量依赖性方式阻断 TL1A:DR3 相互作用。相应的 Fab 分子 (0087、0088 和 0089) 也以剂量依赖性方式保持这种能力 (图 7)。相对地, 来源于不能够抑制 TL1A:DR3 相互作用的 DR3 结合 mAb 的 Fab, 也不具有这种能力 (化合物 0077 和 0091, 图 7)。

[0176] 表 2 显示 Fab 特征的实例: 我们针对结合、阻断 TL1A-DR3 相互作用的能力、TL1A 诱导的 T 细胞活化、结合共表征了 46 种 Fab (其它实施例中更有详尽的资料)。表中显示

了多种选定的 Fab 以及对照：

表 2 :Fab 特征

抑制测定		针对置换/阻断 TL1A 与 hDR3 表达 CHO 细胞的结合所测的 Fab		
Fab ID	Fab 的形式	以 IC50 值(nM)和最大百分比抑制显示的 TL1A 结合的阻断/置换。		
		n:	IC50 nM	%抑制
00228	IgG4-Cys, hz	1	0.484	78
00123	IgG4-Ser, 嵌合	8	0.443	80
00124	IgG4-Ser, 嵌合	4	1.297	79
00130	鼠 Fab	2	1.340	73
00143	IgG4-Ser, 嵌合	2	0.120	76
00152	IgG4-Ser, 嵌合	1	0.512	53
00231	IgG4-Ser, hz	1	24.680	81
00158	IgG4-Ser, hz	11	No inhib	10
00148	IgG4-Ser, 嵌合	2	9.221	33
00163	IgG4-Ser, 嵌合	2	No inhib	12
00122	IgG4-Ser, 嵌合	2	5.114	33

n: 测定次数, No inhib: 未观察到抑制。

实施例 7

DR3 抗体和衍生 Fab 的功能作用

针对 DR3 产生和针对 TL1A 与 DR3 相互作用的阻断测定为阳性的单克隆抗体 (mAb) 是 DR3 信号转导的潜在中和剂。

[0177] 将人 DR3 报道基因细胞系与抗体一起温育 15 分钟,接着用 TL1A 刺激或加入培养基。抗体的确仅在极高浓度下具有 TL1A 作用的适度中和作用,相比之下它们本身在较低剂量下是有效的激活剂。

[0178] 表 3 显示 0072 抗体的作用。在不加入 TL1A 时 0072 的活化图是钟形的,表明二价抗体通过交叉结合受体而激活 DR3。活化增强直到某种浓度,然后其降低 DR3 活化,包括 TL1A 介导的活化。在较高的抗体浓度下,所有抗原互补位不再被受体占据,但是抗体仍阻断 TL1A 结合和活化,并且观察到抑制作用。TL1A 特异性抗体 MAB7441 (R&D Systems) 包括在内以强调 DR3 的活化是 TL1A 特异性的。

[0179] 表 3 :

	培养基	2.5 微克/ ml MAb7441	0.00025 6 微克/ ml -0072	0.00128 微克/ ml -0072	0.0064 微克/ ml -0072	0.032 微克/ ml -0072	0.08 微 克/ml -0072	4 微克/ ml -0072	20 微克/ ml -0072	100 微克/ ml -0072
反应 倍数	1	1.1	1.1	2.2	9.3	18.6	25.1	21.1	16.3	9.2
	40 ng/ml TL1A	TL1A+ 2.5 微克/ ml MAb7441	TL1A+ 0.00025 6 微克/ ml -0072	TL1A+ 0.00128 微克/ ml -0072	TL1A+ 0.0064 微克/ ml -0072	TL1A+ 0.032 微克/ ml -0072	TL1A+ 0.08 微 克/ml -0072	TL1A+ 4 微克/ ml -0072	TL1A+ 20 微克/ ml -0072	TL1A+ 100 微克/ ml -0072
反应 倍数	32.8	3.7	33.8	37.2	40.3	41.0	38.4	34.0	27.8	18.4

根据这些数据,我们假设对 DR3 具有亲和力的单价抗体,例如 Fab (片段 ab),可能不会使受体群聚,但仍可抑制 TL1A 结合。用木瓜蛋白酶切割抗体,纯化出 Fab 片段。在人 DR3 报道分子测定中,测定了 Fab 片段抑制 DR3 的 TL1A 活化的能力。测定了来自 4 种不同 DR3 抗体的 Fab 片段,其中 3 种 (0072、0073 和 0076 对应于 Fab 0087、0088、0089) 可阻断 TL1A 活化 (表 4)。

[0180] 表 4:

	培养基	2.5 微克/ml MAb7441	0.1 微克/ml 抗 DR3 分子	1 微克/ml 抗 DR3 分子	10 微克/ml 抗 DR3 分子	100 微克/ml 抗 DR3 分子
反应倍数 -0087 Fab	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
反应倍数 -0088 Fab	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.0
反应倍数 -0089 Fab	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1
反应倍数 -0097 Fab	1.0	1.0	1.1	1.0	1.1	1.1
	40 ng/ml TL1A	TL1A + 2.5 微克/ml MAb7441	TL1A + 0.1 微克/ml 抗 DR3 分子	TL1A + 1 微 克/ml 抗 DR3 分子	TL1A + 10 微克/ml 抗 DR3 分子	TL1A + 100 微克/ml 抗 DR3 分子
反应倍数 -0087 Fab	24.0	2.3	5.8	2.7	2.1	2.1
反应倍数 -0088 Fab	22.6	2.0	15.2	6.3	2.9	2.8
反应倍数 -0089 Fab	22.5	1.8	17.1	11.2	7.6	7.5
反应倍数 -0097 Fab	25.6	2.3	26.7	25.7	24.9	22.0

第 4 种 Fab 0097 (来自 mAb 0077) 不抑制,这与 mAb 0077 不阻断 TL1A 与 DR3 结合一致 (图 6 和 7)。表 5 显示在没有 TL1A 时 4 种 mAb (-0072、-0073、-0076 和 -0077) 激活 DR3 基因报道分子测定的能力,同样在此证实 -0077 是极差的激动剂。

[0181] 表 5

对人 DR3 报道细胞系测定的抗 DR3 抗体						
	培养基	2.5 微克/ml MAb7441	0.1 微克/ml 抗 DR3 分子	1 微克/ml 抗 DR3 分子	10 微克/ml 抗 DR3 分子	100 微克/ml 抗 DR3 分子
反应倍数 -0072 抗体	1.0	1.0	20.6	19.8	17.3	8.5
反应倍数 -0073 抗体	1.0	1.0	12.8	14.4	12.8	6.9
反应倍数 -0076 抗体	1.0	1.0	18.3	22.7	17.5	9.0
反应倍数 -0077 抗体	1.0	1.0	1.1	1.2	2.8	10.3
	40 ng/ml TL1A	TL1A + 2.5 微克/ml MAb7441	TL1A + 0.1 微克/ml 抗 DR3 分子	TL1A + 1 微 克/ml 抗 DR3 分子	TL1A + 10 微克/ml 抗 DR3 分子	TL1A + 100 微克/ml 抗 DR3 分子
反应倍数 -0072 抗体	24.0	2.3	29.6	24.8	23.3	13.6
反应倍数 -0073 抗体	22.6	2.0	24.2	27.9	25.5	19.0
反应倍数 -0076 抗体	22.5	1.8	27.5	27.8	25.6	19.5
反应倍数 -0077 抗体	25.6	2.3	23.7	23.3	25.1	24.9

在“15”人 DR3 报道细胞系测定中,测定了重组 Fab,并且在使用 40 微克 /ml TL1A 时,测定了 IC₅₀,参见表 6。还包括来自专利 WO2011/106707 的 11H08 抗 DR3-Fab 的两种形式 H1L2 和 H1L4。H1L2 (0227-0000-0230) 和 H1L4 (0227-0000-0231) 分别具有 3.7 nM 和 2.8 nM 的 IC₅₀,而 0227-0000-0228 是 1/10 倍,320 pM。

[0182] 表 6

对人 DR3 报道基因细胞系(15)测定的 Fab		
Fab ID	所来源的抗体	在 40 ng/ml TL1A 下的 IC ₅₀ [摩尔浓度]
0227-0000-0123	27F44	188 pM
0227-0000-0228	27F44	320 pM
0227-0000-0230	H1L2 (11H08) (WO2011106707)	3.7 nM
0227-0000-0231	H1L4 (11H08) (WO2011106707)	2.8 nM
0227-0000-0124	28F26	2.4 nM
0227-0000-0130	45F36	1.4 nM
0227-0000-0143	44F434	290 pM
0227-0000-0152	50F191	2.1 nM
0227-0000-0158	Hz-aTNP	同种型对照
0227-0000-0148	5F13	无拮抗性

制备类似于人报道细胞系的猕猴 DR3 报道细胞系。稳定的猕猴 DR3 报道细胞系称为 Lyda20,通过加入 40 ng/ml 人 (0227-0000-0011) 或猕猴 (0227-0000-0141) 可溶性 TL1A,得到 10-14 倍反应。表 7 中,显示了猕猴 DR3 的 0123 和 0228 活化数据。

[0183] 表 7:

对猕猴 DR3 报道基因细胞系(Lyda20)测定的 Fab	
Fab ID	40 ng/ml TL1A 下的 IC50
0227-0000-0123	236 nM
0227-0000-0228	628 nM

绒猴 DR3 报道细胞测定是瞬时测定法,在用 TL1A 刺激前 2 天,使用 FuGene 6 转染试剂 (Roche),将 NF κ B- 报道质粒和受两个热激元件和最小 cFos 启动子调节的绒猴 DR3 表达载体转染至 HEK293 细胞。表 8 中,显示了用于 Fab 选择的来自 3 个物种的 DR3 活化。

[0184] 表 8:

对瞬时转染的灵长类 DR3 报道细胞测定的 Fab			
Fab ID	40 ng/ml TL1A 下的 IC50, 表达人 DR3 的 HEK293	40 ng/ml TL1A 下的 IC50, 表达猕猴 DR3 的 HEK293	40 ng/ml TL1A 下的 IC50, 表达绒猴 DR3 的 HEK293
0227-0000-0123	330 pM	99 nM	323 pM
0227-0000-0228	355 pM	73 nM	549 pM
0227-0000-0230	4.2 nM	14 nM	219 nM
0227-0000-0231	4.3 nM	13 nM	377 nM

如表 8 所示,当在瞬时猕猴 DR3 报道细胞中测定时,来源于 27F44 抗体的 Fab 分子具有极差的 IC50,为 99 和 73 nM。然而,瞬时绒猴 DR3 报道细胞测定显示类似于瞬时人 DR3 测定的 IC50 值。

[0185] 11H08/H1L2 (0227-0000-0230) 和 11H08/H1L4 (0227-0000-0231) Fab 在瞬时人 DR3 报道分子测定中的 IC50 为 4.2 和 4.3 nM,在瞬时猕猴 DR3 报道分子测定中具有 3 倍高的 IC50,为 14 和 13 nM,最后在瞬时绒猴 DR3 报道基因测定中具有 50 倍高的 IC50,为 219 和 377 nM。表 8 中列出了所有数值。

[0186] 实施例 8

通过流式细胞术测定的与活化 T 细胞的结合

血沉棕黄层获自 Copenhagen University Hospital 的正常健康志愿者。通过磁珠分离,分离出 CD4⁺ T 细胞。细胞用 2 ng/ml IL-12、50 ng/ml IL-18 和 100 ng/ml TL1A (在 Novo Nordisk A/S 产生的 Flag-HIS-TEV-TL1A) 激活,并培养 5 天。在第 5 天,细胞用 10、5、1、0.5、0.1 或 0.0001 μ g/ml 的抗 DR3 mAb 克隆 0072、0073 或 0077,或用 Fab 片段克隆 0087、0088 和 0091 染色。第二 PE 缀合的山羊-抗小鼠 (H+L) 用于检测。

[0187] 结果:单克隆 IgG 克隆 0077 及其相应的 Fab 克隆 0091 显示与细胞仅弱结合。单克隆 IgG 克隆 0072 和 0073 显示与细胞因子活化 CD4⁺ T 细胞强结合,在 1 μ g/ml 的浓度或更低浓度下观察到最大结合。相应的 Fab 克隆 (0087 和 0088) 以类似效价与细胞因子活化细胞结合,但是在结合饱和上记录到略微较低的 MFI 值。预期与 Fab 处理的细胞相比, IgG 处理的细胞有较大的 MFI 观测值,因为第二 (检测) 抗体 (抗 IgG 重链和轻链) 与全长 IgG 抗体克隆的 Fab 和 Fc 部分两者结合,但仅与 Fab 克隆的 Fab 部分结合 (表 9)。

抗体或 Fab 片段	用于测定的浓度	MFI
0072	1 μ g/ml	1300
0073	1 μ g/ml	1300
0077	1 μ g/ml	100

0087	1 μ g/ml	500
0088	1 μ g/ml	500
0091	1 μ g/ml	100

[0188] 表 9 :显示了第 5 天 IL-12/IL-18/TL1A 活化细胞的平均荧光强度 (MFI) 值。以单一 (singlet) 活的 CD4+ T 细胞对细胞进行门控选择。

[0189] 功能测定法:

采用 CD4 Rosettesep (Stem cell technologies) 和 Histopaque (Sigma), 通过磁珠分离从血沉棕黄层中分离出 CD4+ T 细胞。在含和不含抗 TL1A (1000 ng/ml ;MAB7441 ; RnDSYSTEMS) 和 DR3 mAb 或 DR3 Fab (5 或 10 μ g/ml) 时, 用 2 ng/ml IL-12、50 ng/ml IL-18 和 100 ng/ml TL1A (Flag-HIS-TEV-TL1A ;Novo Nordisk) 激活 T 细胞 (2 $\times 10^5$ 个细胞/孔, 96 孔板) 5 天。所用 DR3 mAb 为 0072、0073 和 0077。所用 DR3 Fab 为 0087、0088 和 0091。在活化 5 天后, 细胞用 [3 H] 胸苷脉冲, 16 小时后收获。或者激活细胞 3 天, 随后测量细胞因子的产生 (参见实施例 6、15、18)。

[0190] 表 10 :T 细胞测定 :来自用 IL-12/IL18+TL1A 激活的健康供体的 CD4+ T 细胞

Fab ID	Fab 的形式	表示为 IC50 值(以 nM 表示)和最大百分比抑制的细胞因子产生(TNF α)的抑制:										
		两种代表性供体连同所有所测供体的平均值一起显示。					供体 2					
		供体 1		供体 2			供体 2		供体 2		平均值	
		IC50 nM	%抑制	IC50 nM	%抑制	n:	IC50 nM	%抑制	n:	IC50 nM	%抑制	平均值
00228	IgG4-Cys, hz	0.300	92.20	0.170	82.30	3	0.189	89.27				
00123	IgG4-Ser, 嵌合	0.301	83.50	0.320	75.90	22	0.208	79.64				
00124	IgG4-Ser, 嵌合	1.112	52.30	1.205	41.30	4	1.329	69.29				
00130	鼠 Fab	0.539	84.40	1.766	78.00	5	0.642	82.73				
00143	IgG4-Ser, 嵌合	0.148	76.70	0.074	66.00	5	0.125	70.03				
00152	IgG4-Ser, 嵌合	0.183	73.50			1	0.183	73.50				
00230	IgG4-Ser, hz	27.74	46.00	7.282	68.00	3	15.34	55.66				
00231	IgG4-Ser, hz	31.73	56.00	14.91	72.00	3	17.97	60.15				
00158	IgG4-Ser, hz	无抑制	1.24	无抑制	0.75	8	无抑制	-1.80				
00148	IgG4-Ser, 嵌合	无抑制	9.50	无抑制	-8.50	2	无抑制	0.50				
00122	IgG4-Ser, 嵌合	无抑制	3.90	无抑制	10.00	4	无抑制	6.95				

通过用 TL1A 共刺激, T 细胞增殖增加 3 倍。这种 TL1A 依赖性增加通过与抗 TL1A 中和性对照抗体共温育而被阻断。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下的所有抗 DR3 mAb 以及 Fab 0091 略微地抑制增殖, 而 Fab 0087 和 0088 甚至用该测定法所用最低浓度均完全阻断增殖。综上所述, Fab 0087 和 0088 在减量调节 CD4 阳性 T 细胞增殖的 TL1A 依赖性共刺激中是非常有效的。

