(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 035018 (13) B1

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
**2020.04.17**

(21) Номер заявки
**201400390**

(22) Дата подачи заявки
**2012.09.28**

(51) Int. Cl. *C07K 16/24* (2006.01)
*A61K 39/395* (2006.01)
*A61P 29/00* (2006.01)

## (54) АНТИТЕЛА К TL1a И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **2011904042; 61/541,590**
(32) **2011.09.30**
(33) **AU; US**
(43) **2014.09.30**
(86) **PCT/AU2012/001161**
(87) **WO 2013/044298 2013.04.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТЕВА ФАРМАСЬЮТИКАЛ АВСТРАЛИЯ ПТИ ЛТД. (AU)**

(72) Изобретатель:
**Поултон Линн Дороти, Кларк Адам, Поу Эндрю Джеймс, Тамвакис Дебра, Копсидас Джордж, Дойл Энтони Джерард, Дженнингз Филип Энтони, Поллард Мэттью (AU)**

(74) Представитель:
**Вашина Г.М. (RU)**

(56) US-A1-20110217310
WO-A2-2005018571
YANG, C.-R., et al. "Soluble Decoy Receptor 3 Induces Angiogenesis by Neutralization of TL1A, a Cytokine Belonging to Tumor Necrosis Factor Superfamily and Exhibiting Angiostatic Action", Cancer Research, February 2004, Volume 64, Number 3, Pages 1122-1129, the whole document
MIGONE, T.-S., et al. "TL1A is a TNF-like Ligand for DR3 and TR6/DcR3 and Functions as a T Cell Costimulator", Immunity, March 2002, Volume 16, Number 3, Pages 479-492, the whole document, especially figure 3

(57) Изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему домену, который специфически связывает TL1a, включающему вариабельную область тяжелой цепи ($V_H$), по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 186, и вариабельную область легкой цепи ($V_L$), по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 199. Описана также фармацевтическая композиция для ингибирования или предотвращения активности TL1a, включающая антитело или его антигенсвязывающий домен и фармацевтически приемлемый носитель, а также применение ее для лечения или предотвращения аутоимунных заболеваний.

035018 B1

035018 B1

## Родственные заявки

Заявка на данное изобретение заявляет приоритет патентной заявки Австралии № 2011904042 с названием "Антитела к TL1a и их применение", дата подачи 30 сентября 2011 г., и патентной заявки США № 61/541,590 с названием "Антитела к TL1a и их применение", дата подачи 30 сентября 2011 г. Содержание указанных заявок является включенным в данную заявку во всей полноте посредством ссылки.

## Список последовательностей

Изобретение подается вместе со списком последовательностей, представленным в электронной форме. Содержание указанного списка последовательностей является включенным в данную заявку во всей полноте посредством ссылки.

## Область изобретения

Данное изобретение относится к белкам, которые связываются с TL1a, и их применению, например, в терапии, профилактике, диагностике или прогнозировании.

## Уровень техники

TNF-подобный лиганд 1a (TL1a, syn. член суперсемейства TNF номер 15 (TNFSF15); TL1 и VEGI) является членом суперсемейства факторов некроза опухоли, который экспрессируется антигенными клетками (включая дендритные клетки, B клетки и макрофаги), $CD4^+$ и $CD8^+$ T-клетками и эндотелиальными клетками и может экспрессироваться на клеточной поверхности или выделяться в виде растворимого цитокина. Рецептор для TL1a, рецептор смерти 3 (DR3) экспрессируется многими клетками, включая $CD4^+$ и $CD8^+$ T-клетки, NK клетки, NKT клетки и $FOXP3^+$ регуляторные T (Treg) клетки.

TL1a может также связываться с рецептором-ловушкой (DcR3), который является конкурирующим ингибитором DR3. DcR3 также является рецептором-ловушкой для Fas-лиганда (Fas-L) и лимфотоксин-подобного индуцируемого белка, который конкурирует с гликопротеином D в связывании медиатора вхождения вируса герпеса на T-клетках (LIGHT). Соответственно, DcR3 является важным регулятором нескольких путей сигнальной трансдукции.

TL1a/DR3 сигнальные пути вовлечены в несколько биологических систем, ассоциированных с человеческими болезнями. Например, была показана роль TL1a в иммунитете и ангиогенезе.

Используя мышей с дефицитом TL1a и/или DR3, исследователи также показали, что ингибирование этого пути может принести профилактическую или лечебную пользу при многих заболеваниях с участием иммунной системы, таких как экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ; модель рассеянного склероза), колит, воспалительные заболевания кишечника, астма и артрит. Было также показано, что TL1a способствует формированию пенистых клеток и атеросклеротических бляшек.

Из последующего описания специалисту в данной области станет очевидно, что TL1a играет важную роль в биологических процессах многих важных человеческих заболеваний. Соответственно, соединения, ингибирующие активность TL1a, являются желательными агентами для использования при лечении, профилактике, диагностировании и прогнозировании заболеваний.

## Краткое описание изобретения

Авторы изобретения создали TL1a-связывающие белки, содержащие антигенсвязывающие домены антител, способные специфично связываться с TL1a и ингибировать взаимодействие между TL1a и DR3 (тем самым нейтрализуя активность TL1a), не ингибируя взаимодействие TL1a и DcR3. Не основываясь на какой-либо теории или механизме действия, авторы утверждают, что такие TL1a-связывающие белки могут быть способны к уменьшению или предотвращению сигнальной роли TL1a через DR3 без существенного влияния на гомеостатическое взаимодействие DcR3 и TL1a. При этом сохраняется естественное антагонистическое влияние DcR3 на взаимодействия TL1a-DR3, что может быть полезным, так как DcR3 также регулирует количество свободных Fas-L и LIGHT, доступных для связывания с их рецепторами (Fas и H-VEM, соответственно). Поскольку Fas-опосредствованный цитолиз играет определенную роль в контроле рака, потенциальные последствия увеличения количества DcR3 связывающегося с Fas-L могут включать повышение подверженности раковым заболеваниям. Также, не основываясь на какой-либо теории или механизме действия, белки, специфически ингибирующие взаимодействие TL1a и DR3, но не DcR3, могут быть предпочтительными при лечении заболеваний без ухудшения безопасности.

Подкласс TL1a-связывающих белков, идентифицированных авторами, также ингибирует или предотвращает апоптоз TF-1 клеток, стимулированный низкими концентрациями человеческого TL1a, т.е. антитела обладают низкой эффективной концентрацией или $EC_{50}$. TL1a-связывающие белки, способные к ингибированию или предотвращению активности TL1a (например, TL1a-стимулированного апоптоза TF-1 клеток), иногда в этом тексте называются высокоэффективными TL1a-связывающими белками.

Авторы также идентифицировали участок TL1a, связывающийся с высокоэффективным TL1a-связывающим белком, специфично связывающимся с TL1a и ингибирующим взаимодействие TL1a с DR3, не ингибируя способность TL1a взаимодействовать с DcR3.

TL1a-связывающие белки, идентифицированные авторами, образуют основу для различного терапевтического/профилактического/диагностического/прогностического применения. Это демонстрируется на примере использования авторами TL1a-связывающего белка согласно данному изобретению для лечения модели колита, в котором белок демонстрирует эффективность, по меньшей мере равную стандартному способу лечения этого заболевания.

Соответственно, данное изобретение описывает выделенный или рекомбинантный TL1a-связывающий белок, включающий антигенсвязывающий домен антитела, в котором антигенсвязывающий домен специфично связывается с TL1a и в котором TL1a-связывающий белок ингибирует взаимодействие TL1a и DR3 и не ингибирует взаимодействие TL1a и DcR3.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок не уменьшает в доступной для обнаружения степени взаимодействие между TL1a и DcR3. Например, эффект TL1a-связывающего белка на взаимодействие TL1a и DcR3 оценивается с помощью конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA). Например, TL1a-связывающий белок инкубируют с TL1a (например, человеческим TL1a) и вводят в контакт с полипептидом, включающим DcR3 (например, человеческим DcR3 (hDcR3)), слитым с Fc участком антитела ("DcR3/Fc") и определяют уровень связывания TL1a. В одном примере реализации данного изобретения уровень связывания TL1a в присутствии или в отсутствие белка не отличается существенным образом и/или несущественно отличается для возможности расчета $EC_{50}$.

В одном примере реализации данного изобретения уровень ингибирования взаимодействия TL1a и DcR3 (или DcR3/Fc) в присутствии TL1a-связывающего белка, выраженный в процентах от уровня связывания в отсутствие белка, составляет 25% или менее, или 22% или менее, или 20% или менее, или 18% или менее, или 15% или менее, или 12% или менее, или 10% или менее, или 7% или менее, или 5% или менее.

В одном примере реализации данного изобретения способность TL1a-связывающего белка ингибировать взаимодействие TL1a и DR3 или DcR3 оценивают с помощью иммобилизации DcR3/Fc или полипептида, включающего DR3 (например, человеческий DR3 (hDR3)), слитый с Fc участком антитела (DR3/Fc), на твердой или полутвердой поверхности (например, планшете ELISA) с концентрацией приблизительно 2 мкг/мл. TL1a-связывающий белок затем вводят в контакт с биотинилированным человеческим TL1a (с концентрацией приблизительно 1 мкг/мл) в течение приблизительно 30 мин, затем добавляют к иммобилизованному DcR3/Fc или DR3/Fc. После промывания определяют связывание TL1a. Для определения процентной доли связывания или ингибирования данные нормализуют, выражая их как процентную долю от максимального связывания TL1a с иммобилизованным DcR3/Fc или DR3/Fc в отсутствие TL1a-связывающего белка. Вычисляя уровень ингибирования при различных концентрациях TL1a-связывающего белка, определяют $EC_{50}$.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок ингибирует взаимодействие TL1a и DR3 (или DR3/Fc) но не TL1a и DcR3 (или DcR3/Fc).

Например, TL1a-связывающий белок ингибирует взаимодействие DR3/Fc и TL1a с $EC_{50}$ от приблизительно 20 нмоль/л до приблизительно 10 фмоль/л, или $EC_{50}$ 20 нмоль/л или менее, например, 15 нмоль/л или менее, например, 11 нмоль/л или менее, например 5 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 5 нмоль/л или менее. Например, $EC_{50}$ составляет 3 нмоль/л или менее. Например, $EC_{50}$ составляет 2,5 нмоль/л или менее. Например, $EC_{50}$ составляет 1 нмоль/л или менее. Например, $EC_{50}$ составляет 0,5 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ оценивают с помощью конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA). Например, различные концентрации TL1a-связывающего белка инкубируют с TL1a (например, человеческим TL1a) (например, приблизительно с 1 мкг/мл TL1a) и затем вводят в контакт с DR3/Fc (например, приблизительно с 2 мкг/мл DR3/Fc) и определяют уровень связывания TL1a. Концентрация белка, при которой определяется половина максимального ингибирования связывания с TL1a, принимается как $EC_{50}$.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок нейтрализует активность TL1a в клетке или на клетке, препятствуя взаимодействию TL1a и DR3.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок связывается с внеклеточным доменом TL1a, таким как внеклеточный домен человеческого TL1a.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок связывается с человеческим TL1a, производимым клетками млекопитающих, такими как человеческие клетки.

Типичные TL1a-связывающие белки по данному изобретению понижают уровень апоптоза TF-1 клеток, культивированных в присутствии человеческого TL1a, такого как человеческий TL1a, производимый клетками млекопитающих (например, человеческими клетками) (например, приблизительно 100 нг человеческого TL1a на 1 мл культуры) и циклогексимида. Например, приблизительно от $7\times10^4$ до $8\times10^4$ TF-1 клеток (например, $7{,}5\times10^4$ клеток) вводят в контакт приблизительно с 1 мкг человеческого TL1a на 1 мл культуры и циклогексимида. Например, TL1a-связывающий белок уменьшает уровень апоптоза TF-1 клеток с $EC_{50}$ (т.е. концентрацией TL1a-связывающего белка, при которой достигается 50% от максимального ингибирования TL1a-стимулированного апоптоза TF-1 клеток, достигаемого TL1a-связывающим белком) в 25 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 5 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 2 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 1,5 нмоль/л или менее, или 1,2 нмоль/л или менее, или 1,1 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изо-

бретения $EC_{50}$ составляет 1 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 0,75 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 0,3 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 0,1 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет от приблизительно 1,5 нмоль/л до приблизительно 10 фмоль/л, например от приблизительно 1 нмоль/л до приблизительно 50 фмоль/л, например от приблизительно 1 нмоль/л до приблизительно 100 фмоль/л.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок связывается с TL1a на поверхности клетки с $EC_{50}$ (т.е. концентрацией TL1a-связывающего белка, при которой достигается 50% максимального связывания с клеткой, достигаемого TL1a-связывающим белком) приблизительно в 10 нмоль/л или менее, например, как определено с помощью поточной цитометрии. В одном примере реализации данного изобретения поточную цитометрию проводят приблизительно от $2\times10^5$ до $3\times10^5$ клеток (например, $2{,}5\times10^5$ клеток). В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 5 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 2 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет от приблизительно 10,0 нмоль/л, или 5,0 нмоль/л, или 1,0 нмоль/л, или 0,5 нмоль/л, или 0,1 нмоль/л до приблизительно 10 фмоль/л.

Данное изобретение также описывает выделенный или рекомбинантный TL1a-связывающий белок, включающий антигенсвязывающий домен антитела, в котором антигенсвязывающий домен специфично связывается с TL1a и ингибирует взаимодействие биотинилированного TL1a и DR3/Fc с $EC_{50}$ со значением приблизительно 2,5 нмоль/л или менее, например 1 нмоль/л или менее или от приблизительно 2,5 нмоль/л, или приблизительно 1,0 нмоль/л, или приблизительно 0,5 нмоль/л, или приблизительно 0,1 нмоль/л до приблизительно 10 фмоль/л в конкурентном иммуноферментном анализе ELISA:

в котором DR3/Fc иммобилизован на твердом или полутвердом субстрате (например, на твердом субстрате, таком как планшет ELISA) с концентрацией приблизительно 2 мкг/мл, и

в котором биотинилированный TL1a контактирует в течение приблизительно 30 мин с концентрацией приблизительно 1 мкг/мл с TL1a связывающим белком в интервале концентраций от приблизительно 10 до приблизительно 0,01 мкг/мл и после чего контактирует с иммобилизованным DR3/Fc, и

в котором TL1a-связывающий белок не уменьшает в доступной для обнаружения степени взаимодействие между биотинилированным TL1a и DcR3/Fc в конкурентном иммуноферментном анализе ELISA по сравнению с уровнем связывания биотинилированного TL1a с DcR3/Fc в отсутствие TL1a-связывающего белка, в котором DcR3/Fc иммобилизован на твердом или полутвердом субстрате (например, на твердом субстрате, таком как планшет ELISA) с концентрацией приблизительно 2 мкг/мл, в котором биотинилированный TL1a контактирует в течение приблизительно 30 мин с концентрацией приблизительно 1 мкг/мл с TL1a-связывающим белком с концентрацией от приблизительно 10 до 0,1 мкг/мл и после чего контактирует с иммобилизованным DcR3/Fc.

Данное изобретение также описывает выделенный или рекомбинантный TL1a-связывающий белок, включающий антигенсвязывающий домен антитела:

в котором антигенсвязывающий домен специфично связывается с TL1a и ингибирует взаимодействие биотинилированного TL1a и DR3/Fc с $EC_{50}$ со значением приблизительно 2,5 нмоль/л или менее, например 1 нмоль/л или менее или от приблизительно 2,5 нмоль/л, или приблизительно 1,0 нмоль/л, или приблизительно 0,5 нмоль/л, или приблизительно 0,1 нмоль/л до приблизительно 10 фмоль/л в конкурентном иммуноферментном анализе ELISA, и

в котором DR3/Fc иммобилизован на твердом или полутвердом субстрате (например, на твердом субстрате, таком как планшет ELISA) с концентрацией приблизительно 2 мкг/мл, и

в котором биотинилированный TL1a контактирует в течение приблизительно 30 мин с концентрацией приблизительно 1 мкг/мл с TL1-a связывающим белком в интервале концентраций от приблизительно 10 мкг/мл до приблизительно 0,01 мкг/мл и после чего контактирует с иммобилизованным DR3/Fc, и в котором TL1a-связывающий белок не уменьшает в доступной для обнаружения степени взаимодействие между биотинилированным TL1a и DcR3/Fc в конкурентном иммуноферментном анализе ELISA по сравнению с уровнем связывания биотинилированного TL1a с DcR3/Fc в отсутствие TL1a-связывающего белка, и в котором DcR3/Fc иммобилизован на твердом или полутвердом субстрате (например, на твердом субстрате, таком как планшет ELISA) с концентрацией приблизительно 2 мкг/мл, в котором биотинилированный TL1a контактирует в течение приблизительно 30 мин с концентрацией приблизительно 1 мкг/мл с TL1a-связывающим белком с концентрацией от приблизительно 10 до 0,1 мкг/мл и после чего контактирует с иммобилизованным DcR3/Fc, и

в котором TL1a-связывающий белок уменьшает уровень апоптоза TF-1 клеток, культивированных в присутствии человеческого TL1a произведенного человеческими клетками и циклогексимида с $EC_{50}$ (т.е. концентрацией TL1a-связывающего белка, при которой достигается 50% от максимального ингибирования TL1a-стимулированного апоптоза TF-1 клеток, достигаемого TL1a-связывающим белком) в 25 нмоль/л или менее, или от приблизительно 1,5 нмоль/л, или 1,0 нмоль/л, или 0,5 нмоль/л, или 0,1 нмоль/л, или 0,05 нмоль/л до приблизительно 10 фмоль/л, и

в котором приблизительно $7,5\times10^4$ TF-1 клеток входит в контакт с приблизительно 100 нг человеческого TL1a на мл культуры и приблизительно 10 мкг/мл циклогексимида с TL1a-связывающим белком с концентрацией приблизительно 5 мкг/мл или менее в течение приблизительно от 4 до 5 ч.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a является биотинилированным, с одной стороны, т.е. биотин связан только с одной аминокислотой в TL1a.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок не уменьшает в доступной для обнаружения степени взаимодействие между биотинилированным TL1a и DcR3/Fc по результатам конкурентного иммуноферментного анализа ELISA, по сравнению с уровнем связывания биотинилированного TL1a с DcR3/Fc в отсутствие TL1a-связывающего белка, в котором биотинилированный TL1a контактирует в течение приблизительно 30 мин с концентрацией приблизительно 1 мкг/мл с TL1a-связывающим белком с концентрацией приблизительно 100 мкг/мл и после чего контактирует с иммобилизованным DcR3/Fc.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок не уменьшает в доступной для обнаружения степени взаимодействие между биотинилированным TL1a и DcR3/Fc по результатам конкурентного иммуноферментного анализа ELISA, по сравнению с уровнем связывания биотинилированного TL1a с DcR3/Fc в отсутствие TL1a-связывающего белка, в котором биотинилированный TL1a контактирует в течение приблизительно 30 мин с концентрацией приблизительно 1 мкг/мл с TL1a-связывающим белком с концентрацией приблизительно 10 мкг/мл и после чего контактирует с иммобилизованным DcR3/Fc.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок уменьшает уровень апоптоза TF-1 клеток с $EC_{50}$ 22 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 10 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 5 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 2 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 1,5 нмоль/л или менее, или 1,2 нмоль/л или менее, или 1,1 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 1 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 0,75 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 0,3 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет 0,1 нмоль/л или менее.

Данное изобретение, дополнительно или альтернативным образом, описывает выделенный или рекомбинантный TL1a-связывающий белок, включающий антигенсвязывающий домен антитела:

в котором антигенсвязывающий домен специфично связывается с TL1a, и

в котором TL1a-связывающий белок ингибирует взаимодействие TL1a и DR3 и не ингибирует взаимодействие TL1a и DcR3, и

в котором TL1a-связывающий белок связывает мутировавшую форму растворимого человеческого TL1a, содержащего последовательность, описанную в SEQ ID NO: 202, в которой аргинин в позиции 32 замещен аланином и/или аргинин в позиции 85 замещен аланином на уровне, который по меньшей мере на 75% ниже уровня, на котором TL1a-связывающий белок связывается с растворимым человеческим TL1a, содержащим последовательность, описанную в SEQ ID NO: 202,

В одном примере реализации данного изобретения мутировавшая форма растворимого человеческого TL1a иммобилизована на твердом или полутвердом субстрате (например, на твердом субстрате, таком как планшет ELISA) с концентрацией приблизительно 1 мкг/мл, в котором TL1a связывающий белок в интервале концентраций от приблизительно 10 мкг/мл до приблизительно 0,01 мкг/мл далее контактирует с иммобилизованным мутировавшим TL1a.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок связывает мутировавшую форму растворимого человеческого TL1a, содержащего последовательность, описанную в SEQ ID NO: 202, в которой аргинин в позиции 32 замещен аланином и/или аргинин в позиции 85 замещен аланином на уровне, который не превышает 25% от уровня, на котором белок связывается с растворимым человеческим TL1a, содержащим последовательность, описанную в SEQ ID NO: 202. Например, уровень связывания TL1a-связывающего белка с мутировавшей формой растворимого человеческого TL1a не больше чем 25% от уровня, на котором белок связывается с растворимым человеческим TL1a, если TL1a-связывающий белок проверяют с концентрацией 10 мкг/мл.

Данное изобретение, дополнительно или альтернативным образом, описывает выделенный или рекомбинантный TL1a-связывающий белок, включающий антигенсвязывающий домен антитела:

в котором антигенсвязывающий домен специфично связывается с TL1a, и

в котором TL1a-связывающий белок ингибирует взаимодействие TL1a и DR3 и не ингибирует взаимодействие TL1a и DcR3, и

в котором TL1a-связывающий белок связывает мутировавшую форму растворимого человеческого TL1a, содержащего последовательность, описанную в SEQ ID NO: 202, в которой аргинин в позиции 32 замещен аланином и/или аргинин в позиции 85 замещен аланином на уровне, который по меньшей мере на 75% ниже уровня, на котором белок связывается с растворимым человеческим TL1a, содержащим последовательность, описанную в SEQ ID NO: 202, в котором мутировавшая форма TL1a иммобилизован

на твердом или полутвердом субстрате с концентрацией приблизительно 1 мкг/мл, и в котором TL1a связывающий белок с концентрацией 10 мкг/мл далее контактирует с иммобилизованным мутировавшим TL1a.

В одном примере реализации данного изобретения мутировавшая форма растворимого человеческого TL1a содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 202, в которой аргинин в позиции 32 замещен аланином.

В одном примере реализации данного изобретения мутировавшая форма растворимого человеческого TL1a содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 202, в которой аргинин в позиции 85 замещен аланином.

В одном примере реализации данного изобретения мутировавшая форма растворимого человеческого TL1a содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 202, в которой аргинин в позиции 32 замещен аланином и в которой аргинин в позиции 85 замещен аланином.

В одном примере реализации данного изобретения уровень связывания TL1a-связывающего белка с мутировавшей формой растворимого человеческого TL1a по меньшей мере на 80, или 85, или 90, или 95% ниже уровня, на котором белок связывается с растворимым человеческим TL1a, содержащим последовательность, описанную в SEQ ID NO: 202.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок не связывается на доступном для обнаружения уровне с мутировавшей формой растворимого человеческого TL1a.

В одном примере реализации данного изобретения связывание TL1a-связывающего белка с растворимым человеческим TL1a или его мутировавшей формой оценивают с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Surface Plasmon Resonance). Например, растворимый человеческий TL1a или его мутировавшую форму иммобилизуют (например, с концентрацией приблизительно 1 мкг/мл) и TL1a-связывающий белок (например, с концентрацией приблизительно 500 нг/мл) вводят в контакт с иммобилизованным человеческим растворимым TL1a или его мутировавшей формой и связывание определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Surface Plasmon Resonance). Сравнивая уровни связывания с растворимым человеческим TL1a или его мутировавшей формой, можно определить TL1a-связывающий белок, связывающийся на уровне, который по меньшей мере на 75% ниже уровня, на котором белок связывается с растворимым человеческим TL1a.

В одном примере реализации данного изобретения связывание TL1a-связывающего белка с растворимым человеческим TL1a или его мутировавшей формой оценивают с помощью ELISA. Например, растворимый человеческий TL1a или его мутировавшую форму иммобилизуют (например, с концентрацией приблизительно 1 мкг/мл) и TL1a-связывающий белок (например, с концентрацией приблизительно 10 мкг/мл) вводят в контакт с иммобилизованным человеческим растворимым TL1a или его мутировавшей формой и связывание определяют с помощью ELISA (например, с помощью стандартных методик, принятых в этой области).

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок связывается с эпитопом в TL1a, включающем остатки, соответствующие аргинину в позиции 32 в последовательности SEQ ID NO: 202 и аргинину в позиции 85 в последовательности SEQ ID NO: 202. В одном примере реализации данного изобретения эпитоп является конформационным эпитопом.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок связывается, по меньшей мере, с аминокислотными остатками аргинином в позиции 32 и аргинином в позиции 85 человеческого TL1a, который содержит аминокислотную последовательность, как описано в SEQ ID NO:202.

Типичные TL1a-связывающие белки, обладающие характеристиками связывания, описанными в предыдущих параграфах, очевидны для специалистов в этой области из описания, приведенного в этом тексте, и включают содержащие следующие пары $V_H$ и $V_L$:

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 94, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 95;

(ii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 137, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 138;

(iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 162, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 172; или

(iv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 173, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 174.

$V_H$ и $V_L$, включенные в вышеописанные последовательности, очевидны для специалистов в данной области из описания, приведенного в этом тексте, и должны рассматриваться как входящие mutatis mutandis в данный пример этого изобретения.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению ингибирует взаимодействие TL1a человека, яванской макаки или макаки резус и DR3. Такие TL1a-связывающие белки пригодны для исследования в животных моделях человеческих заболеваний.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению не ингибирует в достаточной для обнаружения степени взаимодействие TL1a мыши, свиньи, кролика или морской свинки и DR3, например TL1a-связывающий белок не ингибирует в достаточной для обнаружения степени уровень апоптоза TF-1 клеток, культивированных в присутствии соответствующего TL1a, например, по результатам анализов, описанных в этом тексте.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению в достаточной для обнаружения степени ингибирует взаимодействие крысиного TL1a и DR3. Например, TL1a-связывающий белок в достаточной для обнаружения степени ингибирует уровень апоптоза TF-1 клеток, культивированных в присутствии соответствующего TL1a, например, по результатам анализов, описанных в этом тексте.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению в достаточной для обнаружения степени связывается с изоформой TL1a, состоящей из аминокислот 72-251 в последовательности SEQ ID NO: 123, и/или с изоформой TL1a, состоящей из аминокислот 84-251 в последовательности SEQ ID NO: 123.

Например, связывание оценивают с помощью анализа ELISA, в котором изоформу TL1a иммобилизуют с концентрацией 1 мкг/мл и TL1a-связывающий белок контактирует с изоформой, и определяют уровень связывания.

Данное изобретение, дополнительно или альтернативным образом, описывает выделенный или рекомбинантный TL1a-связывающий белок, включающий антигенсвязывающий домен антитела, содержащий любой или несколько из следующих:

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 94, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 95;

(ii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 137, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 138;

(iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 162, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 172; или

(iv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 173, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 174.

Данное изобретение, дополнительно или альтернативным образом, описывает выделенный или рекомбинантный TL1a-связывающий белок, включающий антигенсвязывающий домен антитела, содержащий любой или несколько из следующих:

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 2, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 6;

(ii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 10, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 14;

(iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 18, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 22;

(iv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 26, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 30;

(v) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 34, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO:38;

(vi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(vii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 50, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 54;

(viii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(ix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(x) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 66, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 70, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 74, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 78, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 82;

(xv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 86, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 90, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 154, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 164;

(xix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 155, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 163;

(xx) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 156, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 165;

(xxi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 157, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 166;

(xxii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 158, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 167;

(xxiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 159, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 168;

(xxiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 160, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 169;

(xxv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 161, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 170;

(xxvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 234, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 169;

(xxvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 154, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 155, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 156, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxx) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 157, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 158, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 159, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 160, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 161, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 234, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 164;

(xxxvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 165;

(xxxviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 166;

(xxxix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 167;

(xl) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 168;

(xli) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 169;

(xlii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 170;

(xliii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 171;

(xliv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 172;

(xlv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 175, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 188;

(xlvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 176, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 189;

(xlvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 177, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 190;

(xlviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 178, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 191;

(xlix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 179, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 192;

(l) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 180, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 193;

(li) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 181, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 194;

(lii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 182, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 195;

(liii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 183, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 196;

(liv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 184, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 197;

(lv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 185, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 198;

(lvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 186, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 199; или

(lvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 187, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 200.

В определенном примере, описывается выделенный или рекомбинантный TL1a-связывающий белок, включающий антигенсвязывающий домен антитела, включающий $V_H$ и $V_L$, в котором $V_H$ и $V_L$ соответственно включают последовательности, выбираемые из группы, состоящей из:

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(ii) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 106, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 107, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 175, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 188;

(iv) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 222, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 228, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(v) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 176, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 189;

(vi) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 223, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 228, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(vii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 177, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 190;

(viii) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 229, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(ix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 178, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 191;

(x) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой ки-

слотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 230, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 179, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 192;

(xii) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 231, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 180, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 193;

(xiv) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 228, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 181, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 194;

(xvi) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 225, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 230, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 183, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 196;

(xviii) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 226, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 230, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 185, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 198;

(xx) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 226, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 232, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xxi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 186, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 199;

(xxii) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 227, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 232, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xxiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 187, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 200; и

(xxiv) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 227, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 233, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости.

Данное изобретение, дополнительно или альтернативным образом, описывает выделенный или рекомбинантный TL1a-связывающий белок, включающий антигенсвязывающий домен антитела, включающий $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последо-

вательность, описанную в SEQ ID NO: 46, в котором $V_H$ и/или $V_L$ включает одно или несколько следующих замещений или групп замещений:

(i) $V_H$ содержит аланин в позиции 16 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(ii) $V_H$ содержит аланин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iii) $V_H$ содержит серин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iv) $V_H$ содержит гистидин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(v) $V_H$ содержит лейцин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(vi) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(vii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(viii) $V_H$ содержит пролин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(ix) $V_H$ содержит глютамин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(x) $V_H$ содержит лизин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xi) $V_H$ содержит аланин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xii) $V_H$ содержит серин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xiii) $V_H$ содержит гистидин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xiv) $V_H$ содержит лейцин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xv) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xvi) $V_H$ содержит тирозин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xvii) $V_H$ содержит глютамин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xviii) $V_H$ содержит лизин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xix) $V_H$ содержит аланин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xx) $V_H$ содержит серин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxi) $V_H$ содержит гистидин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxii) $V_H$ содержит лейцин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxiii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxiv) $V_H$ содержит пролин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxv) $V_H$ содержит глютамин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxvi) $V_H$ содержит лизин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxvii) $V_H$ содержит аланин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxviii) $V_H$ содержит серин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxix) $V_H$ содержит гистидин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxx) $V_H$ содержит лейцин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxi) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxiii) $V_H$ содержит пролин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxiv) $V_H$ содержит глютамин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxv) $V_H$ содержит лизин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxvi) $V_H$ содержит серин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxvii) $V_H$ содержит гистидин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxviii) $V_H$ содержит лейцин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxix) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xl) $V_H$ содержит тирозин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xli) $V_H$ содержит пролин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlii) $V_H$ содержит глютамин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xliii) $V_H$ содержит лизин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xliv) $V_H$ содержит аланин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlv) $V_H$ содержит гистидин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlvi) $V_H$ содержит лейцин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlvii) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlviii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlix) $V_H$ содержит пролин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(l) $V_H$ содержит глютамин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(li) $V_H$ содержит лизин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lii) $V_H$ содержит аланин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(liii) $V_H$ содержит серин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(liv) $V_H$ содержит гистидин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lv) $V_H$ содержит лейцин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lvi) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lvii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lviii) $V_H$ содержит пролин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lix) $V_H$ содержит глютамин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO:46;

(lx) $V_H$ содержит лизин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxi) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аланин в позиции 23 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 28 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxiii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит тирозин в позиции 33 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxiv) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 34 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxv) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аспарагин в позиции 53 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxvi) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 54 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxvii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аланин в позиции 82 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxviii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 95 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxix) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 96 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxx) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxi) $V_H$ содержит серин в позиции 47 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxiii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxiv) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO:46;

(lxxv) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxvi) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxvii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxviii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxix) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxx) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глютаминовую кислоту в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxxi) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74, треонин в позиции 76, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глютаминовую кислоту в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46; и

(lxxxii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74, треонин в позиции 76, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глицин в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит антигенсвязывающий домен антитела, включающий любой или несколько из следующих:

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 26, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 30;

(ii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 34, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO:38; и

(iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46.

В одном конкретном примере, описывается выделенный или рекомбинантный TL1a-связывающий белок, включающий антигенсвязывающий домен антитела, включающий $V_H$ и $V_L$, в котором $V_H$ и $V_L$ соответственно содержат последовательности, выбираемые из группы, состоящей из

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(ii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 175, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 188;

(iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 176, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 189;

(iv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 177, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 190;

(v) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 178, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 191;

(vi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 179, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 192;

(vii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 180, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 193;

(viii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 181, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 194;

(ix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 183, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 196;

(x) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 185, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 198;

(xi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 186, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 199; и

(xii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 187, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 200,

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит антигенсвязывающий домен, включающий CDR3 вариабельного участка антитела, упомянутого выше. Например, CDR3 определяется согласно номенклатуре Кабата и содержит последовательность, описанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93 или последовательность, обозначенную как "CDR3" и указанную жирным шрифтом на фиг. 1A-1H или на фиг. 9B или 9C, или последовательность, содержащую аминокислоты от 99 до 108 любой из последовательностей SEQ ID NO: 175-187 или аминокислоты от 91 до 100 любой из последовательностей SEQ ID NO: 188-200 или 234.

Например, CDR3 определяется согласно номенклатуре Кабата и содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 45 или 49, или последовательность, содержащую аминокислоты от 99 до 108 любой из последовательностей SEQ ID NO: 175-181, 183 или 185-187 или аминокислоты 91-100 любой из последовательностей SEQ ID NO: 188-194, 196 или 198-200.

В другом примере, CDR3 (например, HCDR3) определяется согласно улучшенной номенклатуре Чотиа и содержит последовательность, обозначенную как "CDR3" и указанную подчеркнутым шрифтом на любой из фиг. 1A, 1C, 1D или 1E или 9B.

В одном примере реализации данного изобретения CDR3 содержит последовательность $EVPX_1TAX_2FEY$ (SEQ ID NO: 143), в которой $X_1$ является аспарагиновой кислотой или глютаминовой кислотой и $X_2$ является серином или аланином.

В одном примере реализации данного изобретения CDR3 содержит последовательность $EX_1PX_2X_3AX_4FX_5Y$ (SEQ ID NO: 235), в которой:

$X_1$ является аминокислотой, выбираемой из группы, состоящей из валина, аланина, серина, гистидина, аспарагиновой кислоты, лейцина, тирозина, пролина, глютамина или лизина;

$X_2$ является аминокислотой, выбираемой из группы, состоящей из аланина, серина, гистидина, лизина, глютаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты;

$X_3$ является аминокислотой, выбираемой из группы, состоящей из аланина, серина, аспарагиновой кислоты, тирозина или треонина;

$X_4$ является аминокислотой, выбираемой из группы, состоящей из серина, аланин, гистидина, лейцина, аспарагиновой кислоты или тирозина; и

$X_5$ является аминокислотой, выбираемой из группы, состоящей из аланина, серина, гистидина, лей-

цина, аспарагиновой кислоты, пролина, глютамина, глютаминовой кислоты или лизина.

В одном примере реализации данного изобретения CDR3 (например, LCDR3) содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 141 (или последовательность, обозначенную как CDR3 жирным шрифтом в последовательности, обозначенной "Консенсус" на фиг. 1F или 9C).

Например, антигенсвязывающий домен включает три CDR вариабельного участка антитела.

В некоторых примерах по этому изобретению антигенсвязывающий домен является вариабельным участком антитела, включающим три CDR вариабельного участка, включающего аминокислотную последовательность, описанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 95, 137, 138, 152-200 или 234.

В некоторых примерах антигенсвязывающий домен является вариабельным участком антитела, включающим три CDR вариабельного участка, включающим:

(a) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42 и включающую одно или несколько следующих замещений или групп замещений:

(i) аланин в позиции 16 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(ii) аланин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(iii) серин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(iv) гистидин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(v) лейцин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(vi) аспарагиновую кислоту в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(vii) тирозин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(viii) пролин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(ix) глютамин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(x) лизин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xi) аланин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xii) серин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xiii) гистидин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xiv) лейцин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xv) аспарагиновую кислоту в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xvi) тирозин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xvii) глютамин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xviii) лизин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xix) аланин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xx) серин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxi) гистидин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxii) лейцин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxiii) тирозин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxiv) пролин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxv) глютамин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxvi) лизин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxvii) аланин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxviii) серин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxix) гистидин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxx) лейцин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxxi) аспарагиновую кислоту в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxxii) тирозин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxxiii) пролин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxxiv) глютамин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxxv) лизин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxxvi) серин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxxvii) гистидин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxxviii) лейцин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xxxix) аспарагиновую кислоту в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xl) тирозин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xli) пролин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xlii) глютамин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xliii) лизин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xliv) аланин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xlv) гистидин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xlvi) лейцин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xlvii) аспарагиновую кислоту в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xlviii) тирозин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(xlix) пролин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(l) глютамин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(li) лизин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(lii) аланин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(liii) серин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(liv) гистидин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(lv) лейцин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(lvi) аспарагиновую кислоту в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(lvii) тирозин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(lviii) пролин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(lix) глютамин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(lx) лизин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(lxi) треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(lxii) серин в позиции 47 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(lxiii) пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73 и аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42;

(lxiv) пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42;

(lxv) пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42;

(lxvi) пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74, треонин в позиции 76, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105; или

(b) $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46 и включающую одно или несколько следующих замещений или групп замещений:

(i) треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(ii) треонин в позиции 23 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iii) аспарагин в позиции 28 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iv) тирозин в позиции 33 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(v) аспарагиновую кислоту в позиции 34 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(vi) аспарагин в позиции 53 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(vii) серин в позиции 54 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(viii) аланин в позиции 82 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(ix) серин в позиции 95 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(x) серин в позиции 96 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xi) треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(xii) треонин в позиции 23 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO:46;

(xiii) треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глютаминовую кислоту в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46 или

(xiv) треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глицин в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46.

Например, антигенсвязывающий домен является $V_H$, содержащим три CDR аминокислотной последовательности, описанной в любой из последовательностей SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 70, 74, 78, 86, 90, 94, 137, 152, 154-162, 173, 175-187 или 234.

В одном примере реализации данного изобретения CDR определяется согласно номенклатуре Кабата.

Например, TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, включая CDR согласно нижеприведенному описанию:

(i) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 4 (если любая или несколько С-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения), и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 5 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела С336 на фиг. 1А);

(ii) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 12 (если любая или несколько С-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения), и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 13 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела С334 на фиг. 1А);

(iii) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 19, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 20 (если любая или несколько С-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного проис-

хождения), и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 21 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C333 на фиг. 1A);

(iv) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 27, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 28 (если любая или несколько C-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения), и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 29 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C323 на фиг. 1A);

(v) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 35, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 36 (если любая или несколько C-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения), и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 37 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C321 на фиг. 1A);

(vi) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 44 (если любая или несколько C-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения), и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 45 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C320 на фиг. 1A);

(vii) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 51, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 52 (если любая или несколько C-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения), и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 53 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C319 на фиг. 1A);

(viii) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 67, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 68 (если любая или несколько C-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения), и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 69 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C320-90 на фиг. 1C);

(ix) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 71, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 72 (если любая или несколько C-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения), и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 73 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C320-103 на фиг. 1C);

(x) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 75, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 76 (если любая или несколько C-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения), и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 77 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C320-114 на фиг. 1C);

(xi) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 79, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 80 (если любая или несколько C-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения), и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 81 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C320-115 на фиг. 1C);

(xii) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 87, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 88 (если любая или несколько C-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения), и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 89 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C320-129 на фиг. 1C);

(xiii) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 91, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 92 (если любая или несколько C-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения). и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 93 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C320-130 на фиг. 1C);

(xiv) CDR1, содержащий последовательность, описанную в аминокислотах от 31 до 35 любой из последовательностей SEQ ID NO: от 175 до 187, CDR2, содержащий аминокислоты от 50 до 66 любой из последовательностей SEQ ID NO: от 175 до 187 (если любая или несколько C-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения) и аминокислоты от 99 до 108 любой из последовательностей SEQ ID NO от 175 до 187;

(xv) CDR1, содержащий последовательность, описанную в аминокислотах от 26 до 35 любой из последовательностей SEQ ID NO: от 175 до 187, CDR2, содержащий аминокислоты от 50 до 66 любой из последовательностей SEQ ID NO: от 175 до 187 (если любая или несколько C-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения) и аминокислоты от 99 до 108 любой из последовательностей SEQ ID NO: от 175 до 187.

Например, TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, включая CDR согласно нижеприведенному описанию:

(i) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 44 (если любая или несколько С-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения), и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 45 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела С320 на фиг. 1А);

(ii) CDR1, содержащий последовательность, описанную в аминокислотах от 31 до 35 любой из последовательностей SEQ ID NO: от 175 до 181, 183 или от 185 до 187, CDR2, содержащий аминокислоты от 50 до 66 любой из последовательностей SEQ ID NO: от 175 до 181, 183 или от 185 до 187 (если любая или несколько С-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения) и аминокислоты от 99 до 108 любой из последовательностей SEQ ID NO: от 175 до 181, 183 или от 185 до 187; или

(iii) CDR1, содержащий последовательность, описанную в аминокислотах от 26 до 35 любой из последовательностей SEQ ID NO: от 175 до 181, 183 или от 185 до 187, CDR2, содержащий аминокислоты от 50 до 66 любой из последовательностей SEQ ID NO: от 175 до 181, 183 или от 185 до 187 (если любая или несколько С-терминальных аминокислот CDR2 аминокислотной последовательности замещена любой другой аминокислотой природного происхождения) и аминокислоты от 99 до 108 любой из последовательностей SEQ ID NO: от 175 до 181, 183 или от 185 до 187.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, включая CDR согласно нижеприведенному описанию:

(i) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 43 (или последовательность, обозначенную как CDR 1 жирным шрифтом в последовательности, обозначенной "Консенсус" на фиг. 1Е);

(ii) CDR2, содержащий последовательность $WX_1NPNSGNTGYAQKFQG$ (SEQ ID NO: 142), где $X_1$ является метионином или лейцином (или последовательность, обозначенную как CDR 2 жирным шрифтом в последовательности, обозначенной "Консенсус" на фиг. 1Е или фиг. 9В); и

(iii) CDR3, содержащий последовательность $EVPX_1TAX_2FEY$ (SEQ ID NO: 143), где $X_1$ является аспарагиновой кислотой или глютаминовой кислотой и $X_2$ является серином или аланином (или последовательность, обозначенную как CDR3 жирным шрифтом в последовательности, обозначенной "Консенсус" на фиг. 1Е или фиг. 9В), или включающий последовательность $EX_1PX_2X_3AX_4FX_5Y$ (SEQ ID NO: 235), где

$X_1$ является аминокислотой, выбираемой из группы, состоящей из валина, аланина, серина, гистидина, аспарагиновой кислоты, лейцина, тирозина, пролина, глютамина или лизина;

$X_2$ является аминокислотой, выбираемой из группы, состоящей из аланина, серина, гистидина, лизина, глютаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты;

$X_3$ является аминокислотой, выбираемой из группы, состоящей из аланина, серина, аспарагиновой кислоты, тирозина или треонина;

$X_4$ является аминокислотой, выбираемой из группы, состоящей из серина, аланина, гистидина, лейцина, аспарагиновой кислоты или тирозина; и

$X_5$ является аминокислотой, выбираемой из группы, состоящей из аланина, серина, гистидина, лейцина, аспарагиновой кислоты, пролина, глютамина, глютаминовой кислоты или лизина.