[0191] 实施例 9

小鼠 27F16A1、27F44A2 和 28F26A3 mAb 的克隆和测序。

[0192] 抗 DR3 抗体的鼠重链和轻链序列从以下杂交瘤克隆:27F16A1、27F44A2 和 28F26A3。使用得自 Qiagen 的 RNeasy-Mini Kit 由杂交瘤细胞提取的总 RNA 用作 cDNA 合成的模板。使用得自 Clontech 的 SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒,在 5'-RACE 反应中合成 cDNA。使用 Phusion High-Fidelity PCR Master 混合物 (Finnzymes) 和作为正向引物的 SMARTer™ RACE 试剂盒中所包括的通用引物混合物 (UPM),通过 PCR 进行 HC 和 LC 序列的后续靶扩增。

[0193] PCR 产物通过凝胶电泳分离,使用得自 GE Healthcare Life Sciences 的 GFX PCR DNA 和 Gel Band Purification Kit 提取,并使用得自 Invitrogen 的 Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit 和化学感受态 TOP10 大肠杆菌克隆用于测序。使用得自 Applied Biosystems 的 AmpliTaq Gold Master Mix 和 13uni/M13rev 引物,对选定菌落进行菌落 PCR (Colony PCR)。使用 ExoSAP-IT 酶混合物 (USB) 进行菌落 PCR 提纯。使用任一 T3/T7 测序引物,在 Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany 进行测序。

[0194] 应用 VectorNTI 程序,对序列进行分析和注释。按照生产商的说明书,使用所有的试剂盒和试剂。从杂交瘤 27F16A1 和 27F44A2 中,鉴定出单一独特的鼠 LC κ 型和单一独特的鼠 HC, IgG1 亚类 (SEQ ID NO 8-11)。从 28F26A3 中,鉴定出单一独特的鼠 LC κ 型和单一独特的鼠 HC, IgG2a 亚类 (SEQ ID NO 12-13)。不包括前导肽序列。

[0195] BLAST 检索

使用翻译的抗 DR3 27F16A1、27F44A2 和 28F26A3 VL 和 VH 氨基酸序列作为查询序列。应用 BLASTp 程序,在 GeneSeqP 专利数据库 (内部数据库,具有自外部数据库输入的序列,但不访问外部各方) 中,针对序列进行 BLAST 检索。在 100 分最高同一性得分中,VH 的最高同一性得分为 87.4 (28F26A3),VL 的最高同一性得分为 97.3 (27F44A2)。综上所述,抗 DR3 的 VH 和 VL 序列代表新的序列。

[0196] 实施例 10

通过流式细胞术进行抗体结合的评价

采用 CD4 Rosettesep (Stem cell technologies) 和 Histopaque (Sigma),从血沉棕黄层纯化人 CD4 阳性 T 细胞。在 T75 培养瓶中,在含 2 mio CD4 T 细胞 /ml 的 RPMI (补充 10% fcs) 中,将 T 细胞用 1:1 比率的 CD3/CD28 Dynabeads (Invitrogen) 刺激 4 天。用磁体除去珠粒,洗涤细胞 2 次后,以抗体对 500,000 个细胞 / 染色进行滴定。在与山羊-抗小鼠藻红蛋白 (Jackson ImmunoResearch) 温育后,测量结合饱和度,随后在 BD LSRII 上通过流式细胞术分析细胞。所有抗体在 3 μ g/ml 达到饱和。表 11 中给出了荧光强度中值,而表 12 中显示染色指数 (MFI Ab/MFI 同种型)。Ab 0070、0072、0073 和 0076 显示比 0071 和 0077 强的结合

表 11 : 荧光强度中值

Ab	荧光强度中值
0070	2329
0071	406
0072	2650
0073	2844
0076	2645
0077	645
IgG1 同种型	222

表 12:染色指数

Ab	染色指数
0070	10.49
0071	1.83
0072	11.94
0073	12.81
0076	11.91
0077	2.91
IgG1 同种型	1

使用藻红蛋白标记试剂盒 lightening link (Innova Biosciences),使所有抗体的等分样品缀合。如上所述刺激 CD4 T 细胞,并用磁体除去珠粒后,洗涤细胞。对未标记的抗体自 0 至 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 终浓度进行滴定,加至细胞中后,在 4°C 下温育 30 分钟。洗涤细胞,加入 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 直接标记的抗体。在 30 分钟温育后,细胞经洗涤,并在流式细胞仪中流动。测定了标记和未标记抗体的所有组合,并记录荧光强度中值。将竞争标记抗体的结合的未标记抗体分组成结合同一框。

[0197] 仅 Ab 0070、0072、0073、0076 能够使活化 T 细胞充分染色以使之分框。如表 13 所述,0070、0072、0073、0076 能够彼此竞争,因此分在同一框。这些 mAb 最可能结合相同表位、重叠表位,或者由于位阻所致而不能同时结合。

[0198] 表 13:“框 1”抗体

框 1
0070
0072
0073
0076

实施例 11

抗体和 Fab 片段的 SPR 分析与 DR3 的不同结构域结合

DR3 的胞外部分位于 DR3 的氨基端部分,由 4 个 TNF 受体的富含半胱氨酸的结构域组成。表达并纯化几种融合蛋白,其含有与人 IgG4 的 Fc 结构域融合的渐增长度的 DR3 胞外域的部分。用于 SPR 分析的 DR3 蛋白经纯化以排除寡聚化物质。采用胺偶联化学法,将这些蛋白质固定在 CM5 传感器芯片上。在 Biacore T100 仪器 (GE Healthcare) 中,通过等离子体表面结合测定法 (plasmon surface binding measurements),测定了称为 0070、0072、0073 和 0076 的抗 DR3 抗体与不同 DR3-Fc 融合蛋白的结合。在 FACS 测定中,所有这些抗体均抑制 TL1A 与 DR3 结合。这 4 种抗体与只含由 DR3 氨基酸 25-71 组成的氨基端 CRD 的重组 DR3 (CRD1)-Fc 蛋白 (SEQ ID NO 2) 结合。另一种抗体 0077 不抑制 TL1A 与 DR3 结合,不与 DR3 (CRD1)-Fc (SEQ ID NO 2) 结合,但与 DR3 (CRD1 + A1)-Fc (SEQ ID NO 3) 结合,其含有 DR3 的氨基酸 25-90,表明了其表位或至少其表位的部分位于氨基酸 77 与 90 之间。

[0199] 针对一些 Fab 片段也进行了相同分析。Fab 片段 0123、0124、0130、0143、0152、0219 和 0228 全部与 DR3(CRD1)-Fc (SEQ ID NO 2) 结合。

[0200] 还通过 SPR 测定了 Fab 片段 230 和 231 与 DR3-Fc 的结合。两种 Fab 与含 DR3 的完

整胞外域的 DR3 (ECD)-Fc (SEQ ID NO 7) 结合,但既不与 DR3 (CRD1)-Fc (SEQ ID NO 2) 也不与 DR3 (CRD1 + A1)-Fc (SEQ ID NO 3) 结合,表明了这 2 种现在技术的 Fab 片段不与 DR3 CRD1 结构域结合。

[0201] 通过 SPR 测量抗 DR3 Fab 片段的结合动力学

实验在 Biacore T200 仪器 (GE Healthcare) 上进行,并用 Biacore T200 评价软件进行分析。按照生产商的说明书,将抗人 IgG 抗体 (得自 GE Healthcare 的人 IgG 俘获试剂盒) 固定在 CM5 传感器芯片的所有流动池中。使用含 0.1% 人血清白蛋白的 HBS-EP (GE Healthcare) 作为运行缓冲液。以介于 14 与 45 RU 之间的低表面密度,将 DR3 (CRD1)-Fc (SEQ ID NO 2) 俘获在芯片上。将 Fab 片段稀释成介于 90 和 0.037 nM 之间的浓度,随后注入达 360 s。标准解离时间为 900 s,然而由于高亲和力所致,对于最高浓度,应用长达 13 000 s 的长解离时间以测定正确的 k_d 值。在 25°C 下以介于 30 和 60 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ 之间的流速,测量结合曲线。

[0202] 用 3 M CaCl_2 进行再生 2 x 20 s。通过减去无俘获配体的参比流动池和缓冲液空白的信号,对原始数据进行双重参比。通过应用 Biacore T200 评价软件 (GE Healthcare) 以 1:1 结合模型进行拟合,来进行动力学参数测定。计算获自 DR3 (CRD1)-Fc (SEQ ID NO 2) 的 3 个不同表面密度的平均值,并陈述于表 14 中。

[0203] 表 14 : K_D 值

Fab	k_a [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]
124	7.52E+05	2.01E-04	2.67E-10
130	1.74E+06	2.08E-04	1.20E-10
143	3.49E+06	5.10E-06	1.47E-12
219	3.20E+06	3.06E-05	9.55E-12
228	3.97E+06	3.19E-05	8.05E-12

Fab 竞争测定法

实验在 Biacore T200 仪器 (GE Healthcare) 中进行。按照生产商的说明书,将抗人 IgG 抗体 (得自 GE Healthcare 的人 IgG 俘获试剂盒) 固定在 CM5 传感器芯片的所有流动池中。使用含 0.1% 人血清白蛋白的 HBS-EP (GE Healthcare) 作为运行缓冲液。以介于 700 和 1200 RU 之间的表面密度俘获 DR3 (ECD)-Fc (SEQ ID NO 7)。使用浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Fab 片段。进行 2 种 Fab 片段的双重注入,分别为 300 和 150 s,接着用 3 M CaCl_2 再生 2 x 20 s。用 Scrubber (BioLogic Software) 分析 Fab 片段的结合反应。

[0204] 无法同时与 DR3 (ECD)-Fc 结合的 Fab 片段被视为属于相同的表位框。如表 15 所示,全部针对 CRD1 结构域的 Fab 片段 124、130、143 和 228,落入同一表位框。同样地,具有相同 CDR 结构域的 Fab 片段 230 和 231,也属于不同于 CRD1 的相同表位框。Fab 片段 148 和 163 不与其它 Fab 的任一种竞争,因此落入不同的表位框。当作为 2. 抗体注入时,Fab 片段 148 不与 124、130、143 和 228 竞争,表明了它属于不同的框。然而,当 148 首先结合时,130、143 或 228 均不再结合,这就表明存在妨碍其它 Fab 片段结合的位阻或 DR3-Fc 的构象变化。

[0205] 表 15 :通过 SPR 测量的竞争结合 DR3-Fc 的 Fab

1. Fab \ 2. Fab	124	130	143	148	163	228	230	231
124	-	-	-	+	+	-	+	n. t.
130	-	-	-	+	+	-	+	n. t.

143	-	-	-	+	+	-	+	n. t.
148	n. t.	-	-	-	+	-	+	+
163	n. t.	n. t.	+	+	-	+	+	+
228	n. t.	n. t.	-	+	+	-	+	+
230	+	+	+	+	+	+	-	-
231	n. t.	n. t.	+	+	+	+	-	-

+ :两种 Fab 的同时结合 ;- :2. Fab 无结合 ;n. t. :未测定

竞争测定

如表 16 所示,在 FACS 上,针对阻断 0107 (0228 的 Mab) 和 0121 (148 的 Mab) 结合 DR3 表达细胞的 Mab 结合,对 Fab 片段 228、231、230 和 148 进行了测定。Fab 片段 230 和 231 不与任何 Mab 竞争,而可同时与 Mab 017 和 Mab 0121 结合。

[0206] 表 16 :通过 FACS 进行的竞争测定

竞争测定 使用高达 1:10000 过量的 Fab, 针对结合 Mab 的阻断所测定的 Fab。		
MAB ID	0107	0121
	(鼠 Mab 0228)	(0148 的鼠 Mab)
Fab ID		
0228	自摩尔比率 Mab/Fab 1:1 开始抑制	无抑制
0230	无抑制	无抑制
0231	无抑制	无抑制
0148	自摩尔比率 Mab/Fab 1:100 开始抑制	自摩尔比率 Mab/Fab 1:3 开始完全抑制

实施例 12

通过 DR3 诱变对 Fab-0228 的表位作图

为了确定人 DR3 的 CRD1 中哪个氨基酸负责与 -0123 Fab 相互作用,制备了几种 DR3 突变体。通过位点定向诱变 (Quikchange, Stratagene) 产生 3 种突变 R29Q、I43N 和 L45V。使突变的 DR3 表达质粒和 NF κ B-Luc 报道质粒瞬时转染至 HEK293 细胞,使细胞与抗 DR3 抗 Fab-0228 短暂预温育,随后用人 TL1A 刺激 4 小时。通过使用 Steady-GLO (Promega) 测定萤光素酶活性,并在 TopCount NXT (Perkin Elmer) 上进行监测。R29Q 比人野生型稍好地被中和,而 I43N、L45V 两种和组合突变体 I43N/L45V 低效得多地被中和,参见表 17。

[0207] 还测定了抗 Fab-0123,顺序与 -0228 类似 ;R29Q>WT>L45V>I43N>I43N-L45V。因此,残基 I43 和 L45 对维持 0228 与 DR3 的结合亲和力是非常重要的。这些残基因此最可能是结合表位的部分。相比之下,R29 对 0228 与 DR3 的结合似乎不是必需的,因为当该残基突变时,亲和力仍保持,甚至略为改进。然而,因为该位置影响 0228 结合,因此其对结合表位具有结构重要性。

[0208] 表 17:

对瞬时转染灵长类 DR3 报道细胞测定的 Fab, 被 TL1A 刺激时 Fab 的 IC50					
Fab ID	人 DR3	R29Q	I43N	L45V	I43N/L45V
0227-0000-0228	645 pM	372 pM	68 nM	2nM	149 nM

实施例 13

抗 DR3 人源化

0072 的序列获自杂交瘤 27F44A2 的克隆。用于该实施例的所有编号是指 Kabat 编号方案。

[0209] >0072VH (CDR 用黑体字标记) (SEQ ID NO 10)

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCSASGF~~AFS~~**SNYDMSWVRQTPEKRLEWVA**AFSSDGYTFYP
DSLKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLGSEDTALYCCARH**ADYANY**PVMDYWGQGTSTVTVSS

>0072VL (CDR 用黑体字标记) (SEQ ID NO 11)

DIVLAQSPASLLVSLGQRATIS**CRASKSVSTSGYSY**MHWYQQKPGQPPKLLIY**LASNLES**
 GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC**QHSRELPLTF**GAGTMLELKR

0072 的序列分析揭示在人源化期间必须除去的重链 91 位处的游离半胱氨酸。

[0210] 采用 MOE [可获自 www.chemcomp.com] 中的标准技术, 构建 0072 的 3D 模型, 有效 CDR 区域 4.5 Å 内的全部残基 (VH:31-35B、50-58、95-102; VL:24-34、50-56、89-97) 定义为掩蔽残基 (mask residue)。掩蔽残基对维持 CDR 中的结合均可能是重要的。

[0211] 掩蔽残基包括重链的 2、4、27-37、47、50-59、69-71、78、91-103 位和轻链的 3-5、7、23-36、46-60、62、65、67、69-71、87-98 位。

[0212] 利用种系检索和手工检查, 将 VH3_13 和 JH4 鉴定为对重链合适的人种系组合, 而 VKI_02 和 JK4 鉴定为对轻链合适的人种系组合。

[0213] 现可按照下列规则进行人源化:

- 掩蔽以外的残基视为人的。

[0214] - 掩蔽以内且 Kabat CDR 以内的残基视为鼠的。

[0215] - 具有小鼠 / 种系共有序列的掩蔽以内且 Kabat CDR 以外的残基视为共有序列。

[0216] - 具有小鼠 / 种系差异的掩蔽以内且 Kabat CDR 以外的残基易遭受潜在的回复突变。

[0217] 将 0072 的有效 CDR 区移植入种系形成 0072 的基础人源化构建体 hz0072。

[0218] 1. >hz0072VH (SEQ ID NO 28)

2. EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS**CAASGFTFS**NYDMSWVRQATGK**GLEWVSAFSSDGYTFYP**

3. GSVKGRFTISR**ENAKNSLYLQ**MNSLRAGDTAVYY**CARHADYANY**PVMDYWGQGT**LVTVSS**

4.

5. >hz0072VL (SEQ ID NO 29)

6. DIQMTQSPSSLSASV**GDRVTITCRASKSVSTSGYSY**MHWYQQKPGKAPKLLIY**LASNLES**

7. GVPSRFSGSGSGTDFTLTI**SSLQPEDFATYYC**QHSRELPL**TFGGG**TKVEIK

与鼠 CDR 相比的唯一差异位于 CDR_H2。

[0219] 掩蔽残基中 0072 和 hz0072 之间的任何偏差可产生潜在回复突变, 名单包括

hz0072VH :T28A, S49A, Y91C

hz0072VL :Q3V, M4L, T5M, S60A

为了研究所有潜在的人源化 mAb, 必须制备上述突变体的所有组合。

[0220] 使表 18 所列 Fab 蛋白在 HEK293 6E 细胞中表达, 如通过 SDS-PAGE 凝胶所评价的, 对每个变体的表达水平进行比较。表 18 的结果显示, 与在重链 91 位处含有其它置换即 Cys (化合物 0172) 或 Ser (化合物 0173 或 0174) 的变体相比, 在该位置含有种系 Tyr 的所有变体 (化合物 0169、1070 和 0171) 具有显著提高的表达水平。同样从表 18 来看, 轻链 4 位处的人形式的 Met 或鼠形式的 Leu 对表达水平没有明显作用。这表明了重链中的 Y91 对 0072 的完全移植形式的表达水平的改进是决定性的。

[0221] 表 18 :通过在重链 91 位或轻链 4 位处具有突变的抗 DR3 Fab 的变体进行的 Fab 表达水平的比较。对人源化抗 DR3 0072 产生具有 HC_T28A_S49A 和 LC_Q3A_T5A_S60A 回复突变的变体。HC_Y91 是人源化形式 ;Y91C 是鼠形式 ;Y91S 是使 Y91 突变成无关氨基酸 Ser。LC_M4 是人源化形式 ;LC_M4L 是鼠形式。通过 SDS-PAGE 凝胶评价表达水平 ;“++++”表示 >50 mg/L 的高表达水平, “+”表示表达水平低下。

化合物 名称	突变位点		表达 水平
	HC_91	LC_4	
0169	Y91	M4L	++++
0170	Y91	M4	++++
0171	Y91	M4	++++
0172	Y91C	M4L	+
0173	Y91S	M4L	+
0174	Y91S	M4	+

[0222] 回复突变的选择

根据表达、效价和亲和力筛选以及通过生物物理表征, 对插入回复突变的可能优势进行了评价。

[0223] 表达模式 :在 HEK293-6E 中, 对 0072 的各种人源化形式 (包括各种回复突变 (BM)) 的表达水平进行了瞬时评价 (有关 HEK293-6E 中的瞬时表达参见实施例 3)。

[0224] 除 hz0072 以外, 就表达而言, 还对下列 BM 分别进行了评价 :

LC :T5A 和 S60A

HC :T28A 和 S49A

实验以一式三份进行。转染后使细胞生长 5 天。收获培养基, 使用 G 蛋白传感器, 通过 forteBIO's Octet 测量表达水平。

[0225] 结果表明, 与 hz0072 表达相比, HC 上的 BM S49A 导致约 2 倍增加。其它 BM 中无一种具有提高表达水平的能力 (表 19)。

[0226] 表 19 :与设置为 100% 表达水平的野生型 (WT) 相比较的具有回复突变的重链 (HC) 和具有回复突变的轻链 (LC) 的相对表达水平。

	平均值 (%)	标准偏差
hz0072	100	0.06
hz0072T28A (VH)	91.7	6.02

hz0072S49A (VH)	251.2	4.58
hz0072T5A (VL)	45.7	1.26
hz0072S60A (VL)	63.6	2.17

[0227] *生物物理表征*

采用示差扫描荧光测定法 (differential scanning fluorimetry, DSF), 测量了人源化 Fab 的热稳定性。采用 MyiQ 实时 PCR 检测系统 (Biorad Laboratories, Inc), 进行了 DSF。将 PBS (pH 7.4) 中终浓度为 0.3 mg/ml 的样品加入密封的 96 孔 PCR 板和染料 Sypro Orange 的 2000 倍稀释的储液中, 所述染料被用来监测蛋白质解折叠转换。用激发 / 发射波长 :480/575 nm 测量荧光强度。表 20 显示人源化 Fab 的热稳定性。结果表明, 具有回复突变的两种 Fab (228 和 229) 具有相同的热稳定性 (T_m), 为 71°C, 而没有回复突变的人源化 Fab (227) 热稳定性降低, 为 66°C

Fab	T_m (°C)
hz0072 (227)	6
hz0072S49A (VH) (228)	1
hz0072S49A (VH) S60A (VL) (229)	1

[0228] 表 20 : 显示人源化 Fab 的 T_m (变性温度) 值。

[0229] *利用生物物理评价选择 IgG4 骨架*

采用生物分析仪, 对 PBS (pH 7.4) 中的 3 mg/ml 人源化 Fab 的 IgG1 和 IgG4 同种型进行了测定以查明断裂方式。采用 Agilent 2100 生物分析仪查明断裂方式。试剂盒为 Agilent Protein 230, 所用标志物是具有 7 个峰的 Protein 230 梯。用 2 μ l 样品、2 μ l Mill-Q 水、2 μ l 样品缓冲液和 1 μ l 0.5 M N-乙基马来酰亚胺 (溶于 CH₃CN 的 NEM) 制备非还原样品。将所有样品加热至 100°C 达最多 5 分钟。

[0230] 表 21 显示非还原条件下 Fab 的游离 LC 的积分量的生物分析仪数据。结果表明, 与 IgG1 Fab 相比, 所有 IgG4 Fab 在非还原条件下均具有较少的游离 LC。

Fab	gG1	gG4
hz0072	1.9	0
hz0072S49A (VH)	.6	.6
hz0072S49A (VH) S60A (VL)	.2	.7

[0231] 表 21 : 非还原条件下 IgG1 和 IgG4 人源化 Fab 的游离 LC 的积分峰值。

[0232] 在上述广泛的效价和亲和力筛选、表达分析和稳定性研究后, 选择最终的人源化候选物作为具有以下序列的 hz0072VH S49A, hz0072VL 的 IgG4 形式 :

```

8. >hz0072VH_S49A (SEQ ID NO 16)
9.  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFPSNYDMSWVRQATGKGLEW
   VAAFSSDGYTFYP
10. GSVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCARHADYANYPVM
   DYWGQGTLVTVSS
11. >hz0072VL (SEQ ID NO 17)
12. DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPKGKA
   PKLLIYLASNLES
13. GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQHSRELPLTFGGGTK
   VEIK

```

该候选物在可变结构域中没有游离的半胱氨酸。

[0233] 实施例 14

重组 Fab 片段的纯化 :

采用 Äkta Explorer FPLC 系统 (GE Healthcare), 通过层析步骤纯化重组 Fab 片段。将含有重组小鼠 Fab 的细胞培养上清液稀释, 以将电导率降至 2 mS 以下。根据 Fab 片段的理论 pH, 采用 MonoQ 或 MonoS 柱 (GE Healthcare), 进行阳离子或阴离子交换层析。使 Fab 片段与低离子强度缓冲液 (pH 值介于 5 和 8.5 之间) 中的柱结合, 用最高 1 M NaCl 的盐梯度洗脱。进行具有 Superdex200 柱 (GE Healthcare) 和 PBS 作为缓冲液的凝胶过滤以除去寡聚体 Fab 复合物。

[0234] 按照生产商的说明书, 用 KappaSelect (GE Healthcare) 通过亲和纯化, 对含有人 κ 免疫球蛋白轻链的恒定部分的嵌合 Fab 片段进行纯化, 接着凝胶过滤除去高分子量复合物。

[0235] *通过木瓜蛋白酶切割 mAb 产生 Fab*

按照生产商的说明书, 使用 Pierce Fab 制备试剂盒 (Thermo Scientific), 通过切割 mAb 来产生 Fab 片段。在一些情况下, 进行具有 Superdex200 柱 (GE Healthcare) 和 PBS 作为缓冲液的凝胶过滤以除去高分子量形式。

[0236] 实施例 15

原代人 T 细胞的细胞因子释放或增殖。

[0237] 使用 CD4 Rosettesep (Stem cell technologies) 和 Histopaque (Sigma) 通过磁珠分离自血沉棕黄层分离的 CD4 + T 细胞, 在不存在 TCR 活化时, 在有和没有 100 ng/ml TL1A (Flag-His-TEV-TL1A ;Novo Nordisk) 时, 用细胞因子 IL-12 (2 ng/ml)、IL-18 (50 ng/ml) 刺激。测量 T 细胞增殖和细胞因子释放。收获经刺激 48 小时的 CD4+ T 细胞 (2×10^5 个细胞 / 孔) 的上清液, 并通过 Bioplex 分析细胞因子释放。5 天后测量 T 细胞增殖。

[0238] 与 IL-12/IL-18 处理的 T 细胞相比, IL-12 (2 ng/ml)、IL-18 (50 ng/ml) 和 100 ng/ml TL1A (Flag-His-TEV-TL1A ;Novo Nordisk) 处理的 CD4+ T 细胞表明 T 细胞增殖增加 6 倍。0123 和 0124 Fab 早在 0.16 μ g/ml 的 Fab 浓度下就完全阻断诱导的 T 细胞增殖, 而相应的 mAb 0072 和 0108 不影响 T 细胞增殖 (图 8)。

[0239] 通过 TL1A 在 48 小时后, 均诱导 IL-12/IL-18 处理的 CD4+ T 细胞的细胞因子 IL-6、IFN γ 、GM-CSF 和 TNF α 释放。与 DR3 结合性非阻断性 Fab 0091 相比, TNF α 被抗 DR3 Fab 0124 显著 ($p=*$) 阻断 (表 22)。

[0240] 表 22:

细胞因子	+TL1A(与 IL12/IL18 活化 T 细胞相比的上调倍数)	+TL1A+ 抗 DR3Fab(与 IL12/IL18 活化 T 细胞相比的下调倍数)
IL-6	16 (p=0.051)	13.3 (p=0.08)
IFN γ	1.2 (p=0.025)	1.1 (p=0.08)
GM-CSF	7.5 (p=0.04)	7.9 (p=0.08)
TNF α	4.4 (p=0.0007)	5 (p=0.025)

实施例 16

脂质部分与 Fab 的缀合

NAP-25 柱, 目录号 17-0852-02, 来自 GE Healthcare

Hitrap Q-sepharose FF 柱 (代码:17-5156-01), 来自 GE Healthcare

TSPP :三苯膦 -3, 3', 3'' - 三磺酸三钠盐水合物, 目录号 39538, 来自 Alfa Aesar

TDSPP :双 (对磺基苯基) 苯膦二水合物二钾盐, 目录号 151888-20-9, 来自 Strem

Chemicals

TEA :三乙醇胺, 产品号 :90279, 来自 Sigma

乙二醇, 目录号 1.00949.1000, 来自 MERCK

NaCl :编号 :207790010, 来自 Acros Organics

EDTA, 二钠盐, 二水合物, 目录号 SC-29092, 来自 ChemCruz

PBS 片, 目录号 18912-014, 来自 GIBCO

Vivaspin 20, 10000 MWC0, PES 膜, 目录号 VS2001, 来自 Sartorius

PD10 G-25 柱, 目录号 17-0851-01, 来自 Ge Healthcare

缩略语

CV :柱体积

FLD :荧光检测

MQ :MilliQ 水 (高纯净水)

m/z :质荷比

MS :质谱法

M+H :单质子化物类的质量

HPLC :高压液相色谱法

RP :反相

LC-MS :液相色谱 - 质谱法

NMR :核磁共振光谱法

rt 或 RT :室温

Boc :叔丁氧基羰基

O-*t*-Bu :叔丁基酯

t-Bu :叔丁基

DCM :二氯甲烷, CH₂Cl₂, 亚甲基氯

DIC :二异丙基碳二亚胺

DIPEA :N, N- 二异丙基乙胺

DMF :N, N- 二甲基甲酰胺

DMSO :二甲亚砜

Fmoc :9H- 芴 -9- 基甲氧基羰基

Lys(Mtt)-OH : (S)-6-[(二苯基 - 对甲苯基 - 甲基) - 氨基] - 2- 氨基 - 己酸

Thx :反式 -4- 氨基甲基环己基甲酸

NMP :N- 甲基吡咯烷 -2- 酮

OEG : (2[2-(氨基) 乙氧基] 乙氧基) 乙酸

TFA :三氟乙酸

THF :四氢呋喃

TIS :三异丙基甲硅烷

TNBS :三硝基苯磺酸

HC :重链

LC :轻链

wt :野生型

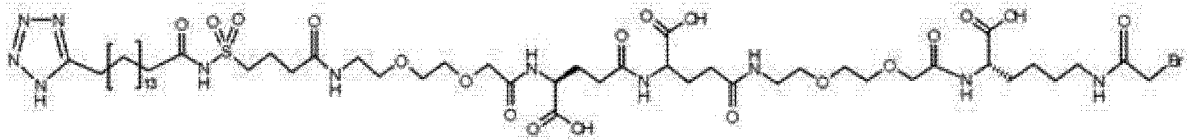
氨基酸缩略语遵照 IUPAC 惯例。

[0241] 缓冲液缩略语遵照 Stoll, V. S. 和 Blanchard, J. S., *Methods of Enzymology*, 182, 1990, Academic Press, 24-38。

[0242] 缀合, 总则

构建在重链 (HC) C 端上或附近具有不成对半胱氨酸的 Fab 用于与疏水延长基团缀合。该半胱氨酸目的在于与具有例如马来酰亚胺或卤素 - 乙酰基的亲疏烷基化试剂缀合。Fab 作为具有针对突变 Cys 的二硫键键合的半胱氨酰化的分子表达。为了释放出用于与烷基化试剂反应的突变 Cys, 使用膦试剂使之还原。在还原后, 将蛋白质与还原试剂相分离, 并通过加入烷基化试剂进行烷基化。最后, 缀合物通过标准低压色谱法纯化。

[0243] 4-(1H-四唑-16-基-十六酰氨磺酰)丁酰基-OEG- γ Glu- γ Glu-OEG- N^{ϵ} (C(O)CH₂Br)Lys-OH(白蛋白结合剂 I):



(化合物 I)

按照方案 1, 采用标准 Fmoc- 肽化学法, 在 ABI433 合成仪 (Applied Biosystems), 以 1 mM 规模, 在固相支持体上合成化合物 I。使用 Fmoc-OEG-OH 和 Fmoc-Glu-OtBu 保护的氨基酸, 使肽在 Fmoc-Lys(MTT)-Wang 树脂上装配。使用 2 当量含 DIC/NHS 的 DCM/NMP, 对 4-(16-1H-四唑-5-基-十六酰氨磺酰)丁酸进行手工偶联过夜, TNBS 试验显示反应完成。树脂然后用 50 mL DCM/TFA/TIS/水 (94:2:2:2) 以流过方式处理, 直到黄色消失, 约 20 分钟, 接着洗涤, 并用 DIPEA/DMF 中和。含溴乙酸 (4 mM) 的 DCM/NMP (1:1) 用 1 mM NHS 和 DIC 的混合物激活, 过滤, 随着更多 1 mM DIPEA 的加入而加到树脂中。1 小时后, 反应完成。树脂用 80 mL TFA/TIS/水 (95:2.5:2.5) 处理 1 小时。用 N₂ 流蒸发, 通过加入 Et₂O 沉淀, 用 Et₂O 洗涤后干燥。粗产物用制备型 HPLC 纯化 (2 轮), 梯度为 30-80% 0.1 TFA/MeCN 相对于含 0.1% TFA 的水溶液。收集流分, 用 ~50% MeCN 冻干, 得到化合物 I。

[0244] TOF-MS :质量 1272.52 (M+1)