Дополнительные остатки, подходящие для включения в CDR3, описаны в этом тексте и подразумеваются включенными mutatis mutandis в данный пример по этому изобретению.

В одном примере реализации данного изобретения CDR определяются согласно улучшенной номенклатуре Чотиа. Например, TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, включая CDR, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 подчеркнутым текстом у антител 336, 334, 333, 323, 321, 320 или 319 на фиг. 1А или антител С320-90, С320-103, С320-114, С320-115, С320-129 или С320-130 на фиг. 1С или последовательности, обозначенной "Консенсус" на фиг. 1С, или 1Е, или 9В.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок дополнительно включает следующее:

(i) тяжелую цепь FR1, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 144;

(ii) тяжелую цепь FR2, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 145;

(iii) тяжелую цепь FR3, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 146; и

(iv) тяжелую цепь FR4, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 147,

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок включает следующее:

(i) тяжелую цепь FR1, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 144;

(ii) тяжелую цепь CDR1, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 43;

(iii) тяжелую цепь FR2, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 145;

(iv) тяжелую цепь CDR2, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 142;

(v) тяжелую цепь FR3, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 146;

(vi) тяжелую цепь CDR3, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 143 или 235;

(vii) тяжелую цепь FR4, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 147,

Например, антигенсвязывающий домен является $V_L$, включающим три CDR аминокислотной последовательности, описанной в любой из последовательностей SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38, 46, 54, 62, 82, 95, 153, 163-172, 174 или 188-200. В одном примере реализации данного изобретения CDR определяется согласно номенклатуре Кабата. Например, TL1a-связывающий белок содержит $V_L$, включая CDR согласно нижеприведенному описанию:

(i) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 9 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C336 на фиг. 1B);

(ii) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 15, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 16, и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 17 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C334 на фиг. 1B);

(iii) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 23, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 24, и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 25 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C333 на фиг. 1B);

(iv) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 31, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 32, и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 33 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C323 на фиг. 1B);

(v) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 39, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 40, и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 41 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C321 на фиг. 1B);

(vi) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 47, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 48, и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 49 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C320 на фиг. 1B);

(vii) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 55, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 56, и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 57 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C319 на фиг. 1B);

(viii) CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 83, CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 84, и CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 85 (или последовательности, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 жирным шрифтом у антитела C320-120 на фиг. 1F); или

(ix) CDR1, содержащий аминокислоты от 23 до 36 любой из последовательностей SEQ ID NO: 188-200, CDR2, содержащий аминокислоты от 52 до 58 любой из последовательностей SEQ ID NO: 188-200, и CDR3, содержащий аминокислоты от 91-100 любой из последовательностей SEQ ID NO: 188-200.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_L$, включая CDR согласно нижеприведенному описанию:

(i) CDR1, содержащий последовательность $X_1X_2$SSSDIGAGLGVH (SEQ ID NO: 139), где $X_1$ является аланином или треонином; $X_2$ является глицином или серином (или последовательность, обозначенную как CDR 1 жирным шрифтом в последовательности, обозначенной "Консенсус" на фиг. 9C);

(ii) CDR2, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 140; и

(iii) CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 141,

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок дополнительно включает следующее:

(i) легкую цепь FR1, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 148;

(ii) легкую цепь FR2, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 149;

(iii) легкую цепь FR3, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в

SEQ ID NO: 150; и

(iv) легкую цепь FR4, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 151,

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок включает следующее:

(i) легкую цепь FR1, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 148;

(ii) легкую цепь CDR1, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 139;

(iii) легкую цепь FR2, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 149;

(iv) легкую цепь CDR2, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 140;

(v) легкую цепь FR3, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 150;

(vi) легкую цепь CDR3, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 141; и

(vii) легкую цепь FR4, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 151,

В одном примере реализации данного изобретения CDR определяются согласно улучшенной номенклатуре Чотиа. Например, TL1a-связывающий белок содержит $V_L$, включая CDR, обозначенные как CDR 1, 2 и 3 подчеркнутым текстом у антител 336, 334, 333, 323, 321, 320 или 319 на фиг. 1B или антител C320-120 на фиг. 1F или последовательности, обозначенной "Консенсус" на фиг. 1H и фиг. 9.

В одном примере реализации данного изобретения антигенсвязывающий домен включает шесть CDR одной из следующих пар V-доменов:

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 2, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 6;

(ii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 10, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 14;

(iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 18, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 22;

(iv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 26, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 30;

(v) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 34, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO:38;

(vi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(vii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 50, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 54;

(viii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(ix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(x) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 66, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 70, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 74, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 78, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 82;

(xv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 86, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 90, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 154, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 164;

(xix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 155, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 163;

(xx) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 156, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 165;

(xxi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 157, и $V_L$, содержащий после-

довательность, описанную в SEQ ID NO: 166;

(xxii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 158, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 167;

(xxiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 159, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 168;

(xxiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 160, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 169;

(xxv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 161, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 170;

(xxvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 234, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 169;

(xxvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 154, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 155, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 156, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxx) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 157, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 158, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 159, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 160, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 161, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 234, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 164;

(xxxvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 165;

(xxxviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 166;

(xxxix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 167;

(xl) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 168;

(xli) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 169;

(xlii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 170;

(xliii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 171;

(xliv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 172;

(xlv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 175, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 188;

(xlvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 176, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 189;

(xlvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 177, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 190;

(xlviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 178, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 191;

(xlix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 179, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 192;

(l) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 180, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 193;

(li) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 181, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 194;

(lii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 182, и $V_L$, содержащий после-

довательность, описанную в SEQ ID NO: 195;

(liii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 183, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 196;

(liv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 184, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 197;

(lv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 185, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 198;

(lvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 186, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 199; или

(lvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 187, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 200,

В одном примере реализации данного изобретения антигенсвязывающий домен включает шесть CDR антитела, включающего $V_H$, содержащего последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащего последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46, при этом $V_H$ и/или $V_L$ включает одно или несколько следующих замещений или групп замещений:

(i) $V_H$ содержит аланин в позиции 16 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(ii) $V_H$ содержит аланин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iii) $V_H$ содержит серин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iv) $V_H$ содержит гистидин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(v) $V_H$ содержит лейцин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(vi) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(vii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(viii) $V_H$ содержит пролин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(ix) $V_H$ содержит глютамин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(x) $V_H$ содержит лизин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xi) $V_H$ содержит аланин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xii) $V_H$ содержит серин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xiii) $V_H$ содержит гистидин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xiv) $V_H$ содержит лейцин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xv) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xvi) $V_H$ содержит тирозин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xvii) $V_H$ содержит глютамин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xviii) $V_H$ содержит лизин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xix) $V_H$ содержит аланин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xx) $V_H$ содержит серин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxi) $V_H$ содержит гистидин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxii) $V_H$ содержит лейцин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxiii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxiv) $V_H$ содержит пролин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxv) $V_H$ содержит глютамин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxvi) $V_H$ содержит лизин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxvii) $V_H$ содержит аланин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxviii) $V_H$ содержит серин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxix) $V_H$ содержит гистидин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxx) $V_H$ содержит лейцин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxi) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxiii) $V_H$ содержит пролин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxiv) $V_H$ содержит глютамин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxv) $V_H$ содержит лизин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxvi) $V_H$ содержит серин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxvii) $V_H$ содержит гистидин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxviii) $V_H$ содержит лейцин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxix) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xl) $V_H$ содержит тирозин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xli) $V_H$ содержит пролин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlii) $V_H$ содержит глютамин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xliii) $V_H$ содержит лизин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xliv) $V_H$ содержит аланин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlv) $V_H$ содержит гистидин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlvi) $V_H$ содержит лейцин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlvii) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlviii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlix) $V_H$ содержит пролин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(l) $V_H$ содержит глютамин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(li) $V_H$ содержит лизин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lii) $V_H$ содержит аланин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(liii) $V_H$ содержит серин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(liv) $V_H$ содержит гистидин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lv) $V_H$ содержит лейцин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lvi) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lvii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lviii) $V_H$ содержит пролин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lix) $V_H$ содержит глютамин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lx) $V_H$ содержит лизин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxi) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аланин в позиции 23 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 28 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxiii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит тирозин в позиции 33 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxiv) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 34 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxv) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аспарагин в позиции 53 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxvi) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 54 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxvii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аланин в позиции 82 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxviii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 95 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxix) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 96 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxx) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxi) $V_H$ содержит серин в позиции 47 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73 и аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxiii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxiv) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO:46;

(lxxv) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxvi) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxvii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxviii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxix) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73 аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxx) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73 аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глютаминовую кислоту в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxxi) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74, треонин в позиции 76, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глютаминовую кислоту в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46 или

(lxxxii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74, треонин в позиции 76, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глицин в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46.

В одном примере реализации данного изобретения антигенсвязывающий домен включает шесть CDR одной из следующих пар V-доменов:

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(ii) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 106, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 107, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости; (iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 175, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 188;

(iv) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 222, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 228, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(v) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 176, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 189;

(vi) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 223, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 228, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(vii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 177, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 190;

(viii) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 229, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(ix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 178, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 191;

(x) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 230, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 179, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 192;

(xii) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 231, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 180, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 193;

(xiv) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере

на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 228, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 181, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 194;

(xvi) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 225, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 230, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 183, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 196;

(xviii) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 226, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 230, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 185, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 198;

(xx) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 226, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 232, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xxi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 186, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 199; и

(xxii) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 227, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 232, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xxiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 187, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 200; или

(xxiv) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 227, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 233, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок включает следующие шесть CDR:

(i) тяжелую цепь CDR1, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 43 (или последовательность, обозначенную как CDR1 жирным шрифтом в последовательности, обозначенной "Консенсус" на фиг. 1E);

(ii) тяжелую цепь CDR2, содержащую последовательность $WX_1NPNSGNTGYAQKFQG$ (SEQ ID NO: 142), где $X_1$ является метионином или лейцином (или последовательность, обозначенную как CDR 2 жирным шрифтом в последовательности, обозначенной "Консенсус" на фиг. 1E);

(iii) тяжелую цепь CDR3 содержащую последовательность $EVPX_1TAX_2FEY$ (SEQ ID NO: 143), где $X_1$ является аспарагиновой кислотой или глютаминовой кислотой и $X_2$ является серином или аланином (или последовательность, обозначенную как CDR3 жирным шрифтом в последовательности, обозначенной "Консенсус" на фиг. 9B) или последовательность $EX_1PX_2X_3AX_4FX_5Y$ (SEQ ID NO: 235), при этом

$X_1$ является аминокислотой, выбираемой из группы, состоящей из валина, аланина, серина, гистидина, аспарагиновой кислоты, лейцина, тирозина, пролина, глютамина или лизина;

$X_2$ является аминокислотой, выбираемой из группы, состоящей из аланина, серина, гистидина, лизина, глютаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты;

$X_3$ является аминокислотой, выбираемой из группы, состоящей из аланина, серина, аспарагиновой

кислоты, тирозина или треонина;

$X_4$ является аминокислотой, выбираемой из группы, состоящей из серина, аланин, гистидина, лейцина, аспарагиновой кислоты или тирозина; и

$X_5$ является аминокислотой, выбираемой из группы, состоящей из аланина, серина, гистидина, лейцина, аспарагиновой кислоты, пролина, глютамина, глютаминовой кислоты или лизина;

(iv) CDR1, содержащий последовательность $X_1X_2$SSSDIGAGLGVH (SEQ ID NO: 139), где $X_1$ жирным шрифтом в последовательности, обозначенной "Консенсус" на фиг. 9C);

(v) CDR2 является аланином или треонином; $X_2$ является глицином или серином (или последовательность, обозначенную как CDR1, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 48; и

(vi) CDR3, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 49.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит следующее:

(a) $V_H$, включающий:

(i) тяжелую цепь FR1, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 144;

(ii) тяжелую цепь CDR1, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 43;

(iii) тяжелую цепь FR2, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 145;

(iv) тяжелую цепь CDR2, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 142;

(v) тяжелую цепь FR3, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 146;

(vi) тяжелую цепь CDR3 содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 143 или 235; и

(vii) тяжелую цепь FR4, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 147; и

(b) $V_L$, включающий:

(i) легкую цепь FR1, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 148;

(ii) легкую цепь CDR1, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 139;

(iii) легкую цепь FR2, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 149;

(iv) легкую цепь CDR2, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 48;

(v) легкую цепь FR3, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 150;

(vi) легкую цепь CDR3 содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 49; и

(vii) легкую цепь FR4, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO:151,

Дополнительные остатки, подходящие для включения в тяжелоцепочечный CDR3, описаны в этом тексте и подразумеваются включенными mutatis mutandis в данный пример по этому изобретению.

В одном примере реализации данного изобретения CDR определяется согласно номенклатуре Кабата. Примеры CDR, определенные согласно номенклатуре Кабата, описаны выше и/или на фиг. 1A-1H, 9B или 9C, обозначены как CDR 1-3 жирным шрифтом и подразумеваются включенными mutatis mutandis в данный пример по этому изобретению.

В одном примере реализации данного изобретения CDR определяются согласно улучшенной номенклатуре Чотиа. Примеры CDR, определенные согласно улучшенной номенклатуре Чотиа, описаны выше и/или на фиг. 1A-1H, обозначены как CDR 1-3 подчеркнутым шрифтом и подразумеваются включенными mutatis mutandis в данный пример по этому изобретению.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит вариабельный участок (V-домен) антитела.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, содержащий последовательность, описанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 70, 74, 78, 86, 90, 94, 137, 152, 154-162, 173, 175-187 или 234, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с любой из упомянутых ранее. В одном примере реализации данного изобретения $V_H$ содержит последовательность, описанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 26, 34, 42 или 94, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с любой из упомянутых ранее. В одном примере реализации данного изобретения $V_H$ содержит последовательность, описанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 42, 175-181, 183 или 185-187, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с любой из упомянутых ранее.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 94, 137, 152, 162 или 173. В одном примере реализации данного изобретения $V_H$ содержит последовательность, описанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 42, 58, 66, 70, 74, 78, 86 или 90. В одном примере реализации данного изобретения $V_H$ содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42 и включающую одно или несколько следующих замещений или групп замещений:

(i) аланин в позиции 16 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(ii) аланин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(iii) серин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(iv) гистидин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(v) лейцин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(vi) аспарагиновую кислоту в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(vii) тирозин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(viii) пролин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(ix) глютамин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(x) лизин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xi) аланин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xii) серин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xiii) гистидин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xiv) лейцин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xv) аспарагиновую кислоту в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xvi) тирозин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xvii) глютамин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xviii) лизин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xix) аланин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xx) серин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxi) гистидин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxii) лейцин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO:42;
(xxiii) тирозин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxiv) пролин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxv) глютамин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxvi) лизин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxvii) аланин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxviii) серин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxix) гистидин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxx) лейцин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxxi) аспарагиновую кислоту в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxxii) тирозин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxxiii) пролин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxxiv) глютамин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxxv) лизин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxxvi) серин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxxvii) гистидин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxxviii) лейцин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xxxix) аспарагиновую кислоту в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xl) тирозин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xli) пролин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xlii) глютамин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xliii) лизин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xliv) аланин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xlv) гистидин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xlvi) лейцин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO:42;
(xlvii) аспарагиновую кислоту в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xlviii) тирозин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(xlix) пролин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(l) глютамин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(li) лизин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(lii) аланин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(liii) серин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(liv) гистидин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(lv) лейцин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(lvi) аспарагиновую кислоту в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(lvii) тирозин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;
(lviii) пролин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO:42;
(lix) глютамин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(lx) лизин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(lxi) треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(lxii) серин в позиции 47 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(lxiii) пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, а аспарагиновая кислота в позиции 73 аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42;

(lxiv) пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42;

(lxv) пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42;

(lxvi) пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, аланин в позиции 72, а аспарагиновая кислота в позиции 73, аргинин в позиции 74, треонин в позиции 76 глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 или

(lxvii) последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с любой из упомянутых ранее.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, описанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 117, 118 или 222-227, или последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичную упомянутой, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, описанную в SEQ ID NO: 106 или 222-227, или последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичную упомянутой, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_L$, содержащий последовательность, описанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38, 46, 54, 62, 82, 95, 138, 153, 163 или 174, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с любой из упомянутых ранее. В одном примере реализации данного изобретения $V_L$ содержит последовательность, описанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 30, 38, 46, 188-194, 196 или 198-200, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с любой из упомянутых ранее.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 95, 138, 153, 163 или 174. В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_L$, содержащий последовательность, описанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 46, 62 или 82. В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46 и включающую одно или несколько следующих замещений или групп замещений:

(i) треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(ii) треонин в позиции 23 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iii) аспарагин в позиции 28 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iv) тирозин в позиции 33 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(v) аспарагиновую кислоту в позиции 34 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(vi) аспарагин в позиции 53 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(vii) серин в позиции 54 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(viii) аланин в позиции 82 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(ix) серин в позиции 95 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(x) серин в позиции 96 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xi) треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(xii) треонин в позиции 23 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO:46;

(xiii) треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глютаминовую кислоту в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(xiv) треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глицин в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46 или

(xv) последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с любой из упомянутых ранее.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, описанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 116 или 228-233, или последовательность, по

меньшей мере приблизительно на 80% идентичную упомянутой, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения белок содержит $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, описанную в SEQ ID NO: 107 или 228-233, или последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичную упомянутой, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок является доменом антитела, возможно связанным с тяжелоцепочечной константной областью (С-доменом) или Fc или тяжелоцепочечной константной областью $C_H2$ и/или $C_H3$ или белком, связывающимся с иммунной эффекторной клеткой.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит, по меньшей мере, $V_H$ и $V_L$, в котором $V_H$ и $V_L$ связываются, образуя Fv, содержащий антигенсвязывающий домен. Например, TL1a-связывающий белок включает любую из следующих пар $V_H$ и $V_L$:

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 2, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 6;

(ii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 10, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 14;

(iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 18, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 22;

(iv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 26, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 30;

(v) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 34, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 38;

(vi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(vii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 50, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 54;

(viii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(ix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(x) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 66, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 70, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 74, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 78, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 82;

(xv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 86, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 90, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 154, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 164;

(xix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 155, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 163;

(xx) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 156, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 165;

(xxi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 157, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 166;

(xxii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 158, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 167;

(xxiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 159, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 168;

(xxiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 160, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 169;

(xxv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 161, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 170;

(xxvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 234, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 169;

(xxvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 154, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 155, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 156, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxx) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 157, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 158, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 159, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 160, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 161, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 234, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 164;

(xxxvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 165;

(xxxviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 166;

(xxxix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 167;

(xl) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 168;

(xli) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 169;

(xlii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 170;

(xliii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 171;

(xliv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 172;

(xlv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 175, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 188;

(xlvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 176, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 189;

(xlvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 177, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 190;

(xlviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 178, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 191;

(xlix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 179, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 192;

(l) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 180, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 193;

(li) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 181, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 194;

(lii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 182, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 195;

(liii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 183, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 196;

(liv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 184, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 197;

(lv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 185, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 198;

(lvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 186, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 199; или

(lvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 187, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 200,

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок включает любую из следующих пар $V_H$ и $V_L$:

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 26, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 30;

(ii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 34, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO:38;

(iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(iv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 175, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 188;

(v) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 176, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 189;

(vi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 177, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 190;

(vii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 178, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 191;

(viii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 179, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 192;

(ix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 180, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 193;

(x) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 181, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 194;

(xi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 183, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 196;

(xii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 185, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 198;

(xiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 186, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 199; или

(xiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 187, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 200;

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 94, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 95,

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 137, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 138.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 152, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 153.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 173, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 174.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок включает любую из следующих пар $V_H$ и $V_L$:

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(ii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 66, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(iv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 70, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(v) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 74, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(vi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 78, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(vii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 82;

(viii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 86, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(ix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 90, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46; или

(x) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62.

Например, TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46, в котором $V_H$ и/или $V_L$ включает одно или несколько следующих замещений или групп замещений:

(i) $V_H$ содержит аланин в позиции 16 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(ii) $V_H$ содержит аланин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iii) $V_H$ содержит серин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iv) $V_H$ содержит гистидин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(v) $V_H$ содержит лейцин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(vi) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(vii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(viii) $V_H$ содержит пролин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(ix) $V_H$ содержит глютамин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(x) $V_H$ содержит лизин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xi) $V_H$ содержит аланин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xii) $V_H$ содержит серин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xiii) $V_H$ содержит гистидин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xiv) $V_H$ содержит лейцин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xv) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xvi) $V_H$ содержит тирозин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xvii) $V_H$ содержит глютамин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xviii) $V_H$ содержит лизин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xix) $V_H$ содержит аланин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xx) $V_H$ содержит серин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxi) $V_H$ содержит гистидин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxii) $V_H$ содержит лейцин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxiii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxiv) $V_H$ содержит пролин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxv) $V_H$ содержит глютамин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxvi) $V_H$ содержит лизин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxvii) $V_H$ содержит аланин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxviii) $V_H$ содержит серин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxix) $V_H$ содержит гистидин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxx) $V_H$ содержит лейцин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxi) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxiii) $V_H$ содержит пролин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxiv) $V_H$ содержит глютамин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxv) $V_H$ содержит лизин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxvi) $V_H$ содержит серин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxvii) $V_H$ содержит гистидин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxviii) $V_H$ содержит лейцин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxix) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xl) $V_H$ содержит тирозин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xli) $V_H$ содержит пролин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlii) $V_H$ содержит глютамин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xliii) $V_H$ содержит лизин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xliv) $V_H$ содержит аланин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlv) $V_H$ содержит гистидин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlvi) $V_H$ содержит лейцин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlvii) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlviii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlix) $V_H$ содержит пролин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(l) $V_H$ содержит глютамин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(li) $V_H$ содержит лизин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lii) $V_H$ содержит аланин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(liii) $V_H$ содержит серин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(liv) $V_H$ содержит гистидин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lv) $V_H$ содержит лейцин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lvi) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lvii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lviii) $V_H$ содержит пролин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lix) $V_H$ содержит глютамин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lx) $V_H$ содержит лизин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxi) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аланин в позиции 23 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 28 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxiii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит тирозин в позиции 33 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxiv) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 34 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxv) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аспарагин в позиции 53 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxvi) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 54 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxvii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аланин в позиции 82 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxviii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 95 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxix) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 96 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxx) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxi) $V_H$ содержит серин в позиции 47 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, aspartic acid в позиции 73 аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxiii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxiv) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO:46;

(lxxv) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxvi) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxvii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxviii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxix) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73 аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxx) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73 аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глютаминовую кислоту в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxxi) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74, треонин в позиции 76, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глютаминовую кислоту в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46; или

(lxxxii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74, треонин в позиции 76, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глицин в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46.

В одном примере реализации данного изобретения $V_H$ и $V_L$ находятся в одной полипептидной цепи. Например, TL1a-связывающий белок является:

(i) одноцепочечным Fv фрагментом (scFv);

(ii) димерным scFv (di-scFv);

(iii) одним из (i) или (ii), связанным с тяжелоцепочечной константной областью или Fc или тяжелоцепочечной константной областью $C_H2$ и/или $C_H3$; или

(iv) одним из (i) или (ii), связанным с белком, связывающимся с иммунной эффекторной клеткой.

В другом примере $V_L$ и $V_H$ находятся в разных полипептидных цепях. Например, TL1a-связывающий белок является:

(i) диателом;

(ii) трителом;

(iii) тетрателом;

(iv) Fab;

(v) $F(ab')_2$;

(vi) Fv;

(vii) одним из (i)-(vi), связанным с тяжелоцепочечной константной областью, или Fc или тяжелоцепочечной константной областью $C_H2$ и/или $C_H3$; или

(viii) одним из (i) - (vi), связанным с белком, связывающимся с иммунной эффекторной клеткой.

В одном примере по данному изобретению TL1a-связывающий белок является антителом.

Типичные TL1a-связывающие белки по данному изобретению являются химерными, деиммунизированными, гуманизированными, человеческими, сингуманизированными или приматизированными.

В одном примере реализации данного изобретения описывается антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, в котором антигенсвязывающий домен специфично связывается с TL1a и, в котором антитело ингибирует взаимодействие TL1a и DR3 и не ингибирует взаимодействие TL1a и DcR3, антигенсвязывающий домен включает любые из следующих:

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 2, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 6;

(ii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 10, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 14;

(iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 18, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 22;

(iv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 26, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 30;

(v) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 34, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO:38;

(vi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(vii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 50, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 54;

(viii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(ix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(x) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 66, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 70, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 74, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 78, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 82;

(xv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 86, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 90, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 154, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 164;

(xix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 155, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 163;

(xx) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 156, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 165;

(xxi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 157, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 166;

(xxii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 158, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 167;

(xxiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 159, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 168;

(xxiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 160, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 169;

(xxv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 161, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 170;

(xxvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 234, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 169;

(xxvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 154, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 155, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 156, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxx) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 157, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 158, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 159, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 160, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 161, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 234, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 164;

(xxxvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 165;

(xxxviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 166;

(xxxix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 167;

(xl) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 168;

(xli) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 169;

(xlii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 170;

(xliii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 171;

(xliv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 172;

(xlv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 175, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 188;

(xlvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 176, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 189;

(xlvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 177, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 190;

(xlviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 178, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 191;

(xlix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 179, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 192;

(l) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 180, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 193;

(li) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 181, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 194;

(lii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 182, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 195;

(liii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 183, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 196;

(liv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 184, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 197;

(lv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 185, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 198;

(lvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 186, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 199; или

(lvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 187, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 200,

В одном примере реализации данного изобретения антитело включает любую из следующих пар $V_H$ и $V_L$:

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 26, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 30;

(ii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 34, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO:38; и

(iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46.

В одном примере реализации данного изобретения антитело включает любую из следующих пар $V_H$ и $V_L$:

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(ii) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 106, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 107, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 175, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 188;

(iv) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 222, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 228, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(v) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 176, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 189;

(vi) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 223, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 228 или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(vii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 177, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 190;

(viii) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 229, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(ix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 178, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 191;

(x) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 230, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 179, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 192;

(xii) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 231, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 180, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 193;

(xiv) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224 или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 228 или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 181, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 194;

(xvi) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 225, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 230, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 183, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 196;

(xviii) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 226 или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 230 или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 185, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 198;

(xx) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 226, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 232, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xxi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 186, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 199;

(xxii) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 227, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 232, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xxiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 187, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 200; или

(xxiv) $V_H$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 227, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и $V_L$, кодированный нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности,

описанной в SEQ ID NO: 233, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения антитело содержит $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 94, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 95,

В одном примере реализации данного изобретения антитело включает любую из следующих пар $V_H$ и $V_L$:

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(ii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 66, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(iv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 70, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(v) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 74, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(vi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 78, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(vii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 82;

(viii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 86, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(ix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 90, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46; или

(x) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62.

Данное изобретение также описывает TL1a-связывающее антитело, содержащее $V_H$ в последовательности SEQ ID NO:42, и $V_L$ в последовательности SEQ ID NO:46.

Данное изобретение также описывает TL1a-связывающее антитело, содержащее $V_H$ в последовательности SEQ ID NO: 175, и $V_L$ в последовательности SEQ ID NO: 188.

Данное изобретение также описывает TL1a-связывающее антитело, содержащее $V_H$ в последовательности SEQ ID NO: 176, и $V_L$ в последовательности SEQ ID NO: 189.

Данное изобретение также описывает TL1a-связывающее антитело, содержащее $V_H$ в последовательности SEQ ID NO: 177, и $V_L$ в последовательности SEQ ID NO: 190,

Данное изобретение также описывает TL1a-связывающее антитело, содержащее $V_H$ в последовательности SEQ ID NO: 178, и $V_L$ в последовательности SEQ ID NO: 191,

Данное изобретение также описывает TL1a-связывающее антитело, содержащее $V_H$ в последовательности SEQ ID NO: 179, и $V_L$ в последовательности SEQ ID NO: 192.

Данное изобретение также описывает TL1a-связывающее антитело, содержащее $V_H$ в последовательности SEQ ID NO: 180, и $V_L$ в последовательности SEQ ID NO: 193.

Данное изобретение также описывает TL1a-связывающее антитело, содержащее $V_H$ в последовательности SEQ ID NO: 181, и $V_L$ в последовательности SEQ ID NO: 194.

Данное изобретение также описывает TL1a-связывающее антитело, содержащее $V_H$ в последовательности SEQ ID NO: 183, и $V_L$ в последовательности SEQ ID NO: 196.

Данное изобретение также описывает TL1a-связывающее антитело, содержащее $V_H$ в последовательности SEQ ID NO: 185, и $V_L$ в последовательности SEQ ID NO: 198.

Данное изобретение также описывает TL1a-связывающее антитело, содержащее $V_H$ в последовательности SEQ ID NO: 186, и $V_L$ в последовательности SEQ ID NO: 199.

Данное изобретение также описывает TL1a-связывающее антитело, содержащее $V_H$ в последовательности SEQ ID NO: 187, и $V_L$ в последовательности SEQ ID NO: 200.

Антитела, описанные в предыдущем списке, обеспечивают одно или несколько из следующих преимуществ:

(i) ингибируют взаимодействие TL1a с DR3 и не ингибируют взаимодействие TL1a и DcR3 согласно результатам экспериментов, описанных в этом тексте;

(ii) понижают уровень апоптоза клеток TF-1 (например, приблизительно $7\times10^4$ - $8\times10^4$ клеток (например, $7{,}5\times10^4$ клеток)) с $EC_{50}$ менее чем приблизительно 2 нмоль/л (например, менее чем приблизительно 1,5 нмоль/л, или 1,2 нмоль/л, или 1,1 нмоль/л, или 1 нмоль/л, или менее) в сравнении с уровнем апоптоза в отсутствие TL1a-связывающего белка; или

(iii) связываются с TL1a на поверхности клетки с $EC_{50}$ менее чем приблизительно 10 нмоль/л, например менее чем приблизительно 5 нмоль/л, или 3 нмоль/л, или 2 нмоль/л, например, по результатам

проведенных анализов способом поточной цитометрии, с приблизительно $2\times10^5$ - $3\times10^5$ клеток (например, $2{,}5\times10^5$ клеток).

В одном примере реализации данного изобретения антитело содержит $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 137, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 138.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 152, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 153.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 162, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 172.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 163, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 174.

Например, антитело содержит $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46, в котором $V_H$ и/или $V_L$ включает одно или несколько следующих замещений или групп замещений:

(i) $V_H$ содержит аланин в позиции 16 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(ii) $V_H$ содержит аланин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iii) $V_H$ содержит серин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iv) $V_H$ содержит гистидин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(v) $V_H$ содержит лейцин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(vi) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(vii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(viii) $V_H$ содержит пролин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(ix) $V_H$ содержит глютамин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(x) $V_H$ содержит лизин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xi) $V_H$ содержит аланин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xii) $V_H$ содержит серин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xiii) $V_H$ содержит гистидин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xiv) $V_H$ содержит лейцин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xv) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xvi) $V_H$ содержит тирозин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xvii) $V_H$ содержит глютамин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xviii) $V_H$ содержит лизин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xix) $V_H$ содержит аланин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xx) $V_H$ содержит серин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxi) $V_H$ содержит гистидин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxii) $V_H$ содержит лейцин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxiii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит

треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxiv) $V_H$ содержит пролин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxv) $V_H$ содержит глютамин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxvi) $V_H$ содержит лизин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxvii) $V_H$ содержит аланин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxviii) $V_H$ содержит серин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxix) $V_H$ содержит гистидин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxx) $V_H$ содержит лейцин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxi) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO:

42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxiii) $V_H$ содержит пролин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxiv) $V_H$ содержит глютамин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxv) $V_H$ содержит лизин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxvi) $V_H$ содержит серин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxvii) $V_H$ содержит гистидин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxviii) $V_H$ содержит лейцин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxix) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xl) $V_H$ содержит тирозин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xli) $V_H$ содержит пролин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlii) $V_H$ содержит глютамин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO:46;

(xliii) $V_H$ содержит лизин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xliv) $V_H$ содержит аланин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlv) $V_H$ содержит гистидин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlvi) $V_H$ содержит лейцин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlvii) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlviii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlix) $V_H$ содержит пролин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(l) $V_H$ содержит глютамин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(li) $V_H$ содержит лизин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lii) $V_H$ содержит аланин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(liii) $V_H$ содержит серин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(liv) $V_H$ содержит гистидин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит тре-

онин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lv) $V_H$ содержит лейцин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lvi) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lvii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lviii) $V_H$ содержит пролин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lix) $V_H$ содержит глютамин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lx) $V_H$ содержит лизин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxi) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аланин в позиции 23 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 28 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxiii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит тирозин в позиции 33 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxiv) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 34 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxv) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аспарагин в позиции 53 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxvi) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 54 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxvii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аланин в позиции 82 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxviii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 95 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxix) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 96 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxx) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxi) $V_H$ содержит серин в позиции 47 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, aspartic acid в позиции 73 аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxiii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxiv) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO:46;

(lxxv) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxvi) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxvii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxviii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxix) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73 аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxx) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73 аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глютаминовую кислоту в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxxi) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74, треонин в позиции 76, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глютаминовую кислоту в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46; или

(lxxxii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74, треонин в позиции 76, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глицин в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит человеческий или не человеческий приматный тяжелоцепочечный иммуноглобулиновый константный участок, выбранный из группы, включающей IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgM, IgE и IgA. Типичный тяжелоцепочечный иммуноглобулиновый константный участок является IgG константным участком, например IgG1 константный участок, такой как человеческий IgG1 константный участок. Например, человеческий IgG1 константный участок содержит Fc область, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 134. В одном примере реализации данного изобретения человеческий или не человеческий приматный тяжелоцепочечный иммуноглобулиновый константный участок не содержит С-терминальный лизиновый остаток.

В другом примере TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит человеческий или не человеческий приматный легкоцепочечный иммуноглобулиновый константный участок, выбираемый из группы, состоящей из каппы или лямбды. В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок содержит человеческий легкоцепочечный константный участок, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 135 (каппа) или SEQ ID NO: 136 (лямбда).

Данное изобретение также описывает выделенную или рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую TL1a-связывающий белок по данному изобретению, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с вышеописанной, или последовательность, гибридизующуюся в нее в условиях средней или высокой строгости. В этом отношении,описание не лимитировано специфическими примерами нуклеиновых кислот, описанных в этом тексте, но также включает любые нуклеиновые кислоты, кодирующие TL1a-связывающий белок по данному изобретению в результате дегенерации генетического кода. Например, нуклеиновая кислота может быть кодоном, оптимизированным для экспрессии определенным видом клеток.

В одном примере реализации данного изобретения нуклеиновая кислота содержит последовательность, описанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 96-118, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с вышеописанной, или последовательность, гибридизующуюся в нее в условиях средней или высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения нуклеиновая кислота содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 102, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с вышеописанной, или последовательность, гибридизующуюся в нее в условиях средней или высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения нуклеиновая кислота содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 103, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с вышеописанной, или последовательность, гибридизующуюся в нее в условиях средней или высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения нуклеиновая кислота содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 102, и последовательность, описанную в SEQ ID NO: 103, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с вышеописанной, или последовательность, гибридизующуюся в нее в условиях средней или высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения нуклеиновая кислота содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 104, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с вышеописанной, или последовательность, гибридизующуюся в нее в условиях средней или высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения нуклеиновая кислота содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 105, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с вышеописанной, или последовательность, гибридизующуюся в нее в условиях средней или высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения нуклеиновая кислота содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 104, и последовательность, описанную в SEQ ID NO: 105, или последо-

вательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с вышеописанной, или последовательность, гибридизующуюся в нее в условиях средней или высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения нуклеиновая кислота содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 106, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с вышеописанной, или последовательность, гибридизующуюся в нее в условиях средней или высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения нуклеиновая кислота содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 107, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с вышеописанной, или последовательность, гибридизующуюся в нее в условиях средней или высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения нуклеиновая кислота содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 106, и последовательность, описанную в SEQ ID NO: 107, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с вышеописанной, или последовательность, гибридизующуюся в нее в условиях средней или высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения нуклеиновая кислота содержит последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, описанной в любой из последовательностей SEQ ID NO: 106, 107 или 222-233, или нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в нее в условиях от средней до высокой строгости.

В одном примере реализации данного изобретения нуклеиновая кислота включает одно или несколько из следующих:

(i) нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 106, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 107, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(ii) нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 222, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 228, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(iii) нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 223, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 228, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(iv) нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 229, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(v) нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 230, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(vi) нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 231, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(vii) нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 224, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 228, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(viii) нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 225, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 230, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(ix) нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 226, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 230, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(x) нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 226, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 232, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости;

(xi) нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 227, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 232, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости; или

(xii) нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 227, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости, и нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 233, или нуклеиновую кислоту, гибридизующуюся в нее в условиях от средней до высокой строгости.

Последовательности типичных нуклеиновых кислот и их комбинации перечислены в табл. 1 и должны рассматриваться как использующиеся для поддержки каждой индивидуальной последовательности и их комбинаций.

В одном примере реализации данного изобретения такая нуклеиновая кислота включена в экспрессионную конструкцию, в которой нуклеиновая кислота функционально связана с промотором. Такая экспрессионная конструкция может быть в векторе, например плазмиде.

В примерах по данному изобретению, описывающих одиночные полипептидные TL1a-связывающие белки, экспрессионная конструкция может включать промотор, связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей эту полипептидную цепь.

В примерах по данному изобретению, описывающих множественные полипептиды, образующие TL1a-связывающий белок, экспрессионная конструкция по данному изобретению содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую один из полипептидов (например, включающий $V_H$), функционально связанный с промотором, и нуклеиновую кислоту, кодирующую драгой полипептид (например, включающий $V_L$), функционально связанный с промотором.

В другом примере, экспрессионная конструкция является бицистронной экспрессионной конструкцией, например, включающей следующие функционально связанные компоненты в порядке от 5' к 3':

(i) промотор;

(ii) нуклеиновая кислота, кодирующая первый полипептид;

(iii) внутренний участок вхождения рибосомы;

(iv) нуклеиновая кислота, кодирующая второй полипептид.

Например, первый полипептид содержит $V_H$ и второй полипептид содержит $V_L$ или первый полипептид содержит $V_L$ и второй полипептид содержит $V_H$.

Данное изобретение также описывает отдельные экспрессионные конструкции, одна из которых кодирует первый полипептид (например, включающий $V_H$) и другая кодирует второй полипептид (например, включающий $V_L$). Например, данное изобретение также описывает композицию, включающую:

(i) первую экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (например, включающий $V_H$, функционально связанный с промотором); и

(ii) вторую экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (например, включающий $V_L$, функционально связанный с промотором), в котором первый и второй полипептиды ассоциированы с образованием TL1a-связывающего белка по данному изобретению.

Данное изобретение также описывает изолированную клетку, экспрессирующую TL1a-связывающий белок по данному изобретению, или рекомбинантную клетку, генетически модифициро-

ванную для экспрессии TL1a-связывающего белка по данному изобретению.

В одном примере реализации данного изобретения клетка включает экспрессионную конструкцию по данному изобретению или:

(i) первую экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (например, включающий $V_H$) функционально связанный с промотором; и

(ii) вторую экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (например, включающий $V_L$) функционально связанный с промотором, в которой первый и второй полипептиды ассоциированы с образованием TL1a-связывающего белка по данному изобретению.

Примеры клеток по данному изобретению включают бактериальные клетки, дрожжевые клетки, клетки насекомых или млекопитающих. Типичными клетками являются клетки млекопитающих.

Данное изобретение дополнительно описывает способы производства TL1a-связывающего белка по данному изобретению. Например, такой способ включает поддержание экспрессионной конструкции (конструкций) по данному изобретению в условиях, достаточных для производства TL1a-связывающего белка.

В одном примере реализации данного изобретения способ получения TL1a-связывающего белка по данному изобретению включает культивирование клетки по данному изобретению в условиях, достаточных для производства белка и в качестве опции его выделения.

В одном примере реализации данного изобретения способ получения TL1a-связывающего белка по данному изобретению дополнительно включает выделение белка.

Данное изобретение также описывает композицию, включающую TL1a-связывающий белок, нуклеиновую кислоту, экспрессионную конструкцию или клетку по данному изобретению и подходящий носитель. В одном примере реализации данного изобретения композиция включает TL1a-связывающий белок по данному изобретению и подходящий носитель. В одном примере реализации данного изобретения носитель является фармацевтически приемлемым, например композиция является фармацевтической композицией.

Данное изобретение также описывает способ лечения или предотвращения симптомов состояния (например, TL1a-связанного состояния) в клетке, ткани, органе или субъекте, при этом этот способ включает введение TL1a-связывающего белка, нуклеиновой кислоты, экспрессионной конструкции, клетки или композиции по данному изобретению в клетку, ткань, орган или субъекта. В одном примере реализации данного изобретения оно описывает способ лечения или предотвращения состояния (например, TL1a-связанного состояния) у субъекта, при этом этот способ включает введение TL1a-связывающего белка, нуклеиновой кислоты, экспрессионной конструкции, клетки или композиции по данному изобретению субъекту. В этом отношении способ предотвращения состояния может предотвращать рецидив состояния, характеризующегося циклом ремиссий-рецидивов, такого как рассеянный склероз, например белок вводится во время ремиссии, чтобы, тем самым, предотвратить рецидив.

Данное изобретение также описывает способ стимулирования или улучшения ангиогенеза у субъекта, включающий введение TL1a-связывающего белка, нуклеиновой кислоты, экспрессионной конструкции, клетки или композиция по данному изобретению субъекту.

Данное изобретение также описывает применение TL1a-связывающего белка, нуклеиновой кислоты, экспрессионной конструкции, клетки или композиции по данному изобретению в медицине.

Данное изобретение также описывает применение TL1a-связывающего белка, нуклеиновой кислоты, экспрессионной конструкции или клетки при производстве медикамента для лечения или предотвращения симптомов состояния (например, TL1a-связанного состояния), или для лечения или предотвращения состояния (например, TL1a-связанного состояния), или для стимулирования или улучшения ангиогенеза у субъекта.

Данное изобретение также описывает TL1a-связывающий белок, нуклеиновую кислоту, экспрессионную конструкцию или клетку для применения при лечении или предотвращении симптомов состояния (например, TL1a-связанного состояния), или для лечения или предотвращения состояния (например, TL1a-связанного состояния), или стимулирования или улучшения ангиогенеза у субъекта.

В одном примере реализации данного изобретения способ лечения или профилактики по данному изобретению дополнительно включает диагностику состояния, например, с помощью способа, описанного в этом документе.

В одном примере реализации данного изобретения способ лечения или профилактики по данному изобретению дополнительно включает определение уровня TL1a у субъекта и введение дозы TL1a-связывающего белка, нуклеиновой кислоты, экспрессионной конструкции, клетки или композиции по данному изобретению, если уровень TL1a не является существенно пониженным или не понижен до уровня, не связанного с заболеванием.

Данное изобретение также описывает способ ингибирования взаимодействия TL1a и DR3 (и в одном примере реализации данного изобретения, не ингибирования взаимодействия TL1a и DcR3) в клетке, ткани, органе или субъекте, включающий введение TL1a-связывающего белка, нуклеиновой кислоты, экспрессионной конструкции, клетки или композиции по данному изобретению в клетку, ткань, орган или субъекта. В одном примере реализации данного изобретения субъект страдает от заболевания (на-

пример, TL1a-связанного состояния).

Данное изобретение также описывает способ обнаружения TL1a в образце, включающий контакт образца с TL1a-связывающим белком по данному изобретению, с образованием комплекса антиген-белок и обнаружением комплекса, при этом обнаружение комплекса свидетельствует о наличии TL1a в образце.

Данное изобретение также описывает способ обнаружения TL1a у субъекта, включающий обнаружение TL1a-связывающего белка по данному изобретению у субъекта, в котором белок конъюгирован с обнаруживаемой меткой. В одном примере реализации данного изобретения способ включает введение белка субъекту.

Данное изобретение также описывает способ диагностики TL1a-связанного состояния у субъекта, включающий применение способа по данному изобретению для обнаружения TL1a в образце субъекта, в котором обнаружение TL1a в образце свидетельствует о наличии TL1a-связанного состояния.

В одном примере реализации данного изобретения способ включает определение уровня TL1a в образце, в котором повышенный или пониженный уровень TL1a в образце в сравнении с контрольным образцом свидетельствует о наличии TL1a-связанного состояния.

В одном примере реализации данного изобретения результаты применения способа для обнаружения TL1a или диагностики/прогнозирования состояния предоставляются, например, в бумажной форме или в машиночитаемой форме.

Данное изобретение также описывает способ включающий получение результатов способа обнаружения TL1a или диагностики/прогнозирования состояния по данному изобретению и введение терапевтической или профилактической композиции или рекомендацию такого введения. В одном примере реализации данного изобретения композиция является композицией по данному изобретению.

Примерами состояний для лечения, предотвращения, диагностики или прогнозирования являются $T_H17$-связанными состояниями, воспалительными состояниями, аутоиммунными состояниями или состояниями, ассоциированными или вызываемыми недостаточным ангиогенезом. Подходящие состояния описаны в этом тексте.

В одном примере реализации данного изобретения состоянием для лечения, предотвращения, диагностики или прогнозирования являются аутоиммунное состояние, например увеит, язвенный колит, болезнь Крона, синдром раздражённого кишечника, ревматоидный артрит, полиартрит, рассеянный склероз, астма или хроническое обструктивное заболевание легких.

В одном примере реализации данного изобретения состояние является воспалительным заболеванием кишечника, таким как колит, например язвенный колит или болезнь Крона.

Данное изобретение также описывает способ выбора TL1a-связывающего белка, специфично связывающегося с TL1a и ингибирующего взаимодействие TL1a и DR3 и который не ингибирует взаимодействие TL1a и DcR3, из множества TL1a-связывающих белков, включающий

контакт множества TL1a-связывающих белков с TL1a мутеином, в котором аргинин в позиции аминокислоты 32 в последовательности SEQ ID NO:202 замещен аланином и/или аргинин в позиции аминокислоты 85 замещен аланином в условиях, достаточных для связывания TL1a-связывающих белков с мутеином с образованием комплекса TL1a-связывающий белок-TL1a мутеин, и истощенного множества TL1a-связывающих белков, не связывающихся с TL1a мутеином; и

сбор TL1a-связывающих белков, не связанных с TL1a мутеином, из истощенного множества TL1a-связывающих белков, в котором собранные TL1a-связывающие белки специфически связываются с TL1a и ингибируют взаимодействие TL1a и DR3 и не ингибируют взаимодействие TL1a и DcR3.

Данное изобретение также описывает способ выделения TL1a-связывающего белка, специфично связывающегося с TL1a и ингибирующего взаимодействие TL1a и DR3 и не ингибирующего взаимодействие TL1a и DcR3, из множества TL1a-связывающих белков, включающий выделение из множества TL1a-связывающих белков одного или нескольких TL1a-связывающих белков, не связывающихся с TL1a мутеином, в которой аргинин в позиции аминокислоты 32 в последовательности SEQ ID NO:202 замещен аланином и/или аргинин в позиции аминокислоты 85 замещен аланином.

Множество TL1a-связывающих белков может присутствовать в библиотеке антител или антиген-связывающих доменов, таких как фаговая дисплейная, рибосомная дисплейная или дрожжевая дисплейная библиотека. Множество TL1a-связывающих белков может присутствовать в антисыворотке. Множество TL1a-связывающих белков может присутствовать в надосадочных жидкостях гибридомных культур.

Данное изобретение также описывает выделенный полипептид, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 202, в которой аргинин в позиции аминокислоты 32 замещен аланином и/или аргинин в позиции аминокислоты 85 замещен аланином.

**Краткое описание чертежей**

На фиг. 1A-1H изображены диаграммы, демонстрирующие последовательности V-областей антител. В сравнениях, показанных на фиг. 1D-1H идентичные аминокислоты обозначены точкой, т.е. ".".

На фиг. 1A показаны последовательности $V_H$ областей человеческих анти-TL1a антител.

На фиг. 1B показаны последовательности $V_L$ областей человеческих анти-TL1a антител.

На фиг. 1C показаны последовательности $V_H$ областей анти-TL1a антител C320 и некоторых его

производных.

На фиг. 1D показано сравнение $V_H$ последовательностей избранных человеческих антител, в которые были внедрены $V_H$ CDR 1, 2 и 3 от C320.

На фиг. 1E показаны консенсусные последовательность $V_H$ областей производных C320.

На фиг. 1F показаны последовательности $V_L$ областей анти-TL1a антитела C320 и его производных.

На фиг. 1G показано сравнение человеческих $V_L$ последовательностей антител, в которые внедрены $V_L$ CDR 1, 2 и 3 от C320.

На фиг. 1H показана консенсусная последовательность $V_L$ областей производных C320, заключенные в рамку области содержат CDR (как указанно) по определению системы нумерации Кабата и улучшенной системы нумерации Клотия. CDR, определенные по системе нумерации Кабата, выделены жирным шрифтом. CDR определенные по улучшенной системе нумерации Клотия выделены подчеркиванием.

На фиг. 2 изображены результаты анализа эффективности, демонстрирующие способность ряда анти-TL1a антител ингибировать TL1a-вызванный апоптоз TF-1 клеток. 5 мкг/мл анти-TL1a антител анализировали на их способность ингибировать TL1a-вызванный апоптоз TF-1 клеток.

На фиг. 3 изображены результаты анализа идентификации высокоэффективных анти-TL1a антител. Результаты показывают уровень ингибирования TL1a-вызванного апоптоза TF-1 клеток, достигнутого при различных концентрациях проверяемых антител (максимальная проверенная концентрация составляет 5 мкг/мл). Эти уровни позволяют определить $EC_{50}$ анти-TL1a антител для ингибирования TL1a-вызванного апоптоза TF-1 клеток, что позволяет делать функциональное сравнение, основанное на относительной эффективности.

На фиг. 4A изображен уровень ингибирования взаимодействия TL1a с DR3, достигаемый при различных концентрациях проверяемых антител (максимальная проверенная концентрация составляет 25 мкг/мл). Антитела C320, C321 и C323 ингибировали взаимодействие между TL1a и DR3 при различных концентрациях.

На фиг. 4B изображен уровень ингибирования взаимодействия TL1a с DcR3 достигаемый при различных концентрациях проверяемых антител (максимальная проверенная концентрация составляет 25 мкг/мл). Антитела C320, C321 и C323 не ингибировали в достаточной для обнаружения степени взаимодействие между TL1a и DcR3 при концентрациях антител 10 мкг/мл или менее.

На фиг. 4C изображен уровень ингибирования взаимодействия TL1a с DR3 достигаемый при различных концентрациях проверяемых антител (максимальная проверенная концентрация составляет 10 мкг/мл). Антитела C320-0, C320-168 и C320-179 ингибировали взаимодействие между TL1a и DR3 при различных концентрациях. Антитела 1B4 и C300-25 включены для сравнения.

На фиг. 4D изображен уровень ингибирования взаимодействия TL1a и DcR3 достигаемый при различных концентрациях проверяемых антител (максимальная проверенная концентрация составляет 100 мкг/мл). Антитела C320-0, C320-168 и C320-179 не ингибировали в достаточной для обнаружения степени взаимодействие между TL1a и DcR3. Антитела 1B4 и C300-25 ингибировали взаимодействие между TL1a и DcR3 при различных концентрациях и приводятся для сравнения.

На фиг. 5A изображено связывание проверяемых антител в различных концентрациях с растворимым человеческим TL1a (SEQ ID NO: 202; вверху) и растворимым человеческим TL1a в котором аргинин в остатке 32 замещен аланином (R32A мутеин, внизу). Все антитела C320-0, C320-168 и C320-179 связывают TL1a при различных концентрациях, но не R32A мутеин TL1a. Анти-TL1a антитела 1B4 и 16H2 (как описано в US20090280116) связываются с TL1a и R32A мутеином TL1a при различных концентрациях. Изотипное контрольное антитело не связывает ни одну форму TL1a.

На фиг. 5B изображено связывание проверяемых антител в различных концентрациях с растворимым человеческим TL1a в котором аргинин в остатке 85 замещен аланином (R85A мутеин, вверху) и растворимым человеческим TL1a, в котором аргинины в остатке 32 и остатке 85 замещены аланином (R32A+R85A мутеин, внизу). Антитела C320-0, C320-168 и C320-179 не связывают ни R85A, ни R32A+R85A мутеин TL1a. Анти-TL1a антитела 1B4 и 16H2 (как описано в US20090280116) связывают как R85A, так и R32A+R85A мутеин TL1a при различных концентрациях. Изотипное контрольное антитело не связывает ни одну форму TL1a.

На фиг. 5C изображено связывание растворимого человеческого TL1a, R32A мутеина TL1a и R85A мутеина TL1a с концентрацией 1 мкг/мл с рецепторами DR3 и DcR3. TL1a связывается с обоими рецепторами одинаково хорошо. R32A и R85A мутеин TL1a связывают DcR3 подобно TL1a, но DR3 связывают на уровне приблизительно 50% или ниже от уровня связывания TL1a с DcR3.

На фиг. 5D изображен результат рентгеноструктурного анализа тримера человеческого TL1a (PDB: 3K51) (серый) с остатками R32 и R85, выделенными черным цветом на каждом из мономеров.

На фиг. 6 продемонстрированы способности антител C320, C321, C323 и 1B4 связываться с TL1a клеточной поверхности. Связывание оценивали с помощью поточной цитометрии, результаты которой представлены в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI). Все антитела, за исключением изотипного контроля, связывают TL1a.

На фиг. 7A изображено производство TL1a клеточной поверхности митоген (конканавалин A)-

стимулированными моноядерными клетками периферической крови (PBMCs). Затемненный график изображает изотипной контрольное антитело, светлый график изображает TL1a клеточной поверхности, обнаруженный химерным крысиным/человеческим анти-человеческим TL1a.

На фиг. 7B изображено повышенное производство секретированного TL1a в PBMC при повышении митогенной (конканавалин A)-стимуляции.

На фиг. 8A продемонстрирована способность анти-TL1a антител (максимальная проверенная концентрация составляет 50 мкг/мл) ингибировать производство интерферона γ (IFN-γ), стимулированное эндогенным человеческим TL1a. Эндогенный TL1a улучшает производство цитокина путем стимулирования PBMC. Антитела C320 и C323 ингибируют производство IFN-γ. Антитело 1B4 приводится для сравнения.

На фиг. 8B продемонстрирована способность TL1a антител (максимальная проверенная концентрация составляет 50 мкг/мл) ингибировать производство IL-13, стимулированное эндогенным человеческим TL1a. Эндогенный TL1a улучшает производство цитокина путем стимулирования PBMC. Антитела C320 и C323 ингибируют производство IL-13. Антитело 1B4 приводится для сравнения.

На фиг. 9A изображено сравнение легкоцепочечной последовательности C320 с генеративной последовательностью высшей гомологии, IGLV1-40*01. Любые идентичные аминокислоты обозначены точкой, т.е. ".". Идентифицированы различия в CDR областях аминокислотных последовательностей.

На фиг. 9B изображено сравнение $V_H$ областей антител, здесь идентифицированных.

На фиг. 9C изображено сравнение $V_L$ областей антител, здесь идентифицированных.

На фиг. 9D представлена копия фотографии результатов изоэлектрического гелевого фокусирования при сравнении C320-168, C320-163 и C320-170. C320-168 обладают 5-6 изоформами с различным зарядом, в сравнении с 1-2 изоформами, визуализированными для C320-163 и C320-170.

На фиг. 9E продемонстрирована способность антител C320-168, C320-179 и C320-183 нейтрализовывать TL1a-стимулированный апоптоз клеток TF-1 при различных концентрациях (максимальная проверенная концентрация составляет 10 мкг/мл). Антитела C320-0 и 1B4 включены для сравнения. Все антитела ингибируют TL1a-стимулированный апоптоз клеток TF-1 в различных концентрациях.

На фиг. 10A продемонстрирована общая площадь изъязвленного кишечника ($см^2$) у крыс после развития DNBS-стимулированного колита. Крысам вводили антитело C320-168 (10 мг/кг), носитель (негативный контроль) в дни 0 и 4 или сульфасалазин (стандартное лечение) ежедневно начиная с 0 дня (с указанием результатов для каждой группы). C320-168 снижает среднюю площадь изъязвления по сравнению с группой негативного контроля в степени, сравнимой с действием сульфасалазина.

На фиг. 10B продемонстрировано изменение веса (г) крыс после развития оксазалон-стимулированного колита. Крысам вводили антитело C320-168 (10 мг/кг) или изотипный контроль (10 мг/кг) в дни 0 и 4 или сульфасалазин (SoC (5-ASA); стандартное лечение) ежедневно, начиная с дня 0 (с указанием результатов для каждой группы.) C320-168 уменьшает потерю веса по сравнению с изотипным контролем в степени, сравнимой с действием сульфасалазина.

На фиг. 10C продемонстрирована консистенция экскрементов (DAI - индекс активности заболевания) у крыс после развития оксазалон-стимулированного колита. Крысам вводили антитело C320-168 (10 мг/кг) или изотипный контроль (10 мг/кг) в дни 0 и 4 или сульфасалазин (SoC (5-ASA); стандартное лечение) ежедневно, начиная с дня 0 (с указанием результатов для каждой группы). C320-168 улучшает клинические признаки заболевания (консистенцию экскрементов) по сравнению с антителом изотипного контроля.

На фиг. 11A продемонстрирована консистенция экскрементов (DAI - индекс активности заболевания) у крыс после развития (DSS (декстран сульфата натрия)-стимулированного колита. Крысам вводили антитело C320-168 (10 мг/кг) или изотипный контроль (10 мг/кг) дважды в неделю начиная с дня 4 после начала заболевания или сульфасалазин (SoC (5-ASA); стандартное лечение) ежедневно, начиная с дня 4 после начала заболевания (с указанием результатов для каждой группы). C320-168 улучшает клинические признаки заболевания (консистенцию экскрементов) по сравнению с антителом изотипного контроля в степени, сравнимой с действием сульфасалазина.

На фиг. 11B продемонстрировано изменение веса (%) у крыс после развития DSS-стимулированного колита. Крысам вводили антитело C320-168 (10 мг/кг или изотипный контроль (10 мг/кг) дважды в неделю начиная с дня 4 после начала заболевания или сульфасалазин (SoC (5-ASA); стандартное лечение) ежедневно, начиная с дня 4 после начала заболевания (с указанием результатов для каждой группы). C320-168 уменьшает потерю веса по сравнению с антителом изотипного контроля в степени, сравнимой с действием сульфасалазина.

На фиг. 12 изображены результаты анализа ELISA по идентификации связывания антитела с различными изоформами TL1a. Как C320-168, так и C320-179 связывают более длинные (72-251) и короткие (84-251) изоформы растворимого, отделенного TL1a.

## Описание изобретения

Общая часть.

В данном описании, если не указано иначе и контекст не подразумевает иного, все ссылки, сделан-

ные в отношении одной стадии, обсуждаемой композиции, группы стадий или групп композиций, должны рассматриваться как включающие и одну, и множество (т.е. одну или более) таких стадий, обсуждаемых композиций, групп стадий или групп обсуждаемых композиций. Таким образом, при употреблении в этом тексте термины, употребляемые в единственном числе, включают также множественное число, если контекст четко не подразумевает иного.

Каждый пример по данному изобретению, при употреблении в этом тексте, mutatis mutandis относится к каждому другому примеру, если четко не указано иного.

Специалисты в данной области заметят, что описанное в этом тексте изобретение может быть подвержено изменениям и модификациям, отличающимся от описанных. Следует учитывать, что данное изобретение включает все такие изменения и модификации. Данное изобретение также включает все стадии, свойства, композиции и соединения, которые упомянуты или описаны в данном документе, вместе или по отдельности, и все и каждые комбинации и любые два или более такие свойства или стадии.

Данное изобретение не ограничивается объемом примеров, описанных в этом тексте, которые используются исключительно в иллюстративных целях. Функционально эквивалентные продукты, композиции и способы являются частью данного изобретения, согласно приведенному описанию.

Данное изобретение осуществлено без избыточного экспериментирования с применением, если не указано иначе, стандартных приемов молекулярной биологии, микробиологии, вирологии, технологии рекомбинантной ДНК, пептидного синтеза в растворе, пептидного синтеза в твердой фазе и иммунологии. Такие приемы и процедуры описаны, например, в Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Second Edition (1989), в Vol. I, II, и III; Benny K.C.Lo, Antibody Engineering: Methods and Protocols, (2004), Humana Press, Vol. 248; ДНК Cloning: A Practical Approach, Vols. I and II (D.N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, whole of text; Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (M.J. Gait, ed., 1984) IRL Press, Oxford, whole of text, и особенно работы Gait, p. 1-22; Atkinson et al., p. 35-81; Sproat et al., p. 83-115; and Wu et al., p. 135-151; 4. Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, весь текст; Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach (1986) IRL Press, Oxford, весь текст; Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), whole of series; J.F. Ramalho Ortigao, "An Chemistry of Peptide Synthesis" In: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Germany); Sakakibara Biochem. Biophys. Res. Commun. 73: 336-342, 1976; Merrifield J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154, 1963; Barany and Merrifield (1979) in Peptides (Gross, E. and Meienhofer, J. eds.), vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York. 12. Wiinsch, E., ed. (1974) Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Metoden der Organischen Chemie (Miiler, E., ed.), vol. 15, 4th edn., Parts 1 и 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984), Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984), Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky Int. J. Peptide Protein Res. 25: 449-474, 1985; Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); и Animal Cell Culture: Practical Approach, Third Edition (John R.W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, весь текст.

Термины "и/или", например, "X и/или Y" должны пониматься означающими как "X и Y", так и "X или Y" и должны рассматриваться как полностью поддерживающие оба значения или каждое значение в отдельности.

Во всем объеме данного документа термин "включать" или его вариации, такие как "включает" или "включающий", должны пониматься как указывающие на вовлечение обсуждаемого элемента, числа или стадии или группы элементов, чисел или стадий, но не исключающее другой элемент, число или стадию или группу элементов, чисел или стадий.

**Список ключевых последовательностей**

SEQ ID NO: 1: аминокислотная последовательность человеческого TL1a внеклеточного домена с N-терминальными HIS и FLAG метками.

SEQ ID NO 2: аминокислотная последовательность C336 $V_H$.

SEQ ID NO: 3: аминокислотная последовательность C336 HCDR1.

SEQ ID NO: 4: аминокислотная последовательность C336 HCDR2.

SEQ ID NO: 5: аминокислотная последовательность C336 HCDR3.

SEQ ID NO: 6: аминокислотная последовательность C336 $V_L$.

SEQ ID NO: 7: аминокислотная последовательность C336 LCDR1.

SEQ ID NO: 8: аминокислотная последовательность C336 LCDR2.

SEQ ID NO: 9: аминокислотная последовательность C336 LCDR3.

SEQ ID NO: 10: аминокислотная последовательность C334 $V_H$.

SEQ ID NO: 11: аминокислотная последовательность C334 HCDR1.

SEQ ID NO: 12: аминокислотная последовательность C334 HCDR2.

SEQ ID NO: 13: аминокислотная последовательность C334 HCDR3.

SEQ ID NO: 14: аминокислотная последовательность C334 $V_L$.

SEQ ID NO: 15: аминокислотная последовательность C334 LCDR1.

SEQ ID NO: 16: аминокислотная последовательность C334 LCDR2.
SEQ ID NO: 17: аминокислотная последовательность C334 LCDR3.
SEQ ID NO: 18: аминокислотная последовательность C333 $V_H$.
SEQ ID NO: 19: аминокислотная последовательность C333 HCDR1.
SEQ ID NO: 20: аминокислотная последовательность C333 HCDR2.
SEQ ID NO: 21: аминокислотная последовательность C333 HCDR3.
SEQ ID NO: 22: аминокислотная последовательность C333 $V_L$.
SEQ ID NO: 23: аминокислотная последовательность C333 LCDR1.
SEQ ID NO: 24: аминокислотная последовательность C333 LCDR2.
SEQ ID NO: 25: аминокислотная последовательность C333 LCDR3.
SEQ ID NO: 26: аминокислотная последовательность C323 $V_H$.
SEQ ID NO: 27: аминокислотная последовательность C323 HCDR1.
SEQ ID NO: 28: аминокислотная последовательность C323 HCDR2.
SEQ ID NO: 29: аминокислотная последовательность C323 HCDR3.
SEQ ID NO: 30: аминокислотная последовательность C323 $V_L$.
SEQ ID NO: 31: аминокислотная последовательность C323 LCDR1.
SEQ ID NO: 32: аминокислотная последовательность C323 LCDR2.
SEQ ID NO: 33: аминокислотная последовательность C323 LCDR3.
SEQ ID NO: 34: аминокислотная последовательность C321 $V_H$.
SEQ ID NO: 35: аминокислотная последовательность C321 HCDR1.
SEQ ID NO: 36: аминокислотная последовательность C321 HCDR2.
SEQ ID NO: 37: аминокислотная последовательность C321 HCDR3.
SEQ ID NO: 38: аминокислотная последовательность C321 $V_L$.
SEQ ID NO: 39: аминокислотная последовательность C321 LCDR1.
SEQ ID NO: 40: аминокислотная последовательность C321 LCDR2.
SEQ ID NO: 41: аминокислотная последовательность C321 LCDR3.
SEQ ID NO: 42: аминокислотная последовательность C320 $V_H$.
SEQ ID NO: 43: аминокислотная последовательность C320 HCDR1.
SEQ ID NO: 44: аминокислотная последовательность C320 HCDR2.
SEQ ID NO: 45: аминокислотная последовательность C320 HCDR3.
SEQ ID NO: 46: аминокислотная последовательность C320 $V_L$.
SEQ ID NO: 47: аминокислотная последовательность C320 LCDR1.
SEQ ID NO: 48: аминокислотная последовательность C320 LCDR2.
SEQ ID NO: 49: аминокислотная последовательность C320 LCDR3.
SEQ ID NO: 50: аминокислотная последовательность C319 $V_H$.
SEQ ID NO: 51: аминокислотная последовательность C319 HCDR1.
SEQ ID NO: 52: аминокислотная последовательность C319 HCDR2.
SEQ ID NO: 53: аминокислотная последовательность C319 HCDR3.
SEQ ID NO: 54: аминокислотная последовательность C319 $V_L$.
SEQ ID NO: 55: аминокислотная последовательность C319 LCDR1.
SEQ ID NO: 56: аминокислотная последовательность C319 LCDR2.
SEQ ID NO: 57: аминокислотная последовательность C319 LCDR3.
SEQ ID NO: 58: аминокислотная последовательность C320-3 $V_H$.
SEQ ID NO: 59: аминокислотная последовательность C320-3 HCDR1.
SEQ ID NO: 60: аминокислотная последовательность C320-3 HCDR2.
SEQ ID NO: 61: аминокислотная последовательность C320-3 HCDR3.
SEQ ID NO: 62: аминокислотная последовательность C320-5 $V_L$.
SEQ ID NO: 63: аминокислотная последовательность C320-5 LCDR1.
SEQ ID NO: 64: аминокислотная последовательность C320-5 LCDR2.
SEQ ID NO: 65: аминокислотная последовательность C320-5 LCDR3.
SEQ ID NO: 66: аминокислотная последовательность C320-90 $V_H$.
SEQ ID NO: 67: аминокислотная последовательность C320-90 HCDR1.
SEQ ID NO: 68: аминокислотная последовательность C320-90 HCDR2.
SEQ ID NO: 69: аминокислотная последовательность C320-90 HCDR3.
SEQ ID NO: 70: аминокислотная последовательность C320-103 $V_H$.
SEQ ID NO: 71: аминокислотная последовательность C320-103 HCDR1.
SEQ ID NO: 72: аминокислотная последовательность C320-103 HCDR2.
SEQ ID NO: 73: аминокислотная последовательность C320-103 HCDR3.
SEQ ID NO: 74: аминокислотная последовательность C320-114 $V_H$.
SEQ ID NO: 75: аминокислотная последовательность C320-114 HCDR1.
SEQ ID NO: 76: аминокислотная последовательность C320-114 HCDR2.
SEQ ID NO: 77: аминокислотная последовательность C320-114 HCDR3.

SEQ ID NO: 78: аминокислотная последовательность C320-115 $V_H$.
SEQ ID NO: 79: аминокислотная последовательность C320-115 HCDR1.
SEQ ID NO: 80: аминокислотная последовательность C320-115 HCDR2.
SEQ ID NO: 81: аминокислотная последовательность C320-115 HCDR3.
SEQ ID NO: 82: аминокислотная последовательность C320-120 $V_L$.
SEQ ID NO: 83: аминокислотная последовательность C320-120 LCDR1.
SEQ ID NO: 84: аминокислотная последовательность C320-120 LCDR2.
SEQ ID NO: 85: аминокислотная последовательность C320-120 LCDR3.
SEQ ID NO: 86: аминокислотная последовательность C320-129 $V_H$.
SEQ ID NO: 87: аминокислотная последовательность C320-129 HCDR1.
SEQ ID NO: 88: аминокислотная последовательность C320-129 HCDR2.
SEQ ID NO: 89: аминокислотная последовательность C320-129 HCDR3.
SEQ ID NO: 90: аминокислотная последовательность C320-130 $V_H$.
SEQ ID NO: 91: аминокислотная последовательность C320-130 HCDR1.
SEQ ID NO: 92: аминокислотная последовательность C320-130 HCDR2.
SEQ ID NO: 93: аминокислотная последовательность C320-130 HCDR3.
SEQ ID NO: 94: аминокислотная последовательность $V_H$ консенсусной последовательности C320 и производных.
SEQ ID NO: 95: аминокислотная последовательность $V_L$ консенсусной последовательности C320 и производных.
SEQ ID NO: 96: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ C336.
SEQ ID NO: 97: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ C336.
SEQ ID NO: 98: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ C334.
SEQ ID NO: 99: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ C334.
SEQ ID NO: 100: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ C333.
SEQ ID NO: 101: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ C333.
SEQ ID NO: 102: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ C323.
SEQ ID NO: 103: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ C323.
SEQ ID NO: 104: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ C321.
SEQ ID NO: 105: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ C321.
SEQ ID NO: 106: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ C320.
SEQ ID NO: 107: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ C320.
SEQ ID NO: 108: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ C319.
SEQ ID NO: 109: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ C319.
SEQ ID NO: 110: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ C320-3.
SEQ ID NO: 111: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ C320-5.
SEQ ID NO: 112: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ C320-90.
SEQ ID NO: 113: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ C320-103.
SEQ ID NO: 114: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ C320-114.
SEQ ID NO: 115: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ C320-115.
SEQ ID NO: 116: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ C320-120.
SEQ ID NO: 117: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ C320-129.
SEQ ID NO: 118: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ C320-130.
SEQ ID NO: 119: аминокислотная последовательность $V_H$ гуманизированного антитела 1B4.
SEQ ID NO: 120: аминокислотная последовательность $V_L$ гуманизированного антитела 1B4.
SEQ ID NO: 121: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ гуманизированного антитела 1B4.
SEQ ID NO: 122: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ гуманизированного антитела 1B4.
SEQ ID NO: 123: аминокислотная последовательность человеческого TL1a (происходящая от гена, добавленного в GeneBank за номером 9966 от 8 мая 2011 г.).
SEQ ID NO: 124: аминокислотная последовательность мышиного TL1a внеклеточного домена.
SEQ ID NO: 125: аминокислотная последовательность яванской макаки/макаки резус TL1a внеклеточного домена.
SEQ ID NO: 126: аминокислотная последовательность крысиного TL1a внеклеточного домена.
SEQ ID NO: 127: аминокислотная последовательность кроличьего TL1a внеклеточного домена.
SEQ ID NO: 128: аминокислотная последовательность TL1a внеклеточного домена морской. свинки.
SEQ ID NO: 129: аминокислотная последовательность человеческого рецептора смерти 3 (происходящая от гена, добавленного в GeneBank за номером. 8718 от 8 мая 2011 г.).
SEQ ID NO: 130: аминокислотная последовательность человеческого рецептора-ловушки 3 (происходящая от гена, добавленного в GeneBank за номером. 8771 от 8 мая 2011 г.).

SEQ ID NO: 131: последовательность домена TL1a.

SEQ ID NO: 132: последовательность домена TL1a.

SEQ ID NO: 133: последовательность домена TL1a.

SEQ ID NO: 134: аминокислотная последовательность человеческого IgG1 Fc домена.

SEQ ID NO: 135: аминокислотная последовательность человеческого каппа константного домена.

SEQ ID NO: 136: аминокислотная последовательность человеческого лямбда константного домена.

SEQ ID NO: 137: аминокислотная последовательность $V_H$ консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO: 138: аминокислотная последовательность $V_L$ консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO 139: аминокислотная последовательность LCDR1 консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO 140: аминокислотная последовательность LCDR2 консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO 141: аминокислотная последовательность LCDR3 консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO 142: аминокислотная последовательность HCDR2 консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO 143: аминокислотная последовательность HCDR3 консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO: 144: аминокислотная последовательность HFR1 консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO: 145: аминокислотная последовательность HFR2 консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO: 146: аминокислотная последовательность HFR3 консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO: 147: аминокислотная последовательность HFR4 консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO: 148: аминокислотная последовательность LFR1 консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO: 149: аминокислотная последовательность LFR2 консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO: 150: аминокислотная последовательность LFR3 консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQID NO: 151: аминокислотная последовательность LFR4 консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO: 152: аминокислотная последовательность $V_H$ консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO: 153: аминокислотная последовательность $V_L$ консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO: 154: аминокислотная последовательность $V_H$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 1TZG.

SEQ ID NO: 155: аминокислотная последовательность $V_H$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 1RHH.

SEQ ID NO: 156: аминокислотная последовательность $V_H$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 2DD8.

SEQ ID NO: 157: аминокислотная последовательность $V_H$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 2JB5,.

SEQ ID NO: 158: аминокислотная последовательность $V_H$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 3FKU.

SEQ ID NO: 159: аминокислотная последовательность $V_H$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 3GBM.

SEQ ID NO: 160: аминокислотная последовательность $V_H$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 3LMJ.

SEQ ID NO: 161: аминокислотная последовательность $V_H$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 3P30.

SEQ ID NO: 162: аминокислотная последовательность $V_H$ консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO: 163: аминокислотная последовательность $V_L$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 1RHH.

SEQ ID NO: 164: аминокислотная последовательность $V_L$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 1TZGL.

SEQ ID NO: 165: аминокислотная последовательность $V_L$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 2DD8.

SEQ ID NO: 166: аминокислотная последовательность $V_L$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 2JB5.

SEQ ID NO: 167: аминокислотная последовательность $V_L$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 3FKU.

SEQ ID NO: 168: аминокислотная последовательность $V_L$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 3GBM.

SEQ ID NO: 169: аминокислотная последовательность $V_L$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 3LMJ.

SEQ ID NO: 170: аминокислотная последовательность $V_L$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 3P30,.

SEQ ID NO: 171: аминокислотная последовательность $V_L$ включающая CDR из C320, пришитый к FRs антитела 3IYW.

SEQ ID NO: 172: аминокислотная последовательность $V_L$ консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO: 173: аминокислотная последовательность $V_H$ консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO: 174: аминокислотная последовательность $V_L$ консенсусной последовательности C320 и производных.

SEQ ID NO: 175: аминокислотная последовательность $V_H$ антитела C320-162.

SEQ ID NO: 176: аминокислотная последовательность $V_H$ антитела C320-163.

SEQ ID NO: 177: аминокислотная последовательность $V_H$ антитела C320-164.

SEQ ID NO: 178: аминокислотная последовательность $V_H$ антитела C320-165.

SEQ ID NO: 179: аминокислотная последовательность $V_H$ антитела C320-166.

SEQ ID NO: 180: аминокислотная последовательность $V_H$ антитела C320-167.

SEQ ID NO: 181: аминокислотная последовательность $V_H$ антитела C320-168.

SEQ ID NO: 182: аминокислотная последовательность $V_H$ антитела C320-169.

SEQ ID NO: 183: аминокислотная последовательность $V_H$ антитела C320-170.

SEQ ID NO: 184: аминокислотная последовательность $V_H$ антитела C320-171.

SEQ ID NO: 185: аминокислотная последовательность $V_H$ антитела C320-172.

SEQ ID NO: 186: аминокислотная последовательность $V_H$ антитела C320-179.

SEQ ID NO: 187: аминокислотная последовательность $V_H$ антитела C320-183.

SEQ ID NO: 188: аминокислотная последовательность $V_L$ антитела C320-162.

SEQ ID NO: 189: аминокислотная последовательность $V_L$ антитела C320-163.

SEQ ID NO: 190: аминокислотная последовательность $V_L$ антитела C320-164.

SEQ ID NO: 191: аминокислотная последовательность $V_L$ антитела C320-165.

SEQ ID NO: 192: аминокислотная последовательность $V_L$ антитела C320-166.

SEQ ID NO: 193: аминокислотная последовательность $V_L$ антитела C320-167.

SEQ ID NO: 194: аминокислотная последовательность $V_L$ антитела C320-168.

SEQ ID NO: 195: аминокислотная последовательность $V_L$ антитела C320-169.

SEQ ID NO: 196: аминокислотная последовательность $V_L$ антитела C320-170.

SEQ ID NO: 197: аминокислотная последовательность $V_L$ антитела C320-171.

SEQ ID NO: 198: аминокислотная последовательность $V_L$ антитела C320-172.

SEQ ID NO: 199: аминокислотная последовательность $V_L$ антитела C320-179.

SEQ ID NO: 200: аминокислотная последовательность $V_L$ антитела C320-183.

SEQ ID NO: 201: аминокислотная последовательность $V_L$ зародышевой последовательности IGLV1-40*1.

SEQ ID NO: 202: аминокислотная последовательность растворимого человеческого TL1a.

SEQ ID NO: 203: аминокислотная последовательность N-связанного участка гликозилирования в $V_H$ C320.

SEQ ID NO: 204: аминокислотная последовательность от $V_H$ 1TZG соответствующая N-связанному участку гликозилирования $V_H$ C320.

SEQ ID NO: 205: аминокислотная последовательность пептида от $V_H$ из C320-168.

SEQ ID NO: 206: аминокислотная последовательность пептида от $V_L$ из C320-168.

SEQ ID NO: 207: аминокислотная последовательность пептида гриппа.

SEQ ID NO: 208: аминокислотная последовательность мутантного пептида от $V_L$ из C320-168.

SEQ ID NO: 209: аминокислотная последовательность мутантного пептида от $V_L$ из C320-168.

SEQ ID NO: 210: аминокислотная последовательность мутантного пептида от $V_L$ из C320-168.

SEQ ID NO: 211: аминокислотная последовательность мутантного пептида от $V_L$ из C320-168.

SEQ ID NO: 212: аминокислотная последовательность мутантного пептида от $V_L$ из C320-168.

SEQ ID NO: 213: аминокислотная последовательность мутантного пептида от $V_L$ из C320-168.

SEQ ID NO: 214: аминокислотная последовательность мутантного пептида от $V_L$ из C320-168.
SEQ ID NO: 215: аминокислотная последовательность мутантного пептида от $V_L$ из C320-168.
SEQ ID NO: 216: аминокислотная последовательность мутантного пептида от $V_L$ из C320-168.
SEQ ID NO: 217: аминокислотная последовательность мутантного пептида от $V_L$ из C320-168.
SEQ ID NO: 218: аминокислотная последовательность мутантного пептида от $V_L$ из C320-168.
SEQ ID NO: 219: аминокислотная последовательность мутантного пептида от $V_L$ из C320-168.
SEQ ID NO: 220: аминокислотная последовательность мутантного пептида от $V_L$ из C320-168.
SEQ ID NO: 221: аминокислотная последовательность мутантного пептида от $V_L$ из C320-168.
SEQ ID NO: 222: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ антитела C320-162.
SEQ ID NO: 223: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ антитела C320-163.
SEQ ID NO: 224: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ антител C320-164, C320-165, C320-166 и C320-167.
SEQ ID NO: 225: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ антител C320-168 и C320-169.
SEQ ID NO: 226: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ антител C320-170 и C320-172.
SEQ ID NO: 227: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_H$ антител C320-179 и C320-183.
SEQ ID NO: 228: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ антител C320-162, C320-163, C320-167 и C320-169.
SEQ ID NO: 229: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ антитела C320-164.
SEQ ID NO: 230: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ антител C320-165, C320-168 и C320-170.
SEQ ID NO: 231: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ антитела C320-166.
SEQ ID NO: 232: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ антител C320-172 и C320-179.
SEQ ID NO: 233: нуклеотидная последовательность, кодирующая $V_L$ антитела C320-183.
SEQ ID NO: 234: аминокислотная последовательность C320-13 и C320-22.
SEQ ID NO: 235: аминокислотная последовательность консенсуса HCDR3 из C320 и производных.

**Избранные определения**

Для целей номенклатуры и отсутствия ограничений аминокислотная последовательность человеческого TL1a описана в SEQ ID NO: 123. Дополнительные последовательности человеческого TL1a описаны в добавлении в Genbank No. 9966. Соответственно, в одном примере реализации данного изобретения, аминокислотная последовательность человеческого TL1a содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO: 123. Другие изоформы TL1a были описаны:

72-251 (позиции от 72 до 251 в последовательности SEQ ID NO: 123);
84-251 (позиции от 84 до 251 в последовательности SEQ ID NO: 123);
101-251 или VEGI-174 (позиции от 101 до 251 в последовательности SEQ ID NO: 123) и
86-251 или VEGI-192 (позиции от 86 до 251 в SEQ ID NO: 123).

Последовательности внеклеточного домена TL1a из разных источников описаны в SEQ ID NO: 1 (аминокислоты от 16 до 184; человек), SEQ ID NO: 124 (мышь), SEQ ID NO: 125 (макака яванская/резус), SEQ ID NO: 126 (крыса), SEQ ID NO: 127 (кролик) и SEQ ID NO: 128 (морская свинка). TL1a у субъекта обычно образует гомотример, и передача сигналов проходит через DR3. Типичные TL1a-связывающие белки по данному изобретению связываются или специфически связываются с человеческим TL1a (обозначаемым здесь как человеческий TL1a), включая его рекомбинантные формы.

Для целей номенклатуры и отсутствия ограничений последовательность человеческого DR3 описана в SEQ ID NO: 129. Дополнительные последовательности человеческого DR3 описаны в добавлении в Genbank No. 8718. В одном примере реализации данного изобретения DR3, описанная в данном изобретении, является человеческим DR3, содержащим последовательность, описанную в SEQ ID NO: 129.

Для целей номенклатуры и отсутствия ограничений последовательность человеческого DcR3 описана в SEQ ID NO: 130, Дополнительные последовательности человеческого DcR3 описаны в добавлении в Genbank No. 8771. В одном примере реализации данного изобретения DcR3, описанный в данном изобретении, является человеческим DcR3, содержащим последовательность, описанную в SEQ ID NO: 130,.

Термин "изолированный (выделенный) белок" или "изолированный (выделенный) полипептид" подразумевает белок или полипептид, который в силу своего происхождения не ассоциируется с природными компонентами, сопровождающими его в его естественном состоянии; он практически свободен от других белков из того же источника. Белок может быть практически освобожден от природных компонентов или практически очищен при выделении с помощью известных в этой области технологий очистки белков. Термин "практически очищен" означает, что белок практически свободен от загрязняющих примесей, например, по меньшей мере приблизительно на 70, или 75, или 80, или 85, или 90, или 95, или 96, или 97, или 98, или 99% свободен от загрязняющих примесей.

Термин "рекомбинантный" означает продукт искусственной генетической рекомбинации. Соответственно, в контексте рекомбинантного белка, включающего антигенсвязывающий домен, этот термин не включает антитела, естественно присутствующие в теле субъекта, являющиеся продуктом природной рекомбинации, происходящей при созревании В-летки. Однако, если такое антитело выделено, оно считается выделенным белком, включающим антигенсвязывающий домен. Подобным образом, если нук-

леиновая кислота, кодирующая белок, является выделенной и экспрессированной рекомбинантными средствами, получившийся белок является рекомбинантным белком, включающим антигенсвязывающий домен антитела. Рекомбинантный белок также включает белок, экспрессированный искусственными рекомбинантными средствами внутри клетки, ткани или субъекта, например, в котором он экспрессируется.

Термин "TL1a-связывающий белок" включает одиночную полипептидную цепь (т.е. серию последовательных аминокислот, связанных пептидными связями) или серию полипептидных цепей, ковалентно или нековалентно связанных друг с другом (т.е. полипептидный комплекс), способных связываться с TL1a, описанным в данном документе образом. Например, серия полипептидных цепей может быть ковалентно связана с помощью подходящей химической или дисульфидной связи. Примеры нековалентных связей включают водородные связи, ионные связи, силы Ван дер Ваальса и гидрофобные взаимодействия.

Термин "полипептид" или "полипептидная цепь", как следует из предыдущего параграфа, означает серию последовательных аминокислот, связанных пептидными связями.

При употреблении в этом документе термин "антигенсвязывающий домен" означает область антитела, способную к специфическому связыванию с антигеном, т.е. $V_H$ или $V_L$, или Fv, включающим оба $V_H$ и $V_L$. Антигенсвязывающий домен необязательно подразумевается в контексте всего антитела, например он может быть выделенным (например, домен антитела) или в другой форме, например, как при употреблении в этом тексте, например в виде scFv.