上述实施例表明, 采用固相合成可能制备高纯度的白蛋白结合剂化合物 I。

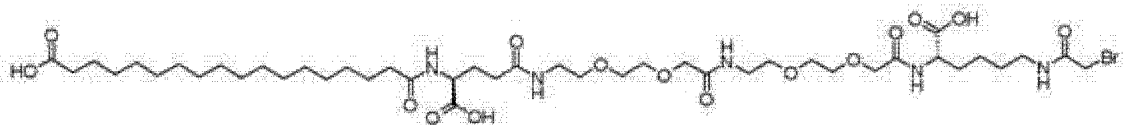
[0245] 方案 1

磺酸三钠盐合物 (TSPP, 40 mg/ml, 350 μ l, 终浓度 3.7 mM) 在 20 mM 三乙醇胺、2 mM EDTA 中的溶液 (pH 8.5) 混合。使反应混合物在室温下温育 150 分钟的时间。然后通过用 20 mM 三乙醇胺、2 mM EDTA、400 mM NaCl, pH 8.5 平衡和洗脱的 3 个 NAP-25 柱中进行缓冲液交换来除去小分子量物质。然后将缓冲液交换的还原 Fab 溶液与白蛋白结合剂 I (490 μ l, 16 mM, 终浓度 :0.8 mM) 在 20 mM 三乙醇胺、2 mM EDTA、400 mM NaCl 中的溶液 (pH 8.5) 混合。使反应混合物 (约 9.5 ml) 在室温下温育 20 小时的时间, 然后用 10 ml 缓冲液 20 mM 三乙醇胺、10% 乙二醇 (pH 8.0) 稀释。随后, 使混合物在用 20 mM 三乙醇胺、10% 乙二醇 (pH 8.0) 平衡的 4 个 NAP25 柱中进行缓冲液交换。采用 Äkta Puifier 100 系统 (GE Healthcare), 将缓冲液交换的物质上样到用 20 mM 三乙醇胺、10% 乙二醇 (pH 8.0) 平衡的 5 ml Hitrap Q-sepharose FF 柱中。用该缓冲液冲洗出未结合的物质 (包括未缀合的 Fab), 在 1.5 小时的时间内, 使用 20 mM 三乙醇胺、10% 乙二醇、1 M NaCl (pH 8.0) 的线性梯度洗脱产物。产物在约 380 mM NaCl 处洗脱, 其具有对称峰谱分布。合并相关流分, 使用 Vivaspin 20 装置在 3500 g 下通过超滤浓缩 (10000 MWC0, Sartorius), 最后交换缓冲液为 PBS 缓冲液。在通过 A280 测定的 1.7 mg/ml 的浓度下, 最后分离的产物为 11.9 mg (48%)。SDS-PAGE 和 MS 分析证实产物的身份 (实测为 m/z 49919 (M+H), 计算为 49917 (M+H))。

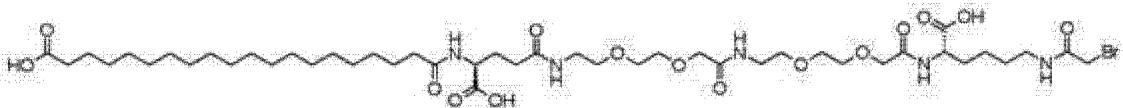
[0246] 上述实施例显示成功的 Fab 与白蛋白结合剂 I 的位点特异性缀合。缀合产生良好收率和高纯度的产物。

[0247] Fab 与白蛋白结合剂 II-VI 的缀合

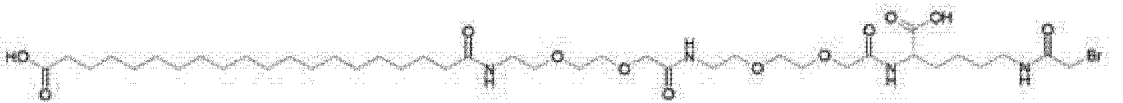
白蛋白结合剂 II-VI 具有如下所示结构



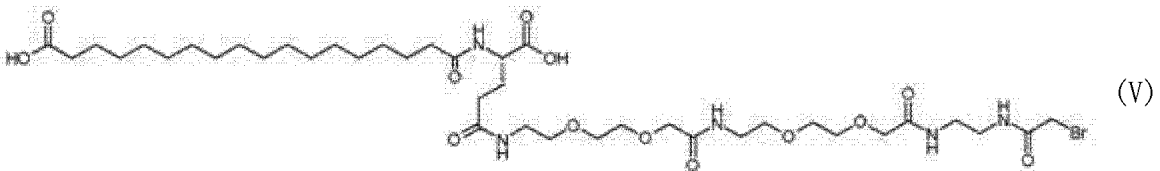
(II)



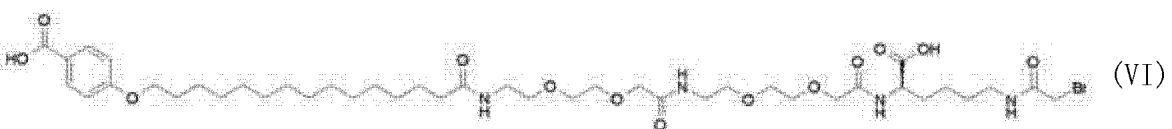
(III)



(IV)



(V)



(VI)

按照上述化合物 I 所述的相同方法使白蛋白结合剂 I-VI 缀合。在白蛋白结合剂 IV 和 VI 的情况下, 在加入 Fab 溶液前, 化合物是非完全可溶解的。在一些情况下, 加入有机溶剂

以促进溶解。由于白蛋白结合剂 II-VI 上较少数目的酸性基团所致,缀合物不与 AIEEX 柱结合,除非 pH 提高至 8.6。在白蛋白结合剂 II-VI 的情况下,纯的单取代产物被不同量的多重修饰的 Fab 污染。这些难以通过离子交换层析法除去。

[0248] 通过表 23 所示 SDS-page 和 LC-MS 实施例,证实了所有缀合物的身份。对于与 II、III 和 V 的缀合物,测定纯度为 >90%,而与 IV 和 VI 的缀合物含有约 30% 基于未缀合 Fab 的杂质。

[0249] 表 23 :与计算质量相比,与各种白蛋白结合剂缀合的 2 种不同 Fab 的 LC-MS 数据。

与以下白蛋白结合剂缀合	化合物编号	Fab 编号	实测 m/z (M+H)	计算 m/z (M+H)
II	0190	0120	49629	49629
III	0192	0120	49657	49657
IV	0193	0120	49427	49528
V	0191	0120	49543	49543
VI	0194	0120	49550	49550
II	0243	0228	48764	48765
III	0240	0228	48792	48793
IV	0242	0228	48663	48664
V	0244	0228	48678	48679
I	0241	0228	49053	49053

[0250] 上述实施例表明,各种不同的白蛋白结合剂可以良好收率和纯度与 IgG1 和 IgG4 两种来源的 Fab 缀合。

[0251] 上述实施例表明,各种不同的白蛋白结合剂可以良好收率和纯度与 IgG1 和 IgG4 两种来源的 Fab 缀合。

[0252] 各种 Fab 与白蛋白结合剂 I 的缀合

下列 Fab 是缀合的 :0118、0119、0127 和 0147 (参见表 25)。这些 Fab 在 C 端或在 0157 情况下紧接 C 端含有不成对的半胱氨酸残基。Fab 来源于 IgG1 或 IgG4,且对应于全部结合 DR3 受体的不同克隆。当按照上述方法反应时,根据 LC-MS 数据,以良好收率形成缀合物。获得了下列 MS 数据 (表 24)

表 24 :与计算质量相比,与白蛋白结合剂 I 缀合的各种 Fab 的 LC-MS 数据

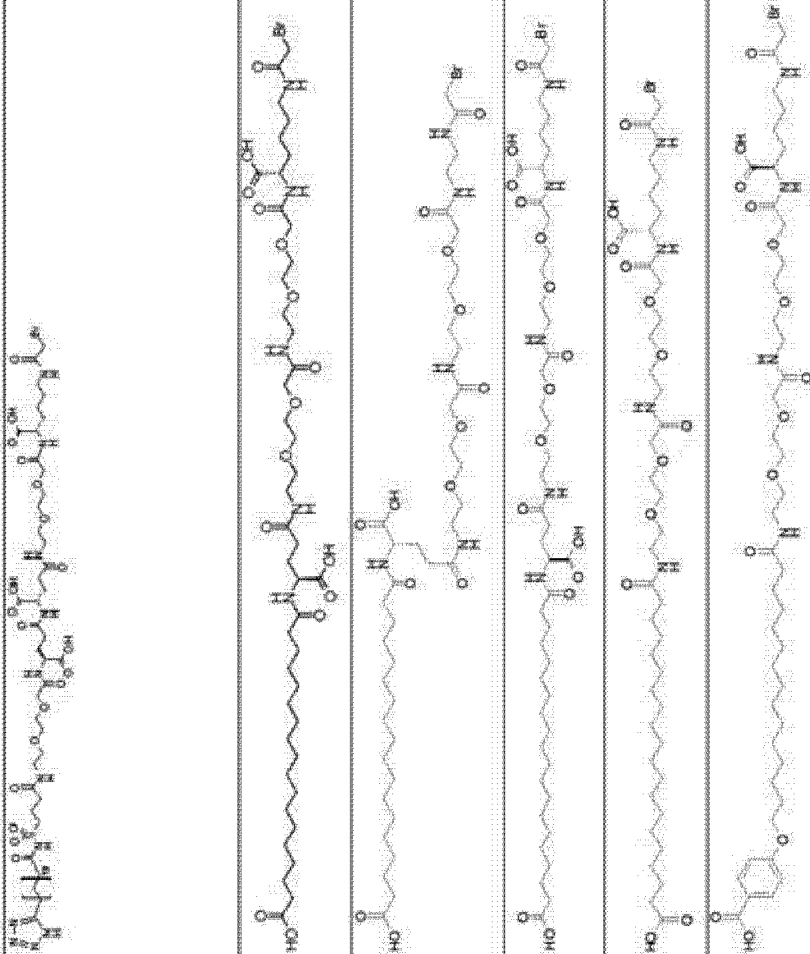
与以下 Fab 缀合	实测 m/z (M+H)	计算 m/z (M+H)
118	49947	49947
119	49408	49408
127	49712	49712
134	49975	49975
147	49409	49409
157	50169	50169

上述实施例表明各种 Fab 可以良好的产率和纯度与不同的白蛋白结合剂分子缀合。

[0253] 表 25 :用于 PK 研究的抗 DR3 Fab 白蛋白结合剂缀合物的列表

内部编号	脂肪酸长度	与以下 Fab 结合	组合化合物编号
I	不适用	0120	0153
		0228	0241
		0118	
		0119	0189
		0127	
		0147	0166
II	C18	0120	0190
		0228	0243
V	C18	0120	0191
		0228	0244
III	C20	0120	0192
		0228	0240
IV	C20	0120	0193
		0228	0242
VI	不适用	0120	0194

白蛋白结合剂结构



命名注释: 该表利用 4 位数标识(例如 0228)。然而, 对于相同化合物可观察到不同的命名。例如化合物 0228 亦称为 0227-0000-0228、0227-0228、00228 或 228。所有这些命名都表示同一化合物。该规则适用于所有化合物。

实施例 17

主要目标是在 iv 和 sc 两种方式给予 DBA/1 小鼠后表征药代动力学参数, 主要重点集

中在终末半寿期,以评价修饰 Fab 片段后延长的程度。

[0254] 研究设计和方法

在本概要中包括了 2 项研究的结果 (DKPF111105 和 DKPF110703)。两项研究在雄性 DBA/1 小鼠中进行,在尾静脉静脉内 (i. v.) 或在腹股沟皮下 (s. c.) 给予小鼠。剂量对于 Fab 为 5 mg/kg,对于修饰的 Fab 为 1 mg/kg。使用稀疏采样设计,在每个采样点收集 3 个血样,从给药前直到给药后 7 天收集样品,这取决于化合物 (例如当测定 Fab 时,只收集样品直到给药后 7 小时,而当测定缀合的 Fab 时,收集样品直到给药后 7 天)。

[0255] 采用 ELISA 测定法,对所收集的血浆样品均进行了分析,简单地说,将板用 hDR3-Fc 融合蛋白 (SEQ ID NO 7) 包被,加入稀释的血样,而分析物 (Fab 或缀合的 Fab) 可与 hDR3 结合,然后通过过氧化物酶标记的抗 Fab 抗体检测结合的分析物,并采用标准方法测量吸光度。根据所测量的血浆浓度值,应用市售软件 Phoenix WinNonlin (Pharsight Corp.),采用标准非区室方法,对药代动力学参数进行了评价。

[0256] 结果

对延长 Fab 的终末半寿期的几个不同的接头进行了评价,根据白蛋白结合技术,对于几个分子,可能延长 Fab 的终末半寿期超过 20 小时 (表 26)。估计 Fab 的半寿期低于 1 小时,这说明了 Fab 较之于全都显示半寿期长得多的缀合 Fab (表 26) 的差异。

[0257] 表 26 :iv 或 sc 给予小鼠后的药代动力学参数

研究	途径	化合物	NC	剂量 (mg/kg)	T _{1/2} (小时)	MRT (小时)	Cl (mL/h/kg)	F (%)
DKPF111105	iv	IgG1 (G1m17)嵌合 Fab wt Cys 含有白蛋白结合剂接头 0195-0000-3007 C18+Glu 的 0120	0227-0000-0120-1A	5	0.8	0.2	158	-
DKPF111105	iv	含有白蛋白结合剂接头 0186-0000-3007 C20+Glu 的 0120	0227-0000-0190-1A	1	14	17	1.7	-
DKPF111105	iv	含有白蛋白结合剂接头 0195-0000-3007 C20+Glu 的 0120	0227-0000-0192-1A	1	21	25	1.9	-
DKPF111105	iv	含有白蛋白结合剂接头 0194-0000-3032 (FGF-21 接头) C18+Glu 的 0120 含有白蛋白结合剂的 0120	0227-0000-0193-1A	1	24	24	3.0	-
DKPF111105	iv	含有白蛋白结合剂接头 0194-0000-3032 (FGF-21 接头) C18+Glu 的 0120	0227-0000-0191-1A	1	16	18	1.8	-
DKPF111105	iv	含有白蛋白结合剂的 0120	0227-0000-0194-1A	1	7.2	9	4.3	-
DKPF111105	sc	IgG1 (G1m17)嵌合 Fab wt Cys 含有白蛋白结合剂接头 0186-0000-3007 C20+Glu 的 0120	0227-0000-0120-1A	5	1.1	2.5	-	13
DKPF111105	sc	含有白蛋白结合剂接头 0195-0000-3007 C20+Glu 的 0120	0227-0000-0192-1A	1	27	37	-	31
DKPF111105	sc	含有白蛋白结合剂接头 0194-0000-3032 C20+Glu 的 0120	0227-0000-0193-1A	1	23	32	-	34
DKPF111105	sc	含有白蛋白结合剂接头 0195-0000-3007 C20+Glu 的 0120	0227-0000-0191-1A	1	19	27	-	52
DKPF110703	iv	含有白蛋白结合剂的 0120	0227-0000-0194-1A	1	32	-	-	34
DKPF110703	iv	含有白蛋白结合剂的 0120	0227-0000-0153-1A	1	25	30	1.1	-
DKPF110703	iv	含有 Cys 至 Ser 的 0120 wt	0227-0000-0124-2A	1	0.2	0.16	183	-
DKPF110703	iv	IgG1 (G1m17)嵌合 Fab wt Cys 含有白蛋白结合剂的 0120	0227-0000-0120-1A	1	0.4	0.31	181	-
DKPF110703	sc	含有 Cys 至 Ser 的 0120 wt	0227-0000-0153-1A	1	24	40	-	55
DKPF110703	sc	IgG1 (G1m17)嵌合 Fab wt Cys	0227-0000-0124-2A	1	-	-	-	16
DKPF110703	sc	IgG1 (G1m17)嵌合 Fab wt Cys	0227-0000-0120-1A	1	-	-	-	22

T_{1/2}: 终末半衰期, MRT: 平均停留时间, Cl: 清除率; F: 生物利用度

实施例 18:

读取干扰素- γ 释放作为测定抗 DR3 活性的方法

通过在 Ficoll (GE Healthcare, 目录号 17-5442-02) 中以 2000 rpm 离心 20 分钟, 从血液血沉棕黄层 (中国北京解放军 307 医院血液中心) 分离新鲜的人外周血单核细胞 (PBMC)。在 DPBS 中洗涤后, 吸取细胞沉淀, 以 1×10^6 /ml 重新悬浮于培养瓶中预热的测定培养基 (RPMI 1640、10% 热灭活 FBS、1% 青霉素 / 链霉素) 中培养过夜。然后取出未贴壁淋巴

细胞,用于 T 细胞共刺激测定。

[0258] 对于共刺激测定,将作为共刺激剂的重组人 TL1A (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 以 50 μl /孔加入干燥的 96 孔 U 底测定板 (Corning costar 3799),该测定板除边缘以外的所有孔中用 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的初级刺激物抗 CD3 mAb (BD Pharmingen 目录号 555336) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中预先包被 3 小时。在 96 孔深孔板 (Nunc 278743) 中以 1.5mL/孔 1:3 连续滴定范围为 0.012-12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 4X 浓度后,将试验性抗 DR3 Fab (0170、0171、0173、0169 和 0118) 以 50 μl /孔一式两份转移至测定板中。然后用 0.1mL 富集的淋巴细胞以 2×10^5 个细胞/孔加入测定板中,使最终积达到 0.2 mL/孔。在含 5% CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中进行细胞培养 40 小时后,从培养板各孔中收获 120mL 上清液,以用 IFN- γ ELISA 试剂盒 (eBioscience 目录号 88-7316-88) 测量细胞因子分泌。按照生产商的建议,将试验上清液 1:20 稀释,以测量在 T 细胞测定中分泌的细胞因子的完整范围。

[0259] 针对其阻断 TL1A 共刺激的来自健康供体外周血的原代 T 细胞的细胞因子分泌的能力,对含 (173、170 和 169) 或不含 (171) 回复突变的多种人源化抗 DR3 Fab 进行了评价。

[0260] 如表 27 所示,抗 CD3 初敏引起中等水平 (~ 50 ng/mL) 的 IFN- γ 分泌,通过重组 TL1A 共刺激,该分泌提高至超过 3 倍 (~ 159 ng/mL);而仅 TL1A 处理只导致最低量的细胞因子释放 (1.2 ng/mL)。在 TL1A 共刺激条件下,所有试验性人源化抗 DR3 Fab 以剂量依赖性且完全的方式抑制 IFN- γ 分泌 ($\text{IC}_{50} \sim 0.01-0.03$ $\mu\text{g}/\text{mL}$),其对抗 CD3 初敏具有最小作用。作为自用多个供体的多项实验鉴定的阴性对照,如对 T 淋巴细胞的 TL1A 共刺激所预期,非配体阻断性嵌合抗 DR3 Fab 0118 不显示显著作用。在用不同供血者的另一项实验中,对第二批的 0171 和 0170 Fab 获得类似结果。

[0261] 表 27:人源化抗 DR3 Fab 对 TL1A 共刺激的健康供血者 T 淋巴细胞的 IFN- γ 分泌的作用

[$\mu\text{g}/\text{mL}$]	IFN- γ (ng/mL)				
	cFab-0118	hFab-0169	hFab-0170	hFab-0171	hFab-0173
0	159 \pm 38	159 \pm 38	159 \pm 38	159 \pm 38	159 \pm 38
0.003	132 \pm 0.2	121 \pm 0.2	131 \pm 31	140 \pm 8.2	160 \pm 3.7
0.01	134 \pm 0.3	138 \pm 34	101 \pm 64	105 \pm 58	163 \pm 0.5
0.03	158 \pm 42	81 \pm 26	108 \pm 24	69 \pm 10	95 \pm 2.8
0.1	151 \pm 0.1	58 \pm 25	46 \pm 27	52 \pm 12	69 \pm 18
0.3	124 \pm 68	31 \pm 0.1	51 \pm 7.1	62 \pm 0.3	62 \pm 11
1.0	132 \pm 55	55 \pm 24	63 \pm 4.7	40 \pm 0.4	48 \pm 3.1

\pm 之后的数值表示测定中的标准偏差。

实施例 19

抗 DR3 抗体 Fab 阻断类风湿性关节炎患者滑液中 效应 T 细胞的 TL1A 共刺激

在前述实施例中显示了人源化抗 DR3 Fab 抑制自健康个体外周血分离的原代 T 细胞的活性。另外,针对其阻断来源于类风湿性关节炎 (RA) 患者的滑液 T 细胞的效应子功能的能力,还对一些 Fab 进行了评价。T 细胞的效应子功能包括但不限于在本实施例分析的 IFN- γ

分泌。用与实施例 18 所述相同的 ELISA 试剂盒,测量了分泌的 IFN- γ 水平。

[0262] 通过在 2000 rpm 下离心 10 分钟,自 RA 患者膝关节液作为 DMARD 关节内注射的副产品(废物)分离新鲜的人滑液(SF)细胞(中国北京大学人民医院)。吸取细胞沉淀,以 1×10^6 /mL 重新悬浮于预热的测定培养基(RPMI 1640、10% 热灭活 FBS、1% 青霉素/链霉素)中。通过 FACS 分析,针对 T 淋巴细胞的存在(%),检查滑液细胞的少量样品($\sim 10^5$ /0.1mL)。将 > 5-10% 淋巴细胞群的 RA/SF 细胞样品用于 T 细胞共刺激实验。

[0263] 对于共刺激测定,将重组人 TL1A (12 μ g/mL) 作为共刺激剂以 50 μ l/孔加入干燥的 96 孔 U 底测定板(Corning costar 3799),该板除边缘以外的所有孔中用 0.3 μ g/mL 的初级刺激物抗 CD3 mAb (BD 目录号 555336) 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中预先包被 3 小时。在 96 孔深孔板(Nunc 278743) 中以 1.5mL/孔 1:3 连续滴定范围为 0.012-4 μ g/mL 的 4X 浓度后,将试验性抗 DR3 Fab (0170、0171、0173 和 0118) 以 50 μ L/孔一式两份转移到测定板中。然后用 0.1mL RA/SF 细胞以 2×10^5 个细胞/孔加入测定板,使最终体积达到 0.2mL/孔。在含 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 培养箱中进行细胞培养 40 小时后,从培养板各孔中收获 120mL 上清液,以用 IFN- γ ELISA 试剂盒(eBioscience 目录号 88-7316-88) 测量细胞因子分泌。按照生产商的建议,对试验上清液测定合适的稀释因子,以测量在 T 细胞测定中分泌的细胞因子的完整范围。

[0264] 针对其阻断 TL1A 共刺激的 RA 患者膝关节滑液 T 细胞的细胞因子分泌的能力,对人源化抗 DR3 Fab (171) 及其骨架突变的变体 (173 和 170) 进行了评价。

[0265] 如表 28 所示,抗 CD3 初敏诱导中等水平(~ 1228 pg/mL) 的 IFN- γ 分泌,通过重组 TL1A 共刺激提高该分泌至约 2 倍(~ 2188 pg/ml);而仅 TL1A 处理显示无可检出的细胞因子释放。在 TL1A 共刺激条件下,3 种试验的人源化抗 DR3 Fab 以剂量依赖性且完全方式抑制 IFN- γ 分泌(IC₁₀₀ ~ 0.1 ug/mL),其对抗 CD3 初敏具有最小作用。作为阴性对照,如对 T 淋巴细胞的 TL1A 共刺激所预期,非配体阻断性嵌合抗 DR3 Fab 0118 不显示显著作用。在用不同 RASF 样品的 5 项实验中,不同批次的 0171 (3 个批次) 和 0170 (2 个批次) Fab 得到类似结果。

[0266] 表 28 :人源化抗 DR3 Fab 抑制 TL1A 共刺激的 RA 患者 SF 细胞的 IFN- γ 分泌

[μ g/mL]	IFN- γ (pg/mL)			
	cFab-0118	hFab-0170	hFab-0171	hFab-0173
0	2188 \pm 255	2188 \pm 255	2188 \pm 255	2188 \pm 255
0.003	2308 \pm 639	1794 \pm 366	1870 \pm 80	1552 \pm 195
0.01	2280 \pm 0.4	1635 \pm 370	1375 \pm 248	1230 \pm 248
0.03	2079 \pm 368	1357 \pm 331	1220 \pm 0.4	1127 \pm 122
0.1	2103 \pm 0.0	1166 \pm 0.2	1143 \pm 65	1131 \pm 82
0.3	2121 \pm 75	1301 \pm 0.1	1157 \pm 180	992 \pm 56
1	2232 \pm 567	1249 \pm 184	1232 \pm 0.1	1062 \pm 36

实施例 20

通过抗 DR3 Fab 的 HX-MS 进行表位作图

HX-MS 技术利用蛋白质氢交换(HX)可容易地后紧质谱法(MS)。通过用含有氘的水性溶

剂替换含有氢的水性溶剂,在蛋白质的给定部位掺入氘原子将引起 1 Da 的质量增加。在交换反应的猝灭样品中,可通过质谱法监测随时间变化的这种质量增加。可在猝灭条件下通过胃蛋白酶消化,并按照所得肽的质量增加,将氘标记信息亚定位于 (sub-localized) 蛋白质的区域。

[0267] HX-MS 的一种应用是通过鉴定在蛋白质-蛋白质复合物形成时氢交换减少的区域,来探测参与分子相互作用的部位。通常可通过因溶剂的空间排阻引起的氢交换显著减少,来揭示结合界面。可仅仅通过测量在各自的结合配偶体存在和不存在时随时间变化掺入任一蛋白质成员的氘总量,通过 HX-MS 检测蛋白质-蛋白质复合物形成。HX-MS 技术使用天然成分,即蛋白质和抗体或 Fab 片段,并且在溶液中进行。因此 HX-MS 提供模拟体内条件的可能性(有关 HX-MS 技术的最近综述参见 Wales 和 Engen, *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 158 (2006))。

[0268] 所用蛋白质批次为:

hDR3:与 Fc 融合的 hDR3 的完整胞外域 (SEQ ID NO 7)。该分子是因 Fc 二聚化引起的相对于 hDR3 的二聚体。表达批次还含有蛋白质的寡聚化形式,但仅纯化的二聚体部分用于 HX-MS 实验。

[0269] Fab 分子:0120、0130、0143、0148、0163、0228、0230 和 0231 (参见表 29)。实验前,将所有蛋白质进行缓冲液交换至 PBS pH 7.4。

[0270] 仪器和数据记录

在与 Synapt G2 质谱仪 (Waters Inc.) 耦合的具有 HDX 技术的 nanoACQUITY UPLC System (Waters Inc.) 中进行 HX 实验。Waters HDX 系统包括由 LeapShell 软件 (Leap Technologies Inc/Waters Inc.) 操作的 Leap 机器人 (H/D-x PAL; Waters Inc.), 其执行氘交换反应的启动、反应时间控制、猝灭反应、向 UPLC 系统的注入和消化时间控制。Leap 机器人配备了分别保持在 20°C 下用于缓冲液贮存和 HX 反应以及保持在 2°C 下用于蛋白质和猝灭溶液贮存的 2 个控温管组 (stack)。此外 Waters HDX 系统包括控温室,其保持前置柱和分析柱及 LC 管和开关阀在 1°C 下。单独的控温室保持胃蛋白酶柱在 25°C 下。对于联机胃蛋白酶消化,使用 100 μ L/分钟 (0.1% 甲酸:CH₃CN 95:5) 的等度流速 (isocratic flow rate), 使含有 200 pmol hDR3 的 100 μ L 猝灭样品上样并通过置于 25°C 下的 Poroszyme® 固定化胃蛋白酶柱体 (Immobilized Pepsin Cartridge) (2.1 \times 30 mm (Applied Biosystems))。将所得肽在 VanGuard 前置柱 BEH C18 1.7 μ m (2.1 \times 5 mm (Waters Inc.)) 中截留并脱盐。随后,打开阀门使前置柱与分析柱 UPLC-BEH C18 1.7 μ m (1 \times 100 mm (Waters Inc.)) 联通,并使用以 200 μ L/分钟递送的 10-40% B 的 9 分钟梯度从 nanoACQUITY UPLC 系统 (Waters Inc.) 分离肽。流动相由 A:0.1% 甲酸和 B:含 0.1% 甲酸的 CH₃CN 组成。采用 Synapt G2 质谱仪 (Waters Inc.), 以阳离子模式获取 ESI MS 数据和各高能 (MS^E) 实验。亮氨酸-脑啡肽用作锁定质量 (lock mass) (m/z 556.2771 的 [M+H]⁺ 离子), 以连续模式收集数据(有关进一步的描述参见 Andersen 和 Faber, *Int. J. Mass Spec.*, **302**, 139-148 (2011))。

[0271] 数据分析

采用标准 MS^E 方法,在各个实验中鉴定出消化性肽,其中利用 Synapt G2 (Waters Inc.) 的离子移动性质,对肽和片段作进一步比对。应用 ProteinLynx Global Server 2.5

版 (Waters Inc.) 处理 MS^E 数据。以 DynamX 软件 (Waters Inc.) 处理 HX-MS 原始数据文件。DynamX 自动执行锁定质量校正和氘掺入测定,即氘化肽的质心测定。此外,用该软件手工检查所有肽以确保正确的峰和氘化分配。

[0272] 表位作图实验

在 Fab 0120、0130、0143、0148、0163、0228、0230 或 0231 存在或不存在时,通过将 hDR3 7 倍稀释于相应的氘化缓冲液 (即在 D₂O 中制备的 PBS,最终为 96% D₂O, pH 7.4 (未校正值)) 中,来启动酰胺氢 / 氘交换 (HX)。所有 HX 反应在 20°C 下进行,在 10 μM Fab 不存在或存在时含有 2 μM hDR3,因此得到 5 倍摩尔过量的 Fab。在范围为 10 秒至 3000 秒的合适时间间隔,50 μl 等分量的 HX 反应物通过 50 μl 冰冷的猝灭缓冲液 (1.35M TCEP) 猝灭,导致最终 pH 为 2.5 (未校正值)。

[0273] 结果与讨论

在 0120、0130、0143、0148、0163、0228、0230 或 0231 Fab 不存在或存在时,监测 20 种消化性肽 (涵盖 hDR3 胞外域一级结构的 75%) 的 HX 时程 10-3000 秒。hDR3 在 N67 和 N106 位含有 2 个 N-糖基化位点,因此肽图谱在这些区域上具有空位。

[0274] 在 Fab 0120、0130、0143、0148、0163、0228、0230 或 0231 存在或不存在时,在早期时间点 (< 300 秒) 观察到的交换方式可分为两个不同的组别:一组肽显示不受 Fab 结合影响的交换方式。相比之下, hDR3 的另一组肽显示在 Fab 结合时受保护免于交换 (表 29)。肽中所观察到的交换保护表示该区参与 Fab 结合。因此表位部分位于或可能甚至全部位于特定肽所限定的区域内。然而,由于 HX-MS 的分辨率以消化性肽为基础,给定区域内的交换保护并非意味着该区域内的每个残基都必须参与 Fab 结合。

[0275] 0148 和 0163 的表位作图

Fab 0148 和 0163 表示结合 hDR3 但不阻断 TL1A 结合的 Fab 分子。研究中包括了这些 Fab 分子用于对照。在 Fab 0148 的 CRD3 中的 P140-L153 区域中观察到表位信号 (表 29)。用 5x 过量的 Fab 进行当前的实验,然而,利用 0148 与 hDR3 等摩尔比 (equimolar ration) 的 HX-MS 实验证实,可在标准等摩尔条件下对该 Fab 作图。

[0276] 在 CRD4 区的 G163-F169 区域和 Y170-L184 区域中部分观察到 Fab 0163 的弱表位信号。

[0277] 0120、0130、0143 和 0228 的表位作图

使用 3-5x 过量的 Fab 分子,在几项实验中对 Fab 0228 作图。在 CRD1 的 R32-G54、G37-L45 和 F46-A59 区域观察到表位信号。然而,根据消化性肽中交换保护的相对水平和 F46-Y56 区域中的弱交换保护或不存在交换保护,可得出结论,0228 的表位在 G37-L45 和 L57-A59 区域中最强。G37-L45 区域还涵盖通过诱变发现对 0228/0123 与 hDR3 结合是重要的残基,这些实验的数据因此完全一致 (实施例 12,表 16)。出人意料的是,需要使用相对于 hDR3 极过量的 0228 Fab。通常,当通过 HX-MS 进行表位作图时,使用等摩尔比的 mAb 或 Fab 便足够。如果使用等摩尔比的 0228 与 hDR3,则未观察到表位信号 (数据未显示),即使 0228 具有非常高的亲和力 (实施例 11,表 14)。这些观察结果指出,0228 表位位于在实验条件下并非完全溶剂可达到的区域。因此尽管 0228 的高亲和力,但低的交换保护可能是 fab 分子必须位于 hDR3 自我相互作用之上或与 hDR3 自我相互作用竞争的结果。hDR3 自我相互作用可能是非特异性聚集的结果或如例如对 TNFR 超家族其它成员所述的胞外域群聚的结