Для целей данного изобретения термин "антитело" включает белок, способный к специфическому связыванию с одним или несколькими родственными антигенами (например, TL1a) с помощью антигенсвязывающего домена, содержащегося в Fv. Этот термин включает четырехцепочечные антитела (например, две легкие цепи и две тяжелые цепи), рекомбинантные или модифицированные антитела (например, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, CDR-связанные антитела, приматизированные антитела, деиммунизированные антитела, сингуманизированные антитела, полу-антитела, биспецифичные антитела). Антитело обычно включает постоянные (константные) домены, которые могут быть организованы в константные участки или константный фрагмент или кристаллизуемый фрагмент (Fc). Типичные формы антитела включают четырехцепочечные структуры в качестве основных элементов. Полноразмерные антитела включают две ковалентно связанные тяжелые цепи (~50-70 кДа) и две легкие цепи (~23 кДа каждая). Легкая цепь обычно содержит вариабельный участок (если есть) и константный участок и у млекопитающих является κ (каппа) легкой цепью или λ (лямбда) легкой цепью. Тяжелая цепь обычно содержит вариабельный участок и один или два константных участка, связанных шарнирным участком с дополнительными константными доменами. Тяжелые цепи млекопитающих являются одним из следующих типов α, δ, ε, γ, или μ. Каждая легкая цепь также ковалентно связана с одной тяжелой цепью. Например, две тяжелые цепи и тяжелая или легкая цепи скрепляются межцепочечными дисульфидными связями и нековалентными взаимодействиями. Количество межцепочечных дисульфидных связей может меняться у антител различных типов. У каждой цепи есть N-терминальный вариабельный участок ($V_H$ или $V_L$ каждый длиной приблизительно 110 аминокислот) и один или несколько константных доменов на С-концах. Константный участок легкой цепи ($C_L$ длиной приблизительно 110 аминокислот) выровнен и связан дисульфидной связью с первым константным участком тяжелой цепи ($C_H1$ длиной от 330 до 440 аминокислот). Легкоцепочечный V-участок выровнен вариабельным участком тяжелой цепи. Тяжелая цепь антитела может включать два или более дополнительных $C_H$ домена (таких как $C_H2$, $C_H3$ и подобные) и может содержать шарнирную область между константными доменами $C_H1$ и $C_H2$. Антитела могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса. В одном примере реализации данного изобретения антитело является мышиным (или крысиным) антителом, или антителом примата (например, человека). В одном примере тяжелая цепь антитела не $V_L$ содержит С-терминалыного лизинового остатка. В одном примере реализации данного изобретения антитело является гуманизированным, сингуманизированным, химерным, CDR-привитым или деиммунизированным.

При употреблении в этом документе термин "вариабельный участок (регион, домен)" относится к части легкой и/или тяжелой цепи антитела, согласно определению в этом документе, способной к специфическому связыванию с антигеном и включающей аминокислотную последовательность гипервариабельных участков (CDR); т.е. CDR1, CDR2 и CDR3, и каркасных участков (FR). Например, вариабельный участок включает три или четыре FR (например, FR1, FR2, FR3 и возможно FR4) вместе с тремя CDR. $V_H$ означает вариабельный участок тяжелой цепи, $V_L$ означает вариабельный участок легкой цепи.

При употреблении в этом документе термин "гипервариабельные участки" (синоним CDR; т.е. CDRI, CDR2, и CDR3) означает аминокислотные остатки вариабельного участка антитела, наличие которых главным образом отвечает за специфическое связывание антигена. Каждый вариабельный участок ($V_H$ или $V_L$) обычно имеет три CDR участка, обозначаемых CDR1, CDR2 и CDR3. В одном примере реализации данного изобретения аминокислотные позиции, назначенные для CDR и FR, определяются в соответствии с системой Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health,

Bethesda, Md., 1987 и 1991 (также называемой "системой нумерации Кабата"). В другом примере аминокислотные позиции, назначенные для CDR и FR, определяются в соответствии с улучшенной системой нумерации Клотия (http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html). По системе нумерации Кабата $V_H$ FR и CDR позиционируются согласно нижеприведенному описанию: остатки 1-30 (FR1), 31-35 (CDR1), 36-49 (FR2), 50-65 (CDR2), 66-94 (FR3), 95-102 (CDR3) и 103-113 (FR4). По системе нумерации Кабата, $V_L$ FRs и CDR позиционируются согласно нижеприведенному описанию: остатки 1-23 (FR1), 24-34 (CDR1), 35-49 (FR2), 50-56 (CDR2), 57-88 (FR3), 89-97 (CDR3) и 98-107 (FR4).

Данное изобретение не ограничено FR и CDR, определенными по системе Кабата, но включает все системы нумерации, включая каноническую систему нумерации или систему Клотия и Леска J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987; Chothia et al., Nature 342: 877-883, 1989; и/или Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273: 927-948, 1997; систему нумерации Honnegher и Plükthun J. Mol. Biol. 309: 657-670, 2001; или систему IMGT, описанную Giudicelli et al., Nucleic acids Res. 25: 206-211 1997. В одном примере реализации данного изобретения CDR определяется согласно номенклатуре Кабата. Тяжелая цепь CDR2 по системе нумерации Кабата может не включать пять С-терминальных аминокислот, перечисленных в этом документе, или любая одна или несколько этих аминокислоты могут быть замещены другой аминокислотой природного происхождения. Кроме того, или альтернативным образом, легкая цепь CDR1 не включает четыре N-терминальных аминокислот, перечисленных в этом документе, или любая одна или несколько этих аминокислот могут быть замещены другой аминокислотой природного происхождения. В этом отношении Padl et al., FASEB J., 9: 133-139, 1995 установили, что пять С-терминальных аминокислот тяжелой цепи CDR2 и/или четыре N-терминальных аминокислоты легкой цепи CDR1 в целом не вовлечены в связывание антигенов.

"Каркасные участки" (FR) являются остатками вариабельных участков, отличными от CDR остатков.

При употреблении в этом документе термин "Fv" должен восприниматься как означающий любой белок, состоящий как из нескольких полипептидов, так и из одного полипептида, в котором $V_L$ и $V_H$ ассоциируются и образуют комплекс, обладающий антигенсвязывающим участком, т.е. способный специфично связываться с антигеном. $V_H$ и $V_L$, образующие антигенсвязывающий домен, могут быть в одной полипептидной цепи или в разных полипептидных цепях. Кроме того, Fv по данному изобретению (так же, как каждый белок по данному изобретению) может иметь несколько антигенсвязывающих доменов, которые могут связывать один и тот же или разные антигены. Этот термин должен пониматься как включающий фрагменты, напрямую происходящие от антитела, а также белки, соответствующие такому фрагменту, полученные рекомбинантными способами. В некоторых примерах $V_H$ не связан с константным участком тяжелой цепи $(C_H)1$ и/или $V_L$ не связан с константным участком легкой цепи $(C_L)$. Типичные Fv содержащие полипептиды или белки, включают Fab фрагмент, Fab' фрагмент, F(ab') фрагмент, scFv, диатело, триатело, тетратело или комплексы более высокого порядка, или любой из вышеупомянутых, связанный с константным участком или его домен, например $C_H2$ или $C_H3$ домен, например минитело. "Fab фрагмент" состоит из моновалентного антигенсвязывающего фрагмента антитела и может быть получен ферментацией целого антитела ферментом папаином с получением фрагмента, состоящего из неизменной легкой цепи и части тяжелой цепи, или может быть получен рекомбинантными способами. "Fab' фрагмент" антитела может быть получен с помощью обработки целого антитела пепсином с последующим восстановлением, с получением молекулы, состоящей из неизменной легкой цепи и части тяжелой цепи, включающий $V_H$ и один константный участок. Из одного антитела, обработанного таким образом, получается два Fab' фрагмента. Fab' фрагмент может также быть получен рекомбинантными средствами. "$F(ab')_2$ фрагмент" антитела состоит из димера двух Fab' фрагментов, связанных двумя дисульфидными связями, и его получают, обрабатывая целое антитело пепсином, без последующего восстановления. "$Fab_2$" фрагмент является рекомбинантным фрагментом, включающим два Fab фрагмента, связанных с помощью, например, лейцина или $C_H3$ домена. "Одноцепочечный Fv" или "scFv" является рекомбинантной молекулой, содержащей фрагмент вариабельного участка (Fv) антитела, в котором вариабельный участок легкой цепи и вариабельный участок тяжелой цепи ковалентно связаны подходящим гибким полипептидным линкером.

При употреблении в этом документе термин "связывать" в отношении взаимодействия TL1a-связывающего белка или его антигенсвязывающего домена с антигеном означает, что взаимодействие зависит от присутствия определенной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) на антигене. Например, антитело распознает и связывается скорее со специфичной белковой структурой, нежели с белками в целом. Если антитело связывается с эпитопом "А", присутствие молекулы, содержащей эпитоп "А" (или свободного, немеченного "А"), в реакции, содержащей меченый "А" и антитело, будет уменьшать количество меченого "А", связавшегося с антителом.

При употреблении в этом документе термин "специфически связывается" или "специфически связывает" означает, что белок по данному изобретению реагирует или ассоциируется чаще, быстрее, более продолжительно и/или с большей аффинностью с определенным антигеном или клеткой, его экспрессирующей, чем с другими антигенами или клетками. Например, белок, который специфично связывается с антигеном, связывает этот антиген с большей аффинностью, авидностью, готовностью и/или с большей

продолжительностью по сравнению со связыванием других антигенов. Например, белок связывается с TL1a (например, человеческим TL1a) с более высокой аффинностью, чем с другими лигандами суперсемейства TNF или с антигенами, обычно распознаваемыми полиреактивными природными антителами (т.е. антитела природного происхождения, обычно связывающими различные антигены, естественным образом присутствующие у человека). Также это определение подразумевает, что, например, белок, который специфично связывается с первым антигеном, может или не может специфично связываться со вторым антигеном. Как таковое, "специфичное связывание" необязательно требует эксклюзивного связывания или не поддающегося обнаружению связывания другого антигена, это называется термином "селективное связывание". В одном примере реализации данного изобретения "специфическое связывание" TL1a-связывающего белка по данному изобретению с антигеном означает, что этот белок связывается с антигеном с константой равновесия ($K_D$) равной 100 нмоль/л или менее, например 50 нмоль/л или менее, например 20 нмоль/л или менее, например, 15 нмоль/л или менее, или 10 нмоль/л или менее, или 5 нмоль/л или менее.

При употреблении в этом документе термин "не связывается в достаточной для обнаружения степени" означает, что TL1a-связывающий белок, например антитело, связывается с антигеном на уровне менее чем 20, или 10 или 6 или 5% над уровнем фона. Фоном может служить уровень сигнала связывания, обнаруживаемый в отсутствие TL1a-связывающего белка и/или в присутствии белка негативного контроля (например, изотипного контрольного антитела), и/или уровень связывания, обнаруживаемый в присутствии антигена негативного контроля. Уровень связывания определяют, например, с помощью анализа ELISA, при котором антиген иммобилизируют и подвергают контакту с TL1a-связывающим белком.

При употреблении в этом документе термин "эпитоп" (синоним "антигенная детерминанта") следует понимать как участок TL1a, с которым связывается белок, включающий антигенсвязывающий домен антитела. Этот термин необязательно ограничивается специфичными остатками или структурами, с которыми белок вступает в контакт. Например, этот термин включает участок перекрывания аминокислот, контактирующих с белком и/или по меньшей мере 5-10 или 2-5 или 1-3 аминокислоты вне этого участка. В некоторых примерах эпитоп представляет собой линейный ряд аминокислот. Эпитоп может также включать ряд прерывистых аминокислот, расположенных близко друг к другу, когда TL1a свернут, т.е. "конформационный эпитоп". Специалист в данной области также заметит, что термин "эпитоп" не ограничивается пептидами или полипептидами. Например, термин "эпитоп" включает химически активные поверхностные группировки молекул, таких как боковые цепи сахаров, фосфорильные боковые цепи или сульфонильные боковые цепи, и в некоторых примерах может обладать трехмерными структурными характеристиками и/или специфичными характеристиками заряда. Эпитоп, или пептид, или полипептид, включающий его, может быть введен животному для генерирования антител против эпитопа.

При употреблении в этом документе термин "ингибирует взаимодействие TL1a, и DR3" означает, что в анализе связывания TL1a и DR3 белок способен к ингибированию 50% связывания (т.е. имеет $EC_{50}$) менее чем приблизительно 13 нмоль/л, например менее чем приблизительно 10 нмоль/л, например менее чем приблизительно 7 нмоль/л, например менее чем приблизительно 5 нмоль/л, например менее чем приблизительно 3 нмоль/л.

При употреблении в этом документе термин "не ингибирует взаимодействие TL1a и DcR3" означает, что TL1a-связывающий белок по данному изобретению не ингибирует взаимодействие TL1a и DcR3 (т.е. таким образом, чтобы взаимодействие стало невозможно обнаружить, например, с помощью анализа ELISA по данному изобретению). Например, с концентрацией 100 мкг/мл белок не ингибирует полностью взаимодействие TL1a и DcR3. В некоторых примерах белок понижает взаимодействие TL1a и DcR3 менее чем приблизительно на 20, или 15,, или 10%, например, при проверке с концентрацией 10 или 100 мкг/мл.

При употреблении в этом документе термин "не понижает в достаточной для обнаружения степени" означает, что белок по данному изобретению понижает связывание TL1a (или его биотинилированной формы) с DcR3 не более чем на 20, или 8, или 6, или 5, или 4, или 3, или 2% свыше уровня взаимодействия в отсутствие белка или свыше уровня фонового взаимодействия, при проверке с концентрацией 10 или 100 мкг/мл. Фон может быть уровнем сигнала связывания, определяемый в отсутствие белка и/или в присутствии белка негативного контроля (например, антитела негативного контроля).

При употреблении в этом документе термин "нейтрализовать" означает, что TL1a-связывающий белок способен уменьшать или предотвращать TL1a-связанную активность в клетке. Способы определения нейтрализации известны специалистам в этой области и/или описаны в этом тексте. Например, TF-1 клеток входит в контакт с TL1a, таким как человеческий TL1a (например, экспрессируемый клеткой млекопитающего) и циклогексимидом в присутствии или в отсутствие TL1a-связывающего белка. TL1a-связывающий белок, уменьшающий уровень апоптоза клеток по сравнению с уровнем в отсутствие белка, считается "нейтрализующим" активность TL1a.

При употреблении в этом документе термин "состояние" относится к нарушению или препятствию нормальному функционированию, не ограничивается каким-либо специфическим состоянием и включает заболевания и расстройства.

При употреблении в этом документе термин "TL1a-связанное состояние" относится к любому состоянию, вызываемому или ассоциируемому с TL1a или клеткой, экспрессирующей TL1a. Специалист в данной области легко определит такие состояния на основе описаний из этого документа и/или выполнив анализ для диагностики TL1a-связанного состояния по данному изобретению. В этом отношении в некоторых примерах по данному изобретению это состояние является воспалительным состоянием, аутоиммунным состоянием, и состоянием, которое может быть излечено повышением ангиогенеза. Описания типичных состояний приведены в этом документе.

При употреблении в этом документе термины "предотвращение", "предотвращать" или "предотвращающий" включают введение белка по данному изобретению для остановки или затруднения развития по меньшей мере одного симптома состояния. Этот термин также включает лечение субъекта в состоянии ремиссии для предотвращения или затруднения рецидива. Например, субъект, страдающий ремиссионно-рецидивирующим рассеянным склерозом, получает лечение в стадии ремиссии для предотвращения наступления стадии рецидива.

При употреблении в этом документе термины "лечить" или "лечение" включают введение белка по данному изобретению для уменьшения или устранения по меньшей мере одного симптома специфического состояния или болезни.

При употреблении в этом документе термин "субъект" означает любое животное, например млекопитающее. В одном примере реализации данного изобретения млекопитающее является человеческим или не человеческим приматом. В одном примере реализации данного изобретения млекопитающим является человек.

При употреблении в этом документе термин "образец" означает любой образец, происходящий от субъекта, такой как, без ограничений, телесная жидкость (например, кровь или фракция крови, такая как сыворотка или плазма, слезы, моча, синовиальная жидкость или цереброспинальная жидкость), клеточный материал (например, тканевый аспират), образцы биопсии ткани или хирургические образцы. В некоторых примерах "образец" представляет собой любое или несколько из следующих: сыворотка, плазма, мононуклеары периферической крови (PBMC) или фракция лейкоцитарной пленки.

При употреблении в этом документе термин "диагноз" и его варианты, такие как, без ограничения, "диагнозировать", "диагнозированный" или "диагностика", включают любой первичный диагноз клинического состояния или диагноз рецидивирующего заболевания.

Термины "прогноз", "прогнозировать" и их варианты при употреблении в этом документе относятся к вероятному исходу или течению заболевания, включая возможность выздоровления или рецидива, или результату лечения.

Термин "экспрессионная конструкция" должен пониматься в широком смысле и включает нуклеиновую кислоту, включающую одну или несколько промоторных последовательностей, функционально связанных с одной или несколькими нуклеиновыми кислотами, согласно описанию, приведенному в этом документе.

Термин "вектор экспрессии" относится к нуклеиновой кислоте, включающей экспрессионную конструкцию, которая дополнительно способна поддерживать и/или воспроизводить нуклеиновую кислоту в экспрессируемом формате. Например, вектор экспрессии может включать плазмид, бактериофаг, фагмид, космиду, вирусный субгеномный или геномный фрагмент. Выбор подходящих векторов находится в компетенции специалистов в данной области.

При употреблении в этом документе термин "промотор" должен пониматься в широком смысле и включает транскрипционные регуляторные последовательности геномного гена, включая TATA-бокс или элемент инициатора, которые необходимы для правильной инициации транскрипции, с дополнительными регуляторными элементами или без них (например, восходящие активирующие последовательности, области связывания транскрипционных факторов, энхансеры и сайленсеры), которые изменяют экспрессию нуклеиновой кислоты, например, в ответ на эволюционный и/или внешний стимул, или образом, специфичным для ткани. В данном контексте термин "промотор" также используется для описания рекомбинантной, синтетической или слитой нуклеиновой кислоты или производного, которая способствует, активирует или усиливает экспрессию нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Типичный промотор может содержать дополнительные копии одного или нескольких специфических регуляторных элементов для дальнейшего усиления экспрессии, и/или изменения пространственной экспрессии, и/или временной экспрессии упомянутой нуклеиновой кислоты.

При употреблении в этом документе термин "функционально связанный с" означает такое расположение промотора относительно нуклеиновой кислоты, при котором экспрессия нуклеиновой кислоты контролируется промотором. Промотор может быть функционально связанный с несколькими нуклеиновыми кислотами, например, посредством внутренней области вхождения рибосомы.

Белки, включающие антигенсвязывающие домены антитела.

Антитела.

Способы, основанные на иммунизации.

Для генерации антител фрагмент, несущий TL1a, или эпитоп, или его часть, или его модифицированную форму (например, слитый белок, включающий человеческий эпитоп внутри мышиного TL1a

белка), или нуклеиновую кислоту, его кодирующую, необязательно смешанную с любым подходящим разбавителем и/или фармацевтически приемлемым носителем, вводят субъекту (например, животному, не являющемуся человеком, такому как мышь, крыса, цыпленок и т.д.) в форме инъецируемой композиции. Примерами не человеческих животных являются млекопитающие, такие как грызуны (например, крысы или мыши). Инъекция может быть интраназальной, внутримышечной, подкожной, внутривенной, внутрикожной, внутрибрюшинной или другой. Необязательным образом, TL1a, или эпитоп, несущий его фрагмент или часть, или нуклеиновая кислота, его кодирующая, вводится несколько раз. Средства для приготовления и анализа антител являются известными в этой области (см., например, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

Производство поликлональных антител можно отслеживать с помощью анализов крови иммунизированного животного после иммунизации. Для достижения необходимой концентрации антител может быть проведена вторая, усиливающая инъекция. Процесс усиления и определения концентрации повторяют до достижения подходящей концентрации. При достижении необходимого уровня иммуногенности, животное обескровливают, выделяют сыворотку и хранят ее и/или используют животное для генерирования моноклональных антител (mAbs).

Моноклональные антитела являются типичными антителами, рассматриваемыми в этом документе. В целом, производство моноклональных антител включает иммунизацию субъекта (например, грызуна, например, мышь или крысу) с помощью фрагмента, несущего TL1a или эпитоп, или его части, или кодирующей его нуклеиновой кислоты, в условиях, стимулирующих антитело к производству клеток. В некоторых примерах мышь, генетически модифицированная для экспрессии белков человеческого иммуноглобулина вместо белков мышиного иммуноглобулина, иммунизируют для производства антитела (например, как описано в PCT/US2007/008231 и/или Lonberg et al., Nature 368: 856-859, 1994). После иммунизации соматические клетки, производящие антитело (например, В-лимфоциты), сливают с бессмертными клетками, например бессмертными клетками миеломы. Различные способы производства таких слитых клеток (гибридом) являются известными в этой области и описаны, например, в Kohler and Milstein, Nature 256: 495-497, 1975. Гибридомные клетки можно далее культивировать в условиях, достаточных для производства антител.

Данное изобретение включает также другие способы производства антител, например технологию ABL-MYC (как описано, например, в Largaespada et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol, 166: 91-96, 1990).

Подходящие антитела далее выбирают на основе способов, описанных в этом тексте.

Способы, основанные на использовании библиотек.

Данное изобретение также включает скрининг библиотек антител или белков, включающих их антигенсвязывающие домены (например, включающие их вариабельные участки), для идентификации TL1a-связывающих белков по данному изобретению.

Примеры библиотек, рассматриваемых в этом документе, включают первичные библиотеки (от неизмененных субъектов), иммунизированные библиотеки (от субъектов, иммунизированных антигеном) и синтетические библиотеки. Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или их участки (например, вариабельные участки), клонируют стандартными способами (например, как описано в Sambrook and Russell, eds, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed, vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) и используют для кодирования и дисплея белков с помощью способов, известных в этой области. Другие методики для производства библиотек белков описаны, например, в US 6300064 (например, HuCAL library of Morphosys AG); US 5885793; US 6204023; US 6291158 или US 6248516.

TL1a-связывающие белки согласно данному изобретению могут быть белками, выделяемыми в жидком виде, или могут присутствовать как слитые белки на поверхности клетки или частицы (например, фага или другого вируса, рибосомы или споры). В данной области известно много форматов дисплейных библиотек. Например, библиотека может являться in vitro дисплейной библиотекой (например, рибосомной дисплейной библиотекой, ковалентной дисплейной библиотекой или mRNA дисплейной библиотекой, например, как описано в US 7270969). В другом примере, дисплейная библиотека является фаговой дисплейной библиотекой, в которой белки, включающие антигенсвязывающие домены антител, экспрессируются на фагах, например, как описано в US 6300064; US 5885793; US 6204023; US 6291158 или US 6248516. Другие способы фагового дисплея также известны в этой области и рассматриваются в этом документе. Также в этом документе рассматриваются способы клеточного дисплея, например бактериальные дисплейные библиотеки, например, как описано в US 5516637; дрожжевые дисплейные библиотеки, например, как описано в US 6423538, или дисплейные библиотеки млекопитающих.

Способы скрининга дисплейных библиотек являются известным в этой области. В одном примере реализации данного изобретения дисплейная библиотека по данному изобретению подвергается скринингу с помощью аффинной очистки, например, как описано в Scopes (In: Protein purification: principles and practice, Third Edition, Springer Verlag, 1994). Способы аффинной очистки обычно включают контакт белков, включающих антигенсвязывающие домены, содержащихся в библиотеке, с целевым антигеном (например, TL1a) и после смыва извлечение тех доменов, которые остались связаны с антигеном.

Любые вариабельные участки или scFv, идентифицированные в результате скрининга, легко преобразуются в целое антитело, при необходимости. Примеры способов модификации или реформации ва-

риабельных участков или scFv в целые антитела описаны, например, в Jones et al., J. Immunol. Methods, 354: 85-90, 2010; или Jostock et al., J. Immunol. Methods, 289: 65-80, 2004. Альтернативным образом или дополнительно, используются стандартные способы клонирования, например, как описано в Ausubel et al., (In: Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987) и/или (Sambrook et al., (In: Molecular Cloning: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Third Edition 2001).

Деиммунизированные, химерные, CDR-связанные, гуманизированные, сингуманизированные, приматизированные, человеческие и композитные TL1a-связывающие белки.

TL1a-связывающие белки по данному изобретению могут быть CDR-связанными белками, включающими CDR из антитела не человеческого вида (например, мыши, крысы или нечеловеческие примата), пришитым или внедренным в FR человеческого антитела, или включающими CDR из антитела одного типа (например, одного типа человеческого антитела), пришитым или внедренным в FR антитела другого типа (например, другого типа человеческого антитела). Этот термин также включает композитный белок, включающий, например, один или несколько CDR-связанных вариабельных участков и один или несколько, например, человеческих вариабельных участков, химерных вариабельных участков, сингуманизированных вариабельных участков или приматизированных вариабельных участков. Такие белки иллюстрируются в этом документе примерами антител, обозначенных C320-16 - C320-33.

TL1a-связывающие белки по данному изобретению могут быть гуманизированными белками.

Термин "гуманизированный белок" означает белок, включающий человекоподобный вариабельный участок, который включает CDR из антитела от нечеловеческого вида (например, мыши или крысы, или не человеческого примата), пришитый или внедренный в FR из человеческого антитела (антитела этого типа также обозначаются "CDR-связанное антитело"). Гуманизированные белки также включают белки, в которых один или несколько остатков человеческого белка модифицированы одной или несколькими заменами аминокислот и/или один или несколько FR остатков человеческого белка заменены соответствующими не человеческими остатками. Гуманизированные белки могут также включать остатки, которые не содержатся ни в человеческих антителах, на в нечеловеческих антителах. Любые другие участки белка (например, Fc участок) в целом являются человеческими. Гуманизация может быть проведена способом, известным в данной области, например, как описано в US 5225539, US 6054297, US 7566771 или US 5585089. Термин "гуманизированный белок" также включает супергуманизированный белок, например, как описано в U S7732578. Этот термин также включает композитный белок, включающий, например, один или несколько гуманизированных вариабельных участков и один или несколько, например, человеческих вариабельных участков, химерных вариабельных участков, сингуманизированных вариабельных участков или приматизированных вариабельных участков.

В одном примере реализации данного изобретения гуманизированный TL1a-связывающий белок включает участки между 27d и 34, 50 и 55 и 89 и 96 легкоцепочечной последовательности, описанной в этом документе; и 31 и 35b, 50 и 58 и 95 и 101 тяжелоцепочечной последовательности, описанной в этом документе (нумерация в соответствии с системой нумерации Кабата). В этом отношении Padl et al., FASEB J., 9: 133-139, 1995 представили свидетельства того, что эти участки являются теми, которые наиболее вероятно связываются или контактируют с антигеном.

TL1a-связывающими белками по данному изобретению могут быть человеческие белки. Термин "человеческий белок" при употреблении в этом документе относится к белкам, включающим вариабельный и, необязательно, константный участок антитела, обнаруживаемые у людей, например в человеческих эмбриональных или соматических клетках, или в библиотеках, произведенных с использованием таких участков. "Человеческие" антитела могут включать аминокислотные остатки, не кодирующиеся человеческими последовательностями, например мутации, внесенные случайными или направленными мутациями in vitro (в особенности мутации, включающие консервативные замещения или мутации в малом количестве остатков белка, например в 1, 2, 3, 4 или 5 остатках белка). Эти "человеческие антитела" необязательно должны быть созданы в результате иммунного ответа человека; они могут быть созданы с помощью рекомбинантных способов (например, скрининга фаговой дисплейной библиотеки) и/или трансгенным животным (например, мышью), включающим константные и/или вариабельные участки человеческого антитела, кодирующие нуклеиновую кислоту и/или с. помощью направленной селекции (например, как описано в US 5565332). Этот термин также включает созревшие формы такого антитела. Для целей данного изобретения человеческий белок также включает белок, включающий FR из человеческого антитела или FR, включающий последовательности из консенсусной последовательности человеческих FR и в котором один или несколько CDR являются случайными или полуслучайными, например, как описано в US 6300064 и/или US 6248516.

Типичные человеческие TL1a-связывающие белки являются антителами, включающими следующие пары вариабельных участков:

(i) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 2, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 6;

(ii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 10, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 14;

(iii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 18, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 22;

(iv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 26, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 30;

(v) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 34, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO:38;

(vi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(vii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 50, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 54;

(viii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(ix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(x) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 66, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 70, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 74, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 78, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 82;

(xv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 86, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 90, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 58, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 62;

(xviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 154, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 164;

(xix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 155, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 163;

(xx) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 156, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 165;

(xxi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 157, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 166;

(xxii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 158, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 167;

(xxiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 159, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 168;

(xxiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 160, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 169;

(xxv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 161, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 170;

(xxvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 234, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 169;

(xxvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 154, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 155, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 156, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxx) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 157, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 158, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 159, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxiii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 160 и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxiv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 161 и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 234, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46;

(xxxvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42 и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 164;

(xxxvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42 и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 165;

(xxxviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42 и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 166;

(xxxix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42 и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 167;

(xl) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 168;

(xli) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 169;

(xlii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 170;

(xliii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 171;

(xliv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 172;

(xlv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 175, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 188;

(xlvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 176, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 189;

(xlvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 177, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 190;

(xlviii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 178, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 191;

(xlix) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 179, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 192;

(l) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 180, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 193;

(li) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 181, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 194;

(lii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 182, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 195;

(liii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 183, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 196;

(liv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 184, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 197;

(lv) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 185, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 198;

(lvi) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 186, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 199; или

(lvii) $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 187, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 200.

Дополнительными типичными человеческими TL1a-связывающими белками являются антитела, включающие $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46, в котором $V_H$ и/или $V_L$ включает одно или несколько следующих замещений или групп замещений:

(i) $V_H$ содержит аланин в позиции 16 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(ii) $V_H$ содержит аланин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iii) $V_H$ содержит серин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iv) $V_H$ содержит гистидин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(v) $V_H$ содержит лейцин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(vi) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$

содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(vii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(viii) $V_H$ содержит пролин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(ix) $V_H$ содержит глютамин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(x) $V_H$ содержит лизин в позиции 100 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xi) $V_H$ содержит аланин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xii) $V_H$ содержит серин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xiii) $V_H$ содержит гистидин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xiv) $V_H$ содержит лейцин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xv) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xvi) $V_H$ содержит тирозин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xvii) $V_H$ содержит глютамин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xviii) $V_H$ содержит лизин в позиции 101 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xix) $V_H$ содержит аланин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xx) $V_H$ содержит серин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxi) $V_H$ содержит гистидин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxii) $V_H$ содержит лейцин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxiii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxiv) $V_H$ содержит пролин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxv) $V_H$ содержит глютамин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxvi) $V_H$ содержит лизин в позиции 102 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxvii) $V_H$ содержит аланин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxviii) $V_H$ содержит серин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxix) $V_H$ содержит гистидин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxx) $V_H$ содержит лейцин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxi) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxiii) $V_H$ содержит пролин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxiv) $V_H$ содержит глютамин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxv) $V_H$ содержит лизин в позиции 103 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxvi) $V_H$ содержит серин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxvii) $V_H$ содержит гистидин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит

треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxviii) $V_H$ содержит лейцин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xxxix) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xl) $V_H$ содержит тирозин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xli) $V_H$ содержит пролин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlii) $V_H$ содержит глютамин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xliii) $V_H$ содержит лизин в позиции 104 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xliv) $V_H$ содержит аланин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlv) $V_H$ содержит гистидин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlvi) $V_H$ содержит лейцин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlvii) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlviii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(xlix) $V_H$ содержит пролин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(l) $V_H$ содержит глютамин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(li) $V_H$ содержит лизин в позиции 105 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lii) $V_H$ содержит аланин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(liii) $V_H$ содержит серин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(liv) $V_H$ содержит гистидин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lv) $V_H$ содержит лейцин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lvi) $V_H$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lvii) $V_H$ содержит тирозин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lviii) $V_H$ содержит пролин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lix) $V_H$ содержит глютамин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO:46;

(lx) $V_H$ содержит лизин в позиции 107 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxi) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аланин в позиции 23 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 28 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxiii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит тирозин в позиции 33 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxiv) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аспарагиновую кислоту в позиции 34 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxv) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аспарагин в позиции 53 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxvi) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 54 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxvii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит аланин в позиции 82 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxviii) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит се-

рин в позиции 95 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxix) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 96 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxx) $V_H$ содержит треонин в позиции 41 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxi) $V_H$ содержит серин в позиции 47 в последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxiii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxiv) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxv) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxvi) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51 и глютаминовую кислоту в позиции 102 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxvii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxviii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxix) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxx) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74 и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глютаминовую кислоту в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46;

(lxxxi) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74, треонин в позиции 76, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глютаминовую кислоту в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46; и

(lxxxii) $V_H$ содержит пролин в позиции 41, лейцин в позиции 51, аланин в позиции 72, аспарагиновую кислоту в позиции 73, аргинин в позиции 74, треонин в позиции 76, глютаминовую кислоту в позиции 102 и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42 и $V_L$ содержит треонин в позиции 23, серин в позиции 24, треонин в позиции 76 и глицин в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46.

$V_H$ может быть связан с тяжелоцепочечным константным участком, например IgG1 тяжелоцепочечным константным участком. В одном примере реализации данного изобретения тяжелоцепочечный константный участок лишен С-терминального лизинового остатка.

$V_L$ может быть связан с легкоцепочечным константным участком.

TL1a-связывающие белки по данному изобретению могут быть сингуманизированными белками. Термин "сингуманизированный белок" означает белок, полученный согласно способу, описанному в WO 2007/019620, Сингуманизированный TL1a-связывающий белок включает вариабельный участок (V-домен) антитела, в котором вариабельный участок включает FR из вариабельного участка антитела примата New World и CDR из вариабельного участка антитела примата не-New World, например сингуманизированный TL1a-связывающий белок включает вариабельный участок (V-домен) антитела, в котором вариабельный участок включает FR из вариабельного участка антитела примата New World и CDR из антитела мыши или крысы. В одном примере реализации данного изобретения сингуманизированный TL1a-связывающий белок является TL1a-связывающим антителом, в котором один или оба вариабельных участка сингуманизированы. Этот термин также описывает композитный белок, включающий, например, один или несколько сингуманизированных вариабельных участков и один или несколько, на-

пример, человеческих вариабельных участков, или гуманизированных вариабельных участков, или химерных вариабельных участков.

TL1a-связывающие белки по данному изобретению могут быть приматизированными белками. "Приматизированный белок" включает вариабельный участок (участки) антитела, созданного после иммунизации нечеловеческого примата (например, яванской макаки). Как вариант вариабельные участки антитела нечеловеческого примата связаны с человеческими константными участками для получения приматизированного антитела. Примеры способов получения приматизированных антител описаны в US 6113898. Этот термин также включает композитный белок, включающий, например, один или несколько приматизированных вариабельных участков и один или несколько, например, человеческих вариабельных участков, или гуманазированных вариабельных участков, или химерных вариабельных участков.

В одном примере TL1a-связывающий белок по данному изобретению является химерным белком. Термин "химерные белки" относится к белкам, у которых антигенсвязывающий домен происходит от определенного вида (например, от грызунов, например, от мыши или от крысы) или принадлежит к определенному классу или подклассу антител, тогда как остаток белка происходит от другого вида (например, человеческого или не человеческого примата) или принадлежит к другому классу или подклассу антител. В одном примере реализации данного изобретения химерный белок является химерным антителом, включающим $V_H$ и/или $V_L$ не человеческого антитела (например, антитела грызуна), и остальные участки антитела происходят от человеческого антитела. Получение таких химерных белков известно в этой области и может быть осуществлено стандартными способами (например, такими как описаны в патентах США US6331415; US5807715; US4816567 и US4816397). Этот термин также включает композитный белок, включающий, например, один или несколько химерных вариабельных участков и один или несколько, например, человеческих вариабельных участков, или гуманизированных вариабельных участков, или химерных вариабельных участков.

Данное изобретение также описывает деимуннизированный TL1a-связывающий белок, например, такой, как описано в WO 2000/34317 и WO 2004/108158. У деиммунизированных антител и белков один или несколько эпитопов, например эпитопы B-клетки или эпитопы T-клетки, удалены (т.е. мутированы), чтобы, таким образом, уменьшить вероятность появления у субъекта иммунного ответа на антитело или белок. Например, TL1a-связывающий белок по данному изобретению анализируют для идентификации одного или нескольких эпитопов B- или T-клеток и один или несколько аминокислотных остатков в этих эпитопах подвергают мутации для понижения иммуногенности TL1a-связывающего белка. Авторы данного изобретения использовали такие приемы для идентификации эпитопов, которые могут связываться с MHC Class II молекулами, и идентификации TL1a связывающих белков, для которых менее характерно вызывать иммунный ответ у субъекта.

Для специалистов в этой области из вышесказанного очевидно, что "композитный" белок включает одну форму $V_H$ (например, человеческую) и другую форму $V_L$ (например, гуманизированную). Данное изобретение включает все комбинации форм $V_H$ и $V_L$.

Другие TL1a-связывающие белки, включающие антигенсвязывающий домен.

Данное изобретение также описывает другие TL1a-связывающие белки, включающие вариабельный участок или антигенсвязывающий домен антитела, такие как:

(i) монодоменное антитело, являющееся одной полипептидной цепью, включающей все или часть $V_H$ или $V_L$ антитела (см., например, US 6248516);

(ii) диатела, триатела и тетратела, например, как описано в US 5844094 и/или US 2008152586;

(iii) scFvs, например, как описано в US 5260203;

(iv) минитела, например, как описано в US 5837821;

(v) биспецифические белки "ключ и скважина" (key and hole), как описано в US 5731168;(vi) гетероконъюгированные белки, например, как описано в US 4676980;

(vii) гетероконъюгированные белки, полученные с помощью химического кросс-линкера, например, как описано в US 4676980;

(viii) Fab'-SH фрагменты, например, как описано в Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225, 1992; или

(ix) $Fab_3$ (например, как описано в EP 19930302894).

Слияния константных доменов.

Данное изобретение включает TL1a-связывающий белок, включающий антигенсвязывающий домен антитела и константный участок или Fc или его домен, например $C_H2$ и/или $C_H3$ домен. Подходящие константные участки и/или домены очевидны для специалиста в этой области и/или последовательности таких полипептидов легкодоступны в базах данных с публичным доступом. Кабат et al. также описывал некоторые подходящие константные участки/домены.

Константные участки и/или их домены пригодны для использования биологической активности, такой как димеризация, увеличенный период полураспада сыворотки (например, путем связывания с FcRn), антителозависимая клеточно-обусловленная цитотоксичность (ADCC), комплементзависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP).

Данное изобретение также описывает TL1a-связывающие белки, включающие мутантные константные участки или домены, например, как описано в US 7217797; US 7217798 или US 20090041770 (с повышенным временем полураспада) или US 2005037000 (с повышенным ADCC).

С-терминальный лизин тяжелоцепочечного константного участка антитела по данному изобретению или TL1a-связывающего белка по данному изобретению, включающий константный участок или Fc может быть удален, например, во время получения или очистки антитела или с помощью рекомбинантного инжениринга нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела или белка. Соответственно, целые антитела или белки могут включать популяции антител или белков, у которых удалены все С-терминальные лизиновые остатки, популяции антител или белков с С-терминальными лизиновыми остатками или популяции антител или белков, состоящие их смеси антител, имеющих и не имеющих С-терминальные лизиновые остатки. В некоторых примерах популяции антител или белков могут дополнительно включать такие антитела или белки, у которых С-терминальный лизиновый остаток удален на одном из тяжелоцепочечных константных участков. Подобным образом, композиция из антител или белков может включать такую же или подобную смесь популяций антител или белков с присутствующими или отсутствующими С-терминальными лизиновыми остатками.

Улучшение эффекторной функции.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению может стимулировать эффекторную функцию или улучшенную эффекторную функцию.

В контексте данного изобретения термин "эффекторная функция" относится к таким разновидностям биологической активности с участием клеток или белков, связывающихся с Fc участком (Fc участком неизмененной последовательности или Fc участком варианта аминокислотной последовательсноти) антитела, которые приводят к смерти клетки. Примеры эффекторых функций, стимулируемых антителом, включают комплементзависимую цитотоксичность (CDC); антителозависимую клеточно-обусловленную цитотоксичность (ADCC); антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и В-клеточную активацию.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению связывается и с TL1a на поверхности клетки таким образом, что он способен стимулировать эффекторные функции, такие как ADCC или CDC.

Например, TL1a-связывающий белок остается связанным с TL1a на поверхности клетки в течение времени, достаточного для стимулирования эффекторной функции, такой как ADCC и/или CDC.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению способен стимулировать улучшенную эффекторную функцию, например, с помощью модификации Fc участка или путем включения участка, способного связываться с клеткой иммунного эффектора. Например, уровень эффекторной функции увеличивается по сравнению с уровнем, стимулируемым человеческим IgG1 или IgG3 Fc участком. Улучшенная эффекторная функция, стимулируемая TL1a-связывающим белком по данному изобретению, может привести к улучшенному терапевтическому или профилактическому эффекту, например, не только блокируя действие TL1a, но также убивая или уменьшая количество клеток, вызывающих патологическое состояние, убивая аутореактивные Т-клетки.

В одном примере реализации данного изобретения Fc участок TL1a-связывающего белка по данному изобретению модифицирован для увеличения уровня эффекторной функции, которую он способен стимулировать, по сравнению с не модифицированным Fc участком. Такие модификации могут быть произведены на аминокислотном уровне, и/или вторичном структурном уровне, и/или третичном структурном уровне, и/или гликозилированием Fc участка.

Специалист в данной области заметит, что усиленная эффекторная функция может проявляться разными путями, например в виде усиления эффекта, увеличения длительности эффекта, или ускорения эффекта.

В одном примере реализации данного изобретения Fc участок включает одну или несколько аминокислотных модификаций, увеличивающих его способность стимулировать улучшенную эффекторную функцию. В одном примере реализации данного изобретения Fc участок связывается с большей аффинностью с одним или несколькими FcγRs, такими как FcγRIII. В одном примере реализации данного изобретения Fc участок включает по меньшей мере одно аминокислотное замещение в позиции, выбираемой из группы, состоящей из: 230, 233, 234, 235, 239, 240, 243, 264, 266, 272, 274, 275, 276, 278, 302, 318, 324, 325, 326, 328, 330, 332, и 335, при нумерации в соответствии с EU индексом Кабата. В одном примере реализации данного изобретения Fc участок содержит следующие аминокислотные замещения S239D/I332E, при нумерации в соответствии с EU индексом Кабата. Этот Fc участок обладает приблизительно в 14 раз большей аффинностью к FcγRIIIa, чем дикий Fc участок, и приблизительно в 3,3 раза большей способностью стимулировать ADCC, чем дикий Fc участок. В одном примере реализации данного изобретения Fc участок содержит следующие аминокислотные замещения S239D/A330L/I332E, при нумерации в соответствии с EU индексом Кабата. Этот Fc участок обладает приблизительно в 138 большей аффинностью к FcγRIIIa, чем дикий Fc участок, и приблизительно в 323 раз большей способностью стимулировать ADCC, чем дикий Fc участок.

Дополнительные аминокислотные замещения, увеличивающие способность Fc участка стимулировать эффекторную функцию, известны специалистам в данной области и/или описаны, например, в US 6737056 или US 7317091.

В одном примере реализации данного изобретения гликозилирование Fc участка изменяют для увеличения его способности стимулировать улучшенную эффекторную функцию. В этом отношении природные антитела, производимые клетками млекопитающих, обычно включают разветвленный, 2-антенарный олигосахарид, обычно присоединенный N-связью к Asn297 $C_H2$ домена Fc участка. Олигосахарид может содержать различные углеводы, например маннозу, N-ацетил глюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в "стволе" 2-антенарной олигосахаридной структуры. В некоторых примерах Fc участки в соответствии с данным изобретением включают углеводную структуру, лишенную фукозы, присоединенной (прямо или косвенно) к Fc участку, т.е. Fc участок является "афукозилированным". Такие варианты могут улучшать способность стимулировать ADCC. Способы производства афукозилированных антител включают экспрессию антитела или антигенсвязывающего его фрагмента в клеточной линии, не способной экспрессировать α-1,6-фукозилтрансферазу (FUT8) (например, как описано в Yumane-Ohnuki et al., Biotechnol. Bioengineer. 87: 614-622, 2004), экспрессию антитела или антигенсвязывающего его фрагмента в клетках, экспрессирующих малую интерферирующую РНК против FUT8 (например, как описано в Mori et al., Biotechnol. Bioengineer., 88: 901-908, 2004), экспрессию антитела или антигенсвязывающего его фрагмента в клетках, не способных к экспрессии гуанозин дифосфата (GDP)-маннозы 4,6-дегидратазы (GMD) (например, как описано в Kanda et al., J. Biotechnol., 130: 300-310, 2007). Данное изобретение также описывает использование белков, обладающих пониженным уровнем фукозилирования, например, производимых с помощью клеточной линии, модифицированной для экспрессии β-(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnT-III) (например, как описано в Umāna et al., Nat. Biotechnol. 17:176-180, 1999).

Другие способы включают использование клеточных линий, естественно производящих антитела, способные стимулировать улучшенную эффекторную функцию с участием Fc (например, утиные стволовые эмбриональные клетки для производства вирусных вакцин, WO 2008/129058; производство рекомбинантных белков в avi EBX® клетках, WO 2008/142124).

TL1a-связывающие белки по данному изобретению также включают таковые с разделенными олигосахаридами, например, у которых 2-антенарный олигосахарид, присоединенный к Fc участку, разделен пополам GlcNAc. Такие белки могут понижать фукозилирование и/или улучшать ADCC функцию. Примеры таких белков описаны, например, в US 6602684 и US 20050123546.

TL1a-связывающие белки по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc участку, также включены в это изобретение. Такие белки могут иметь улучшенную CDC функцию. Такие белки описаны, например, в WO 1997/30087 и WO 1999/22764.

TL1a-связывающие белки могут также включать Fc участок, способный стимулировать повышенный уровень CDC. Например, гибриды IgG1 и IgG3 производят антитела, обладающие повышенной CDC активностью (Natsume et al., Cancer Res. 68: 3863-3872, 2008).

TL1a-связывающие белки могут также, или альтернативным образом, быть слитыми или конъюгированными с белками (например, вариабельными участками антител), которые связываются с иммунными эффекторными клетками, например, посредством связывания с CD3 или CD16.

Способы определения эффекторной функции известны специалистам в этой области. В одном примере реализации данного изобретения уровень активности ADCC оценивают с помощью анализа высвобождения $^{51}Cr$, анализа высвобождения европия или анализа высвобождения $^{35}S$. В каждом из этих анализов клетки, экспрессирующие TL1a, культивируют с одним или несколькими упомянутыми соединениями в течение такого времени и в таких условиях, которые достаточны для усвоения соединения клеткой. В случае анализа высвобождения $^{35}S$ клетки могут быть культивированы с $^{35}S$-меченным метионином и/или цистеином в течение времени, достаточного для инкорпорации меченой аминокислоты в новые синтезированные белки. Затем клетки культивируют в присутствии или в отсутствие белка и в присутствии иммунных эффекторных клеток, например PBMCs и/или NK клеток. Затем определяют количество $^{51}Cr$, европия и/или $^{35}S$ в культивировочной клеточной среде, и его увеличение в присутствии белка в сравнении с отсутствием белка означает, что связывающаяся молекула/агент обладает эффекторной функцией. Примеры публикаций, описывающие анализы для оценки уровня ADCC, стимулируемого белком, включают Hellstrom et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 83: 7059-7063, 1986 и Bruggemann et al., J. Exp. Med. 166: 1351-1361, 1987.

Другие анализы для оценки уровня ADCC, стимулируемого белком, включают анализ нерадиоактивный цитотоксический анализ ACTI™ для поточной цитометрии (Клетка Technology, Inc. CA, USA) и нерадиоактивный цитотоксический анализ CytoTox 96® (Promega, WI, USA).

Альтернативным образом или дополнительно, эффекторную функцию TL1a-связывающего белка можно оценить путем определения его аффинности к одному или нескольким FcγRs, например, как описано в US 7317091.

Анализ связывания C1q также может быть использован для подтверждения того, что TL1a-

связывающий белок способен связывать C1q и может стимулировать CDC. Для оценки комплементной активации можно провести анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163, 1996).

В другом примере TL1a-связывающий белок включает один или несколько аминокислотных замещений, увеличивающих время полураспада белка. Например, TL1a-связывающий белок содержит константный участок, включающий одно или несколько аминокислотных замещений, увеличивающих аффинность константного участка к неонатальному Fc участку (FcRn). Например, константный участок увеличивает аффинность к FcRn при пониженном pH, например приблизительно при pH 6,0, для облегчения Fc/FcRn связывания в эндосоме. В одном примере реализации данного изобретения константный участок увеличивает аффинность к FcRn приблизительно при pH 6 в сравнении с его аффинностью приблизительно при pH 7,4, что способствует повторному выделению Fc в кровоток после клеточного рециклинга. Такие аминокислотные замещения полезны для увеличения периода полураспада TL1a-связывающего белка путем уменьшения вывода из кровотока.

Примеры аминокислотных замещений включают T250Q, и/или M428L, или T252A, T254S и T266F, или M252Y, S254T и T256E, или H433K и N434F в соответствии с системой нумерации EU. Дополнительные или альтернативные аминокислотные замещения описаны, например, в US 20070135620 или US 7083784.

Стабилизированные TL1a-связывающие белки.

Нейтрализация TL1a-связывающих белков по данному изобретению может включать IgG4 константный участок или стабилизированный IgG4 константный участок. Термин "стабилизированный IgG4 константный участок" означает IgG4 константный участок, модифицированный для уменьшения обмена Fab-фрагмента, или склонности к обмену Fab-фрагмента, или образования полуантитела, или склонности к образованию полуантитела. "Обмен Fab-фрагмента" относится к типу модификации белка человеческого IgG4, при которой тяжелая цепь IgG4 с присоединенной легкой цепью (полумолекула) обменивается на тяжело-легкоцепочечную пару другой IgG4 молекулы. Таким образом, молекулы IgG4 могут получить два различных Fab-фрагмента, распознающих два различных антигена (приводя к биспецифическим молекулам). Обмен Fab-фрагментов происходит естественным образом in vivo и может быть стимулирован in vitro путем очистки клеток крови или уменьшения содержания таких агентов, как восстановленный глютатион. "Полуантитело" образуется, когда IgG4 антитело диссоциирует с образованием двух молекул, каждая из которых содержит одну тяжелую цепь и одну легкую цепь.

В одном примере реализации данного изобретения стабилизированный IgG4 константный участок содержит пролин в позиции 241 шарнирной области по системе нумерации Кабата (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1987 и/или 1991). Эта позиция соответствует позиции 228 шарнирной области согласно систему нумерации EL) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health и Human Services, 2001 и Edelm et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63: 78-85, 1969). В человеческом IgG4 этот остаток обычно является серином. После замещения серина на пролин IgG4 шарнирная область содержит последовательность CPPC. В этом отношении специалист в данной области заметит, что "шарнирная область" является богатой пролином частью константного участка тяжелой цепи антитела, связывающей Fc и Fab участки, придающей мобильность двум Fab-фрагментам антитела. Шарнирная область включает цистеиновые остатки, вовлеченные во внутренние дисульфидные связи тяжелых цепей. Она в целом определяется как простирающаяся от Glu226 до Pro243 человеческого IgG1 по системе нумерации Кабата. Шарнирные области других изотипов IgG могут быть выровнены с IgG1 последовательностью путем расположения первого и последнего цистеиновых остатков, образующих внутренние дисульфидные связи тяжелых цепей (S-S), в одинаковое положение (см. например WO 2010/080538).

Мутантные TL1a-связывающие белки.

Данное изобретение также описывает TL1-связывающий белок или нуклеиновую кислоту, его кодирующую, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с последовательностью, описанной в этом тексте. В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок или нуклеиновая кислота по данному изобретению включает последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85, или 90, или 95, или 97, или 98, или 99% идентичную последовательности, описанной в этом тексте, в которой белок специфично связывается с TL1a и ингибирует взаимодействие TL1a и DR3 и не ингибирует взаимодействие TL1a и DcR3.

Альтернативным образом или дополнительно, TL1a-связывающий белок содержит CDR (например, три CDR), по меньшей мере приблизительно на 80, или 85, или 90, или 95, или 97, или 98, или 99% идентичные CDR из $V_H$ или $V_L$, как описано в этом тексте согласно любому примеру, в котором белок способен специфично связываться с TL1a и ингибировать взаимодействие TL1a и DR3 и в котором белок не ингибирует взаимодействие TL1a и DcR3. В этом отношении авторы изобретения получили ряд антител, имеющие различные последовательности внутри своих CDR. Способы определения связывания белка TL1a и определения взаимодействия TL1a и DR3 или TL1a и DcR3 описаны в этом тексте.

Например, авторы данного изобретения идентифицировали группу TL1a-связывающих белков, об-

ладающих 60% идентичностью в их HCDR1, согласно системе нумерации Кабата и другую подгруппу белков, обладающих 80% идентичностью в их HCDR1, согласно системе нумерации Кабата.

Авторы данного изобретения также идентифицировали подкласс TL1a-связывающих белков, имеющих 40% идентичность или 47% идентичность их HCDR2 согласно системе нумерации Кабата.

Как обсуждалось в этом документе, специалистам в данной области также известно, что пять С-терминальных остатков тяжелой цепи CDR2 могут быть мутированы путем консервативных или неконсервативных аминокислотных замещений (31% остатков) (Padl et al., FASEB J. 9: 133-139, 1995). Так, белок может содержать CDR2, обладающий по меньшей мере приблизительно 69% идентичностью с тяжелоцепочечный CDR2 последовательностью, здесь описанной.

Авторы данного изобретения также идентифицировали класс белков, включающий варианты вариабельных участков антитела C320, описанного в этом тексте. Эти варианты позволяют идентифицировать области вариабельных участков, которые могут быть замещены без потери функциональности.

Например, авторы данного изобретения идентифицировали несколько остатков в $V_H$, содержащих последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, которая может быть замещена без потери функциональности. Соответственно, изобретение включает белки, включающие $V_H$ по меньшей мере приблизительно с 86% идентичностью с последовательностью, описанной в SEQ ID NO: 42. В этом отношении авторы данного изобретения получили модифицированную форму последовательности SEQ ID NO: 42, имеющую приблизительно 17 аминокислотных замещений (т.е. приблизительно на 86% идентичную вышеописанной), сохраняющую описанную функциональность. В этом отношении авторы данного изобретения также получили модифицированную форму последовательности SEQ ID NO: 42, имеющую приблизительно 90 или 94% идентичность с вышеописанной последовательностью, сохраняющую описанную функциональность. В одном примере реализации данного изобретения последовательность обладает по меньшей мере приблизительно 95, или 96, или 97, или 98% идентичностью с последовательностью, описанной в SEQ ID NO: 42. В этом отношении авторы данного изобретения получили белки, обладающие приблизительно 97, или 98, или 99% идентичностью с последовательностью, описанной в SEQ ID NO: 42. В одном примере реализации данного изобретения последовательность обладает по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью с последовательностью, описанной в SEQ ID NO: 42. В одном примере реализации данного изобретения последовательность обладает по меньшей мере приблизительно 99,2% идентичностью с последовательностью, описанной в SEQ ID NO: 42.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок включает 1-17 аминокислотных замещений по сравнению с SEQ ID NO: 42. Например, TL1a-связывающий белок включает 1, или 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 8, или 9, или 10, или 11, или 12, или 13, или 14, или 15, или 16, или 17 аминокислотных замещений по сравнению с SEQ ID NO: 42.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок включает 1-17 аминокислотных замещений в FRs по сравнению с SEQ ID NO: 42. Например, TL1a-связывающий белок включает 1, или 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 8, или 9, или 10, или 11, или 12, или 13, или 14, или 15, или 16, или 17 аминокислотных замещений в FRs по сравнению с SEQ ID NO: 42. В одном примере реализации данного изобретения замещение отсутствует в позиции 73 в последовательности SEQ ID NO: 42.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок включает 1-3 аминокислотных замещений в CDR3 по сравнению с SEQ ID NO: 42. Например, TL1a-связывающий белок включает 1, или 2, или 3 аминокислотных замещения в CDR3 по сравнению с SEQ ID NO: 42. В одном примере реализации данного изобретения замещение отсутствует в одной или нескольких из позиций 99, или 101, или 104, или 108 в последовательности SEQ ID NO: 42.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок включает одно или несколько замещений для предотвращения или уменьшения гликозилирования белка, в котором замещения находятся между аминокислотами 72-76 в последовательности SEQ ID NO: 42. Например, белок содержит аланин вместо аргинина в позиции 71, и/или аспарагиновую кислоту вместо аспарагина в позиции 72, и/или аргинин вместо треонина в позиции 73, и/или треонин вместо изолейцина в позиции 75 в последовательности SEQ ID NO: 42.

В одном примере реализации данного изобретения $V_H$ белка не гликозилирован и/или не содержит консенсусной области для N-связанного гликозилирования.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит мутацию последовательности, описанной в SEQ ID NO: 42, при этом мутировавшая последовательность, по меньшей мере, содержит серин в позиции 16 в последовательности SEQ ID NO: 42.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит мутацию последовательности, описанной в SEQ ID NO: 42, при этом мутировавшая последовательность, по меньшей мере, содержит пролин в позиции 41,.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит мутацию последовательности, описанной в SEQ ID NO: 42, при этом мутировавшая последовательность, по меньшей мере, содержит аргинин в позиции 74.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит мутацию последовательности, описанной в SEQ ID NO: 42, при этом мутировавшая по-

следовательность, по меньшей мере, содержит глютаминовую кислоту или глицин в позиции 49 в последовательности SEQ ID NO: 42.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит мутацию последовательности, описанной в SEQ ID NO: 42, при этом мутировавшая последовательность, по меньшей мере, содержит пролин в позиции 41, и лейцин в позиции 51, и глютаминовую кислоту в позиции 102, и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит мутацию последовательности, описанной в SEQ ID NO: 42, при этом мутировавшая последовательность, по меньшей мере, содержит пролин в позиции 41, и лейцин в позиции 51, и аланин в позиции 72, и аспарагиновую кислоту в позиции 73, и аргинин в позиции 74, и глютаминовую кислоту в позиции 102, и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит мутацию последовательности, описанной в SEQ ID NO: 42, при этом мутировавшая последовательность, по меньшей мере, содержит пролин в позиции 41, и лейцин в позиции 51, и аланин в позиции 72, и аспарагиновую кислоту в позиции 73, и аргинин в позиции 74, и треонин в позиции 76, и глютаминовую кислоту в позиции 102, и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42.

Авторы данного изобретения идентифицировали позицию в HCDR2, которая может быть замещена. Вместе с наблюдениями Padl et al., supra, это изобретение, таким образом, описывает белок, включающий $V_H$, включающий CDR2, имеющий последовательность, по меньшей мере приблизительно на 65% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 44. В одном примере реализации данного изобретения степень идентичности составляет по меньшей мере приблизительно 70, или 75, или 80, или 90%. В одном примере реализации данного изобретения степень идентичности составляет по меньшей мере приблизительно 94%.

Авторы данного изобретения идентифицировали ряд позиций в HCDR3, которые могут быть замещены. Таким образом, данное изобретение описывает белок, включающий $V_H$, включающий CDR3, имеющий последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60% идентичную последовательности, описанной в SEQ ID NO: 45, В одном примере реализации данного изобретения степень идентичности составляет по меньшей мере приблизительно 70% с последовательностью, описанной в SEQ ID NO: 45, например, как описано в этом тексте. В одном примере реализации данного изобретения степень идентичности составляет по меньшей мере приблизительно 75, или 80, или 90%. В одном примере реализации данного изобретения степень идентичности составляет по меньшей мере приблизительно 90%.

В одном примере реализации данного изобретения мутантная форма последовательности SEQ ID NO: 45 содержит глютаминовую кислоту в позиции 1 в последовательности SEQ ID NO: 45, и/или пролин в позиции 3 в последовательности SEQ ID NO: 45, и/или аланин в позиции 6 в последовательности SEQ ID NO: 45. Мутантная форма также может дополнительно содержать фенилаланин в позиции 8 в последовательности SEQ ID NO: 45 и/или тирозин в позиции 10 в последовательности SEQ ID NO: 45,.

Дополнительные остатки, которые могут мутировать, показаны на фиг. 1C-1E и в SEQ ID NO: 94, 137, 152, 162 и 173.

В одном примере реализации данного изобретения авторы данного изобретения идентифицировали несколько остатков в $V_L$, содержащих последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46, которая может быть замещена без потери функциональности. Соответственно, данное изобретение также описывает белки, включающие $V_L$ по меньшей мере приблизительно с 95% идентичностью с последовательностью, описанной в SEQ ID NO: 46. Например, авторы данного изобретения подвергли мутации 32 остатка в $V_L$ без потери функциональности, это означает, что данное изобретение также описывает белок, имеющий по меньшей мере приблизительно 71% идентичность с последовательностью, описанной в SEQ ID NO: 46. В одном примере реализации данного изобретения степень идентичности составляет по меньшей мере приблизительно 75, или 80, или 90, или 95, или 97%. В одном примере реализации данного изобретения степень идентичности составляет по меньшей мере приблизительно 98%. В одном примере реализации данного изобретения степень идентичности составляет по меньшей мере приблизительно 99%. В одном примере реализации данного изобретения степень идентичности составляет по меньшей мере приблизительно 99.1%.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок включает 1-17 аминокислотных замещений по сравнению с SEQ ID NO: 42. Например, TL1a-связывающий белок включает 1, или 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 8, или 9, или 10, или 11, или 12, или 13, или 14, или 15, или 16, или 17, или 18, или 19, или 20, или 21, или 22, или 23, или 24, или 25, или 26, или 27, или 28, или 29, или 30, или 31, или 32 аминокислотные замещения по сравнению с SEQ ID NO: 46.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок включает 1-32 аминокислотных замещения в FR по сравнению с SEQ ID NO: 46. Например, TL1a-связывающий белок включает 1, или 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 8, или 9, или 10, или 11, или 12, или 13, или 14, или 15,

или 16, или 17, или 18, или 19, или 20, или 21, или 22, или 23, или 24, или 25, или 26, или 27, или 28, или 29, или 30, или 31, или 32 аминокислотные замещения в FRs по сравнению с SEQ ID NO: 46.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок включает 1-3 аминокислотных замещения в CDR по сравнению с SEQ ID NO: 46. Например, TL1a-связывающий белок включает 1, или 2, или 3 аминокислотных замещения в CDR по сравнению с SEQ ID NO: 46. В одном примере реализации данного изобретения замещение отсутствует в одной или нескольких из позиций 34, 54, 94 в последовательности SEQ ID NO: 46.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит мутацию последовательности, описанной в SEQ ID NO: 46, при этом мутировавшая последовательность, по меньшей мере, содержит серин в позиции 24 в последовательности SEQ ID NO: 46.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит мутацию последовательности, описанной в SEQ ID NO: 46, при этом мутировавшая последовательность, по меньшей мере, содержит треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит мутацию последовательности, описанной в SEQ ID NO: 46, при этом мутировавшая последовательность, по меньшей мере, содержит глютамин в позиции 81 в последовательности SEQ ID NO: 46.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит мутацию последовательности, описанной в SEQ ID NO: 46, при этом мутировавшая последовательность, по меньшей мере, содержит треонин в позиции 23, и серин в позиции 24, и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению содержит мутацию последовательности, описанной в SEQ ID NO: 46, при этом мутировавшая последовательность, по меньшей мере, содержит треонин в позиции 23, и серин в позиции 24, и треонин в позиции 76, и глютаминовую кислоту в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46.

Авторы данного изобретения идентифицировали ряд позиций в LCDR1, которые могут быть замещены. Таким образом, данное изобретение описывает белок, включающий $V_L$, включающий CDR1, обладающий последовательностью, по меньшей мере приблизительно на 60% идентичной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 47. В одном примере реализации данного изобретения степень идентичности составляет по меньшей мере приблизительно 70, или 75, или 80, или 90%. Например, авторы данного изобретения подвергли мутации две позиции в LCDR1, содержащие последовательность, описанную в SEQ ID NO: 47, тем самым получив белок, обладающий по меньшей мере приблизительно 86% идентичностью с упомянутой последовательностью. В одном примере реализации данного изобретения степень идентичности составляет по меньшей мере приблизительно 90%.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a связывающий белок по данному изобретению содержит $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 46, в котором $V_H$ и/или $V_L$ включает одно или несколько следующих замещений или групп замещений:

(i) $V_H$ содержит, по меньшей мере, серин в позиции 16 в последовательности SEQ ID NO: 42;

(ii) $V_L$ содержит, по меньшей мере, треонин в позиции 76 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iii) $V_L$ содержит, по меньшей мере, глютамин в позиции 81 в последовательности SEQ ID NO: 46;

(iv) $V_H$ содержит, по меньшей мере, пролин в позиции 41, и лейцин в позиции 51, и глютаминовую кислоту в позиции 102, и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42, и $V_L$ содержит, по меньшей мере, треонин в позиции 23, и серин в позиции 24, и треонин в позиции 76 относительно последовательности SEQ ID NO: 46; или

(v) $V_H$ содержит, по меньшей мере, пролин в позиции 41, и лейцин в позиции 51, и аланин в позиции 72, и аспарагиновую кислоту в позиции 73, и аргинин в позиции 74, и глютаминовую кислоту в позиции 102, и аланин в позиции 105 относительно последовательности SEQ ID NO: 42, и $V_L$ содержит, по меньшей мере, треонин в позиции 23, и серин в позиции 24, и треонин в позиции 76, и глютаминовую кислоту в позиции 51 относительно последовательности SEQ ID NO: 46.

В другом примере нуклеиновая кислота по данному изобретению содержит последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80, или 85, или 90, или 95, или 97, или 98, или 99% идентичную последовательности, описанной в этом тексте, и кодирующую TL1a-связывающий белок, способный специфично связываться с TL1a и ингибировать взаимодействие TL1a и DR3, при этом белок не ингибирует взаимодействие TL1a и DcR3. Данное изобретение также включает нуклеиновые кислоты, кодирующие TL1a-связывающий белок по данному изобретению, который отличается от последовательности, здесь описанной, в результате дегенерации генетического кода.

Степень идентичности нуклеиновой кислоты или полипептида определяют с помощью GAP (Needlem и Wunsch. Mol. Biol. 48, 443-453, 1970) анализа (программа GCG) с параметром "gap creation penalty=5" и "gap extension penalty=0,3". Анализируемая последовательность имеет по меньшей мере 50 остатков в длину, и анализ GAP выравнивает две последовательности по участку по меньшей мере в

50 остатков. Например, анализируемая последовательность имеет по меньшей мере 100 остатков в дину и анализ GAP выравнивает две последовательности по участку по меньшей мере в 100 остатков. Например, две последовательности выравниваются по всей длине.

Как обсуждалось ранее, данное изобретение также описывает нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется в строгих условиях гибридизации в нуклеиновую кислоту, кодирующую TL1a-связывающий белок, описанный в этом тексте, например нуклеиновую кислоту, кодирующую $V_H$ или $V_L$ антитела C319, C320, C321, C323, C333, C334, C336, C320-3, C320-5, C320-90, C320-103, C320-114, C320-115, C320-120, C320-129, C320-130, C320-135, C320-162, C320-163, C320-164, C320-165, C320-166, C320-167, C320-168, C320-169, C320-170, C320-171, C320-172, C320-179 или C320-183. Условия "средней строгости" определяются как гибридизация и/или промывание, проводимое в 2× SSC буфере, 0,1% (вес./об.) SDS при температуре в интервале 45-65°C, или эквивалентные. Условия "высокой строгости" определяются как гибридизация и/или промывание, проводимое в 0,1× SSC буфере, 0,1% (w/v) SDS, или с более низкой концентрацией соли и при температуре по меньшей мере 65°C или эквивалентные. Ссылка в этом тексте на определенный уровень строгости включает эквивалентные условия с использованием других растворов для промывания/гибридизации, нежели SSC, известных специалистам в этой области. Например, способы расчета температуры, при которой спирали двухспиральной нуклеиновой кислоты диссоциируют (также известной как температура плавления, или Tm) известны специалистам в этой области. Температура, подобная (например, ±5°C или ±10°C) или эквивалентная Tm нуклеиновой кислоты считается условием высокой строгости. Средней строгостью является температура в рамках 10-20°C или 10-15°C от рассчитанной Tm нуклеиновой кислоты.

Данное изобретение также описывает мутантные формы TL1a-связывающего белка по данному изобретению, включающие одно или несколько консервативных аминокислотных замещений по сравнению с описанной последовательностью. В некоторых примерах TL1a-связывающий белок включает 10 или менее, например 9 или 8, или 7, или 6, или 5, или 4, или 3, или 2, или 1, консервативных аминокислотных замещений. "Консервативным аминокислотным замещением" является такое, при котором аминокислотный остаток замещают другим аминокислотным остатком, имеющим похожую боковую цепь, и/или гидропатичность, и/или гидрофильность.

Семейства аминокислотных остатков с похожими боковыми цепями описаны в этой области, включая щелочные основные цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глютамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), β-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Гидропатические индикаторы описаны, например у Kyte и Doolittle J. Mol. Biol., 157: 105-132, 1982 и гидрофильные индикаторы описаны, например, в US 4554101.

Данное изобретение также описывает неконсервативные аминокислотные изменения. Например, особенно интересны замещения заряженной аминокислоты другой заряженной аминокислотой, а также нейтральной или позитивно заряженной аминокислотой. В некоторых примерах TL1a-связывающий белок включает 10 или менее, например, 9 или 8, или 7, или 6, или 5, или 4, или 3, или 2, или 1, неконсервативных аминокислотных замещений.

В одном примере реализации данного изобретения мутации происходят внутри FR антигенсвязывающего домена TL1a-связывающего белка по данному изобретению. В другом примере мутации происходят внутри CDR TL1a-связывающего белка по данному изобретению. Примеры способов получения мутантных форм TL1a-связывающего белка включают:

мутагенез ДНК (Thie et al., Methods Mol. Biol. 525: 309-322, 2009) или РНК (Kopsidas et al., Immunol. Lett. 107:163-168, 2006; Kopsidas et al. BMC Biotechnology, 7: 18, 2007 и WO 1999/058661);

введение нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, внутрь клетки-мутатора, например, XL-1Red, XL-mutS и XL-mutS-Kanr бактериальных клеток (Stratagene);

ДНК перетасовка, например, как описано в Stemmer, Nature, 370: 389-91, 1994; и

сайт-зависимый мутагенез, например, как описано в Dieffenbach (ed) и Dveksler (ed) (B: PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1995).

Типичные способы определения биологической активности мутировавших TL1a-связывающих белков по данному изобретению очевидны для специалистов в данной области и/или описаны в этом тексте, например связывание антигенов. Например, в этом документе описаны способы определения связывания антигенов, конкурирующего ингибирования связывания, аффинности, ассоциации, диссоциации и терапевтической эффективности.

Типичные TL1a-связывающие белки.

В табл. 1 и 2 приведены примеры TL1a-связывающих белков, содержащих вариабельные участки, и кодирующих их аминокислот, полученных авторами.

Таблица 1

Последовательности типичных TL1a-связывающих белков и кодирующих нуклеиновых кислот

| | Обозначение антитела | $V_H$ аминокислоты SEQ ID NO | $V_H$ нуклеотидной цепи SEQ ID NO | $V_L$ аминокислоты SEQ ID NO | $V_L$ нуклеотидной цепи SEQ ID NO |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | C336 | 2 | 96 | 6 | 97 |
| 2 | C334 | 10 | 98 | 14 | 99 |
| 3 | C333 | 18 | 100 | 22 | 101 |
| 4 | C323 | 26 | 102 | 30 | 103 |
| 5 | C321 | 34 | 104 | 38 | 105 |
| 6 | C320 | 42 | 106 | 46 | 107 |
| 7 | C319 | 50 | 108 | 54 | 109 |
| 8 | C320-3 | 58 | 110 | 46 | 107 |
| 9 | C320-5 | 42 | 106 | 62 | 111 |
| 10 | C320-90 | 66 | 112 | 62 | 111 |
| 11 | C320-103 | 70 | 113 | 62 | 111 |
| 12 | C320-114 | 74 | 114 | 62 | 111 |
| 13 | C320-115 | 78 | 115 | 62 | 111 |
| 14 | C320-120 | 58 | 110 | 82 | 116 |
| 15 | C320-129 | 86 | 117 | 46 | 107 |
| 16 | C320-130 | 90 | 118 | 46 | 107 |
| 17 | C320-135 | 58 | 110 | 62 | 111 |
| 18 | C320-7 | 154 | | 164 | |
| 19 | C320-8 | 155 | | 163 | |
| 20 | C320-9 | 156 | | 165 | |
| 21 | C320-10 | 157 | | 166 | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 22 | C320-11 | 158 | | 167 | |
| 23 | C320-12 | 159 | | 168 | |
| 24 | C320-13 | 234 | | 169 | |
| 25 | C320-14 | 160 | | 170 | |
| 26 | C320-15 | 161 | | 171 | |
| 27 | C320-16 | 154 | | 46 | |
| 28 | C320-17 | 155 | | 46 | |
| 29 | C320-18 | 156 | | 46 | |
| 30 | C320-19 | 157 | | 46 | |
| 31 | C320-20 | 158 | | 46 | |
| 32 | C320-21 | 159 | | 46 | |
| 33 | C320-22 | 234 | | 46 | |
| 34 | C320-23 | 160 | | 46 | |
| 35 | C320-24 | 161 | | 46 | |
| 36 | C320-25 | 42 | | 164 | |
| 37 | C320-26 | 42 | | 163 | |
| 38 | C320-27 | 42 | | 165 | |
| 39 | C320-28 | 42 | | 166 | |
| 40 | C320-29 | 42 | | 167 | |
| 41 | C320-30 | 42 | | 168 | |
| 42 | C320-31 | 42 | | 169 | |
| 43 | C320-32 | 42 | | 170 | |
| 44 | C320-33 | 42 | | 171 | |
| 45 | C320-162 | 175 | 222 | 188 | 228 |
| 46 | C320-163 | 176 | 223 | 189 | 228 |
| 47 | C320-164 | 177 | 224 | 190 | 229 |
| 48 | C320-165 | 178 | 224 | 191 | 230 |
| 49 | C320-166 | 179 | 224 | 192 | 231 |
| 50 | C320-167 | 180 | 224 | 193 | 228 |
| 51 | C320-168 | 181 | 225 | 194 | 230 |
| 52 | C320-169 | 182 | 225 | 195 | 228 |
| 53 | C320-170 | 183 | 226 | 196 | 230 |
| 54 | C320-171 | 184 | | 197 | |
| 55 | C320-172 | 185 | 226 | 198 | 232 |
| 56 | C320-179 | 186 | 227 | 199 | 232 |
| 57 | C320-183 | 187 | 227 | 200 | 233 |

Таблица 2

Аминокислотные замещения в $V_H$ (относительно SEQ ID NO: 42) и $V_L$ (относительно SEQ ID NO: 46) типичных TL1a-связывающих белков

| | Обозначение антитела | $V_H$ замещение[1] | $V_L$ замещение[1] |
|---|---|---|---|
| 1 | C320-2 | A16S | - |
| 2 | C320-53 | E99S | A76T |
| 3 | C320-54 | E99H | A76T |
| 4 | C320-55 | E99L | A76T |
| 5 | C320-56 | E99D | A76T |
| 6 | C320-57 | E99Y | A76T |
| 7 | C320-58 | E99P | A76T |
| 8 | C320-59 | E99Q | A76T |
| 9 | C320-60 | E99K | A76T |
| 10 | C320-61 | V100A | A76T |
| 11 | C320-62 | V100S | A76T |
| 12 | C320-63 | V100H | A76T |
| 13 | C320-64 | V100L | A76T |
| 14 | C320-65 | V100D | A76T |
| 15 | C320-66 | V100Y | A76T |
| 16 | C320-67 | V100P | A76T |
| 17 | C320-68 | V100Q | A76T |
| 18 | C320-69 | V100K | A76T |
| 19 | C320-70 | P101A | A76T |
| 20 | C320-71 | P101S | A76T |
| 21 | C320-72 | P101H | A76T |
| 22 | C320-73 | P101L | A76T |
| 23 | C320-74 | P101D | A76T |
| 24 | C320-75 | P101Y | A76T |
| 25 | C320-76 | P101Q | A76T |
| 26 | C320-77 | P101K | A76T |
| 27 | C320-78 | D102A | A76T |
| 28 | C320-79 | D102S | A76T |
| 29 | C320-80 | D102H | A76T |
| 30 | C320-81 | D102L | A76T |
| 31 | C320-82 | D102Y | A76T |
| 32 | C320-83 | D102P | A76T |
| 33 | C320-84 | D102Q | A76T |
| 34 | C320-85 | D102K | A76T |
| 35 | C320-86 | T103A | A76T |
| 36 | C320-87 | T103S | A76T |
| 37 | C320-88 | T103H | A76T |
| 38 | C320-89 | T103L | A76T |
| 39 | C320-90 | T103D | A76T |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 40 | C320-91 | T103Y | A76T |
| 41 | C320-92 | T103P | A76T |
| 42 | C320-93 | T103Q | A76T |
| 43 | C320-94 | T103K | A76T |
| 44 | C320-95 | A104S | A76T |
| 45 | C320-96 | A104H | A76T |
| 46 | C320-97 | A104L | A76T |
| 47 | C320-98 | A104D | A76T |
| 48 | C320-99 | A104Y | A76T |
| 49 | C320-100 | A104P | A76T |
| 50 | C320-101 | A104Q | A76T |
| 51 | C320-102 | A104K | A76T |
| 52 | C320-103 | S105A | A76T |
| 53 | C320-104 | S105H | A76T |
| 54 | C320-105 | S105L | A76T |
| 55 | C320-106 | S105D | A76T |
| 56 | C320-107 | S105Y | A76T |
| 57 | C320-108 | S105P | A76T |
| 58 | C320-109 | S105Q | A76T |
| 59 | C320-110 | S105K | A76T |
| 60 | C320-111 | E107A | A76T |
| 61 | C320-112 | E107S | A76T |
| 62 | C320-113 | E107H | A76T |
| 63 | C320-114 | E107L | A76T |
| 64 | C320-115 | E107D | A76T |
| 65 | C320-116 | E107Y | A76T |
| 66 | C320-117 | E107P | A76T |
| 67 | C320-118 | E107Q | A76T |
| 68 | C320-119 | E107K | A76T |
| 69 | C320-120 | T41P | A23T |
| 70 | C320-121 | T41P | D28N |
| 71 | C320-122 | T41P | L33Y |
| 72 | C320-123 | T41P | G34D |
| 73 | C320-124 | T41P | Y53N |
| 74 | C320-125 | T41P | Y54S |
| 75 | C320-126 | T41P | P82A |
| 76 | C320-127 | T41P | G95S |
| 77 | C320-128 | T41P | T96S |
| 78 | C320-129 | D102E | - |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 79 | C320-130 | M51L | - |
| 80 | C320-131 | - | D49E |
| 81 | C320-135 | T41P | A76T |
| 82 | C320-162 | T41P+M51L+S75A+D102E | A76T |
| 83 | C320-163 | T41P +R72A+N73D+T74R+I76T | A76T |
| 84 | C320-164 | T41P+M51L+D102E | G24S+A76T |
| 85 | C320-165 | T41P+M51L+D102E | A23T+G24S+A76T |
| 86 | C320-166 | T41P+M51L+D102E | A23T+A76T |
| 87 | C320-167 | T41P+M51L+D102E | A76T |
| 98 | C320-168 | T41P+M51L+D102E+S105A | A23T+G24S+A76T |
| 89 | C320-169 | T41P+M51L+D102E+S105A | A76T |
| 90 | C320-170 | T41P+R72A+N73D+T74R+I76T | A23T+G24S+A76T |
| 91 | C320-171 | T41P+R72A+N73D+T74R+I76T | A23T+G24S+A76T+Y51P |
| 92 | C320-172 | T41P+R72A+N73D+T74R+I76T | A23T+G24S+A76T+Y51E |
| 93 | C320-179 | T41P+M51L+R72A+N73D+T74R+I76T +D102E+S105A | A23T+G24S+A76T+Y51E |
| 94 | C320-183 | T41P+M51L+R72A+N73D+T74R+I76T +D102E+S105A | A23T+G24S+A76T+Y51G |

[1] Замещения перечислены как остаток в SEQ ID NO: 42 или 46; позиция в SEQ ID NO: 42 или 46; замещенная аминокислота, т.е. A16S в $V_H$, означает, что в позиции 16 в последовательности SEQ ID NO: 42 находится аланин, который был замещен серином в TL1a-связывающем белке.

## Способы получения белков

Рекомбинантная экспрессия.

Как обсуждалось в этом документе, нуклеиновую кислоту, кодирующую TL1a-связывающий белок по данному изобретению (и/или полипептиды, содержащиеся в таком TL1a-связывающем белке), внедряют в экспрессионную конструкцию, так что она функционально связывается с промотором, способствуя его экспрессии. Способы получения экспрессионных конструкций, например клонирование экспрессионных конструкций/векторов, известны специалистам в этой области и/или описаны в Ausubel et al., (B: Current Protocols в Molecular Biology. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987) и (Sambrook et al., (B: Molecular Cloning: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Third Edition 2001) и US7270969.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению экспрессируется в бактериальной клетке. Типичные промоторы, подходящие для экспрессии в бактериальных клетках, таких как, например, бактериальная клетка, выбираемая из группы, включающей E.coli, Staphylococcus sp, Corynebacterium sp., Salmonella sp., Bacillus sp. и Pseudomonas sp., включают, но не ограничиваются, такие промоторы, как lacz, lpp, температурно-чувствительные ($_L$ или ($_R$ промоторы, T7, T3, SP6 или полуискусственные промоторы, такие как IPTG-стимулируемый tac промотор или lacUV5 промотор.

В другом примере TL1a-связывающий белок экспрессируется в дрожжевой клетке. Типичные промоторы, подходящие для экспрессии в дрожжевых клетках, таких как Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae и S.pombe, включают, не ограничиваясь ими, промоторы из следующих генов: ADH1, GAL1, GAL4, CUP1, PHO5, nmt, RPR1, или TEF1.

В следующем примере TL1a-связывающий белок экспрессируется в клетке насекомого. Типичные промоторы, подходящие для экспрессии в клетках насекомого или в насекомых, включают, не ограничиваясь ими, OPEI2 промотор, промотор актина насекомых, выделенный из Bombyx тип, Drosophila sp. dsh промотор (Marsh et al., Human. Mol. Genet. 9: 13-25, 2000).

TL1a-связывающий белок по данному изобретению может также экспрессироваться в растительной клетке. Промоторы для экспрессии пептидов в растительной клетке известны специалистам в этой области и включают, не ограничиваясь ими, генный промотор амилазы Hordeum vulgare, промотор мозаичного вируса 35S цветной капусты, генный промотор нопалин синтазы (NOS) и ауксин-стимулируемые растительные промоторы P1 и P2.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению экспрессируется в клетке млекопитающего или в млекопитающем. Типичные промоторы, подходящие для экспрессии в клетке млекопитающего, включают, например, промотор, выбираемый из группы, состоящей из ретровирусных LTR элементов, SV40 раннего промотора, SV40 позднего промотора, немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV IE), $EF_1$ промотор (из человеческого фактора элонгации 1), EM7 промотор, UbC промотор (из человеческого убиквитина C). Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают почечную обезьянью линию CVl, трансформированную SV40 (COS-7); человеческую эмбриональную почечную линию (HEK-293 клетки); почечные клетки детенышей хомячков (BHK); клетки яичников китайских хомячков (CHO); почечные клетки африканских

зеленых обезьян (VERO-76) или клетки миеломы (например, NS/0 клетки).

Другие элементы экспрессионных конструкций/векторов известны специалистам в этой области и включают, например, энхансеры, транскрипционные терминаторы, полиаденилирующие последовательности, нуклеиновые кислоты, кодирующие выборочные или определяемые маркеры и источники репликации.

В одном примере реализации данного изобретения экспрессионная конструкция является бицистронной экспрессионной конструкцией. Под "бицистронной" имеется в виду отдельная молекула нуклеиновой кислоты, способная кодировать два отдельных полипептида из разных участков нуклеиновой кислоты, например отдельная нуклеиновая кислота, способная кодировать $V_H$-содержащий полипептид и $V_L$-содержащий полипептид как отдельные полипептиды. В целом, участки, кодирующие каждый отдельный полипептид, разделены участком внутренней посадки рибосомы (IRES) и участок 5' IRES не содержит последовательность, терминирующую транскрипцию. Примеры IRES описаны, например, в US 20090247455.

После производства подходящей экспрессионной конструкции она внедряется в подходящую клетку любым способом, известным в этой области. Примеры способов включают микроинъекцию, трансфекцию посредством DEAE-декстрана, трансфекцию посредством липосом, таких как коммерчески доступные реагенты, PEG-связанное поглощение ДНК, электропорация и бомбардировка микрочастицами, например, с использованием покрытых ДНК вольфрамовых и золотых частиц (Agracetus Inc., Wl, USA).

Клетки, используемые для производства TL1a-связывающего белка по данному изобретению, далее культивируют в условиях, известных в данной области как подходящие для производства TL1a-связывающих белков по данному изобретению.

Свободные клеточные экспрессионные системы также описываются данным изобретением, например TNT T7 и TNT T3 системы (Promega), pEXP1-DEST и pEXP2-DEST векторы (Invitrogen).

Очищение белков.

После получения/экспрессии TL1a-связывающий белок по данному изобретению очищают способом, известным специалистам в этой области. Такое очищение делает белок по данному изобретению свободным от неспецифических белков, кислот, липидов, углеводов и т.д. В одном примере реализации данного изобретения белок представлен в виде состава, в котором более чем приблизительно 90% (например, 95, 98 или 99%) белка является TL1a-связывающим белком по данному изобретению.

Стандартные способы очищения пептидов, используемые для получения очищенного TL1a-связывающего белка по данному изобретению, включают, не ограничиваясь этим, жидкостную хроматографию высокого давления (или высокой эффективности) (HPLC) и не-HPLC способы, такие как эксклюзионная хроматография размеров, ионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, хроматография в смешанном режиме, фазовое разделение, электрофоретическое разделение, осаждение, высаливание, иммунохроматография и/или другие способы.

В одном примере реализации данного изобретения для выделения слитого белка, включающего метку, используют аффинную очистку. Способы выделения белка с помощью аффинной хроматографии известны специалистам в этой области и описаны, например, в Scopes (B: Protein purification: principles and practice, Third Edition, Springer Verlag, 1994). Например, антитело или соединение, связанное с меткой (в случае полигистидиновой метки это может быть, например, никель-NTA) иммобилизуют на твердом носителе. Образец, включающий белок, далее контактирует с иммобилизованным антителом или соединением в течение такого времени и при таких условиях, которые позволяют произойти присоединению. Белок выделяют после промывания для удаления несвязанных и неспецифично связанных белков.