果 (Mukai 等 (2010) Sci. Signal. 3,ra83)。此外,可在 C 端区域中观察到弱的作用。由于当与只含有 CRD1 的蛋白质结合时,0228 和 0120 具有充分的亲和力 (实施例 11,表 14),因此 C 端作用最可能是在 Fab 结合时构象重排的结果,并且可能是融合 DR3 与 Fc 的铰链区运动的结果。

[0278] 从 SPR 实验来看,已经证实 0120、0130 和 0143 均与 0228 竞争并相互竞争与 hDR3 结合 (实施例 11,表 15)。因此,这些 Fab 部分或完全共享表位。

[0279] 一致的是,对这些 Fab 的 HX-MS 还显示在相同区域 G37-L45 中的表位信号。然而交换保护幅度较弱。根据上述观察结果,可以推测,为了使 HX-MS 在群聚界面显示交换保护,需要高度过量的结合分子,而且它应是高亲和力相互作用。

[0280] *0230 和 0231 的表位作图*

对 Fab 0230 和 0231 (来自 W02011106707 的 11H08) 的表位作图不显示任何表位。鉴于上述观察结果,即为了成功,对 hDR3 的表位作图需要良好的亲和力,可推测这些 Fab (W02011106707) 相对较弱的亲和力妨碍通过 HX-MS 进行成功的表位作图。

[0281] 表 29 :产生 Fab 分子的表位信息的 DR3 的 HXMS 分析。在氘交换反应后,DR3 用胃蛋白酶消化,产生经分析的下列消化性肽区域。N67 和 N106 位置是糖基化的,因此肽图谱在这些区域上具有空位。DR3 残基的编号遵循 SEQ ID NO 1。

序列	区域	0120	0130	0143	0148	0163	0228
		阻断	阻断	阻断	非阻断	非阻断	阻断
R32-G54	CRD1	EX	NA	NA	N	NA	EX
G37-L45	CRD1	W	W	W	N	N	EX
F46-Y56	CRD1	W/N	N	N	N	N	W/N
F46-A59	CRD1	EX/W	N	NA	N	N	EX
L71-F78	CRD2	N	N	N	N	N	N
L71-L79	CRD2	N	N	N	N	N	N
L79-E88	CRD2	N	N	N	N	N	N
L79-C89	CRD2	N	N	N	N	N	N
A80-C89	CRD2	N	N	N	N	N	N
V110-W121	CRD2/CRD3	N	N	N	N	N	N
V110-F122	CRD2/CRD3	N	N	N	N	N	N
V123-C130	CRD3	NA	N	N	N	N	N
V131-L142	CRD3	N	NA	N	N	N	N
P140-L153	CRD3	N	N	N	EX	N	N
D143-L153	CRD3	N	N	N	EX	N	N
L154-L166	CRD3/CRD4	N	N	N	N	N	N
L154-F169	CRD3/CRD4	N	N	N	N	W	N
G163-F169	CRD4	N	N	N	N	W	N
Y170-L184	CRD4	N/W	N	N	N	W	N/W
Y170-A193	CRD4	N/W	N	N	N	W	N/W

EX: 表明表位区域的 Fab 结合时的交换保护(> 0.4 Da)。

W: Fab 结合时的弱交换保护(0.2-0.4 Da)。

N: Fab 结合时无交换保护(< 0.2 Da)。

NA: 在相应实验中未分析。

[0282] 不止一种的分配表明, 两项或更多项实验给出有关交换保护的幅度方面略微不同的结果。

[0283] 实施例 21

本文提及抗体的概述

表 30 提供本文所提及抗体的概述, 其命名取决于所使用的不同 mAb/Fab 形式。命名注释: 表 30 利用 4 位数标识 (例如 0228)。然而, 对于相同化合物可观察到不同的命名。例如化合物 0228 亦称为 0227-0000-0228、0227-0228、00228 或 228。所有这些命名表示同一化合物。该规则适用于所有化合物。

[0284] 表 30: 选用于研究的抗 DR3 mAb 和 Fab 化合物的列表。该表给出 mAb、Fab 和杂交瘤克隆编号间的关系。同一行的化合物具有相同的 CDR 区, 并且来源于相同的鼠 mAb, 但以不同的形式制备。同一栏的化合物共有相同的分子形式, 例如化合物的种类或同种型, 但制备自不同的鼠 mAb。

[0285]

杂交瘤编号	杂交瘤纯化的鼠mAb	重组鼠mAb	来自木瓜蛋白酶切割的鼠的mAb Fab	重组鼠Fab	嵌合鼠Fab. 鼠可变结构, 人IgG1恒定结构域.	嵌合鼠Fab. 鼠可变结构, 人IgG4恒定结构域.	嵌合鼠Fab. 鼠可变结构, 人IgG4恒定结构域. 铰链 Cys-> Ser	人源化 Fab, IgG4	人源化 Fab, IgG1	阻断结合	TLIA	SEQ ID NO
5F13	0025	0121		0140	0147	0149	0148			否		24, 25
27F16 或 27F16A1	0070 或 0083	0106		0110	0118	0125	0122			部分		8, 9
27F38	0071									否		
27F44 或 27F44A2	0072 或 0084	0107	0087	0111	0119	0126	0123	0227, 0228 (S49A HC), 0229 (S49A HC, S60A LC)	0169, 0170, 0171, 0172, 0173, 0174, 0222, 0219 (S49A HC), 0226 (S49A HC, S60A LC)	是		10, 11, 16, 17
28F26 或 28F26A3	0073 或 0085	0108	0088	0112	0120	0127	0124			是		12, 13
28F69	0074									否		
29F6	0075									否		

CD4⁺ T细胞。细胞用2 ng/ml IL-12、50 ng/ml IL-18和100 ng/ml TL1A（在Novo Nordisk A/S产生的Flag-HIS-TEV-TL1A）激活，并培养5天。在第5天，细胞用10、5、1、0.5、0.1或0.0001 μg/ml抗DR3 mAb克隆0072、0073或0077，或用Fab片段克隆0087、0088或0091染色。第二PE缀合的山羊-抗小鼠（H+L）用于检测。样品为一式两份。通过FACS评价染色强度。

[0286] 结果：对于单克隆IgG克隆0077及其相应的Fab克隆0091，无法检测到与细胞结合。单克隆IgG克隆0072和0073显示与细胞因子活化CD4⁺ T细胞强结合，在1μg/ml的浓度或更低浓度下观察到最大结合。相应的Fab克隆（0087和0088）以类似效价与细胞因子活化细胞结合，但是在结合饱和上记录到略微较低的MFI值。预期与Fab处理的细胞相比，全长抗体处理的细胞有较大的MFI观测值，因为第二（检测）抗体（抗IgG重链和轻链）与全长IgG抗体克隆的Fab和Fc部分两者结合，但仅与Fab克隆的Fab部分结合（表31）。

抗体或 Fab 片段	用于测定的浓度	MFI
0072	1μg/ml	1300b
0073	1μg/ml	1300
0077	1μg/ml	100
0087	1μg/ml	500
0088	1μg/ml	500
0091	1μg/ml	100

[0287] 表31：显示了在第5天IL-12/IL-18/TL1A活化细胞的平均荧光强度（MFI）值。以单一活的CD4⁺ T细胞对细胞进行门控选择。

[0288] 实施例 23

T 细胞增殖：

采用CD4 Rosettesep (Stem cell technologies) 和Histopaque (Sigma), 通过磁珠分离, 从血沉棕黄层中分离出CD4⁺ T细胞。在含和不含抗TL1A (1000 ng/ml; MAB7441; RnDSystems) 或DR3 mAb或DR3 Fab (5或10 μg/ml) 时, 用2 ng/ml IL-12、50 ng/ml IL-18和100 ng/ml TL1A (Flag-HIS-TEV-TL1A; Novo Nordisk) 激活T细胞 (2*10⁵ 个细胞/孔, 96孔板中) 达5天。所用的DR3 mAb为0072、0073和0077。所用的DR3 Fab为0087、0088和0091。所有样品以一式三份进行。通过胸苷掺入, 测量细胞增殖。在活化5天后, 细胞用 [³H] 胸苷脉冲, 16小时后收获。通过Top Counter以每分钟计数 (cpm) 测定掺入的胸苷。

[0289] 结果：通过用TL1A共刺激, T细胞增殖增加3倍。这种TL1A依赖性增加通过与抗TL1A中和性对照抗体共温育而被阻断。在10 μg/ml下, 所有抗DR3 mAb以及Fab 0091略微抑制增殖, 而Fab 0087和0088甚至用该测定法所用最低浓度都完全阻断增殖。综上所述, Fab 0087和0088在减量调节CD4阳性T细胞增殖的TL1A依赖性共刺激中是非常有效的。

[0290] 在类似的实验中, 与IL-12/IL-18处理的T细胞相比, IL-12 (2 ng/ml)、IL-18 (50 ng/ml) 和100 ng/ml TL1A (Flag-His-TEV-TL1A; Novo Nordisk) 处理的CD4⁺ T细胞显示T细胞增殖有6倍增加。0123和0124 Fab早在0.16 μg/ml Fab的浓度下便完全阻断所诱导的T细胞增殖, 而相应的mAb 0072和0108不影响T细胞增殖。表2中显示了mAb 0072和相应Fab 0123对的数据。通过胸苷掺入而检测的增殖以每分钟计数 (cpm) 给出。

[0291] 表 32:

处理	mAb0072	Fab0123
IL-12/IL-18	1629 ± 109cpm	1629 ± 109cpm
IL-12/IL-18+TL1A	10439 ± 689cpm	10439 ± 689cpm
IL-12/IL-18+TL1A+0.00128 μg/ml mAb 或 Fab	10434 ± 1132cpm	5492 ± 1330cpm
IL-12/IL-18+TL1A+0.16 μg/ml mAb 或 Fab	11886 ± 984cpm	2329 ± 336cpm
IL-12/IL-18+TL1A+10 μg/ml mAb 或 Fab	10139 ± 689cpm	1619 ± 109cpm

标准偏差用 ± 后的数值表示。

[0292] 受抗 DR3 Fab 影响的细胞因子释放

在不存在 TCR 活化时,使用 CD4 Rosettesep (Stem cell technologies) 和 Histopaque (Sigma) 通过磁珠分离自血沉棕黄层分离的 CD4 + T 细胞用含和不含 100 ng/ml TL1A (Flag-His-TEV-TL1A ;Novo Nordisk) 的细胞因子 IL-12 (2 ng/ml)、IL-18 (50 ng/ml) 刺激。48 小时后,收获活化 CD4+ T 细胞 (2x10⁵ 个细胞/孔) 的上清液,并通过 Bioplex 分析细胞因子释放。

[0293] 通过 TL1A 在 48 小时后均诱导 IL-12/IL-18 处理的 CD4+ T 细胞的细胞因子 IL-6、IFN γ、GM-CSF 和 TNF α 的释放。通过 TL1A 诱导的 IL-6、IFN γ、GM-CSF、TNF α 是较之于 IL-12/IL-18 活化细胞的 16 倍 (p=0.05)、1.2 (p=0.02)、7.5 倍 (p=0.04)、4.4 (p=0.0007)。当与 DR3 结合非阻断性 Fab 0091 相比时,IL-6 (p=0.04)、GM-CSF (p=0.04) 和 TNF α (p=0.0008) 均被抗 DR3 Fab 0124 显著阻断 (表 33)。

[0294] 表 33:

细胞因子 (平均值 +/-SEM)	IL-12/IL-18 活化 CD4+T 细胞 (平均值 ± SEM)	IL-12/IL-18 活化 CD4+T 细 胞 +TL1A (平均值 ± SEM)	IL-12/IL-18 活化 CD4+T 细胞 +TL1A+0124 (平均值 ± SEM)	IL-12/IL-18 活化 CD4+T 细胞 +TL1A+0091 (平均值 ± SEM)
IL-6	361 ± 145	5981 ± 1918	698 ± 282	9268 ± 3564
IFN γ	4207 ± 270	4893 ± 400	4388 ± 195	4945 ± 516
GM-CSF	45 ± 11	336 ± 101	55 ± 17	437 ± 167
TNF α	23 ± 2.3	102 ± 3	24 ± 2.5	121 ± 21

标准偏差用 ± 之后的数值表示。

[0295] 实施例 24

使用自克罗恩病患者的肠活检样品分离的固有层单核细胞进行的功能研究

在含和不含抗 DR3 Fab 0124 和非阻断性对照 0091 时,将自克罗恩病患者肠活检样品分离的固有层单核细胞 (LPMC) 与非 IBD 对照用 IL-12 (2 ng/ml)、IL-18 (50 ng/ml) 和 100 ng/ml TL1A (Flag-His-TEV-TL1A ;Novo Nordisk) 激活。

[0296] 来自炎性克罗恩病患者的 LPMC 能够通过诱导 IFN γ 而对 IL-12/IL-18 + TL1A 起反应,且 TL1A 诱导的 IFN γ 水平被 0124 显著阻断 (p=0.0001, n=4),表 34。此外,DR3 Fab 0124 和 0228 抑制 IL-12/IL-18 刺激、TL1A 处理的克罗恩病患者的 LPMC 的 GM-CSF、TNF-α 和 IFNγ 分泌。

[0297] 表 34:

细胞因子 (平均值 +/-SEM)	IL-12/IL-18 活化 LPMC (平均值±SEM, n=4)	IL-12/IL-18 活化 LPMC + TL1A (平均值±SEM, n=4)	IL-12/IL-18 活化 LPMC + TL1A+0124 (平均值±SEM, n=4)
IFNγ	195±51	577±158	199±53

115	120	125
Gln Cys Val Ser Ser Ser	Pro Phe Tyr Cys Gln Pro Cys	Leu Asp Cys
130	135	140
Gly Ala Leu His Arg His	Thr Arg Leu Leu Cys Ser Arg Arg	Asp Thr
145	150	155
Asp Cys Gly Thr Cys Leu	Pro Gly Phe Tyr Glu His Gly Asp	Gly Cys
165	170	175
Val Ser Cys Pro Thr Ser	Thr Leu Gly Ser Cys Pro Glu Arg	Cys Ala
180	185	190
Ala Val Cys Gly Trp Arg	Gln Met Phe Trp Val Gln Val	Leu Leu Ala
195	200	205
Gly Leu Val Val Pro Leu	Leu Leu Gly Ala Thr Leu Thr	Tyr Thr Tyr
210	215	220
Arg His Cys Trp Pro His	Lys Pro Leu Val Thr Ala Asp	Glu Ala Gly
225	230	235
Met Glu Ala Leu Thr Pro	Pro Pro Ala Thr His Leu Ser	Pro Leu Asp
245	250	255
Ser Ala His Thr Leu Leu	Ala Pro Pro Asp Ser Ser Glu	Lys Ile Cys
260	265	270
Thr Val Gln Leu Val Gly	Asn Ser Trp Thr Pro Gly Tyr	Pro Glu Thr
275	280	285
Gln Glu Ala Leu Cys Pro	Gln Val Thr Trp Ser Trp Asp	Gln Leu Pro
290	295	300
Ser Arg Ala Leu Gly Pro	Ala Ala Ala Pro Thr Leu Ser	Pro Glu Ser
305	310	315
		320

[0003]

Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met Met Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr
 325 330 335

Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg
 340 345 350

Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile
 355 360 365

Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln
 370 375 380

Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met
 385 390 395 400

Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu Asp Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly
 405 410 415

Pro

<210> 2
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> hDR3 (CRD1):Fc 融合物

<400> 2

Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His
 1 5 10 15

Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr
 20 25 30

Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Glu

[0004]

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 245 250 255

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 260 265 270

Ser Leu Gly Lys
 275

<210> 3
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> DR3 (CRD1+ A1):Fc 融合物

<400> 3

Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His
 1 5 10 15

Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr
 20 25 30

Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val
 35 40 45

Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu
 50 55 60

Cys Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 65 70 75 80

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 85 90 95

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

[0006]

100	105	110
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp 115	120	125
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 130	135	140
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 145	150	155 160
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu 165	170	175
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 180	185	190
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys 195	200	205
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 210	215	220
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 225	230	235 240
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 245	250	255
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser 260	265	270
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 275	280	285
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys 290	295	