В случае TL1a-связывающего белка, включающего Fc участок антитела, для аффинной очистки используют белок A или белок G или их модифицированные формы. Белок A пригоден для выделения очищенных белков, включающих человеческий γ1, γ2 или γ4 тяжелоцепочечный Fc участок. Белок G рекомендуется для всех мышиных Fc изотипов и для человеческого γ3.

Конъюгаты.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок по данному изобретению конъюгирован с соединением. Например, соединение выбирают из группы, состоящей из радиоизотопа, определяемой метки, терапевтического соединения, коллоида, токсина, нуклеиновой кислоты, пептида, белка, соединения, увеличивающего время полураспада TL1a-связывающего белка у субъекта и их смесей.

Другое соединение может быть прямо или косвенно связано с TL1a-связывающим белком (например, при непрямом связывании может включать линкер). Примеры соединений включают радиоизотоп (например, йод-131, иттрий-90 или индий-111), определяемую метку (например, флуорофор или флуоресцирующий нанокристалл, или квантовую точку), терапевтическое соединение (например, химиотерапевтический или противовоспалительный препарат), коллоид (например, золото), токсин (например, рицин или столбнячный анатоксин), нуклеиновую кислоту, пептид (например, пептид, связывающий сывороточный альбумин), белок (например, белок, включающий антигенсвязывающий домен антитела или

сывороточный альбумин), соединение, повышающее период полураспада TL1a-связывающего белка у субъекта (например, полиэтиленгликоль или другой водорастворимый полимер, обладающий такой активностью) и их смеси. Примеры соединений, которые могут быть конъюгированы с TL1a-связывающим белком по данному изобретению, и способы такой конъюгации известны специалистам в этой области и описаны, например, в WO 2010/059821.

TL1a-связывающий белок может быть конъюгирован с наночастицей (например, как описано в Kog et al., Nanomedicine (Lond). 2: 287-306, 2007). Наночастицы могут быть металлическими.

TL1a-связывающий белок может содержаться в нацеленных на антитело бактериальных миниклетках (например, как описано в PCT/IB2005/000204).

Некоторые примеры соединений, которые могут быть конъюгированы с TL1a-связывающими белками по данному изобретению, представлены в табл. 3.

Таблица 3

Соединения, пригодные для конъюгации

| Группа | Описание |
|---|---|
| Радиоизотопы (прямая или непрямая конъюгация) | $^{123}$I, $^{125}$I, $^{130}$I, $^{133}$I, $^{135}$I, $^{47}$Sc, $^{72}$As , $^{72}$Sc, $^{90}$Y, $^{88}$Y, $^{97}$Ru, $^{100}$Pd, $^{101m}$Rh, $^{101m}$Rh, $^{119}$Sb, $^{128}$Ba, $^{197}$Hg, $^{211}$At, $^{212}$Bi, $^{153}$Sm, $^{169}$Eu, $^{212}$Pb, $^{109}$Pd, $^{111}$In , $^{67}$Gu, $^{68}$Gu, $^{67}$Cu, $^{75}$Br, $^{76}$Br , $^{77}$Br, $^{99m}$Tc, $^{11}$C, $^{13}$N, $^{15}$O, $^{18}$I, $^{188}$Rc, $^{203}$Pb, $^{64}$Cu, $^{105}$Rh, $^{198}$Au, $^{199}$Ag или $^{177}$Lu |
| Увеличители периода полураспада | • Полиэтиленгликоль<br>• Глицерол |
| | • Глюкоза |
| Флуоресцентные пробы | • Фикоэритрин (PE)<br>• Аллофикоцианин (APC)<br>• Alexa Fluor 488<br>• Cy5,5 |
| Биологические вещества | • флуоресцентные белки, такие как люцифераза Ренилла, GFP<br>• иммунные модуляторы или белки, такие как цитокины, например, интерферон<br>• токсины<br>• иммуноглобулин, или антитело, или вариабельный участок антитела<br>• увеличители периода полураспада, такие как альбумин или вариабельный участок антител, или пептиды, связывающиеся с альбумином |
| Химиотерапевтические агенты | • Таксол<br>• 5-FU<br>• Доксорубицин<br>• Идарубицин |

Скрининговые анализы.

TL1a-связывающие белки, включающие антитело-связывающие домены по данному изобретению, легко подвергаются скринингу на биологическую активность, например, как описано ниже.

Анализы связывания.

Одной из форм анализа является анализ антигенного связывания, например, как описано в Scopes (B: Protein purification: principles and practice, Third Edition, Springer Verlag, 1994). Такой способ в целом включает установку метки на TL1a-связывающий белок и его контакт с иммобилизованным антигеном. После смывания для удаления не специфически связанного белка определяют количество метки и, следовательно, связанного белка. Конечно, TL1a-связывающий белок может быть иммобилизованным и антиген-меченым. Также можно использовать анализы пэннинг-типа, например, описанные в этом тексте. Альтернативным образом или дополнительно, можно использовать анализ поверхностного плазмонного резонанса.

В одном примере реализации данного изобретения анализ связывания проводят с применением пептида, включающего эпитоп TL1a. В этом случае выбирают TL1a-связывающие белки, связывающиеся со специфическим участком TL1a.

Ингибирование взаимодействия TL1a и DR3.

Способы идентификации TL1a-связывающих белков, ингибирующих взаимодействие TL1a и DR3, станут очевидны специалисту в данной области на основе описания, изложенного в этом тексте.

Например, DR3 (например, 2 мкг/мл DR3) иммобилизуют на носителе и вводят в контакт с TL1a (например, 1 мкг/мл TL1a) и с проверяемым TL1a-связывающим белком (в случае контроля добавляют изотипно подходящее контрольное антитело). Пониженный уровень TL1a, связанного с DR3 в присутствии TL1a-связывающего белка по сравнению со связыванием в отсутствие TL1a-связывающего белка свидетельствует о том, что этот TL1a-связывающий белок ингибирует связывание TL1a с DR3. Анализ также может быть проведен с иммобилизованным TL1a, с которым контактирует DR3. Анализ также может быть проведен с меченым TL1a и/или DR3 для облегчения обнаружения.

В некоторых примерах проверяются разные концентрации TL1a-связывающего белка и определяется концентрация, при которой наблюдается 50% от максимального ингибирования TL1a-связывающим белком связывания TL1a с DR3 (эта концентрация известна как $EC_{50}$). В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ для TL1a-связывающего белка по данному изобретению составляет менее чем приблизительно 5, или 4, или 3,5, или 3, или 2,5, или 2,3, или 1, или 0,5 нмоль/л. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет менее чем 3 нмоль/л. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет менее чем 2,5 нмоль/л. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет менее чем 1 нмоль/л. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ составляет менее чем 0,5 нмоль/л.

В некоторых примерах максимальное ингибирование взаимодействия TL1a и DR3 оценивают путем определения уровня взаимодействия TL1a и DR3 в присутствии и в отсутствие TL1a-связывающего белка. Затем уровень ингибирования взаимодействия TL1a и DR3 в присутствии белка выражают в процентах от уровня взаимодействия в отсутствие белка. В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок ингибирует по меньшей мере приблизительно 80% взаимодействия между TL1a и DR3. Например, степень ингибирования составляет по меньшей мере приблизительно 84, или 85, или 90, или 93, или 94, или 95%. В одном примере реализации данного изобретения степень ингибирования составляет по меньшей мере приблизительно 93%. В одном примере реализации данного изобретения степень ингибирования составляет по меньшей мере приблизительно 94%. В одном примере реализации данного изобретения степень ингибирования оценивают с помощью полипептида, включающего DR3, слитый с Fc участком антитела. В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок используется с концентрацией приблизительно 10 мкг/мл.

Селективное ингибирование взаимодействия TL1a и DR3.

Способы идентификации TL1a-связывающих белков, ингибирующих взаимодействие TL1a и DR3, но не TL1a и DcR3, очевидны для специалистов в этой области и/или описаны в этом тексте.

Например, DcR3 (например, 2 мкг/мл DcR3) иммобилизуют на носителе и приводят в контакт с TL1a (например, 1 мкг/мл TL1a) и проверяемым TL1a-связывающим белком (в случае негативного контроля, используют изотипно подходящее контрольное антитело). Затем определяют уровень TL1a, связанного с DcR3. Пониженный уровень TL1a, связанного с DcR3 в присутствии TL1a-связывающего белка по сравнению с отсутствием TL1a-связывающего белка, свидетельствует о том, что TL1a-связывающий белок ингибирует связывание TL1a с DcR3. Одинаковый уровень связывания TL1a в присутствии или в отсутствие TL1a-связывающего белка свидетельствует о том, что TL1a-связывающий белок не ингибирует взаимодействие TL1a и DcR3. Этот анализ можно также использовать с иммобилизованным TL1a, с которым контактирует DcR3.

В некоторых примерах проверяют разные концентрации TL1a-связывающего белка для определения уровня ингибирования взаимодействия TL1a с DcR3 при различных концентрациях.

В некоторых примерах максимальное ингибирование взаимодействия TL1a и DcR3 оценивают путем определения уровня взаимодействия TL1a и DcR3 в присутствии и в отсутствие TL1a-связывающего белка. Затем уровень ингибирования взаимодействия TL1a и DcR3 в присутствии белка выражают в процентах от уровня взаимодействия в отсутствие белка. В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок с концентрацией 10 мкг/мл ингибирует 25% или менее взаимодействия между TL1a и DcR3. Например, степень ингибирования составляет 20% или менее, или 18% или менее, или 15% или менее, или 12% или менее, или 10% или менее, или 8% или менее, или 5% или менее. В одном примере реализации данного изобретения степень ингибирования составляет приблизительно 18% или менее. В одном примере реализации данного изобретения степень ингибирования составляет приблизительно 7% или менее. В одном примере реализации данного изобретения степень ингибирования составляет приблизительно 5% или менее. В одном примере реализации данного изобретения степень ингибирования оценивают с помощью полипептида, включающего DcR3, слитый с Fc участком антитела. В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок используют с концентрацией приблизительно 10 мкг/мл.

Анализы нейтрализации.

Способы идентификации TL1a-связывающих белков, нейтрализующих активность TL1a посредством DR3, также будут очевидны для специалиста в этой области, например, на основе описания, приведенного в этом тексте.

Например, DR3-экспрессирующие клетки (например, TF-1 клетки) (например, от приблизительно $7\times10^4$ до $8\times10^4$ клеток, например $7{,}5\times10^4$ клеток) подвергают контакту с TL1a и ингибитором синтеза белка (например, циклогексимидом) в присутствии или в отсутствие проверяемого TL1a-связывающего белка. Затем проверяют уровень апоптоза клеток, например, путем обнаружения активации каспазы или усвоения пропидий йодида или с помощью других известных анализов. TL1a-связывающий белок, понижающий уровень апоптоза в сравнении с уровнем апоптоза в отсутствие TL1a-связывающего белка, считается ингибирующим активность TL1a или нейтрализующим активность TL1a посредством DR3.

В некоторых примерах проверяют разные концентрации TL1a-связывающего белка для определения уровня нейтрализации при разных концентрациях. В некоторых примерах определяют концентрацию, при которой наблюдается 50% от максимального ингибирования апоптоза TL1a-связывающим белком (эта концентрация известна как $EC_{50}$). В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ TL1a-связывающего белка по данному изобретению составляет 3 нмоль/л или менее, например приблизительно 2,5 нмоль/л или менее, например приблизительно 2,4 нмоль/л или менее, например приблизительно 2 нмоль/л или менее, например приблизительно 1,5 нмоль/л или менее, например приблизительно 1 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ TL1a-связывающего белка по данному изобретению составляет приблизительно 0,99 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ TL1a-связывающего белка по данному изобретению составляет приблизительно 0,6 нмоль/л или менее. В одном примере реализации данного изобретения $EC_{50}$ TL1a-связывающего белка по данному изобретению составляет приблизительно 0,4 нмоль/л или менее.

Способность TL1a-связывающих белков по данному изобретению нейтрализовывать TL1a-активность можно также оценить путем определения их способности понижать секрецию цитокина иммунными клетками. Например, PBMC подвергают контакту с конканавалином A в присутствии или в отсутствие TL1a-связывающего белка. Затем оценивают уровень секреции TL1a-индуцированного цитокина (например, интерферона γ или IL-13), например, с помощью ELISA. Уменьшение секреции цитокина в присутствии TL1a-связывающего белка по сравнению с секрецией в отсутствие белка свидетельствует о том, что TL1a-связывающий белок нейтрализует активность TL1a.

В некоторых примерах разные концентрации TL1a-связывающего белка проверяют для определения уровня понижения секреции цитокина при различных концентрациях. В некоторых примерах определяют концентрацию, при которой наблюдается 50% от максимального ингибирования секреции цитокина TL1a-связывающим белком (эта концентрация известна как $EC_{50}$). Например, $EC_{50}$ для ингибирования секреции интерферона-γ составляет 4 нмоль/л или менее, например 3 нмоль/л или менее, или 2,5 нмоль/л или менее, или 2 нмоль/л или менее. В другом примере $EC_{50}$ для ингибирования секреции IL-13 составляет 15 нмоль/л или менее, например 10 нмоль/л или менее, например 5 нмоль/л или менее, например 1 нмоль/л или менее. Например, $EC_{50}$ для ингибирования секреции IL-13 составляет 0,5 нмоль/л или менее.

Другие анализы для определения нейтрализации активности TL1a включают определение уровня пролиферации, миграции и образования трубочек эндотелиальных клеток в присутствии и в отсутствие TL1a-связывающего белка. Например, эндотелиальные клетки культивируют во внеклеточной матрице, например Matrigel™, и определяют уровень миграции и/или образования трубочек, например, с помощью микроскопии. Увеличение миграции и/или образования трубочек в присутствии TL1a-связывающего белка по сравнению с отсутствием TL1a-связывающего белка свидетельствует о том, что TL1a-связывающий белок нейтрализует активность TL1a посредством DR3.

In vivo анализ Matrigel™ можно также проводить, как описано, например, в Bagley et al., Cancer Res. 63: 5866, 2003.

Дополнительные анализы включают оценку способности TL1a-связывающего белка понижать или предотвращать секрецию интерферона γ из T-клеток периферической крови и/или NK клеток, стимулированную IL-12 и/или IL-18 или FcγR активированными моноцитами.

In vivo анализы.

TL1a-связывающие белки по данному изобретению можно также анализировать на их терапевтическую эффективность в животной модели состояния, например TL1a-связанного состояния. Например, TL1a-связывающий белок вводят при модели воспалительного заболевания кишечника или колита (например, декстр натрий сульфат (DSS)-индуцированного колита) или CD45Rb адаптивной трансферной модели колита (например, Kanai et al., Inflamm. Bowel Dis. 12: 89-99, 2006). В другом примере TL1a-связывающий белок вводят при модели рассеянного склероза, например EAE модели, при которой мышь или крысу иммунизируют белком миелиновой оболочки или происходящим от него пептидом (например, MOG, MBP или PLP), и иммунный ответ генерируется в отношении белка, тем самым стимулируя модель рассеянного склероза. Примеры EAE моделей рассматриваются, например, в Tsunoda и Fujinami,

J. Neuropathol. Exp. Neurol. 55: 673-686, 1996. TL1a-связывающий белок может также или альтернативным образом быть проверен на модели артрита, например, у SKG разновидности мышей (Sakaguchi et al., Nature 426: 454-460, 1995), на крысиной модели коллагенового артирита II типа, мышиной модели коллагенового артрита II типа или антиген-стимулированной модели артрита (Bendele J. Musculoskel. Neuron. Interact. 1: 377-385, 2001) и/или на модели воспалительного заболевания дыхательных путей (например, OVA проба или проба на антиген таракана), или на модели воспалительного увеита, например интерфоторецептор ретиноид-связывающий белок иммунизационно-стимулированного увеоретинита (Caspi, Curr. Protoc. Immunol. Chapter 15: unit 15,6, 2003).

Способность TL1a-связывающего белка по данному изобретению нейтрализовывать активность TL1a можно также или альтернативным образом оценить на модели реакции "трансплантат против хозяина", например, при которой спленоциты одного животного вводятся другому аллогенному животному (например, по MHC или HLA неподходящему животному).

Анализы картирования эпитопов.

В другом примере эпитоп, связанный белком, описанным в этом тексте, картирован. Способы картирования эпитопов известны специалистам в этой области. Например, получают ряд перекрывающихся пептидов, охватывающих TL1a последовательность или ее участок, включающий интересующий эпитоп, например, пептиды включающие 10-15 аминокислот. TL1a-связывающий белок затем вводят в контакт с каждым пептидом или их комбинацией и определяют пептид(ы), с которым он связывается. Это позволяет определить пептид(ы), включающий эпитоп, с которым связывается TL1a-связывающий белок. Если с белком связываются несколько несвязанных пептидов, то белок может связывать конформационный эпитоп.

Альтернативным образом или дополнительно, аминокислотные остатки в TL1a подвергают мутации, например, с помощью аланин-сканирующего мутагенеза и определяют мутации, понижающие или предотвращающие связывание белка. Любая мутация, понижающая или предотвращающая связывание TL1a-связывающего белка, вероятно, находится в эпитопе, связывающимся белком. В этом тексте в качестве примера приводится одна из форм этого способа.

Другой способ включает связывание TL1a или его участка с иммобилизованным TL1a-связывающим белком по данному изобретению и усваивание получившегося комплекса с протеазой. Пептид, остающийся связанным с иммобилизованным белком, далее изолируют и анализируют, например, с помощью масс-спектрометрии для определения его последовательности.

Анализы аффинности.

При желании, можно определить константу диссоциации ($K_d$), или константу ассоциации ($K_a$), или константу равновесия ($K_D$) TL1a-связывающего белка для TL1a или пептида, включающего его эпитоп. Эти константы для TL1a-связывающего белка в одном примере измеряют с помощью анализа связывания радоимеченого или флуоресцентно-меченого TL1a. Этот анализ уравновешивает белок с минимальной концентрацией меченого TL1a в присутствии титрационной серии немеченного TL1a. После промывания для удаления несвязанного TL1, определяют количество носителя метки.

Измерения аффинности могут быть проведены по стандартной методике реакции антител, например путем иммунных анализов, поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Rich and Myszka Curr. Opin. Biotechnol. 11: 54, 2000; Englebienne Analyst. 123: 1599, 1998), изотермальной титрационной калориметрии (ITC) или других анализов кинетического взаимодействия, известных в этой области.

В одном примере реализации данного изобретения константы измеряют с помощью анализов поверхностного плазмонного резонанса, например с помощью BIAcore поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) с иммобилизованным TL1a или его участком. Примеры SPR способов описаны в US 7229619.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок, описанный в этом тексте в любом из примеров, обладает $K_D$ для TL1a размером 100 нмоль/л или менее, например 50 нмоль/л или менее, например 20 нмоль/л или менее, например 10 нмоль/л или менее или 6 нмоль/л или менее. Например, TL1a-связывающий белок имеет $K_D$, равную 5,5 нмоль/л или менее. Например, TL1a-связывающий белок имеет $K_D$, равную 5 нмоль/л или менее. Например, TL1a-связывающий белок имеет $K_D$, равную 4 нмоль/л или менее.

Анализы периода полураспада.

Некоторые TL1a-связывающие белки, описанные в данном изобретении, обладают улучшенным временем полураспада, например модифицированы для увеличения времени полураспада по сравнению с немодифицированными TL1a-связывающими белками. Способы определения TL1a-связывающих белков с улучшенным временем полураспада известны специалистам в этой области. Например, анализируется способность TL1a-связывающего белка связываться с неонатальным Fc рецептором (FcRn). В этом отношении улучшенная аффинность связывания с FcRn увеличивает время полураспада в сыворотке TL1a-связывающего белка (см., например, Kim et al., Eur. J. Immunol. 24: 2429, 1994).

Время полураспада TL1a-связывающего белка по данному изобретению можно также измерить с помощью фармакокинетических исследований, например, в соответствии с методикой, описанной в Kim et al., Eur. J. of Immunol. 24: 542, 1994. В соответствии с этой методикой радиомеченый TL1a-

связывающий белок внутривенно вводится мыши, и его концентрация в плазме периодически измеряется как функция от времени, например от 3 мин до 72 ч после инъекции. Полученная кривая должна быть двухфазной, т.е. состоять из альфа-фазы и бета-фазы. Для определения периода полураспада TL1a-связывающего белка in vivo рассчитывают скорость клиренса в бета-фазе и сравнивают с таковой у немодифицированного TL1a-связывающего белка или TL1a-связывающего белка дикого типа.

Анализы стабильности.

Стабильность TL1a-связывающего белка по данному изобретению может быть оценена с помощью любого из множества анализов. Например, TL1a-связывающий белок подвергается состоянию, например нагреву, или воздействию кислоты, или хранению в течение определенного времени (например, 1 месяц) при комнатной температуре. Агрегацию TL1a-связывающего белка можно оценить путем определения помутнения (по увеличению помутнения после воздействия состояния, означающему нестабильность), эксклюзионной хроматографии, невосстановительного гелевого электрофореза или с помощью исследования связывания или нейтрализации, описанного в этом тексте.

Фармацевтические композиции и способы лечения.

TL1a-связывающий белок по данному изобретению, или кодирующую его нуклеиновую кислоту, или экспрессирующую его клетку (syn. активный ингредиент) используют для парентерального, местного, орального или локального применения, аэрозольного применения или трансдермального применения для профилактического или терапевтического лечения.

Составы для применения, содержащие TL1a-связывающий белок, или кодирующую его нуклеиновую кислоту, или экспрессирующую его клетку, различаются в зависимости от выбранного способа применения и лекарственной формы (например, раствор, эмульсия, капсула). Подходящую фармацевтическую композицию, включающую TL1a-связывающий белок, или кодирующую его нуклеиновую кислоту, или экспрессирующую его клетку, можно приготовить с участием физиологически приемлемого носителя. Также можно использовать смесь TL1a-связывающих белков. Для растворов или эмульсий подходящие носители включают, например, водные или спирто-водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевой раствор и буферные растворы. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или жирные масла. Различные подходящие жидкие носители, известные специалисту в этой области, включают воду, буферный солевой раствор, полиолы (например, глицерол, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль), раствор декстрозы и глицин. Внутривенные носители могут включать различные добавки, консерванты или жидкости, питательные вещества или корректорные электролиты (см., в целом, Remington's Pharmaceutical Science, 16th Edition, Mack, Ed., 1980). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для корректировки физиологического состояния, такие как регуляторы pH и буферные агенты, и регуляторы токсичности, например ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция и лактат натрия. TL1a-связывающий белок по данному изобретению можно лиофилизировать для хранения и восстановить в подходящем носителе перед использованием в соответствии с известными с этой области технологиями лиофилизации и восстановления.

Оптимальную концентрацию активных ингредиентов в выбранной среде можно установить эмпирическим путем в соответствии с процедурами, хорошо знакомыми специалистам в этой области, и она будет зависеть от выбранного фармацевтического состава.

Интервал дозировок для введения TL1a-связывающего белка по данному изобретению связан с оказанием желаемого эффекта. Например, композиция содержит терапевтически или профилактически эффективное количество TL1a-связывающего белка, или кодирующей его нуклеиновой кислоты, или экспрессирующей его клетки.

При употреблении в этом документе термин "эффективное количество" означает количество TL1a-связывающего белка, нуклеиновой кислоты или клеток, достаточное для стимуляции/увеличения или ингибирования/уменьшения/предотвращения сигнального пути TL1a у субъекта. Специалист в данной области понимает, что такое количество может меняться в зависимости, например, от TL1a-связывающего белка, нуклеиновой кислоты или клеток, и/или конкретного субъекта, и/или типа и сложности состояния, нуждающегося в лечении. Соответственно, этот термин не должен восприниматься как ограничивающий данное изобретение определенным количеством, например всем количеством TL1a-связывающего белка, нуклеиновой кислоты или клеток.

При употреблении в этом документе термин "терапевтически эффективное количество" означает количество TL1a-связывающего белка, нуклеиновой кислоты или клеток, достаточное для уменьшения или ингибирования одного или нескольких симптомов состояния.

При употреблении в этом документе термин "профилактически эффективное количество" означает количество TL1a-связывающего белка, нуклеиновой кислоты или клеток, достаточное для предотвращения, или ингибирования, или задержки появления одного или нескольких обнаруживаемых симптомов состояния.

Дозировка не должна быть такой большой, чтобы вызвать нежелательные побочные эффекты, такие как синдром повышения вязкости крови, отек легких, ишемическую болезнь сердца и т.д. В целом, дозировка зависит от возраста, состояния, пола и тяжести болезни пациента и определяется специалистом в

этой области. В случае каких-либо осложнений дозировку может изменить лечащий врач. Дозировка может изменяться от приблизительно 0,1 до приблизительно 300 мг/кг, например от приблизительно 0,2 до приблизительно 200 мг/кг, например от приблизительно 0,5 до приблизительно 20 мг/кг, в составе одной или нескольких доз ежедневного приема, в течение одного или нескольких дней.

В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок вводят в дозировке от приблизительно 1 до приблизительно 15 мг/кг. В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок вводят в дозировке от приблизительно 2 до приблизительно 10 мг/кг. В одном примере реализации данного изобретения TL1a-связывающий белок вводят подкожно или внутривенно.

В некоторых примерах TL1a-связывающий белок или другой активный ингредиент вводят в начальной (или загрузочной) дозе, которая больше последующих (поддерживающих) доз. Например, связывающую молекулу вводят с начальной дозой от приблизительно 1 до приблизительно 30 мг/кг. Затем связывающую молекулу вводят в поддерживающей дозе от приблизительно 0,0001 до приблизительно 1 мг/кг. Поддерживающие дозы могут вводиться каждые 7-35 дней, например каждые 14, или 21, или 28 дней.

В некоторых примерах используется режим повышения дозы, при котором TL1a-связывающий белок или другой активный ингредиент вначале вводится в меньшей дозе, чем в последующий период. Этот режим дозировки пригоден в том случае, если субъект изначально страдает от побочных эффектов.

Если субъект не реагирует на лечение адекватным образом, можно вводить несколько доз в неделю. Альтернативным образом или дополнительно, можно вводить увеличивающиеся дозы.

Один или несколько TL1a-связывающих белков по данному изобретению можно вводить индивидууму соответствующим путем как в виде единственного лечения, так и в комбинации (до, одновременно, или после) с другим медикаментом или агентом. Например, TL1a-связывающий белок по данному изобретению можно использовать в комбинации с белками, например антагонистом TNF, анти-IL-12/23 антителом, противовоспалительным средством, кортикостероидом, метотрексатом или обезболивающим средством. TL1a-связывающий белок по данному изобретению можно использовать как отдельно вводимую композицию, назначаемую в сочетании с антибиотиками и/или противомикробными агентами.

Специалистам в данной области понятно, что TL1a-связывающие белки по данному изобретению можно вводить субъекту путем введения экспрессионной конструкции по данному изобретению или клетки, экспрессирующей TL1a-связывающий белок по данному изобретению. Можно использовать множество способов для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, в целевую клетку in vivo. Например, в нужную область можно вводить чистую нуклеиновую кислоту или инкапсулированную в липосомы или вводить посредством вирусного вектора.

Анализы обнаружения TL1a.

Нижеописанные анализы можно проводить в отношении TL1a-связывающего белка по данному изобретению, например TL1a-связывающего белка, конъюгированного с обнаруживаемой меткой, как обсуждалось в этом документе. Обнаружение TL1a с помощью анализа, описанного в этом тексте, полезно при диагностике или прогнозировании состояния.

Иммунологический анализ является примером анализа для диагностики состояния у субъекта или обнаружения TL1a в образце. Данное изобретение предполагает все формы иммунологических анализов, включая вестерн-блоттинг, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), твердофазный иммунофлуоресцентный анализ (FLISA), конкурентный анализ, радиоиммунный анализ, иммуноанализ латерального потока, иммуноанализ непрерывного потока, электрохемилюминесцентный анализ, нефелометрические анализы, турбидиметрический анализ и анализы клеточной сортировки с возбуждением флуоресценции (FACS).

Одной из форм подходящего иммунологического анализа является, например, ELISA или FLISA.

В одном варианте такой анализ включает иммобилизацию TL1a-связывающего белка по данному изобретению на твердой матрице, например на полистироловой или поликарбонатной микролунке или стержне, мембране или на стеклянной основе (например, на стеклянной пластинке). Проверяемый образец приводят в прямой контакт с TL1a-связывающим белком и TL1a в образце подвергается связыванию. После промывания для удаления несвязанного белка в образце белок, связывающийся с TL1a по дальнему эпитопу, приводят в прямой контакт со связанным TL1a. Этот детекторный белок обычно помечен с помощью обнаруживаемой репортерной молекулы, такой как, например, фермент (например, пероксидаза хрена (HRP), щелочная фосфатаза (AP) или β-галактозидаза) в случае ELISA, или флуорофор в случае FLISA. Альтернативным образом, можно использовать второй меченый белок, который связывается с белком-детектором. После промывания для удаления несвязанного белка обнаруживаемую репортерную молекулу обнаруживают путем добавления субстрата (в случае ELISA), такого как, например, перекись водорода, TMB, или толуидина, или 5-бром-4-хлор-3-индол-бета-D-галаотопиронозида (x-gal). Конечно, иммобилизованный (связанный) белок и детекторный белок можно использовать противоположным образом.

Затем уровень антигена в образце определяют с помощью стандартных кривых, построенных на основе известного количества маркера или на основе сравнения с контрольным образцом.

Вышеописанные анализы можно модифицировать для использования в качестве основы для обнаружения хемилюминесценции или электрохемилюминесценции.

Как известно специалисту в данной области, в целях данного изобретения можно использовать другие способы обнаружения, основанные на иммуносорбентном анализе. Например, иммуносорбентный способ основан на описании, приведенном выше, с использованием для обнаружения радиометки, или золотой метки (например, коллоидного золота), или липосомы, например, инкапсулирование NAD+ для обнаружения, или акридиниевого иммуносорбентного анализа.

В некоторых примерах по этому изобретению уровень TL1a определяют с помощью детектора поверхностного плазмонного резонанса (например, BIAcore™, GE Healthcare, Piscataway, N.J.), потока через устройство, например, как описано в US 7205159; микро- или наноиммунологического устройства (например, как описано в US 20030124619); устройства латерального потока (например, как описано в US 20040228761 или US 20040265926); флуоресцентного поляризационного иммуноанализа (FPIA, например, как описано в US 4593089 или US 4751190) или иммунонефелометрического анализа (например, как описано в US5571728 или US 6248597).

Образцы и контрольные образцы.

Как известно специалисту в этой области, некоторые примеры, описанные в этом тексте, требуют в некоторой степени количественного определения уровня TL1a. Такое количественное определение возможно при условии включения в анализы по данному изобретению подходящих контрольных образцов.

В одном примере реализации данного изобретения подходящий контрольный образец является образцом, происходящим от здорового субъекта или нормального субъекта.

В данном контексте термин "здоровый субъект" означает индивидуума, в отношении которого известно, что он не страдает от состояния, связанного с TL1a, например воспалительного состояния.

Термин "нормальный субъект" означает индивидуума, имеющего нормальный уровень TL1a в образце по сравнению с популяцией индивидуумов.

Данное изобретение также описывает контрольный образец как набор данных, полученный от нормального и/или здорового субъекта, или популяции нормальных и/или здоровых субъектов.

В одном примере реализации данного изобретения способ по данному изобретению дополнительно включает определение уровня TL1a в контрольном образце, например, способом, упомянутым в этом тексте.

В одном примере реализации данного изобретения образец от субъекта и контрольный образец анализируют приблизительно или в основном в одно и то же время.

В одном примере реализации данного изобретения образец от субъекта и контрольный образец анализируют одинаковыми способами, описанными в данном документе в одном или нескольких примерах, для создания возможности сравнения полученных результатов.

Состояния.

Примеры состояний, которые можно лечить/предотвращать/диагнозировать/прогнозировать способами, описанными в данном изобретении, включают аутоиммунные заболевания, воспалительные состояния и состояния, характеризующиеся недостаточным ангиогенезом.

В одном примере реализации данного изобретения состояние является аутоиммунным заболеванием.

Примеры состояний включают воспалительную болезнь кишечника (IBD), синдром раздраженного кишечника (IBS), болезнь Крона, язвенный колит, диветрикулез, системную красную волчанку, ревматоидный артрит, юношеский хронический артрит, спондилоартропатию, системный склероз (склеродерма), идиопатические воспалительные миопатии (болезнь Вагнера-Унферрихта-Хеппа, полимиозит), синдром Шегрена, системный васкулит, синдром Бенье-Бека-Шауманна, демиелинизирующие заболевания центральной и периферической нервной систем, такие как рассеянный склероз, идиопатическая полиневропатия, аутоиммунные и иммуносвязанные глазные заболевания, такие как аутоиммунный увеит и увеит, ассоциированный с различными васкулитами, аутоиммунные и иммунносвязанные кожные заболевания, включая буллезные кожные заболевания, полиморфная эритема и контактный дерматит, псориаз, аллергические заболевания легких, такие как астма, гиперчувствительность дыхательных путей, эозинофильная пневмония, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), идиопатический пульмонарный фиброз и гиперчувствительный пневмонит, атеросклероз и реакция "трансплантат против хозяина".

В одном примере реализации данного изобретения состоянием является артрит, например ревматоидный артрит, полиартрит, остеоартрит или спондилоартропатия. В этом отношении Bull et al., J. Exp. Med. 205: 2457, 2008 показали, что антитела, антагонизирующие TL1a, пригодны для лечения ревматоидного артрита. Выборочная природа TL1a-связывающих белков по данному изобретению делает их пригодными для лечения ревматоидного артрита.

В одном примере реализации данного изобретения состоянием является рассеянный склероз. В этом отношении в US 20090317388 показано, что у мышей, страдающих недостатком TL1a, не развивается экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (EAE), являющийся признанной моделью рассеянного склероза.

В одном примере реализации данного изобретения воспалительным состоянием является воспалительное состояние слизистой оболочки, например воспалительное заболевание кишечника (например, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона или неспецифический язвенный колит) или воспалительные заболевания легких (например, гиперреактивность дыхательных путей или астма).

В одном примере реализации данного изобретения состоянием является воспалительное заболевание кишечника и/или колит. В этом отношении Takedatsu et al., Gastroenterology 135: 552, 2008 показали, что антитела, антагонизирующие TL1a, пригодны для лечения колита.

В одном примере реализации данного изобретения состоянием является астма, или гиперчувствительность дыхательных путей, или хроническое обструктивное заболевание легких (COPD).

В другом примере состоянием является воспалительное заболевание кожи (например, аутоиммунное и иммунносвязанное кожное заболевание), например буллезное кожное заболевание, полиморфная эритема, контактный дерматит. Альтернативным образом, кожной болезнью является псориаз.

Примерами заболеваний, характеризующихся недостаточным ангиогенезом, являются сердечно-сосудистое заболевание, аутоиммунные состояния (например, ревматоидный артрит, псориатический артрит, системная красная волчанка (SLE) и склеродермия), антинейтрофильные цитоплазматические антитела (ANCA)-связанный васкулит, ишемия (включая ишемию, происходящую от трансплантата) или некроз.

Наборы.

Данное изобретение дополнительно описывает набор, включающий одно или несколько из следующих:

(i) TL1a-связывающий белок по данному изобретению или экспрессионная конструкция(и), его кодирующая;

(ii) клетка по данному изобретению или

(iii) фармацевтическая композиция по данному изобретению.

В случае набора для обнаружения TL1a он может дополнительно включать средства обнаружения, например, связанные с TL1a-связывающим белком по данному изобретению.

В случае набора для терапевтического/профилактического использования набор может дополнительно включать фармацевтически приемлемый носитель.

При необходимости, набор по данному изобретению упаковывается с приложением инструкции по применению способа, описанного в этом тексте согласно любому из примеров.

Данное изобретение включает следующие неограничивающие примеры.

Пример 1. Материалы и способы.

В следующих примерах ссылка на позицию остатка является ссылкой на позицию в соответствующей последовательности в соответствии с описанием в этом тексте, если не указано иначе.

1.1. Экспрессионная система HEK293/pTT5.

Для всех трансфекций с участием экспрессионной системы HEK293E/pTT5 (Durocher et al., Nucl. Acids Res., 30: E9, 2002), клетки HEK293E культивировали в полной клеточной питательной среде (1 л среды F17 (Invitrogen), 9 мл Pluronic F68 (Invitrogen), 2 ммоль/л Глютамин с содержанием 20% (вес./об.) Tryptone NI (Organotechnie) с Geneticin™ (50 мг/мл, Invitrogen) при 50 мкл/100 мл культуры). В день перед трансфекцией клетки собрали центрифугированием и повторно суспендировали в свежей среде без Geneticin™. На следующий день ДНК смешали с коммерческим трансфекционным реагентом и ДНК трансфекционную смесь добавили к культуре по каплям. Культуру инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% $CO_2$ и 120 об/мин без Geneticin™. На следующий день добавили 12,5 мл Tryptone и 250 мкл Geneticin™ на 500 мл культуры. Культуру инкубировали при 37°C, 5% $CO_2$ и 120 об/мин в течение 7 дней, затем собрали надосадочную жидкость и очистили ее.

1.2. TL1a белок.

Человеческий TL1a был куплен (Peprotech и Genscript: both E. coli-expressed) или произведен в млекопитающей HEK293E/pTT5 экспрессионной системе с использованием ДНК экспрессионной конструкции, кодированной для внеклеточного домена (ECD) человеческого TL1a с N-терминально расположенным HIS и FLAG метками (SEQ ID NO: 1). Надосадочную жидкость, содержащую секретированный TL1a белок, собрали с помощью центрифугирования при 2000g в течение 10 мин для удаления клеток. TL1a белок очистили от надосадочной жидкости с помощью HisTrap™ HP колонки (GE Healthcare). Элюированный белок экстрагировали с помощью буферного раствора в PBS с помощью HiLoad 16/60 Superdex 200 препаративной колонки (GE Healthcare) и ~70 кДа фракцию отделили с помощью гель-фильтрации на HiLoad 26/60 Superdex 200 препаративной колонке (GE Healthcare).

Для фаговых дисплейных экспериментов рекомбинантный человеческий TL1a (Peprotech, Genscript HEK293E-derived) биотинилировали с помощью набора EZ-link Sulfo-NHS-LC-биотин (Pierce) с соотношением 3:1 биотин:TL1a. Свободный биотин отделили от биотина с помощью диализа с PBS, используя Slide-A-Lyzer диализную кассету с отсечением молекулярного веса 3,5 кДа.

TL1a также был получен с меткой, позволяющей биотинилирование одной позиции. Этот TL1a белок экспрессировали в HEK-293 клетках и очищали, как описано ранее. Затем его биотинилировали с

помощью фермента, который селективно инкорпорирует биотин в TL1a белок.

1.3. Фаговый дисплей.

Антитела, специфически связывающиеся с TL1a, выделили из неизмененной фагмидной библиотеки, включающей более $10\times10^{10}$ индивидуальных человеческих FAb фрагментов.

Анти-TL1a антитела выделили их библиотеки фагового дисплея в ходе нескольких пэннинговых "кампаний" (т.е. отдельных фаговых дисплейных экспериментов с различными реагентами или условиями пэннинга). Общий протокол следовал способу, описанному у Marks и Bradbury (Methods Mol. Biol. 248:161-176, 2004).

Каждая кампания фагового дисплея включала три цикла пэннинга. Для каждого цикла $\sim1\times10^{13}$ фаговых частиц блокировали путем смешивания 1:1 с блокирующим буферным раствором (5% снятого латекса в солевом фосфатном буфере (PBS) pH 7,4) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Библиотеку блокированных фагов затем предварительно истощали на стрептовидиновые биндеры путем инкубирования в течение 45 мин с 100 мкл стрептавидин-связанными гранулами Dynabeads (Invitrogen), которые блокировали в соответствии с описанием для библиотеки. Затем от гранул (с прикрепленными стрептавидиновыми биндерами) избавлялись после стадии инкубации.

Рекомбинантный человеческий TL1a антиген получали для пэннинга путем захвата на поверхность стрептавидин-связанных гранул Dynabeads (Invitrogen). Для этого 10-100 пмоль биотинилированного TL1a инкубировали с 100 мкл гранул в течение 45 мин при комнатной температуре. Полученные комплексы гранула-TL1a промывали PBS для удаления свободного TL1a и использовали в последующих реакциях пэннинга.

Пэннинг библиотеки проводили путем смешивания блокированной и предварительно истощенной библиотеки с комплексами гранула-TL1a в 1,5 мл микроцентрифужных кюветах с вращением в течение 2 ч при комнатной температуре. Неспецифически связанные фаги удаляли путем ряда промываний. Каждое промывание включало перемещение гранул с комплексами из раствора на стенку кюветы с помощью магнитов, отсасывание надосадочной жидкости и повторное суспендирование гранул в свежем буферном растворе. Это повторяли несколько раз с PBS промывочным буферным раствором (PBS с 0,5% снятого латекса) или PBS-T промывочным буферным раствором (PBS с 0,05% TWEEN-20 (Sigma) и 0,5% снятого латекса). Фаги, оставшиеся связанными после промывки, элюировали от комплексов гранула-TL1a путем инкубации с 0,5 мл 100 ммоль/л триэтиламина (TEA) (Merck) в течение 20 мин при комнатной температуре. Элюированные фаги нейтрализовали добавлением 0,25 мл 1 M Tris-HCl pH 7,4 (Sigma).

В конце первого и второго циклов пэннинга полученные фаги добавляли к 10 мл культуры экспоненциально растущих TG1 E.coli (триптон-дрожжевая (YT) растительная среда) и позволяли инфицировать клетки путем инкубации в течение 30 мин при 37°C без встряхивания, затем со встряхиванием при 250 об/мин в течение 30 мин. Фагемиды, кодирующие фаговый дисплей, собирали в виде фаговых частиц, следуя стандартному протоколу (Marks и Bradbury, supra).

В конце третьего цикла пэннинга клетки TG1 инфицировали полученными фагами, но помещали клетки на твердую YT растительную среду (с добавкой 2% глюкозы и 100 мкг/мл карбенициллина) с достаточным разбавлением для производства отдельных колоний E.coli. Эти колонии использовали для инокуляции 1 мл жидкой культуры для экспрессии FAb фрагментов для использования в скрининговых экспериментах.

1.4. SPR скрининг FAb на связывание TL1a.

Каждую индивидуальную колонию E.coli использовали для экспрессии Fab, который можно подвергнуть скринингу на TL1a-связывающую активность. Колонии инокулировали в 1 мл YT заквасочной культуры (с добавкой 100 мкг/мл карбенициллина и 2% глюкозы) на глубоком 96-луночном планшете (Costar) и инкубировали в течение ночи при 30°C со встряхиванием при 650 об/мин. Эти заквасочные культуры разбавили 1:50 в 1 мл экспрессионную культуру (YT с добавкой 100 мкг/мл карбенициллина) и выращивали до оптической плотности 0,8-1,0 при 600 нм. Экспрессию FAb стимулировали добавлением изопропил-бета-D-тиагалактопиранозида до конечной концентрации в 1 ммоль/л. Культуры инкубировали при 20°C в течение 16 ч.

Образцы FAb готовили путем сбора клеток центрифугированием (2500g, 10 мин) и проведением периплазматической экстракции. Клеточную таблетку повторно суспендировали в 75 мкл экстракционного буфера (30 ммоль/л Tris-HCl, pH 8.0, 1 ммоль/л EDTA, 20% сахарозы) и встряхивали при 1000 об/мин в течение 10 мин при 4°C. Приготовление экстракта завершали добавлением 225 мкл $H_2O$, встряхиванием при 1000 об/мин в течение 1 ч и осветлением экстракта центрифугированием при 2500g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отделяли, фильтровали через платины-отделители молекулярного веса Acroprep 100 кДа (Pall Corporation) и хранили при 4°C для использования в дальнейших экспериментах.