[0007]

<210> 4
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> DR3 (CRD1+CRD2):Fc 融合物

 <400> 4

 Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His
 1 5 10 15

 Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr
 20 25 30

 Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val
 35 40 45

 Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu
 50 55 60

 Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu
 65 70 75 80

 Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp Thr Arg Cys Gly Glu Ser Lys Tyr
 85 90 95

 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 100 105 110

 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 115 120 125

 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 130 135 140

 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

[0008]

<212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> DR3 (CRD1+CRD2+A1):Fc 融合物

 <400> 5

 Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His
 1 5 10 15

 Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr
 20 25 30

 Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val
 35 40 45

 Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu
 50 55 60

 Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu
 65 70 75 80

 Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly
 85 90 95

 Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe
 100 105 110

 Tyr Cys Gln Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 115 120 125

 Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 130 135 140

 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 145 150 155 160

 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val

[0010]

	165		170		175
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln					
	180		185		190
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln					
	195		200		205
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly					
	210		215		220
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro					
225		230		235	240
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr					
	245		250		255
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser					
	260		265		270
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr					
	275		280		285
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr					
	290		295		300
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe					
305		310		315	320
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys					
	325		330		335
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys					
	340				
<210> 6					
<211> 287					

[0011]

<212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> GST-hDR3 (CRD1)

 <400> 6

 Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro Thr
 1 5 10 15

 Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu Tyr
 20 25 30

 Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu Gly
 35 40 45

 Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys Leu
 50 55 60

 Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn Met
 65 70 75 80

 Leu Gly Gly Ser Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu Gly
 85 90 95

 Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser Lys
 100 105 110

 Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu Met
 115 120 125

 Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Ser His Lys Thr Tyr Leu Asn Gly
 130 135 140

 Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp Val
 145 150 155 160

 Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu Val

[0012]

	165	170	175
Ser Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr Leu			
	180	185	190
Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr			
	195	200	205
Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg Gly			
	210	215	220
Ser Pro Glu Phe Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala			
	225	230	235
Gly Asp Phe His Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro			
	245	250	255
Ala Gly His Tyr Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser			
	260	265	270
Thr Cys Leu Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His Arg Asp			
	275	280	285
<210> 7			
<211> 411			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> hDR3-TEV:Fc 融合物			
<400> 7			
Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His			
1	5	10	15
Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr			
	20	25	30

[0013]

Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val
 35 40 45

Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu
 50 55 60

Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu
 65 70 75 80

Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly
 85 90 95

Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe
 100 105 110

Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys Gly Ala Leu His Arg His Thr Arg
 115 120 125

Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly
 130 135 140

Phe Tyr Glu His Gly Asp Gly Cys Val Ser Cys Pro Thr Ser Thr Leu
 145 150 155 160

Gly Ser Cys Pro Glu Arg Cys Ala Ala Val Cys Gly Trp Arg Gln Glu
 165 170 175

Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 180 185 190

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 195 200 205

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 210 215 220

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn

[0014]

225	230	235	240
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg	245	250	255
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val	260	265	270
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser	275	280	285
Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	290	295	300
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu	305	310	315
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	325	330	335
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu	340	345	350
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe	355	360	365
Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly	370	375	380
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr	385	390	395
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys	405	410	
<210> 8			
<211> 119			

[0015]

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ala Phe Ser Ser Asp Gly Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Leu Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Gly Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Cys Cys Ala
 85 90 95

Arg His Ala Asp Tyr Ala Asn Tyr Pro Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 27F44A2/"0072": LC-k

<400> 11

Asp Ile Val Leu Ala Gln Ser Pro Ala Ser Leu Leu Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

[0018]

Ala Arg His Arg Gly Gly Asn Tyr Pro Gln Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 13
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 28F26A3/"0073"/"0124": LC-κ

<400> 13

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Phe Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Asn Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 14
 <211> 227
 <212> PRT

[0020]

<213> 人工

<220>

<223> 11H08 H1 (0230)

<400> 14

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

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

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

Ser Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Lys Asp Gly Asn Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

[0021]

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

Pro Pro Ser
 225

<210> 15
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 11H08 L2 (0230)

<400> 15

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr

[0022]

85

90

95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 16

<211> 226

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> "0228 重链" (27F44A2/"0072"的人源化形式); 包括"S49A"回复突变

<400> 16

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

[0023]

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

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

Ala Ala Phe Ser Ser Asp Gly Tyr Thr Phe Tyr Pro Gly Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg His Ala Asp Tyr Ala Asn Tyr Pro Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

[0024]

210	215	220
Pro Cys		
225		
<210> 17		
<211> 218		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> "0228 轻链" (27F44A2/"0072"的人源化形式)		
<400> 17		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser		
	20	25 30
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro		
	35	40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser		
	50	55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75 80
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg		
	85	90 95
Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		
	100	105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
	115	120 125

[0025]

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 18
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> "0130 重链" (45F36)

<400> 18

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

[0026]

Arg Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 20
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> "0143"重链(44F434)

<400> 20

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Leu Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Gln Arg Glu Ile Tyr Tyr Gly Thr Tyr Tyr Ala Leu Asp His
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21

[0028]

<211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> "0143"轻链(44F434)

 <400> 21

 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30

 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Gln
 65 70 75 80

 Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Pro Leu Pro Trp
 85 90 95

 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 22
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> "0152"重链(50F191)

 <400> 22

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

[0029]

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

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

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

Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

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

Val Arg Asp Gln Asp Tyr Arg Tyr Asp Gly Tyr Tyr Ala Met Asp His
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> "0152"轻链(50F191)

<400> 23

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu His Tyr
 20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

[0030]

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

Ala Arg Gln Thr Arg Ser Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> "0148"轻链

<400> 25

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105 110

[0032]

<223> "0163"轻链

<400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
 20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45

Tyr Asn Val Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Thr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg Arg
 100 105

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 0072 的基础人源化构建体 hz0072 (VH)

<400> 28

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

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

[0034]

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

Ser Ala Phe Ser Ser Asp Gly Tyr Thr Phe Tyr Pro Gly Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg His Ala Asp Tyr Ala Asn Tyr Pro Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 29

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 0072 的基础人源化构建体 hz0072 (VL)

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

[0035]

SEQ ID NO 1: hDR3 (信号肽 1-14 和跨膜结构域以灰色显示, 死亡结构域(DD)用下划线表示)

1-417

MEQRPRGCAAVAAALLLVLLGARAQGGTRSPRCD CAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEP
CGNSTCLVCPQDTFLAWENHHNSECARCQACDEQASQVALENC SAVADTRCGCKPGWFVECQ
VSQCVSSSPFYCQPCLDCGALHRHTRLLCSRRD TDCGTCLPGFYE HGDGCVSCPTSTLGSCPER
CAAVCGWRQMF~~FWQVLLAGLVPLLLGAT~~LTYYRHCWPHKPLVTADEAGMEALTPPPATHLSP
LDSAHTLLAPPSSEKICTVQLVGN SWTPGYPETQEALCPQVTWSWDQLPSRALGPAAAPTLSPE
SPAGSPAMMLQPGPQLYDVMDAVPARRWKEFVRTLGLREAEIEAVEVEIGRFRDQQYEMLKRW
RQQQPAGLGAVYAALERMGLDGCVEDLRSRLQRGP

SEQ ID NO 2:

DR3 (CRD1) – Fc (**DR3** 区有下划线)

QGGTRSPRCD CAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLESKYGPPCPPCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO 3:

DR3 (CRD1+ A1) – Fc (**DR3** 区有下划线)

QGGTRSPRCD CAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTFLAWENHHNS
ECAESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO 4:

DR3 (CRD1+CRD2) – Fc (**DR3** 区有下划线)

QGGTRSPRCD CAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTFLAWENHHNS
ECARCQACDEQASQVALENC SAVADTRCGESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI

图 1

SRTPEVTCVWVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
K

SEQ ID NO 5:

DR3 (CRD1+CRD2+A1) – Fc (**DR3** 区有下划线)

QGGTRSPRCDACAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTFLAWENHHNS
ECARCQACDEQASQVALENCSAVADTRCGCKPGWFVEECQVSQCVSSSPFYCQESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO 6:

GST-hDR3 (CRD1): (**DR3** 区有下划线)

SPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVCLKTQ
SMAIIRYIADKHNMLGGSPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPMLKMF
DRLSHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVSFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAW
PLQGQWQATFGGDHPPKSDLVPRGSPEFQGGTRSPRCDACAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKA
PCTEPCGNSTCLEFPGRLERPHRD

SEQ ID NO 7:

hDR3-TEV-Fc (**DR3** 区有下划线)

QGGTRSPRCDACAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTFLAWENHHNS
ECARCQACDEQASQVALENCSAVADTRCGCKPGWFVEECQVSQCVSSSPFYCQPCLDCGALHR
HTRLLCSRRTDCGTCLPGFYEHGDGCVSPTSTLGSCPERCAAVCGWRQENLYFQGESKYGP
PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

图 1

SEQ ID NO 8:**27F16A1: 重链-mIgG1 (CDR 用黑体字标示)**

EVQLVESGGDFVKGPGSLKLSAASGFTFNNY**GMS**WVRQTPDKRLEWVA**AISSGV**TYTYYPD
TVKGRRFTISRDNANTLYLHMSSLKSEDTAMY**YCGRHDDYGNHFDY**WGQGTTLTVSS

SEQ ID NO 9:**27F16A1: 轻链-κ (CDR 用黑体字标示)**

DIVMTQSPSSLAMSLGQRVTMN**CKSSQ**LLNSHNQKNYLA**WYQQKPGQSP**KLLVY**FASSRE**
SGVPDRFIGSGSGTDFLT**ISSVQAEDLADYFCQQHYSTPFT**FGSGTKLEIKR

SEQ ID NO 10:**27F44A2/"0072": 重链-mIgG1 (CDR 用黑体字标示)**

EVKLVESGGGLVKPGSLKLSASGFAFS**NYDMS**WVRQTPEKRLEWVA**AFSSDGYTFY**PDS
LKGRRFTISRDNARNTLYLQ**MSSLG**SEDTALYCCAR**HADYANYPVMDY**WGQGTSVTVSS

SEQ ID NO 11:**27F44A2/"0072": 轻链-κ (CDR 用黑体字标示)**

DIVLAQSPASLLVSLGQRATIS**CRASKSV**STSGYSY**MHWYQQKPGQP**PKLLIY**LASNLE**SGVP
ARFSGSGSGTDFLT**NIHPVEEEDAATYYCQHSRELP**LTFGAGTMLEIKR

SEQ ID NO 12:**28F26A3/"0073"/"0124": 重链-mIgG2a (CDR 用黑体字标示)**

EVKV**VESGGGLV**KPGSLKLSAASG**VFSSYDMS**WVRQIPEKRLEWVA**AISSGDYYTY**YPDS
VKGRRFTISRDDARNTLYLQ**MSSLR**SEDTALY**CCARHRGGNYPQY**AMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO 13:**28F26A3/"0073"/"0124": 轻链-κ (CDR 用黑体字标示)**

DILLTQSPASFAVSLGQRATIS**CRASKSV**STSGY**NIHWYQQKPGQP**PKLLIY**LTSNLE**SGVPA
RFSGSGSGTDFLT**NIHPVEEEDAATYYCQHSRELP**PFTFGSGTKLEIKR

SEQ ID NO 14:**11H08 重链(0230)-CDR 用下划线标示**

图 1

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTNYAMSWWRQAPGQRLEWVSTITSGGSYIYYLDSV
KGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYNCARRKDGNYYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP
 SSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPS

SEQ ID NO 15:

11H08 轻链(0230)-CDR 用下划线标示

DIVLTQSPSSLSASVGRVTITCRASESVDSYGNSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFS
 GSGSRTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYEDPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
 ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA
 CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO 16:

“0228 重链” (27F44A2/“0072”的人源化形式): 包括“S49A”回复突变-**CDR** 用下划线标示

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMSWWRQATGKGLEWAAAFSSDGTYTFYPGSV
KGRFTISRRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCARHADYANYPVMDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP
 SSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPC

SEQ ID NO 17:

“0228 轻链” (27F44A2/“0072”的人源化形式)-CDR 用下划线标示

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSR
 FSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQHSRELPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA
 CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO 18:

“0130 重链” (45F36)-CDR 用下划线标示

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWWRQSPDKRLEWVAEISSGDTYTYYPDTV
TGRFTISRDNAKKTLYLEMSGLRSEDTAMYYCARDREAYYGQQYVMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO 19:

“0130 轻链” (45F36)-CDR 用下划线标示

图 1

DIVLTQSPASLAVSLGLSVTISCRASESIEYSGTSFLQWYQQKPGQPPRLLIYGSSTVESGVPARFS
GSGSGTDFSLNIHPVEEDDSAMYFCQQSRRLPWTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO 20:

“0143”重链(44F434)-CDR 用下划线标示

EVQLVESGGDLVMPGGSLKLSCAASGFIFSSYGLSWIRQTPDKRLEWWATISGGDSYTYYPDSVK
GRFTISSDNAKNTLYLQMTSLKSEDTAMYYCATQREIYYGTYALDHWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO 21:

“0143”轻链(44F434)-CDR 用下划线标示

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG
SGTDYSLTISSELEQDDIATYFCQQGSPLPWTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO 22:

“0152”重链(50F191)-CDR 用下划线标示

EVQLVESGGGLVEPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWWRQSPEKRLEWWAEISSGDSYTYYPDIVT
GRFTISRDDAKNTLFLEMSSLRSEDTAIYYCVRDQDYRYDGYAMDHWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO 23:

“0152”轻链(50F191)-CDR 用下划线标示

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEHYGTSLMQWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPAR
FSGRSGPDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQQSRRIPWTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO 24:

“0148”重链(5F13-CDR 用下划线标示)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKFSCAVSGFTFSSYVMSWWRQTPEKRLEWWAAISSDSTYTYYLDSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARQTRSDAMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO 25:

“0148”轻链(5F13-CDR 用下划线标示)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARF
SGSGSRTDFTLTINPVEADDVAIYYCQQSNEDPLTFGAGTKLELKR

SEQ ID NO 26:

“0163”重链(45F187-CDR 用下划线标示)

图 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTNYMAWWRKPPGKTLLEWLGFMRNIVNGYTTDYSG
 SVEGRFTISRDNSSQSIYLQMNALRPEDSATYYCARDIGYRYDGGGGYGLDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO 27:

“0163”轻链(45F187-CDR 用下划线标示)

DIQMTQSPASLSASVGETVTLTCRASGNIHNYLTWYQQKQKGKSPQLLVYNVKTLDGVSSRFSGS
 GSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHFWITPYTFGGGKLEIRR

SEQ ID NO 28:

0072 的基础人源化构建体 hz0072 (VH)-CDR 用下划线标示

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMSWWRQATGKGLEWWSAFSSDGYTFYPGSV
 KGRFTISRRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCARHADYANYPVMDYWGQGTSLVTVSS

SEQ ID NO 29:

0072 的基础人源化构建体 hz0072 (VL)-CDR 用下划线标示

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPKGKAPKLLIYLASNLES
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSRELPLTFGGGKVEIK

图 1

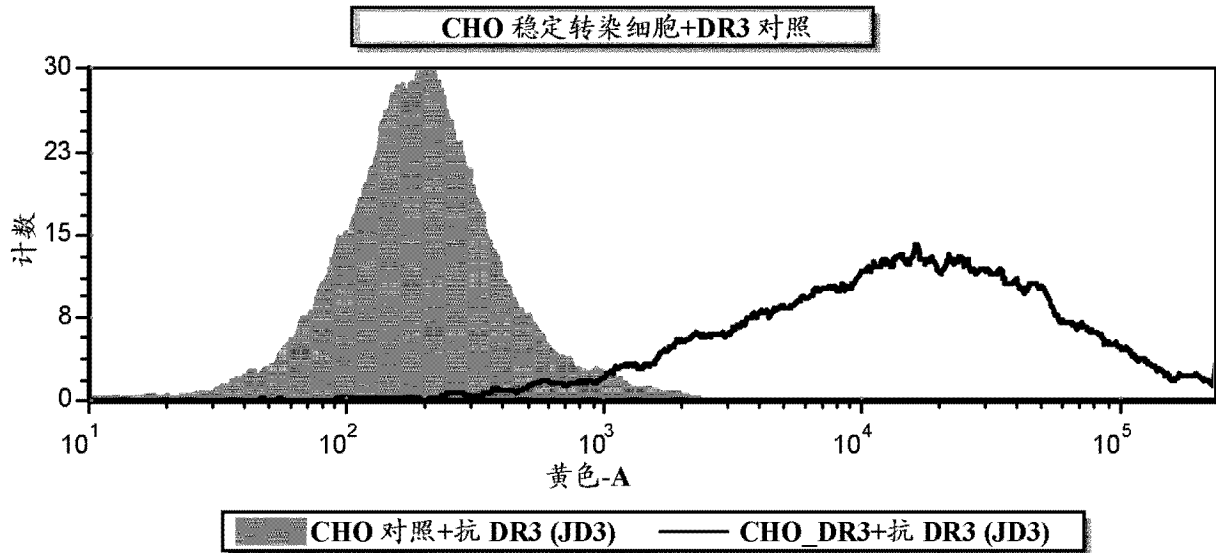


图 2

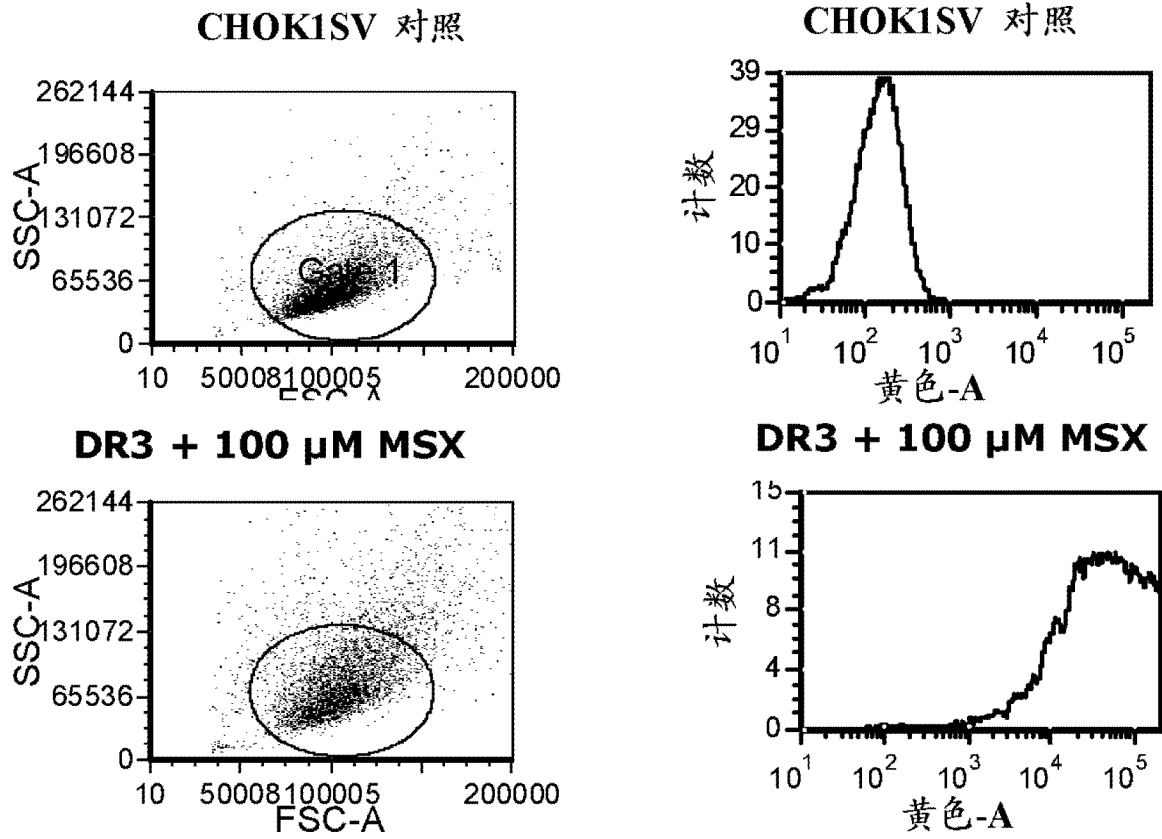


图 3

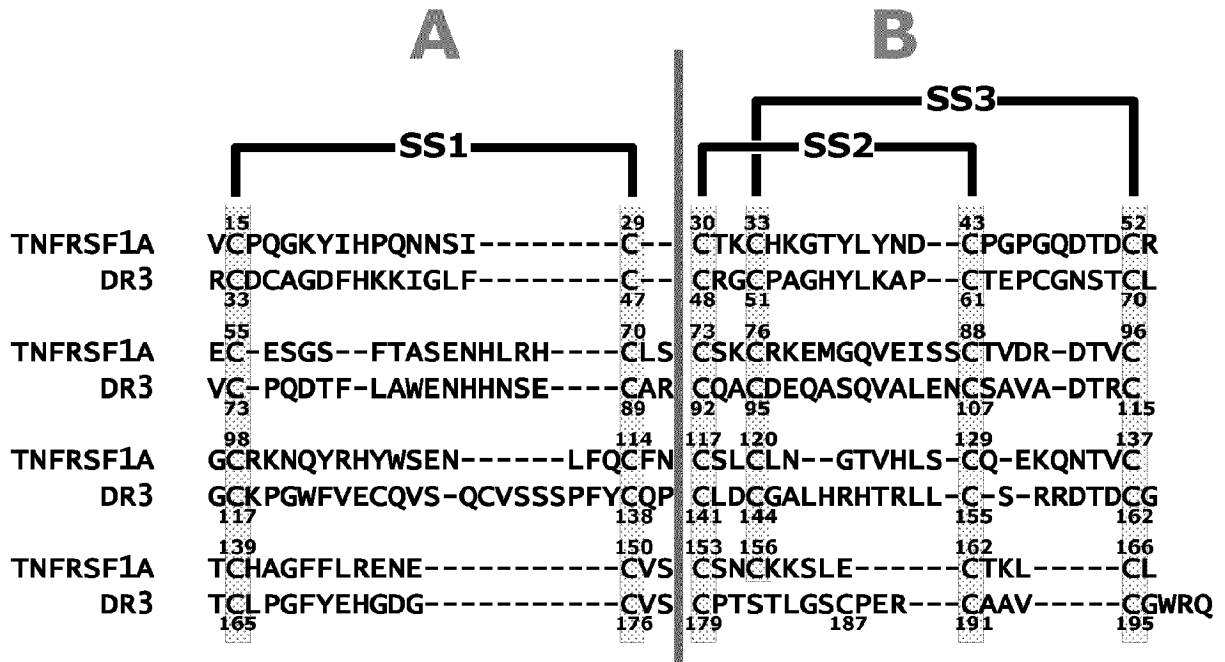
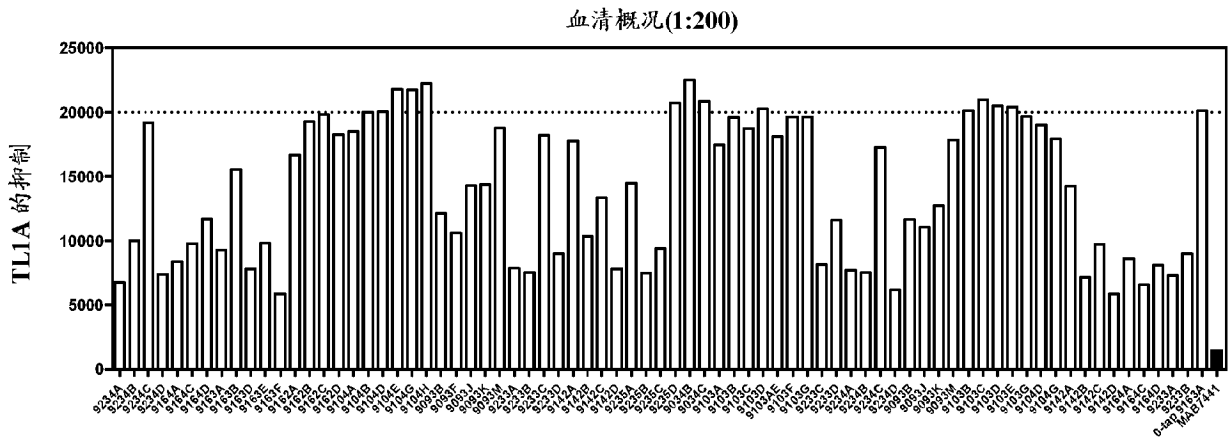


图 4



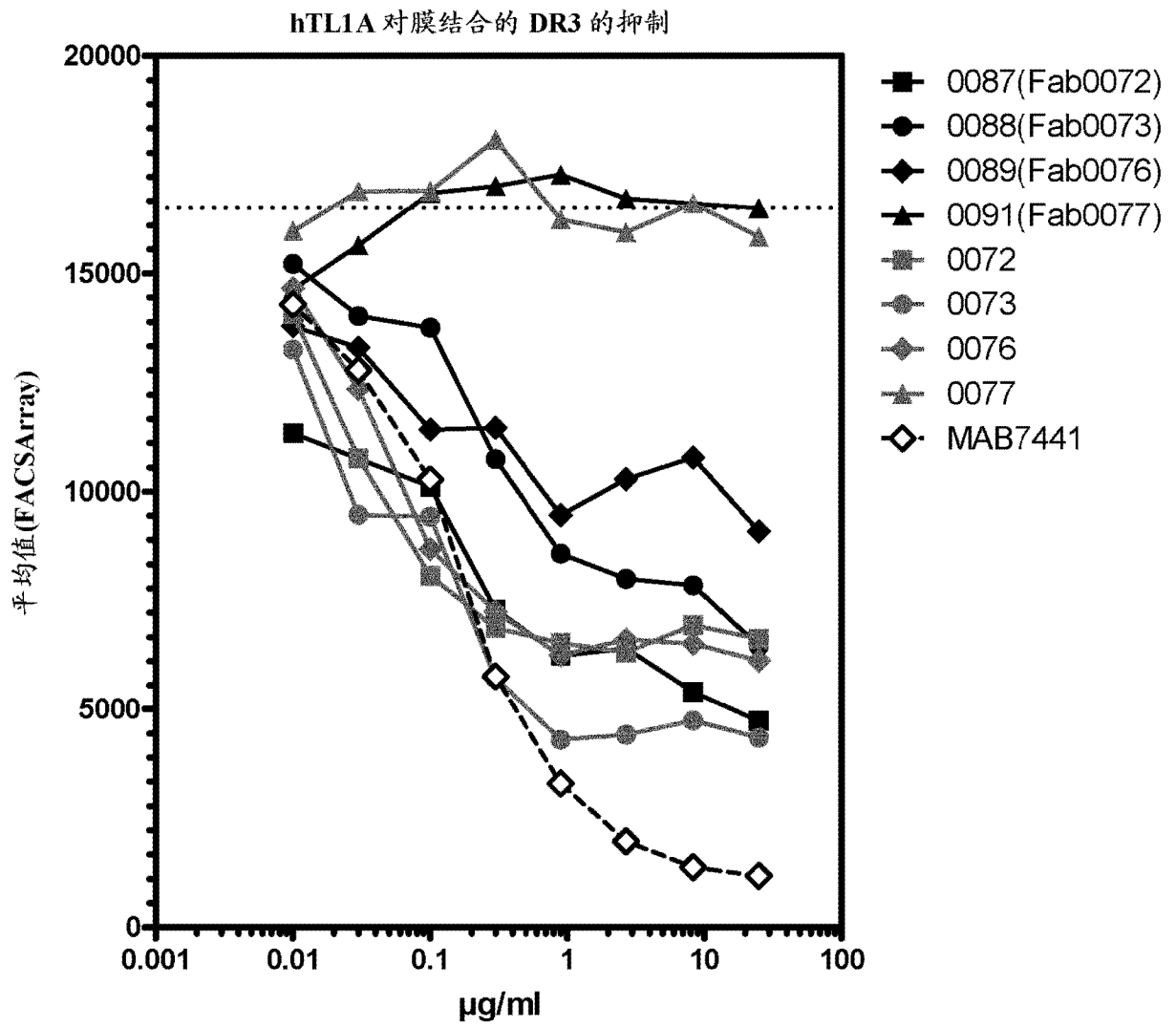


图 7

供体 120511A; 第 5 天
用 IL12/IL18 和 TL1A (NN)刺激
用不同的 DR3 Ab 和 FAB 阻断:
NNCD 0227-0000-0123-1A, 与 NNCD 0227-0000-0072-1A 的嵌合 FAB
NNCD 0227-0000-0124-1A, 与 NNCD 0227-0000-0108-2A 的嵌合 FAB

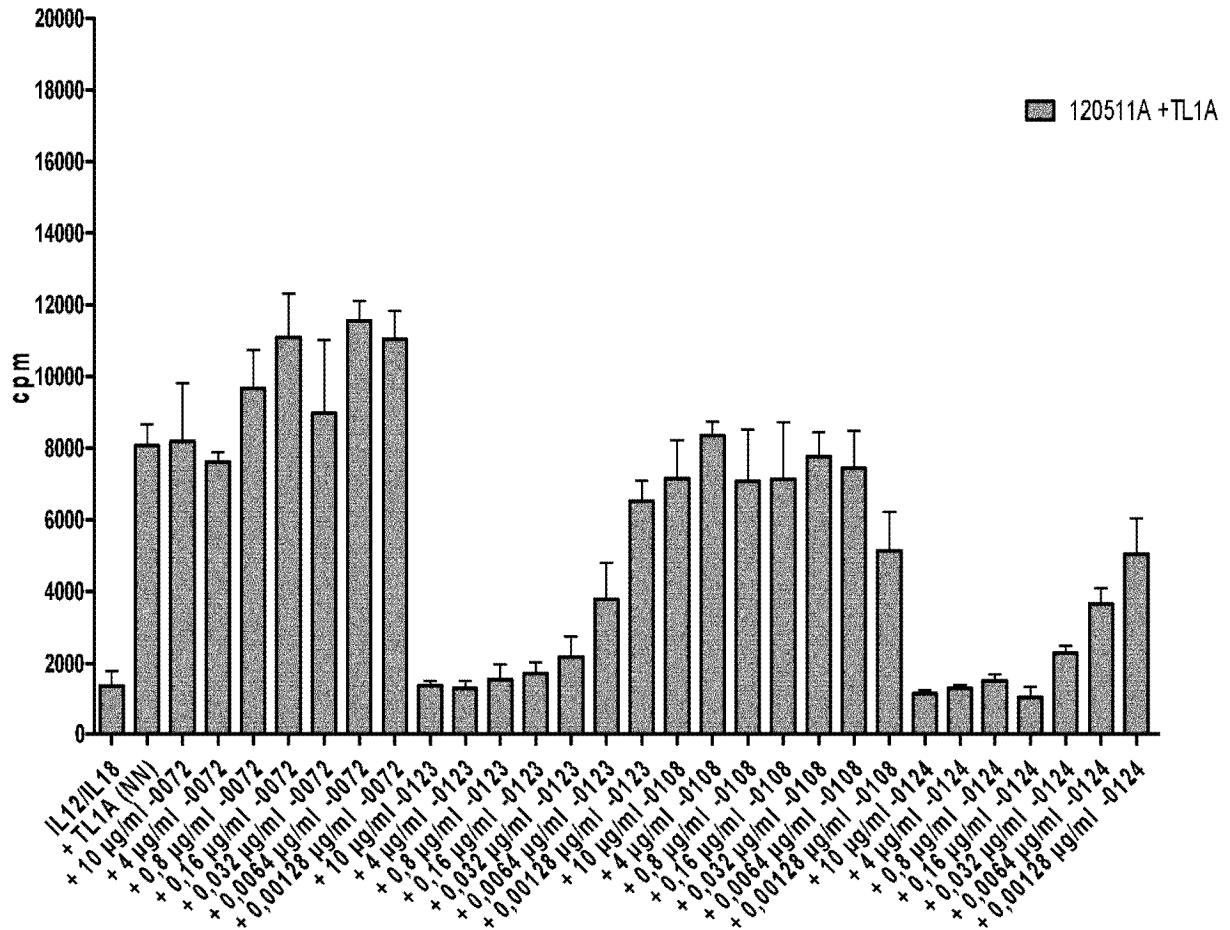


图 8