Образцы FAb подвергали скринингу на TL1a-связывающую активность с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Высокоэффективный скрининг SPR проводили с помощью BIAcore 4000 Biosensor (GE Healthcare) в однопроходном анализе одной концентрации. Приблизительно 10,000 RU антитела antiV5 (Invitrogen cat # R960CUS) иммобилизовали на чипе CM5 Series S Sensor chip, с помощью стандартного аминного присоединения при pH 5,5 в точках 1, 2, 4 и 5 каждых четырех кле-

ток, оставляя точку 3 нетронутой. Использовали буфер HBS-EP+ (GE Healthcare) и все взаимодействия измеряли при 25°C, сбор данных производили при 10Hz. Сырые периплазматические составы V5-tagged FAbs разбавляли в два раза в текущем буфере перед отбором при скорости потока 10 мкл/мин в течение 100 с (обычно отбирали около 200RU FAb) в точках 1 или 5 каждой клетки. После короткого стабилизационного периода человеческий TL1a тример пропускали через все точки всех четырех клеток одновременно со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 100 с. Диссоциацию взаимодействия измеряли в течение 100 с перед обратной регенерацией в антитело antiV5 с помощью 30 с пульса 100 ммоль/л фосфорной кислоты. Полученные сенсограммы сравнивали с соседними точками antiV5 антитела для каждой клетки и выравнивали с помощью 1:1 уравнения Ленгмюра для определения $K_a$, $K_d$ и $K_D$.

Данные SPR скрининга использовали для выбора потенциальных TL1a-биндеров. Значения FAb $K_d$ упорядочивали и 200 самых сильных биндеров использовали для анализа последовательности ДНК. FAb с уникальными последовательностями выбирали для конверсии в полноразмерные человеческие IgG1 антитела.

1.5. Секвенирование вариабельных участков.

Секвенирование ДНК проводилось группой Applied Genetic Diagnostics департамента патологии Мельбурнского университета (Мельбурн, Австралия). Фагмидную ДНК (~500 нг) смешивали с 5 пмоль соответствующего праймера для секвенирования Fab $V_H$ или $V_L$ цепи. Реакции секвенирования проводили с помощью набора циклического секвенирования BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы анализировали капиллярным разделением на 3130xl генетическом анализаторе (Applied Biosystems). Данные хроматограмм последовательностей анализировали с помощью программного пакета Chromas Lite (Technelysium, Brisbane, QLD, Australia). Текстовые файлы последовательностей транслировали на аминокислотные последовательности и анализировали с помощью программного пакета SeqAgent (Xoma, Berkely, CA, USA).

1.6. Создание векторов, экспрессирующих антитела.

$V_H$ аминокислотные цепи экспрессировали с человеческим константным участком (человеческим IgG1 тяжелоцепочечный $C_H1$, шарнир, $C_H2$ и $C_H3$ домены (например, SwissProt No. P01857)). Это было достигнуто обратной трансляцией аминокислотных последовательностей в DNA последовательности, синтезированные de novo сборкой синтетических олигонуклеотидов. После синтеза генов целую последовательность субклонировали в несколько точек клонирования тяжелоцепочечного вектора pTT5 (Durocher et al., Nucl. Acids Res. 30: E9, 2002). $V_L$ аминокислотные цепи экспрессировали с человеческим каппа легкоцепочечным константным участком (SwissProt No. P01834.1) или человеческим лямбда легкоцепочечным константным участком (SwissProt No. P0CG05,1) субклонированием последовательности в несколько точек легкоцепочечного вектора pTT5.

Альтернативным образом, FAb $V_H$ и $V_L$ последовательности были амплифицированы напрямую из фагмидов ДНК с помощью PCR и субклонированы в IgG экспрессионные векторы. Реакции PCR проводили с помощью набора Platinum PCR Supermix kit (Invitrogen) по инструкции производителя. Приблизительно 50 нг эталонного фагмида ДНК, кодирующего Fab, смешали с 10 пмоль соответствующих прямого и обратного PCR праймеров и реагентом PCR Supermix до общего объема 50 мкл. В каждой реакции использовали специфичный к последовательности прямой праймер в комбинации с со стандартным $V_H$ или $V_L$ специфичным обратным праймером. Для облегчения клонирования в IgG экспрессионные векторы, праймеры для $V_H$ амплификации использовались для добавления 5' BsiWI и 3' NheI рестрикцонных ферментных центров, праймеры для $V_L$-каппа амплификации добавляли 5' BssHII и 3' BsiWI центры и праймеры для $V_L$-лямбда амплификации добавляли 5' BssHII и 3' AvrII центры.

PCR проводили в тонкостенных PCR 96-луночных системах GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems, Scoresby, Victoria, Australia). Циклические условия включали начальную пятиминутную денатурацию при 94°C, с последующими 30 циклами амплификации (денатурация при 94°C в течение 30 с, затем ренатурация праймера при 55°C в течение 30 с, затем удлинение при 68°C в течение 30-90 с) и финальную стадию удлинения при 68°C в течение 7 мин. Амплифицированные $V_H$ гены очищали с помощью набора для очищения Minelute PCR purification kit (Qiagen), ферментировали с BsiWI и NheI ферментами (New England Biolabs) и переочищали с помощью набора для очищения Minelute Reaction Clean-up kit (Qiagen). Амплифицированные $V_L$-каппа гены получали подобным образом, но ферментирование проводили с помощью BssHII и BsiWI. Амплифицированные $V_L$-лямбда гены также получали подобным образом, но ферментирование проводили с помощью BssHII и AvrII. Полученные $V_H$ и $V_L$ генные фрагменты клонировали в мультиклонировочный центр соответствующего pTT5 тяжело- или легкоцепочечного вектора (каппа- или лямбда легкоцепочечного), как описано выше.

1.7. Экспрессия и очистка антител.

Тяжело- и легкоцепочечные ДНК со-трансфектировали в HEK293/pTT5 экспрессионную систему и культивировали 7 дней. Надосадочные жидкости, полученные от этих трансфекций, отрегулировали до pH 7,4 перед загрузкой на колонку HiTrap Protein A (5 мл, GE Healthcare). Колонку промывали 50 мл PBS (pH 7,4). Элюирование проводили с помощью 0,1 М лимонной кислоты pH 2,5, элюированное антитело опресняли с помощью колонок Zeba Desalting (Pierce) в PBS (pH 7,4). Антитело анализировали с помо-

щью SDS-PAGE. Концентрацию антитела определяли с помощью набора BCA assay kit (Pierce). Для конверсии между концентрациями антитела в мкг/мл и молярные концентрации для всех антител использовали предполагаемый молекулярный вес 150 кДа.

1.8. Анализ активности клеточной линии TF-1.

Для определения того, какие анти-TL1a антитела функционально нейтрализуют биологическую активность TL1a, антитела проверяли на их способность нейтрализовывать TL1a-стимулированный апоптоз в клеточной линии TF-1. Человеческую эритролейкемийную клеточную линию TF-1 (ATCC: CRL-2003) содержали в культуре в стандартных условиях. TF-1 клетки ($7{,}5\times10^4$ на лунку) инкубировали на черных 96-луночных планшетах (Greiner) с рекомбинантным человеческим TL1a 100 нг/мл и циклогексимидом 10 мкг/мл для стимулирования апоптоза. Проверяемые антитела с концентрацией 10 мкг/мл (66,7 нмоль/л) или менее добавили на планшеты и инкубировали в течение 4-5 ч. Стимуляцию апоптоза оценивали с помощью набора Homogeneous Caspases Kit (Roche) в соответствии с инструкциями производителя. В экспериментах по проверке способности антител нейтрализовывать функцию TL1a у яванских макак и макак резус, мышей, крыс, морских свинок, свиней и кроликов соответствующие TL1a замещали человеческим TL1a в рамках этого протокола.

Данные нормализовали, выражая их в процентах от максимального апоптоза (уровня апоптоза, достигаемого рекомбинантным человеческим TL1a плюс циклогексимид в отсутствие анти-TL1a антител).

1.9. Рецепторная селективность ведущих антитела.

TL1a связывается с его родственным сигнальным рецептором, DR3, и рецептором-ловушкой, DcR3, который также служит рецептором-ловушкой для членов семейства TNF Fas-L и LIGHT.

Антитела анализировали на их способность ингибировать связывание TL1a с его рецепторами в конкурентном иммуноферментном анализе ELISA. DR3/Fc Chimera (R&D Systems) или DcR3/Fc Chimera (R&D Systems) наносили на 96-луночный планшет (Maxisorp, Nunc) с концентрацией 2 мкг/мл. Серийно разбавленные проверяемые антитела предварительно инкубировали с моносайтовым биотинилированным рекомбинантным человеческим TL1a 1 мкг/мл в течение 30 мин, затем добавляли к лункам, покрытым DR3/Fc или DcR3/Fc. Связанный TL1a определяли с помощью стрептавидин-пероксидаза хрена 1:2000 (BD Pharmingen). Данные нормализовали, выражая их в процентах от максимального связывания TL1a с рецептором в отсутствие анти-TL1a антитела.

Антитело, описанное как ингибирующее активность TL1a (1B4; имеющий $V_H$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 119, и $V_L$, содержащий последовательность, описанную в SEQ ID NO: 120, описанный в WO 2009/064854 и публикации патентной заявки США № 200900280116), было включено в анализ для сравнения.

1.10. Картирование эпитопов.

Картирование эпитопов проводили с помощью экспериментов аланин-сканирования. Модельный анализ проводили для определения возможных доступных остатков на TL1a. Затем создавали TL1a конструкции, у которых каждый из этих теоретически доступных остатков заменяли аланином. Эти конструкции затем экспрессировали и надосадочную жидкость экспрессионных культур проверяли на экспрессию белка и связывание с анти-TL1a антителом C320 с помощью SPR. Сенсорный чип Ni-NTA (Biacore) использовали для захвата HIS маркированного TL1a мутеина из надосадочной жидкости трансфектированных HEK-293E клеток. Мутеин захватывали в проточной ячейке 2 (или 4) и затем пропускали C320 через проточную ячейку 1+2 (или 3+4). Экспрессию мутеина (RU) определяли по изменению в RU в конце введения мутеина. Связывание C320 (RU) определяли по изменению в RU, определяемому в конце введения C320.

TL1a конструкции, которые экспрессировались, но очевидно теряли связь с C320, повторно трансфектировали и очищали для анализа ELISA. Планшеты ELISA покрывали поликлональным кроличьим античеловеческим TL1a (Peprotech) (1 мкг/мл), DR3/Fc химерой (R&D systems) (2 мкг/мл) или DcR3/Fc химерой (R&D systems) (1 мкг/мл). TL1a мутеины или незамещенные TL1a добавляли на планшеты с концентрацией 1 мкг/мл. Связанный TL1a определяли с помощью биотинилированного поликлонального кроличьего античеловеческого TL1a (Peprotech) (250 нг/мл) и стрептавидин-пероксидазы хрена (BD Pharmingen) 1:2000. Конструкции, определяемые с помощью поликлонального анти-TL1a, считались должным образом экспрессированными и свернутыми. Должным образом экспрессированные и свернутые конструкции, которые не связывались с одним или другим рецептором, считались важными для связывания TL1a с этим рецептором. Связывание проверяемых антител с TL1a мутеинами проверяли с помощью прямого анализа ELISA. Планшеты ELISA покрывали различными TL1a мутеинами (1 мкг/мл). Затем добавляли серийно разбавленные проверяемые антитела и связанные антитела определяли с помощью античеловеческий IgG-пероксидазы хрена (Invitrogen) 1:2000. Связывание проверяемых антител с различными изоформами TL1a определяли таким же способом.

1.11. Создание мембрано-связанной клеточной линии, экспрессирующей TL1a (mbTL1a).

HEK 293 клетки электропорировали с вектором, содержащим последовательность, кодирующую полную длину TL1a (SEQ ID NO: 123), и содержали в селективной среде (среде с добавкой бластицидина 6 мкг/мл). После нескольких циклов клетки проверяли на поверхностную экспрессию TL1a с помощью

проточной цитометрии. $2,5\times10^5$ клеток/лунку помещали на 96-луночные круглодонные планшеты (Coming) и инкубировали с биотинилированным поликлональным кроличьим античеловеческим TL1a (Peprotech) на льду в течение 30 мин. Образцы промывали и затем инкубировали со стрептавидин-FITC в течение еще 30 мин на льду. Затем образцы промывали, повторно суспендировали и анализировали с помощью проточной цитометрии.

1.12. Проточная цитометрия.

После подтверждения стабильной экспрессии TL1a на клеточной поверхности (как описано в примере 1.10) антитела C320, C321 и C323 подвергали скринингу с помощью как трансфектированных, так и не трансфектированных клеток ($2,5\times10^5$ клеток на лунку в 96-луночных круглодонных планшетах (Corning)) с уменьшающейся концентрацией, начиная с 10 мкг/мл. Для обнаружения антител использовали поликлональный козий античеловеческий IgG-FITC (Sigma) с разбавлением 1:200. Анти-TL1a антитело 1B4 использовали для сравнения.

1.13. Ингибирование производства цитокинов.

Для дальнейшей характеризации антител, описанных в этом тексте, проверяли их действие на первичные человеческие клетки. Для подтверждения производства эндогенного TL1a, PBMC выделяли из лейкоцитарной пленки с помощью градиента лимфопреп (Nycomed) и культивировали в 96-луночных планшетах для культивирования тканей (Coming) с конканавалином A при уменьшающихся концентрациях начиная с 2 мкг/мл. Планшеты инкубировали в течение ночи, затем собирали надосадочную жидкость и анализировали на TL1a с помощью набора человеческого TL1a ELISA (Peprotech).

Дополнительно, собирали склеенные клетки и анализировали их на экспрессию TL1a с помощью проточной цитометрии с биотинилированным античеловеческим TL1a (Peprotech) 1:100 и стрептавидин-FITC (Zymed) 1:200.

1.14. Эксперименты по изоэлектрической гель-фокусировке.

Изоэлектрическое гелевое фокусирование проводили с помощью NOVEX© Xcell Surelock™ системы (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя.

1.15. HPLC белка A.

Надосадочные жидкости клеток HEK-293E, трансфектированные для временной экспрессии антител, анализировали с помощью HPLC белка A на POROS A/20 2,1×30 мм Id колонке (Applied Biosystems), соединенной с хроматографической системой Agilent 1100. Колонку уравновешивали фосфатным солевым буферным раствором (PBS) pH 7,4. Загружали 0,2 мл надосадочной жидкости HEK-293E, содержащей белок, элюировали PBS отрегулированным до pH 2,2. Хроматограммы при длине волны 215 или 280 нм интегрировали с помощью программного обеспечения производителя и рассчитывали площадь под кривой (AUC).

1.16. Определение экспрессии антитела и связывания антигена с помощью SPR.

Используя сенсорный чип CM5 (Biacore), белок A соединяли с поверхностью чипа с помощью аминного присоединения. Белок A соединяли с проточной ячейкой 1 и 2 (или альтернативным образом 3 и 4) с помощью Biacore 3000. Клеточную надосадочную жидкость клеток HEK-293, содержащую антитела, пропускали над поверхностью проточной ячейки 2, при этом буфер (HBS-EP) пропускали над проточной ячейкой 1. В конце инъекции надосадочной жидкости измеряли заряд в сработавших ячейках. Это значение учитывалось как захват белка A (SPR). Процент экспрессии представляет захват белка A (SPR) проверяемого антитела как процент захвата белка A (SPR) из C320 в этом же эксперименте. Для определения связывания антителом TL1a, TL1a пропускали над проточной ячейкой 1 и 2.

Сенсограммы представляли с двойной ссылкой (проточную ячейку 2 вычитали из проточной ячейки 1 и буфера).

Пример 2. Результаты фагового дисплея.

Рекомбинантый человеческий TL1a подвергали операциям фагового дисплея. Шесть отдельных операций проводили с использованием рекомбинантного бактериально-экспрессированного TL1a. Выделили небольшое число Fab, связанных с TL1a, и не выделили нейтрализующих антител.

Последующие операции проводили с TL1a, экспрессирующимся млекопитающими. Процент выделенных Fab, связывающих TL1a, был существенно выше при использовании TL1a, происходящих от млекопитающих, чем при использовании TL1a бактериального происхождения. Количество Fab, демонстрирующих связывание TL1a во всех фаговых дисплейных операциях, превышает 200. Из них было идентифицировано 55 FAb с уникальными последовательностями, из которых 29 было выбрано для конверсии в полноразмерные IgG1 антитела.

Пример 3. Нейтрализация активности TL1a.

Способность полноразмерных IgG1 антител, включающих FAb, выделенных с помощью фагового дисплея, ингибировать или уменьшать TL1a-стимулированный апоптоз оценивали в соответствии с вышеприведенным описанием (пример 1.8). В этих условиях 15/29 проверенных антител продемонстрировали более чем 50% ингибирование TL1a-стимулированного апоптоза (фиг. 2). Эти антитела включают C319, C320, C321, C323, C333, C334, C335, C336.

Эти данные демонстрируют, что, хотя можно выделить целые антитела, связывающиеся с TL1a, только небольшое их количество обладает специфичностью, необходимой для функционального ингибирования активности TL1a.

В группе антител, демонстрирующих ингибирование рекомбинантного человеческого TL1a, профили относительного ингибирования каждого антитело оценивали с помощью значения $EC_{50}$ (табл. 4 и фиг. 3). Только антитела C320, C321 и C323 обладают ингибиторным значением $EC_{50}$ 1 нмоль/л или менее.

Таблица 4

Значения $EC_{50}$ антител для ингибирования TL1a-стимулированного апоптоза

| Обозначение антитела | Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO) | Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO) | $EC_{50}$ ( нмоль/л) |
|---|---|---|---|
| C336 | 2 | 6 | 4,05 |
| C334 | 10 | 14 | 22,14 |
| C333 | 18 | 22 | 2,34 |
| C323 | 26 | 30 | 0,99 |
| C321 | 34 | 38 | 0,56 |
| C320 | 42 | 46 | 0,31 |
| C319 | 50 | 54 | 11,17 |
| 1B4 | 74 | 75 | 3,37 |

Пример 4. Рецепторная селективность.

Антитела C320, C321 и C323 ингибируют взаимодействие TL1a с DR3 (фиг. 4A) но не ингибируют взаимодействие TL1a с DcR3 (фиг. 4B). С помощью такого же анализа было показано, что антитела C319, C333, C334 и C336 демонстрируют такую же селективную нейтрализацию.

С помощью подобного анализа было показано, что связывание антитела C320 и его производных описанных ниже, особенно C320-168 и C320-179, ингибирует взаимодействие TL1a с DR3 (фиг. 4C) с $EC_{50}$ 1 нмоль/л или менее. Эти антитела также не ингибируют взаимодействие TL1a с DcR3 (фиг. 4D) при проверке с концентрацией от 0,1 до 100 мкг/мл. Эти результаты контрастируют с таковыми для антитела C300-25 и 1B4. В этом отношении антитело C300-25 является крысиным моноклональным антителом, полученным авторами данного изобретения.

Таблица 5

Значения $EC_{50}$ антител для ингибирования TL1a взаимодействия рецепторами DR3 и DcR3

| Антитело | $EC_{50}$ ( нмоль/л) | |
|---|---|---|
| | DR3 | DcR3 |
| C320 | 0,97 | DNI |
| C320-179 | 0,72 | DNI |
| C320-168 | 0,97 | DNI |
| C300-25 | 13.5 | 9.84 |
| 1B4 | 17,8 | 26.5 |

DNI - не ингибирует.

Было показано, что DR3 и DcR3 конкурируют при связывании TL1a. Поэтому было неожиданно, что антитела были выделены со специфичностью, будучи нацеленными на эпитоп TL1a, нейтрализующий DR3, но не DcR3. Эти результаты указывают на то, что описанные здесь антитела способны предотвращать активность TL1a через его родственный рецептор DR3 без нарушения как естественной антагонистической функции DcR3, так и гомеостатического баланса связывания DcR3. Без связи с какой-либо теорией или механизмом действия такое селективное ингибирование может быть биологически значимым, поскольку DcR3 регулирует количество свободных Fas-L и LIGHT, доступных для связывания с их родственными сигнальными рецепторами (Fas и H-VEM соответственно). Следовательно, ингибирование взаимодействия между TL1a и DcR3 может привести к увеличению количества Fas-L и LIGHT, связанных с DcR3, тем самым понижая количество, доступное для сигнальных путей через родственные рецепторы. Так как Fas-связанное уничтожение играет роль в контроле рака, потенциальные нисходящие последствия увеличения количества DcR3, связывающегося с Fas-L, могут включать повышение восприимчивости к раку. Также без связи с какой-либо теорией или механизмом действия выделение антител, специфично ингибирующих взаимодействие TL1a и DR3, но не DcR3, может быть полезным при лечении заболеваний без понижения уровня безопасности.

Пример 5. Картирование эпитопов.

Аминокислотные замещения были произведены в последовательности растворимого TL1a (SEQ ID NO: 202) для генерирования ряда TL1a мутеинов.

С помощью основанного на SPR анализа мутеинов, описанного в примере 1.10, TL1a мутеины в надосадочных жидкостях трансфектированных HEK-293E клеток проверяли на уровни экспрессии и связывание с C320, результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6

Экспрессирование и связывание растворимого человеческого TL1a и его мутеинов с антителом C320

| **Аминокислотное замещение** | **Экспрессия мутеина (RU)** | **C320 связывание (RU)** | **Аминокислотное замещение** | **Экспрессия мутеина (RU)** | **C320 связывание (RU)** |
|---|---|---|---|---|---|
| Дикий тип | 3244,9 | 125,6 | A55S | 2933,1 | 33,2 |
| L1A | 3264,3 | 115 | A55L | 2746,5 | -7,6 |
| K2A | 3094,4 | 152 | A55R | 2307,7 | -12,3 |
| Q4A | 3366,2 | 120 | A55G | 1991,2 | -5,8 |
| E5A | 3086,5 | 360,4 | A55D | 2386,5 | -21,1 |
| F6A | 2948,3 | 240,2 | T57A | 3335,6 | 42,7 |
| P8A | 3455,9 | 124.3 | K58A | 3241,5 | 4,3 |
| S9A | 3594,2 | 94.5 | N59A | 3382,9 | 73,8 |
| H10A | 3372,5 | 122,7 | R60A | 3405,8 | 116,5 |
| Q11A | 3572,9 | 71,4 | N62A | 3264,9 | 117,4 |
| Q12A | 3098,5 | 193,8 | T64A | 3083,6 | 289,8 |
| V13A | 3213,9 | 167,8 | N65A | 3226,8 | 156,6 |
| Y14A | 2883,5 | 401 | K66A | 3183,3 | 27,1 |
| P16A | 2938 | 225 | F67A | 3216,1 | 304,7 |
| L17A | 2904,1 | 194,5 | L69A | 3389,8 | 212,6 |
| R18A | 3102,5 | 132,2 | E72A | 3171,5 | 136,2 |
| D20A | 3247,6 | 154,6 | S73A | 3129,3 | 146 |
| G21S | 2915,3 | 184,8 | R85A | 3047,1 | -33,5 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| G21L | 3424.4 | 72,8 | M87A | 3161,2 | 46,1 |
| G21R | 3197 | 116,2 | S89A | 3600,3 | 10,8 |
| G21A | 3483 | 85 | E90A | 3129,7 | 1089,1 |
| G21D | 3032 | 158,6 | E93A | 3181,6 | 343,9 |
| D22A | 3185,6 | 169,8 | I94A | 3125,1 | 352,3 |
| R32A | 3103,7 | -36,5 | R95A | 3634,8 | 28,8 |
| T34A | 3278,7 | 389,2 | Q96A | 3256,5 | 149,4 |
| P35A | 3385 | -28,6 | R99A | 3351,3 | 105,2 |
| T36A | 2771,9 | 486,1 | P100A | 2898,5 | 199,5 |
| Q37A | 2789,3 | 319,2 | K102A | 3420,8 | 155,7 |
| H38A | 3133 | 147,4 | D104A | 2982,9 | 533,2 |
| F39A | 2509,8 | 445,5 | S105A | 3425,8 | 127,1 |
| K40A | 3213,5 | 55,5 | D115A | 3648,5 | 110,1 |
| N41A | 2967,5 | 248,5 | S116A | 2962,4 | 282,1 |
| Q42A | 3073 | 175,7 | Y117A | 3323,8 | 189,8 |
| F43A | 3245,8 | 109,3 | P118A | 3254,9 | 161,7 |
| P44A | 3180,1 | 200,4 | E119A | 3263,7 | 278,5 |
| A45S | 3407,3 | 61,5 | P120A | 3143 | 164,8 |
| A45L | 3087,7 | 35,6 | Q122A | 3189 | 148,5 |
| A45R | 3167 | 107,2 | S135A | 3109,4 | 95,4 |
| A45G | 3385,9 | 77,1 | F138A | 3496,7 | 21 |
| A45D | 3395,1 | 38,9 | S148A | 2883,9 | 228,7 |
| H47A | 3466,4 | 159,1 | Q150A | 3151,1 | 193,5 |
| H50A | 3249,3 | 132,4 | E151A | 3796,5 | 90,8 |
| E51A | 3136,5 | 33,8 | K154A | 3610,3 | 86,7 |
| L52A | 3105,5 | 52,7 | S160A | 1272,2 | 901,6 |
| G53S | 3238,5 | 19 | D161A | 3391,4 | 223,4 |
| G53L | 1299,7 | -3,9 | I162A | 3139,2 | 72,4 |
| G53R | 3796,7 | 7,2 | S163A | 3054 | 481 |
| G53A | 3652,4 | -4,8 | Y167A | 2942,2 | 70,7 |
| G53D | 2130,3 | -6,1 | T168A | 3335,1 | 2,6 |
| | | | K169A | 3005 | 69,7 |
| | | | E170A | 3418,7 | 16 |

Мутеины, которые хорошо экспрессируются (мутеины с экспрессией больше чем 2000 RU) но не связывают антитело C320 (связывание TL1a менее чем 17 RU), были выбраны для дальнейшего анализа.

Мутеины с замещениями у аминокислот G53 и A55 экспрессируются плохо и обладают пониженной связываемостью с поликлональным анти-TL1a, что позволяет предположить что они являются важными остатками для структурной целостности TL1a. Все другие мутеины экспрессировались адекватно, связывались с поликлональными анти-TL1a и вели себя эквивалентно дикому типу TL1a на понижающем и не понижающем SDS-PAGE геле. Эти характеристики позволяют предположить, что мутеины были должным образом экспрессированы и сложены в TL1a белки.

Мутеины проявляли различный характер связывания с различными моноклинальными анти-TL1a антителами, описанными в этом тексте. Антитела C320, C320-168 и C320-179 не связывали в достаточной для обнаружения степени мутеины R32A и R85A или мутеины, содержащие оба этих замещения (фиг. 5A и 5B). C320 также продемонстрировало незначительное связывание с P35A, T168A и E170A мутеинами, тогда как C320-168 и C320-179 показали пониженное связывание с этими мутеинами, но не в такой же степени, как C320. Напротив, TL1a-связывающие антитела 1B4 и 16H2 продемонстрировали связывание с мутеинами R32A, R85A, P35A, T168A, на 50% большее, чем TL1a дикого типа, что свидетельствует о том, что аминокислоты в этих позициях не важны для связывания 1B4 и 16H2 с TL1a.

Учитывая, что антитела C320, C320-168 и C320-179 ингибируют связывание TL1a с DR3, но не DcR3, эти антитела скорее всего связываются с аминокислотами, вовлеченными в связывание DR3 с TL1a, и нарушают это взаимодействие. DR3, но не DcR3, демонстрирует существенно меньшее связывание с R32A и R85A мутеинами, что позволяет предположить, что эти остатки вовлечены в связывание TL1a с DR3 (фиг. 5C).

Центр связывания антител C320, C320-168 и C320-179 с TL1a продемонстрирован на фиг. 5D. Как видно из диаграммы, остатки R32 и R85, будучи разнесенными в первичной аминокислотной последовательности, расположены рядом друг с другом в третичной структуре белка. Поэтому их можно считать ключевыми остатками в эпитопе на TL1a, с которыми связываются антитела C320, C320-168 и C320-179.

Пример 6. Исследование связывания антител с TL1a клеточной поверхности.

TL1a, как большинство членов суперсемейства TNF-лигандов, присутствует в клеточно-поверхностной форме, которая отделяется с образованием растворимого TL1a, и как другие члены, мембранная форма TL1 (mbTL1a) обладает биологической функцией. Поэтому для нейтрализации активности TL1a полезно иметь антитела, хорошо связывающие и мембранный, и растворимый TL1a. Антитела, демонстрирующие функциональное ингибирование TL1a, подвергали скринингу при помощи проточной цитометрии на линии человеческих клеток, трансфектированных с мембранно-прикрепленным TL1a (полученным, как описано в примере 1.11).

Все антитела C320, C321, C323 и 1B4 связываются с TL1a трансфектированной клеточной линией (фиг. 6) с $EC_{50}$ равной 0,5-2 нмоль/л, но не с нормальными нетрансфектированными клетками.

Для дальнейшего исследования антител, описанных в этом тексте, проверяли их действие на первичных человеческих клетках. PBMC выделяли, как описано в примере 1.12. В условиях анализа, описанных в примере 1.13, эти клетки продемонстрировали производство как mbTL1a (фиг. 7A), так и растворимого TL1a (фиг. 7B).

PBMC стимулировали, как описано в примере 1.13, и анализировали на производство цитокина в присутствии анти-TL1a антител. Так как к клеточной культуре не добавляли экзогенный TL1a, действие анти-TL1a антител было основано на нейтрализации эндогенного TL1a. Антитела C320 и C323 продемонстрировали хорошее ингибирование производства цитокина в PBMC, стимулированного эндогенным TL1a (фиг. 8). Это ингибирование было очевидно на цитокинах, обычно производимых клетками Th1 (IFN-γ; фиг. 8A) и Th2 (IL-13; фиг. 8B). Эти данные демонстрируют, что эти антитела, вероятно, способны ингибировать TL1a, производимый первичными человеческими клетками, и что эти антитела могут быть использованы в качестве диагностических реагентов для определения TL1a на клетках или в сыворотке.

Пример 7. Создание улучшенных вариантов C320.

Антитело C320 далее оптимизировали посредством изменения его последовательности с целью оказания положительного эффекта на биофизические свойства антитела, не затрагивая эффективность C320.

Например, желательными являются изменения, повышающие уровень экспрессии антитела с одновременным увеличением уровня производства. Удаление N-связанного центра гликозилирования в $V_H$ посредством аминокислотного замещения для уменьшения гетерогенности продукта может далее улучшить C320. Замещение аминокислотных остатков с целью влияния на стабильность антитела в отношении окисления или изомеризации во время очищения или хранения остатками, не подверженными таким изменениям (Wang et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 96:1-26, 2006), может далее улучшить C320. Замещение редких или соматических последовательностей C320, которые могут потенциально отвечать за иммуногенность, такими, которые обладают пониженной иммуногенностью, может далее улучшить C320. Такие изменения более подробно описаны ниже.

Улучшение экспрессии C320.

Базу данных зародышевых аминокислотных последовательностей человеческих антител исследовали с помощью поискового инструмента Basic Local Alignment Search Tool (BLAST: Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990) с применением C320 $V_H$ и $V_L$ аминокислотных последовательностей. Это позволило идентифицировать 20 зародышевых последовательностей человеческих антител наиболее гомологичных C320 $V_H$ и C320 $V_L$ соответственно. Выравнивание человеческих зародышевых последовательностей с таковыми из C320 позволило идентифицировать остатки, присутствующие в C320, но не являющиеся обычными для большинства зародышевых линий. Наиболее обычную аминокислоту из зародышевых последовательностей заместили в C320 аминокислотную последовательность.

В табл. 7 перечислены аминокислотные замещения и полученный эффект на уровень экспрессии каждого антитела из трансфекции HEK-293E клеток.

Таблица 7

Эффект аминокислотных замещений на экспрессию и эффективность

| Обозначение антитела | Аминокислотное замещение (цепь) | % уровень экспрессии относительно C320 | Эффективность TF-1 EC-50 (pM) |
|---|---|---|---|
| C320 | N/A | 100 | 233 |
| C320-2 | A16S (тяжелая) | 156 | 159 |
| C320-3 | T41P (тяжелая) | 338 | 428 |
| C320-4 | N73D (тяжелая) | DNE | N/A |
| C320-5 | A76T (легкая) | 231 | 89 |
| C320-6 | L81Q (легкая) | 98 | 67 |
| C320-135 | T41P (тяжелая) & A76T (легкая) | 288 | 462 |

Аминокислотные замещения сделаны относительно SEQ ID NO: 42 тяжелой цепи и SEQ ID NO: 46 для легкой цепи.

Два замещения, присутствующих в C320-3 и C320-5, увеличивают уровень экспрессии антитела более чем в два раза, минимально затрагивая эффективность антитела в анализе эффективности TF-1. Следующее антитело, содержащее оба замещения, C320-135, обладает в значительной степени эквивалентной эффективностью и улучшенным уровнем экспрессии.

C320-4 содержит N73D (N72D по системе нумерации Кабата) замещение, нацеленное на улучшение экспрессии и также на удаление N-связанного мотива гликозилирования. Однако N73D замещение привело к прекращению экспрессии антитела, что позволяет предположить, что N73 желателен для экспрессии антитела.

Для дальнейшего улучшения экспрессии C320, CDR из C320 пришили на другой скелет антител, имеющих известную кристаллическую структуру. Этот необычный подход применили, так как антитела с известной кристаллической структурой обычно обладают совпадающими $V_H$:$V_L$ парами. Для выбора антитела с подходящими $V_H$- и $V_L$-скелетами использовали BLAST поиск по базам данных кристаллических структур для идентификации антитела с аминокислотными последовательностями, похожими на C320. BLAST поиск с использованием C320 $V_H$ использовали для идентификации 100 наиболее гомологичных последовательностей антител с известной кристаллической структурой. Подобным образом, идентифицировали 100 последовательностей антител, наиболее гомологичных C320 $V_L$ с известными кристаллическими структурами. Кристаллические структуры, обнаруживаемые как в тяжелых, так и в легких цепях, считались подходящими скелетами для пришивания CDR. Были выбраны 1TZG, 1RHH, 2DD8, 2JB5, 3FKU, 3GBM, 3IYW, 3LMJ, и 3P30. CDR от C320 были использованы для замещения CDR последовательностей, присутствующих в каждой из вышеописанных последовательностей. Выравнивание каждой из последовательностей, содержащих C320 CDR участки, показано на фиг. 1D (тяжелые цепи) и фиг. 1G (легкие цепи). Тяжелые и легкие цепи антитела были затем сдвоены согласно нижеприведенному описанию и проанализированы на экспрессию белка и связывание TL1a; результаты представлены в табл. 8.

Таблица 8

Результаты сшивания CDR на экспрессию и связывание TL1a

| Обозначение антитела | Тяжелая цепь | Легкая цепь | Захват белка A (RU) | AUC Белок A HPLC (215 нм) | Связывание TL1a (RU) |
|---|---|---|---|---|---|
| C320 | C320 | C320 | 779 | 2764 | 282 |
| mock | N/A | N/A | 25 | 376 | N/D |
| C320-7 | 1TZG | 1TZG | 187 | 912 | N/D |
| C320-8 | 1RHH | 1RHH | 437 | 1718 | 29 |
| C320-9 | 2DD8 | 2DD8 | 2235 | 8687 | 305 |
| C320-10 | 2JB5 | 2JB5 | 2098 | 11406 | 368 |
| C320-11 | 3FKU | 3FKU | 129 | 637 | N/D |
| C320-12 | 3GBM | 3GBM | 100 | 697 | N/D |
| C320-13 | 3IYW | 3IYW | 1566 | 4488 | 524 |
| C320-14 | 3LMJ | 3LMJ | 570 | 1125 | 171 |
| C320-15 | 3P30 | 3P30 | 1063 | 2192 | 318 |
| C320-16 | 1TZG | C320 | 2527 | 11604 | 653 |
| C320-17 | 1RHH | C320 | 2241 | 11980 | 683 |
| C320-18 | 2DD8 | C320 | 1528 | 5786 | 408 |
| C320-19 | 2JB5 | C320 | 1805 | 8018 | 465 |
| C320-20 | 3FKU | C320 | 986 | 1909 | 310 |
| C320-21 | 3GBM | C320 | 39 | 428 | N/D |
| C320-22 | 3IYW | C320 | 2107 | 8622 | 665 |
| C320-23 | 3LMJ | C320 | 1119 | 2044 | 324 |
| C320-24 | 3P30 | C320 | 1023 | 2353 | 311 |
| C320-25 | C320 | 1TZG | 376 | 1062 | 42 |
| C320-26 | C320 | 1RHH | 438 | 1012 | 81 |
| C320-27 | C320 | 2DD8 | 2272 | 9795 | 578 |
| C320-28 | C320 | 2JB5 | 2176 | 11771 | 623 |
| C320-29 | C320 | 3FKU | 1549 | 3195 | 355 |
| C320-30 | C320 | 3GBM | 1288 | 3356 | 455 |
| C320-31 | C320 | 3IYW | 1061 | 2806 | 381 |
| C320-32 | C320 | 3LMJ | 892 | 1888 | 331 |
| C320-33 | C320 | 3P30 | 1527 | 4473 | 521 |

Примечание: последовательности тяжелых и легких цепей этих антител перечислены на фиг. 1D и 1G.

RU это единицы ответа (response units) - единица измерения связывания с поверхностью с использованием SPR и AEC это площадь под кривой.

Когда CDR из C320 были пришиты к скелетам других антител, большое количество получившихся антител экспрессировались на уровне, превышающим таковой у антитела C320. Антитело C320-16, в котором тяжелоцепочечные C320 CDR были пришиты на скелет антитела 1TZG и сдвоены с легкой цепью C320, экспрессировалось в 3 раза лучше, чем C320. Этот эксперимент также продемонстрировал, что с применением данного подхода является возможным изменить изотип антитела и сохранить экспрессию белка и связывание с TL1a, так как некоторые легкоцепочечные скелеты антител, к которым пришивали легкоцепочечные CDR из C320, принадлежали к каппа-изотипу, в отличие от лямбда-изотипа, присутствующего в C320.

Для дальнейшего улучшения экспрессии антитела аминокислотные замещения произвели в CDR3 участке вариабельной области тяжелой цепи C320, антитела подвергли трансфекции в HEK-293E клетки и подвергли скринингу на уровни экспрессии с помощью HPLC белка A и захвата белка A с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Результаты описаны в табл. 9.

Таблица 9

Влияние замещений HCDR3 на экспрессию

| **Обозначение антитела** | **Тяжелоцепочное замещение (относительно SEQ ID NO: 42)** | **Легкоцепочное замещение (относительно SEQ ID NO: 46)** | **Захват белка A (RU)** | **AUC (белок A HPLC) (280 нм)** |
|---|---|---|---|---|
| C320-0 | N/A | N/A | 6413 | 487 |
| mock | N/A | N/A | 198 | N/D |
| C320-53 | E99S | A76T | 6831 | 581 |
| C320-54 | E99H | A76T | 6594 | 444 |
| C320-55 | E99L | A76T | 6797 | 540 |
| C320-56 | E99D | A76T | 5823 | 343 |
| C320-57 | E99Y | A76T | 7789 | 670 |
| C320-58 | E99P | A76T | 5679 | 335 |
| C320-59 | E99Q | A76T | 8534 | 1149 |
| C320-60 | E99K | A76T | 8293 | 839 |
| C320-61 | V100A | A76T | 8381 | 863 |
| C320-62 | V100S | A76T | 8423 | 803 |
| C320-63 | V100H | A76T | 8828 | 751 |
| C320-64 | V100L | A76T | 8288 | 910 |
| C320-65 | V100D | A76T | 8816 | 1003 |
| C320-66 | V100Y | A76T | 7750 | 570 |
| C320-67 | V100P | A76T | 7831 | 660 |
| C320-68 | V100Q | A76T | 8170 | 715 |
| C320-69 | V100K | A76T | 8741 | 706 |
| C320-70 | P101A | A76T | 5022 | 234 |
| C320-71 | P101S | A76T | 5083 | 268 |
| C320-72 | P101H | A76T | 5403 | 230 |
| C320-73 | P101L | A76T | 5518 | 283 |
| C320-74 | P101D | A76T | 5756 | 297 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| C320-75 | P101Y | A76T | 5084 | 212 |
| C320-76 | P101Q | A76T | 5036 | 263 |
| C320-77 | P101K | A76T | 5702 | 309 |
| C320-78 | D102A | A76T | 8249 | 684 |
| C320-79 | D102S | A76T | 8964 | 1102 |
| C320-80 | D102H | A76T | 8957 | 830 |
| C320-81 | D102L | A76T | 7969 | 515 |
| C320-82 | D102Y | A76T | 8135 | 558 |
| C320-83 | D102P | A76T | 7765 | 462 |
| C320-84 | D102Q | A76T | 7826 | 635 |
| C320-85 | D102K | A76T | 8487 | 890 |
| C320-86 | T103A | A76T | 10209 | 1882 |
| C320-87 | T103S | A76T | 8236 | 567 |
| C320-88 | T103H | A76T | 4934 | 227 |
| C320-89 | T103L | A76T | 7580 | 822 |
| C320-90 | T103D | A76T | 8694 | 1106 |
| C320-91 | T103Y | A76T | 3838 | 130 |
| C320-92 | T103P | A76T | 4792 | 219 |
| C320-93 | T103Q | A76T | 4104 | 164 |
| C320-94 | T103K | A76T | 3592 | 149 |
| C320-95 | A104S | A76T | 4811 | 240 |
| C320-96 | A104H | A76T | 4882 | 251 |
| C320-97 | A104L | A76T | 4557 | 189 |
| C320-98 | A104D | A76T | 5371 | 279 |
| C320-99 | A104Y | A76T | 6305 | 410 |
| C320-100 | A104P | A76T | 5678 | 339 |
| C320-101 | A104Q | A76T | 6634 | 508 |
| C320-102 | A104K | A76T | 5826 | 438 |
| C320-103 | S105A | A76T | 8159 | 825 |
| C320-104 | S105H | A76T | 6664 | 426 |
| C320-105 | S105L | A76T | 6193 | 357 |
| C320-106 | S105D | A76T | 7752 | 992 |
| C320-107 | S105Y | A76T | 8209 | 1072 |
| C320-108 | S105P | A76T | 6132 | 483 |
| C320-109 | S105Q | A76T | 6767 | 465 |
| C320-110 | S105L | A76T | 6999 | 452 |
| C320-111 | E105K | A76T | 6919 | 500 |
| C320-112 | E107S | A76T | 7713 | 631 |
| C320-113 | E107H | A76T | 6723 | 459 |
| C320-114 | E107L | A76T | 7739 | 839 |
| C320-115 | E107D | A76T | 8505 | 1034 |
| C320-116 | E107Y | A76T | 6465 | 375 |
| C320-117 | E107P | A76T | 6699 | 400 |
| C320-118 | E107Q | A76T | 8109 | 704 |
| C320-119 | E107K | A76T | 8776 | 952 |

Примечание: Замещения в этой таблице относятся к таковым в C320 антителе.

Было получено несколько антител, обладающих уровнем экспрессии, значительно превышающим таковой у C320, по измерению захвата на поверхности белка A. Несколько антител с высокой экспрессией подвергли повторной трансфекции, очистили с помощью хроматографии белка A и измерили их эффективность с помощью анализа TF-1. Результаты представлены в табл. 10.

Таблица 10

Влияние замещений HCDR3 на ингибирование TL1a

| Обозначение антитела | Тяжелоцепочное замещение (относительно SEQ ID NO: 42) | Легкоцепочное замещение (относительно SEQ ID NO: 46) | Эффективность TF-1 EC-50 (pM) |
|---|---|---|---|
| C320-0 | N/A | N/A | 233 |
| C320-61 | V100A | A76T | 272 |
| C320-63 | V100H | A76T | 1067 |
| C320-65 | V100D | A76T | 546 |
| C320-68 | V100Q | A76T | 535 |
| C320-86 | T103A | A76T | 303 |
| C320-87 | T103S | A76T | 356 |
| C320-90 | T103D | A76T | 370 |
| C320-103 | S105A | A76T | 455 |
| C320-104 | S105H | A76T | 349 |
| C320-106 | S105D | A76T | 1587 |
| C320-112 | E107S | A76T | 242 |
| C320-114 | E107L | A76T | 514 |
| C320-115 | E107D | A76T | 321 |
| C320-117 | E107P | A76T | 251 |
| C320-119 | E107K | A76T | 4142 |

Примечание: Замещения в этой таблице относятся к таковым в C320 антителе.

Эффективность полученных антител отличается от более низкой по сравнению с C320, как у C320-119, до уровня, эквивалентного C320.

Легкоцепочечную последовательность C320 выровняли с зародышевой последовательностью высшей гомологии IGLV1-40*01. Была идентифицирована разница в аминокислотных последовательностях в CDR участках, как показано на фиг. 9A. В позиции, в которой последовательности различались, было проведено обратное замещение аминокислоты из зародышевой последовательности в C320. Антитела экспрессировали в HEK-293 клетках, очищали и определяли выход белка относительно C320. Анализ эффективности с использованием TF-1 клеток провели для исследования профиля ингибирования антитела. Результаты представлены в табл. 11.

Таблица 11

Эффект гуманизирования C320 на ингибирование TF1a

| Обозначение антитела | Тяжелоцепочное замещение (относительно SEQ ID NO: 42) | Легкоцепочное замещение (относительно SEQ ID NO: 46) | % уровень экспрессии относительно C320 | Эффективность TF-1 EC-50 (pM) |
|---|---|---|---|---|
| C320 | N/A | N/A | 100 | 233 |
| C320-120 | T41P | A23T | 279 | 343 |
| C320-121 | T41P | D28N | 239 | 1433 |
| C320-122 | T41P | L33Y | 247 | 5480 |
| C320-123 | T41P | G34D | 207 | DNI |
| C320-124 | T41P | Y53N | 128 | 1613 |
| C320-125 | T41P | Y54S | 259 | 13393 |
| C320-126 | T41P | P82A | 187 | 539 |
| C320-127 | T41P | G95S | 140 | 541 |
| C320-128 | T41P | T96S | 134 | 328 |

Примечание: Замещения в этой таблице относятся к таковым в C320 антителе.

Антитело C320-120 продемонстрировало хороший уровень экспрессии и наивысшую эффективность из всех антител, протестированных в этом эксперименте. Некоторые из замещений, такие как в C320-123 и C320-125, привели к антителам, которые экспрессировались, но больше не ингибировали или слабо ингибировали TL1a-стимулированный апоптоз TF-1 клеток. Это позволяет предположить, что аминокислоты в позициях G34 (G32 по системе нумерации Кабат) и Y54 (Y52 по системе нумерации Кабат) вариабельной области легкой цепи могут быть важны для ингибирования антителом активности TL1a.

Удаление потенциальных центров окисления и изомеризации из C320.

Аминокислотный анализ последовательностей вариабельной области тяжелой и легкой цепей позволил идентифицировать несколько аминокислот, которые могут быть подвержены окислению или изомеризации. Особенное внимание было уделено аминокислотам, находящимся в CDR антитела. Изменения в этих аминокислотах могут со временем изменить профиль связывания антитела. В вариабельной области тяжелой цепи M51 (M51 по системе нумерации Кабат) идентифицировали в качестве потенциального центра окисления вместе с потенциальным аспартатным центром изомеризации D102 (D98 по

системе нумерации Кабат). В легкой цепи D94 (D92 по системе нумерации Кабат) идентифицировали в качестве потенциального центра изомеризации. Для уменьшения потенциального влияния этих предполагаемых рисков были получены разновидности C320, содержащие консервативные или полуконсервативные аминокислотные замещения в этих позициях. Эти замещения и их влияние на эффективность полученных разновидностей C320 продемонстрированы в табл. 12.

Таблица 12

Эффект аминокислотных замещений на экспрессию и TL1a ингибирование

| Обозначение антитела | Аминокислотное замещение от C320 (цепь) | % уровень экспрессии относительно C-320 | Эффективность TF-1 EC-50 (pM) |
|---|---|---|---|
| C320 | N/A | 100 | 233 |
| C320-129 | D102E (тяжелая) | 201 | 433 |
| C320-130 | M51L (тяжелая) | 185 | 528 |
| C320-131 | D94E (легкая) | 103 | 10680 |

Примечание: Замещения в этой таблице относятся к таковым в C320 антителе, с тяжелоцепочечными замещениями относительно SEQ ID NO: 42 и легкоцепочечными замещениями относительно SEQ ID NO: 46.

Потенциальные центры окисления и изомеризации, присутствующие в тяжелой цепи, были успешно замещены консервативными аминокислотами, что привело к улучшению экспрессии и сохранению эффективности. Замещение D94E в участке CDR легкой цепи привело к антителу, экспрессирующемуся на уровне, аналогичном C320, но обладающему существенно улучшенной эффективностью, это означает, что D94 легкой цепи может быть важен для реализации функциональной активности C320.

Удаление центра N-гликозилирования из тяжелой цепи C320.

Более ранняя попытка удаления центра гликозилирования $V_H$ NTS путем замещения на DTS (N73D; N72D по системе нумерации Кабат) была неудачной; были осуществлены дальнейшие попытки разрушения N-связанного мотива гликозилирования, NX(S/T) (при X≠P) с помощью всестороннего ряда замещений. Во-первых, другие остатки были протестированы вместо аспарагина в позиции 73. Во-вторых, было протестировано замещение T74P (T73P по системе нумерации Кабат), так как известно, что пролин в этой позиции предотвращает N-связанное гликозилирование. Также был протестирован ряд аминокислот вместо S75 (S74 по системе нумерации Кабат). Конструкции, протестированные в попытках удалить этот центр гликозилирования и их влияние на уровень экспрессии антитела, показаны в табл. 13.

Таблица 13

Эффект аминокислотных замещений на уровни экспрессии

| Обозначение антитела | Тяжелоцепочное замещение относительно SEQ ID NO: 42 | Легкоцепочное замещение относительно SEQ ID NO: 46 | AUC (Белок A HPLC) |
|---|---|---|---|
| C320-0 | N/A | N/A | 162 |
| C320-120 | T41P | A23T | 710 |
| mock | N/A | N/A | N/D |
| C320-138 | N73S | A23T | 87 |
| C320-139 | N73K | A23T | 58 |
| C320-140 | N73H | A23T | N/D |
| C320-141 | N73T | A23T | 66 |
| C320-142 | N73Q | A23T | 70 |
| C320-143 | N73G | A23T | N/D |
| C320-144 | N73P | A23T | N/D |
| C320-145 | N73L | A23T | 54 |
| C320-146 | N73Y | A23T | N/D |
| C320-147 | T74P | A23T | 110 |
| C320-148 | S75L | A23T | 115 |
| C320-149 | S75I | A23T | 96 |
| C320-150 | S75A | A23T | 194 |
| C320-151 | S75Y | A23T | 88 |
| C320-152 | S75K | A23T | 115 |
| C320-153 | S75E | A23T | 110 |
| C320-154 | S75F | A23T | 78 |
| C320-155 | S75H | A23T | 118 |

Примечание: Замещения в этой таблице относятся к таковым в C320 антителе.

Большинство протестированных вариантов C320 демонстрировали более низкие уровни экспрессии по сравнению с C320, что заставляет предположить, что замещение индивидуальных аминокислот в мо-

тиве NTS в C320 снижает экспрессию антитела.

Результатом более ранних попыток улучшить экспрессию C320 путем пришивания C320 CDR на скелет другого антитела явилось антитело, обозначенное C320-16, которое использует скелет 1TZG. Это антитело хорошо экспрессируется связывает TL1a (табл. 7). Скелеты 1TZG и C320-16 были лишены N-связанного мотива последовательности гликозилирования, так как RNTSI (SEQ ID NO: 203) в позициях 72-76 в последовательности SEQ ID NO: 42 (71 - 75 по системе нумерации Кабат) $V_H$ последовательности C320 замещен на ADRST (SEQ ID NO: 204) в соответствующей $V_H$ последовательности 1TZG.

Вариант C320-135 включающий улучшающие экспрессию замещения $V_H$ T41P и $V_L$ A73T был подвергнут дальнейшему тяжелоцепочечному инжинирингу. C320 $V_H$ последовательность RNTSI (SEQ ID NO: 203) в позициях 71-75 заменили на ADRST (SEQ ID NO: 204) из соответствующей $V_H$ последовательности 1TZG для получения антитела C320-163. Это антитело, теперь лишенное N-связанного центра гликозилирования, экспрессируется при трансфекции в HEK-293E клетки и после очищения способно функционально ингибировать TL1a-связанный апоптоз клеток TF-1 (табл. 14).

Улучшенные варианты C320.

Аминокислотные замещения, идентифицированные в предыдущих экспериментах как придающие благоприятные свойства C320, были последовательно комбинированы, и полученные антитела были экспрессированы, очищены и проанализированы на их эффективность. Их последовательности продемонстрированы на фиг. 9B (вариабельная область тяжелой цепи) и фиг. 9C (вариабельная область легкой цепи). Сравнительные данные эффективности и экспрессии для каждого антитело приведены в табл. 14.

Таблица 14

Эффект аминокислотных замещений на экспрессию и TL1a ингибирование

| Обозначение антитела | % экспрессии по сравнению с C320 | Эффективность TF-1 EC-50 (pM) |
|---|---|---|
| C320 | 100 | 233 |
| C320-162 | 74 | 1053 |
| C320-163 | 170 | 1160 |
| C320-164 | 299 | 338 |
| C320-165 | 380 | 240 |
| C320-166 | 339 | 793 |
| C320-167 | 344 | 239 |
| C320-168 | 219 | 46 |
| C320-169 | N/A | 477 |
| C320-170 | 232 | 287 |
| C320-171 | 102 | DNI |
| C320-172 | 140 | 269 |
| C320-179 | 161 | 96 |
| C320-183 | 129 | 439 |

* Note: DNI = не ингибирует.

Сравнение антител C320-168 (содержащие N-связанный мотив гликолизирования) с C320-163 и C320-170 (не имеющими N-связанный мотив гликолизирования) с помощью изоэлектрического фокусирования (IEF) продемонстрировало исчезновение гетерогенности заряда из профиля антител после удаления N-связанного центра гликозилирования (фиг. 9D). У C320-168 наблюдалось 5-6 различных заряженных изоформ по сравнению с 1-2 изоформами, визуализированными для C320-163 и C320-170. Это уменьшение гетерогенности заряда является благоприятным качеством, способствующим однородности партий продукта при промышленном производстве (Wang et al., Journal of Pharmaceutical Sciences 96:1-26, 2006).

Из протестированных антител два были более эффективными, чем исходное C320 антитело - C320-168 и C320-179 (фиг. 9E). Оба этих варианта C320 включают замещение легкоцепочечного V-участка G24S (G25S по системе нумерации Кабат), которое, как оказалось, улучшает эффективность в анализах TF-1 в комбинации с другими благоприятными аминокислотными замещениями, описанными ранее.

Удаление предсказанных MHC Class II связывающих пептидов из антитела.

Аминокислотную последовательность C320-168 с вариабельным тяжелоцепочечным и легкоцепочечным участками проанализировали in silico с помощью программного пакета Epibase™ (LONZA). Эта программа предсказала склонность пептидных последовательностей, присутствующих в C320-168, связывать MHC Class II аллели. Такое связывание пептидов с MHC Class II аллелями является важным шагом в иммунном ответе, направленном против вводимого антитела.

Было предсказано, что пептидная последовательность в тяжелой цепи C320-168, GLEWMGWLNPNSGNT (SEQ ID NO: 205), будет прочно связываться с DRB1*0401. Было предсказано, что пептидная последовательность в легкой цепи C320-168, LLIYGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 206), будет прочно связываться с DRB1*1101, DRB1*1104 и DRB1*1501.

Вышеуказанные пептидные последовательности и модифицированные версии этих пептидных последовательностей синтезировали и инкубировали с соответствующим MHC Class II белком и провели анализ ELISA для определения образования комплекса пептида с MHC Class II белком. Пептид гриппа, PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 207), использовали в качестве позитивного контроля в этих анализах для индикации образования комплекса пептид:MHC Class II. Связывание каждого пептида с MHC Class II аллелем продемонстрировано в табл. 15.

Таблица 15

Связывание пептидов с MHC Class II

| Пептид | MHC Class II аллель | Связывание (% от позитивного контроля) |
|---|---|---|
| GLEWMGWLNPNSGNT (SEQ ID NO: 205) | DRB1*0401 | 6 |
| LLIYGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 206) | DRB1*1501 | 123 |
| LLIEGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 208) | DRB1*1501 | 41 |
| LLIGGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 209) | DRB1*1501 | 42 |
| LLIPGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 210) | DRB1*1501 | 0 |
| LLIKGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 211) | DRB1*1501 | 74 |
| LLIYGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 212) | DRB1*1101 | 1 |
| LLIEGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 213) | DRB1*1101 | 0 |
| LLIGGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 214) | DRB1*1101 | 0 |
| LLIPGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 215) | DRB1*1101 | 0 |
| LLIKGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 216) | DRB1*1101 | 0 |
| LLIYGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 217) | DRB1*1104 | 1 |
| LLIEGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 218) | DRB1*1104 | 0 |
| LLIGGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 219) | DRB1*1104 | 1 |
| LLIPGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 220) | DRB1*1104 | 0 |
| LLIKGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 221) | DRB1*1104 | 0 |

Пептидами, которые могут быть иммунологически важными и заслуживающими дальнейшего исследования как хорошо связывающиеся, считаются те, которые продемонстрировали значение ≥15% от позитивного контроля. Поэтому пептид GLEWMGWLNPNSGNT (SEQ ID NO: 205) имеет низкую вероятность быть иммуногенным и не производилось попыток модифицировать этот мотив в C320-связанное антитело.

Пептид LUYGYYNRPSGVPD (SEQ ID NO: 206) продемонстрировал образование комплекса с MHC Class II белком DRB1*1501 (123% связывание), но не с DRB1*1101 или с DRB1*1104. Попытка снижения образования комплекса пептид:MHC Class II была сделана на основе модификации тирозинового остатка в четвертой позиции пептида (соответствующего позиции 51 (позиция 49 по системе нумерации Кабат) в C320-168 вариабельной легкоцепочечной последовательности) на один из следующих: глютаминовая кислота, глицин, пролин или лизин. Введение остатка глютаминовой кислоты или глицина в эту позицию понизило комплексообразование более чем на 50% (табл. 14). Введение пролина в эту позицию привело к предотвращению образования комплекса. Антитела C320-172 и C320-179 содержали замещение Y51E (Y49E по системе нумерации Кабат) в их $V_L$ участок, тогда как C320-183 содержал Y51G (Y49G по системе нумерации Кабат) в $V_L$ участке. Все три антитела экспрессировались и функционально ингибировали TL1a, как показано в табл. 13. Была обнаружена экспрессия антитела C320-171 включающего замещение Y51E (Y49P по системе нумерации Кабат), однако, это антитело оказалось неспособно функционально ингибировать TL1a, что означает, что не все аминокислоты подходят к позиции 49 в легкой цепи (табл. 13).

Пример 8. Создание высокоэффективных DR3-селективных антител.

Новые антитела, способные к нейтрализации активности TL1a с высокой эффективностью и способные селективно ингибировать TL1a-DR3-связанную активность, созданы фокусировкой на эпитопе антитела C320 на TL1a. Например, мутантные вариабельные участки и/или индивидуальные замещения, демонстрирующие улучшенную экспрессию и/или TL1a-нейтрализацию (например, как описано в примере 7), комбинируют и заново исследуют для определения накопления улучшений.

При других подходах антитела, связывающиеся с эпитопом, связанным с C320, выбирают одним из многих доступных способов.

8.1. Выбор из библиотеки антител с помощью C320 антитела.

Используют протокол фагового дисплея, при котором проводят первую операцию пэннинга с плотностью антигена (т.е. биотинилированного TL1a) со значением приблизительно 100 пмоль и стадию TEA

элюирования, как описано ранее. Вторую и третью операции проводят с пониженной плотностью антигена (например, приблизительно 50 пмоль). Фаги элюируют, добавляя C320 IgG в 10-кратном молярном избытке, и инкубируют реакции при комнатной температуре в течение 2, 5, 10 или 20 мин. Ожидается, что IgG специфично заменит и элюирует экспрессируемые фагами FAb, связанные с C320 эпитопом. Менее вероятно, что неспецифические биндеры и фаги, связанные с другими участками поверхности TL1a, будут элюироваться в этих условиях.

Промывание включает шесть смывов с M-PBS для операций 1 и 2. Для операции 3 используются три промывания с PBST и три промывания с PBS.

Элюированные фаги используют для инфицирования TG1 E.coli для фагмидного спасения или создания колоний для скрининга, как описано для других фаговых дисплейных экспериментов.

8.2. Выбор/производство антител с помощью мутанта TL1a.

С помощью использования мутировавших версий TL1a в качестве реагентов для пэннинга фагового дисплея можно получить антитела, распознающие эпитоп, подобный таковому у C320. Из фаговой дисплейной библиотеки можно убрать антитела, распознающие TL1a с аминокислотным замещением R32A и/или R85A. Затем библиотеку можно подвергнуть пэннингу на TL1a. Полученные изолированные антитела будут, вероятно, связывать остатки R32 и/или R85.

Пример 9. Аффинное созревание C320.

Антитело C320 уже является эффективным ингибитором активности TL1a. Однако эффективность можно увеличить с помощью подхода аффинного созревания. Повышенная эффективность часто дает преимущество в дозировке и эффекте.

Различные способы аффинного созревания антител известны специалистам в этой области. Многие из них основаны на общей стратегии создания панелей или библиотек вариантов белков путем мутагенеза с последующей селекцией и/или скринингом на улучшенную аффинность. Мутагенез часто проводят на уровне ДНК, например, с помощью подверженной ошибкам PCR (Thie et al., Methods Mol. Biol. 525: 309-322, xv, 2009) генной перестановки (Kolkm и Stemmer, Nat. Biotechnol. 19: 423-428, 2001) путем использования мутагенных химикатов и радиации, использованием "мутаторных" штаммов с подверженной ошибкам репликационной технологией (Greener et al., In vitro Mutagenesis Protocols. (Humana press, NJ),1996) или с применением подхода соматической гипермутации, использующего природный механизм аффинного созревания (Peled et al., Annu. Rev. Immunol. 26: 481-511, 2008). Мутагенез также используют на уровне РНК, например, путем использования Qβ репликазы (Kopsidas et al., Immunol. Lett. 107: 163-168, 2006). Способы, основанные на применении библиотек, позволяющие проводить скрининг на улучшенные варианты белков, основаны на различных дисплейных техниках, таких как фаговая, дрожжевая, рибосомная, бактериальная или использующая клетки млекопитающих, и известны специалистам в этой области (Benhar, Expert Opin. Biol. Ther. 7: 763-779, 2007). Аффинное созревание также достигается более направленными/предсказательными способами, например сайт-направленным мутагенезом или генным синтезом, направляемым данными 3D белкового моделирования (см., например, US 6180370 или US 5225539).

Аффинное созревание с использованием рибосомного дисплея (Kopsidas et al., BMC Biotechnol. 7: 18, 2007) выполняется с помощью РНК, кодирующей $V_L$ и $V_H$ домены C320-подобного антитела в scFv формате. Библиотеку вариантов таких РНК создают с помощью Qβ репликазы (обычно 1-3 изменений на молекулу), и эту библиотеку отображают и выбирают на рибосомах для связывания с TL1a. Достигается связь фенотип-генотип, так как используемые конструкции РНК остаются прикрепленными к рибосомам, транслирующим функционал scFv белка. C320-подобные scFv-РНК-рибосома комплексы подвергают пэннингу на TL1a и выделяют. РНК конвертируют в ДНК и инкорпорируют в бактериальную экспрессионную систему. Индивидуальные бактерии, кодирующие один scFv, изолируют и стимулируют для экспрессии scFv. С помощью конкурентного анализа ELISA идентифицируют scFvs с более высокой аффинностью к TL1a, чем C320-подобным ScFv. Эти scFvs конвертируют в полноразмерные антитела, которые подвергают скринингу в анализе TF-1 апоптоза, как описано в примере 1.8, для определения улучшения ингибирования биологической активности TL1a по сравнению с C320.

Пример 11. Эффективность анти-TL1a антител в животных моделях колита.

Перекрестно реагирующие анти-TL1a антитела грызунов, описанные в этом тексте, тестировали на моделях острого колита у грызунов, стимулированного интраректальным введением ди- или три-нитробензолсульфоновой кислоты (D/TNBS) или оксазолона и хронический колит стимулировали введением DSS в питьевую воду (как описано в Wirtz et al., Nat. Protoc. 2: 541-546, 2007). DNBS и оксазолон вызывают локальное язвообразование и воспаление. Введение DSS вызывает сильное общее воспаление пищеварительного тракта, характеризующееся эрозийными ранами и воспалительным инфильтратом. Симптомы всех этих моделей обычно включают диарею, скрытое кровотечение, потерю веса и иногда пролапс прямой кишки.

В профилактической модели лечение антителом было начато одновременно с началом введения стимулирующего колит соединения. В терапевтической модели лечение антителом было начато через несколько дней после начала стимуляции колита. Определяли эффект лечения на вес, консистенцию кала

и скрытое кровотечение, а также микроскопический эффект на цельность эпителия и степень воспалительного инфильтрата. Данные собирали ежедневно на основе консистенции кала и наличия скрытого кровотечения, вычисляя значение индекса активности болезни (DAI).

Антитело C320-168 продемонстрировало сравнимую эффективность с соединением, использующимся в качестве стандартного лечения при профилактическом использовании при DNBS- или оксазолон-стимулированном колите (фиг. 10A-10C) и при терапевтическом использовании при DSS-стимулированном колите (фиг. 11A и 11B).

Пример 12. Эффективность анти-TL1a антител в животной модели заболевания.

Антитела дополнительно тестировали на животной модели рассеянного склероза у грызунов (Racke, Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 9, Unit 9 7, 2001). В этой модели стимулируется острая или хроническая демиелинизация путем введения в спинной мозг гомогената или очищенных миелиновых пептидов с адъювантом. Это введение вызывает аутоиммунное разрушение миелиновой оболочки вокруг нейронов спинного мозга, приводя к ослаблению нижних конечностей, которое может развиться в паралич, и характеризуется значительной инфильтрацией спинного мозга. Острая форма является монофазной, и животное выздоравливает спонтанно. Хроническая форма напоминает возвратно-ремитирующий рассеянный склероз и состоит из двух и более эпизодов слабости/паралича задних конечностей.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий домен, который специфически связывает TL1a, включающий вариабельную область тяжелой цепи ($V_H$), по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 186, и вариабельную область легкой цепи ($V_L$), по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 199.

2. Антитело или его антигенсвязывающий домен, который специфически связывает TL1a, включающий вариабельную область тяжелой цепи ($V_H$), по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 42, и вариабельную область легкой цепи ($V_L$), по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 46.

3. Антитело или его антигенсвязывающий домен по любому из пп.1, 2, в котором антитело или его антигенсвязывающий домен связывает TL1a мыши, TL1a человека, TL1a яванского макака, TL1a крысы и TL1a морской свинки.

4. Антитело или его антигенсвязывающий домен по любому из пп.1-3, в котором антитело или его антигенсвязывающий домен включает константную область тяжелой цепи IgG1.

5. Антитело или его антигенсвязывающий домен по любому из пп.1-4, в котором антитело или его антигенсвязывающий домен включает константную область легкой цепи лямбда.

6. Антитело или его антигенсвязывающий домен по любому из пп.1-5, в котором антитело или его антигенсвязывающий домен включает константную область тяжелой цепи человеческого IgG1 и константную область легкой цепи лямбда человека.

7. Фармацевтическая композиция для ингибирования или предотвращения активности TL1a, включающая антитело или его антигенсвязывающий домен по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.

8. Применение антитела или его антигенсвязывающего домена по любому из пп.1-6 при изготовлении медикамента для лечения или предотвращения аутоиммунного заболевания.

9. Применение по п.8, в котором аутоиммунное заболевание является астмой.

10. Применение по п.8, в котором аутоиммунное заболевание является язвенным колитом, болезнью Крона, синдромом раздраженного кишечника, ревматоидным артритом, полиартритом, рассеянным склерозом, увеитом или хронической обструктивной болезнью легких..

| | | CDR1 | | CDR2 |
|---|---|---|---|---|
| C336 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS | GYTFTGYYMH | WVRQAPGQGLEWMG | WINPNSGGTNYA |
| C334 | QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS | GGTFSSYTIS | WVRQAPGQGLEWMG | GIIPIFGTANHA |
| C333 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS | GGTFSSYTIS | WVRQAPGQGLEWMG | GIIPIFGTTNYA |
| C323 | QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS | GGTFSSYTIS | WVRQAPGQGLEWMG | GIIPIFGTTNYA |
| C321 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS | GYTFTSYGIS | WVRQAPGQGLEWMG | WISAYNGNTNYA |
| C320 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS | GYTFTSYDIN | WVRQATGQGLEWMG | WMNPNSGNTGYA |
| C319 | QLQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVS | GGSISSRNWWS | WVRQSPGKGLEWIG | EIY HSDITNYN |

| | CDR2 | | CDR3 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| C336 | QKFQG | RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAS | GGQTHL DV | WGQGTTVTVSS | SEQ ID NO: 2 |
| C334 | QSFQG | RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCST | NSYSSSWYDAF DI | WGQGTMVTVSS | SEQ ID NO: 10 |
| C333 | QRFQG | RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAIYYCST | NSYSSSWYDAF DI | WGQGTMVTVSS | SEQ ID NO: 18 |
| C323 | QRFQG | RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAIYYCST | NSYSSSWYDAF DI | WGQGTMVTVSS | SEQ ID NOT 26 |
| C321 | QKLQG | RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR | DSHIYDILTGY DY | WGQGTLVTVSS | SEQ ID NO: 34 |
| C320 | QKFQG | RVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR | EVPDTASF EY | WGQGTLVTVSS | SEQ ID NO: 42 |
| C319 | PSLKS | RVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAK | DGEAGGTYIDAFDV | WGQGTMVTVSS | SEQ ID NO: 50 |

Фиг. 1A

| | | CDR1 | | CDR2 |
|---|---|---|---|---|
| C336 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC | QASQ DITDYLN | WYQQRPGKAPKLLIY | DASNLET |
| C334 | DVVMTQSPAFLSVSPGERATLSC | RASQ SISNNLA | WYQQMPGQAPRLLLY | DASTRAT |
| C333 | EIVLTQSPATLSVSPGERATLSC | RASQ SITNNLA | WYQQLPGQAPRLLIY | DASTRAT |
| C323 | AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC | RASQ GIGSALA | WYQQKPGKAPKLLIY | DASSLQS |
| C321 | DVVMTQTPLSSPVTLGQPASISC | HSSQSLVHSDGNTYLS | WLQQRPGQPPRLLIY | KISNRFS |
| C320 | QSVLTQPPSVSGA PGQRVTISC | AGSSSDIG AGLGVH | WYQQLPGTAPKLLIY | GYYNRPS |
| C319 | QSALTQPRSVSGS PGQSVTISC | TGTSSDVG IYNYVS | WYQQHPGKAPKLIIY | DVSERPS |

| | | CDR3 | | |
|---|---|---|---|---|
| C336 | GVPSRFSGSGSGTYFTFTISSLQPEDFATYYC | QQYDNLP IT | FGQGTRLEIKR | SEQ ID NO: 6 |
| C334 | DIPARFSGSGSGSEFTLTISGLQSADFAVYYC | QQYNNWP LT | FGGGTKLEIKR | SEQ ID NO: 14 |
| C333 | DIPARFSGTGSGSEFTLTISGLQSADFAVYYC | QQYNNWP LT | FGGGTKVDIKR | SEQ ID NO: 22 |
| C323 | GVPSRYSGSGSGTDFTLTISGLQPEDFATYYC | QQFSYYP LT | FGGGTKLEIKR | SEQ ID NO: 30 |
| C321 | GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC | MQDTQFP QT | FGQGTKVEIKR | SEQ ID NO: 38 |
| C320 | GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLLPEDEGDYYC | QSYDGTLSAL | FGGGTKLTVLG | SEQ ID NO: 46 |
| C319 | GVPDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEADYYC | YSYAGTYTSL | FGGGTKVTVLG | SEQ ID NO: 54 |

Фиг. 1B

| | | CDR1 | | CDR2 |
|---|---|---|---|---|
| C320 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS | GYTFTSYDIN | WVRQATGQGLEWMG | WMNPNSGNTGYAQKFQG |
| C320-3 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS | GYTFTSYDIN | WVRQAPGQGLEWMG | WMNPNSGNTGYAQKFQG |
| C320-90 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS | GYTFTSYDIN | WVRQATGQGLEWMG | WMNPNSGNTGYAQKFQG |
| C320-103 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS | GYTFTSYDIN | WVRQATGQGLEWMG | WMNPNSGNTGYAQKFQG |
| C320-114 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS | GYTFTSYDIN | WVRQATGQGLEWMG | WMNPNSGNTGYAQKFQG |
| C320-115 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS | GYTFTSYDIN | WVRQATGQGLEWMG | WMNPNSGNTGYAQKFQG |
| C320-129 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS | GYTFTSYDIN | WVRQATGQGLEWMG | WMNPNSGNTGYAQKFQG |
| C320-130 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS | GYTFTSYDIN | WVRQATGQGLEWMG | WLNPNSGNTGYAQKFQG |
| **Консенсус** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS | GYTFTSYDIN | WVRQAXGQGLEWMG | WXNPNSGNTGYAQKFQG |
| | | | T | M |
| | | | P | L |

| | | CDR3 | | |
|---|---|---|---|---|
| C320 | RVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR | EVPDTASFEY | WGQGTLVTVSS | SEQ ID NO: 42 |
| C320-3 | RVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR | EVPDTASFEY | WGQGTLVTVSS | SEQ ID NO: 58 |
| C320-90 | RVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR | EVPDDASFEY | WGQGTLVTVSS | SEQ ID NO: 66 |
| C320 103 | RVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR | EVPDTAAFEY | WGQGTLVTVSS | SEQ ID NO: 70 |
| C320-114 | RVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR | EVPDTASFLY | WGQGTLVTVSS | SEQ ID NO: 74 |
| C320-115 | RVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR | EVPDTASFDY | WGQGTLVTVSS | SEQ ID NO: 78 |
| C320-129 | RVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR | EVPETASFEY | WGQGTLVTVSS | SEQ ID NO: 86 |
| C320-130 | RVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR | EVPDTASFEY | WGQGTLVTVSS | SEQ ID NO: 90 |
| **Консенсус** | RVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR | EVPXXAXFXY | WGQGTLVTVSS | SEQ ID NO: 94 |
| | | ET S L | | |
| | | DD A D | | |
| | | E | | |

Фиг. 1C

```
                                                CDR1                                    CDR2
C320        QVQLV-QSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYDIN WVRQATGQGLEWMG WMNPNSGNTGYAQKFQG
1TZG        .....-.......R..S..T...... .......... .....P.R...... ..................
1RHH        E...LE..........S..Q...... .......... .....P.H...... ..................
2DD8        ....Q-..........S......... .......... .....P........ ..................
2JB5        .....-..........S......... .......... .....P........ ..................
3FKU        .....-..........S......TS. .......... .....P......L. ..................
3GBM        E....-E.........S......... .......... .....P...P.... ..................
3LMJ        ...V.-......R...........V. .......... .....P.K...... ................K
3P30        .....-........A.S..R...... .......... .....P...PQ... ..................
3IYW        E....-......R.....T........ .......... .....P........ ..................

Консенсус   XVQXXXXSGAEVXXPGXSXXVSCXXS GYTFTSYDIN WVRQAXGXGXXWXG WMNPNSGNTGYAQKFQG
            Q  LV-Q      KK  A VK   KA              T Q LE M
            E  VLLE      RR  S TT   TS              P R PQ L
                Q         A    Q    V                H
                                R                    K
```

```
                                                CDR3
C320        RVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR EVPDTASFEY WGQGTLVTVSS SEQ ID NO: 42
1TZG        .I.I.ADR.T....L..N...P.......... .......... ........... SEQ ID NO: 155
1RHH        ...F.ADQAT.......TN...D......... .......... ........... SEQ ID NO: 156
2DD8        ...I.TDE.T...................... .......... .....T..... SEQ ID NO: 157
2JB5        ...I.ADE.T...................... .......... ........... SEQ ID NO: 158
3FKU        ...I.ADQ.TR....D.R.............. .......... ........... SEQ ID NO: 159
3GBM        ...I.ADDFAG.V............M....K .......... ..K..T..... SEQ ID NO: 160
3LMJ        ..S..ED..TN...................T .......... ........... SEQ ID NO: 161
3P30        .L.I.AD..TN...L......YD.......T. .......... ........... SEQ ID NO: 162
3IYW        ......D..T..V................... .......... ........... SEQ ID NO: 234

Консенсус   RXXXTXXXXXXTXYXXLXXLRXXDTAXYYCXX EVPDTASFEY WGXGTXVTVSS SEQ ID NO: 163
             VTM RNTSIS A ME SS  SE   V   AR              Q  L
             ISI ADRATR V LD NN  PD   M   TK              K  T
             L F T QFAG      T   Y         T
                 E E  N      R
                   D
```

Фиг. 1D

```
                                                CDR1                                    CDR2
Консенсус   XVQXXXXSGAEVXXPGXSXXVSCXXS GYTFTSYDIN WVRQAXGXGXXWXG WXNPNSGNTGYAQKFQG
            Q  LV-Q      KK  A VK   KA              T Q LE M    M
            E  VLLE      RR  S TT   TS              P R PQ L    L
                Q         A    Q    V                H
                                R                    K
```

```
                                                CDR3
Консенсус   RXXXTXXXXXXTXYXXLXXLRXXDTAXYYCXX EXPXXAXFXY WGXGTXVTVSS SEQ ID NO: 137
             VTM RNTSIS A ME SS  SE   V   AR  V ET S L   Q  L
             ISI ADRATR V LD NN  PD   M   TK  A DD A D   K  T
             L F T QFAG      T   Y         T  S AA H E
                 E E  N      R                H SS L A
                   D                          L HY D S
                                              D K  Y H
                                              Y      P
                                              P      Q
                                              Q      K
                                              K
```

Фиг. 1E

```
                                        CDR1                                CDR2
C320        QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC  AGSSSDIGAGLGVH  WYQQLPGTAPKLLIY  GYYNRPS
C320-5      QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC  AGSSSDIGAGLGVH  WYQQLPGTAPKLLIY  GYYNRPS
C320-120    QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC  TGSSSDIGAGLGVH  WYQQLPGTAPKLLIY  GYYNRPS

Консенсус   QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC  XGSSSDIGAGLGVH  WYQQLPGTAPKLLIY  GYYNRPS
                                    A
                                    T

                                                CDR3
C320        GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLLPEDEGDYYC  QSYDGTLSAL  FGGGTKLTVLG  SEQ ID NO: 46
C320-5      GVPDRFSGSKSGTSASLTITGLLPEDEGDYYC  QSYDGTLSAL  FGGGTKLTVLG  SEQ ID NO: 62
C320-120    GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLLPEDEGDYYC  QSYDGTLSAL  FGGGTKLTVLG  SEQ ID NO: 82

Консенсус   GVPDRFSGSKSGTSASLXITGLLPEDEGDYYC  QSYDGTLSAL  FGGGTKLTVLG  SEQ ID NO: 95
                                A
                                T
```

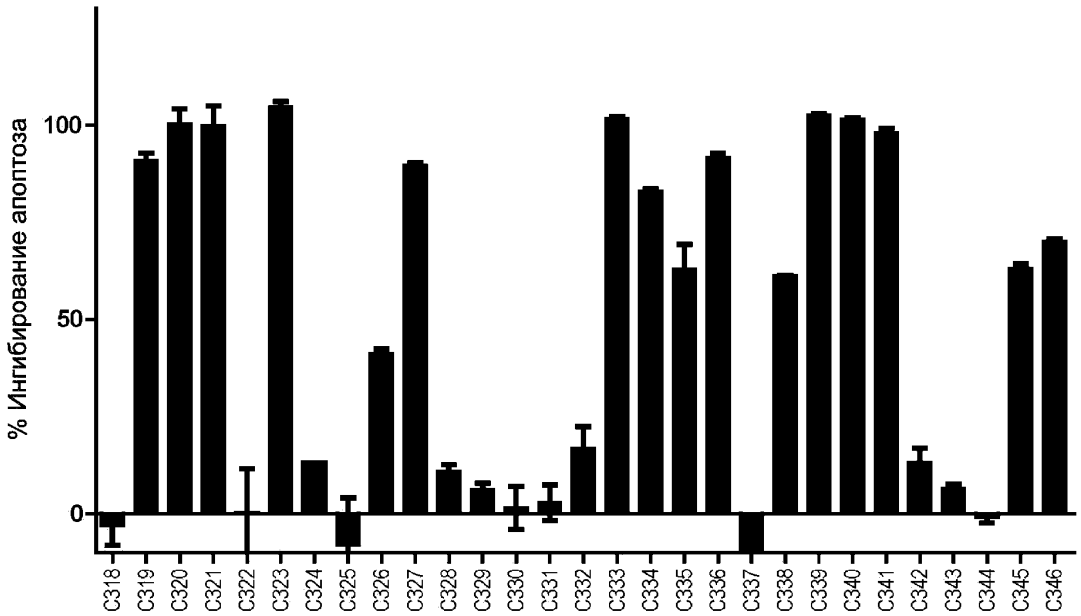
Фиг. 1F

```
                                        CDR1                                CDR2
C320        QSVLTQPP-SVSGAPGQRVTISC  AGSSSDIGAGLGVH  WYQQLPGTAPKLLIY  GYYNRPS
1RHH        EL....S.GTL.LSA.E.A.L..  ..............  ....K..Q..R....  .......
1TZGL       EI....S.GTQ.LS..E.A.L..  ..............  ....R..Q..R....  .......
2DD8        SYE.....-...V...KTAR.T.  ..............  ....K..Q..V.VV.  .......
2JB5        DIA....A-....S...SI....  ..............  ....H..K....M..  .......
3FKU        .PG.....-...KGLR.TA.LT.  ..............  .L..HQ.HP....S.  .......
3GBM        ........-...A....K.....  ..............  ..............  .......
3LMJ        .......S-....T.........  ..............  ..............  .......
3P30        ........-....T.........  ..............  ..............  .......
3IYW        .......S-....T.........  ..............  ..............  .......

Консенсус   XXXLTQXXXXXSXXXXXXXXXXC  AGSSSDIGAGLGVH  WXQQXXGXXPXLXXY  GYYNRPS
            QSV   PP-SV GAPGQRVTIS                   Y  LP TA K LI
            ELE   SAGTL LSARETARLT                   L  KQ QP R VV
            SIA    S  Q VGL KSI                         R  K  V MS
            DYG         KT   K                          H  H
             P          A

                                                CDR3
C320        GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLLPEDEGDYYC  QSYDGTLSAL  FGGGTKLTVLG  SEQ ID NO: 46
1RHH        I......c.G...DFT.T.GR.E...LAV....  ..........  .Q....EIKR.  SEQ ID NO: 164
1TZGL       .A......G...DFT.T.SR.E...FAV....  ..........  .Q...VE.KR.  SEQ ID NO: 165
2DD8        I.E.....N..NT.T.T.SRVEAG..A.....  ..........  .T...V.....  SEQ ID NO: 166
2JB5        .SN........NT...T.S..QA...A.....  ..........  ...........  SEQ ID NO: 167
3FKU        ISE...A.R..NT...T....Q....A.....  ..........  ...........  SEQ ID NO: 168
3GBM        I.............T.G....QTG..AN....  ..........  ...........  SEQ ID NO: 169
3LMJ        ...................S..QS...A.....  ..........  ...........  SEQ ID NO: 170
3P30       ...................S..RS...A.....  ..........  .A.........  SEQ ID NO: 171
3IYW        ...................S..RS...A.....  ..........  .A.........  SEQ ID NO: 172

Консенсус   XXPDRFXGXKSXXXXSXAXXXXXXEXXXDYYC  QSYDGTLSAL  FXGGTXXXXXG  SEQ ID NO: 173
            GVP   S S  GTSA L ITGLLP DEG                   G   KLTVL
            IAE   A G  NDFT T GRVEAG LAV                   Q   VEIKR
             SN     N        G S  QT  F N                  T
                    R             RS                       A
```

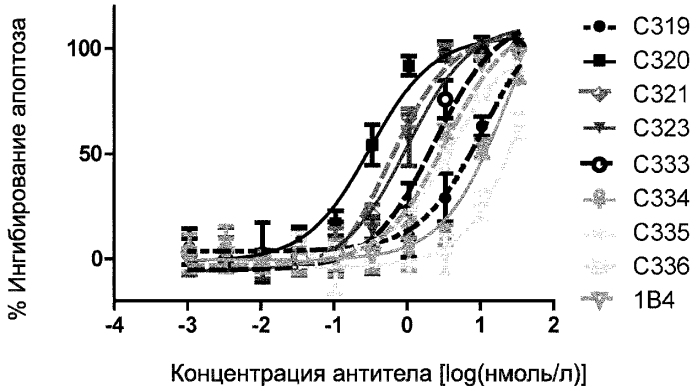
Фиг. 1G

```
                                        CDR1                                CDR2

Консенсус   XXXLTQXXXXXSXXXXXXXXXXC  XXSSSDIGAGLGVH  WXQQXXGXXPXLXXX  GYYNRPS
            QSV   PP-SV GAPGQRVTIS  AG                Y  LP TA K LIP
                                    TS                L  KQ QP R VVE
            QSV   PP-SV GAPGQRVTIS                      R  K  V MSG
            SIA   SSGTQ VGLRKSIRLT                      H  H       Y
            DYG    A  L KTA EKA
            EPE         AS   T
             L          L

                                                CDR3

Консенсус   XXXDRFXGXKSXXXXSXXXXXXXXXEXXXDYYC  QSYDGTLSAL  FXGGTXXXXXG  SEQ ID NO: 138
            GVP   S S  GTSA LAITGLLP DEG                   G   KLTVL
            IAE   A G  NDFT TTGRVEAG LAV                   Q   VEIKR
             SN     N        G S  QTA F N                  T
                    R             RS    A                  A
                                   Q
```

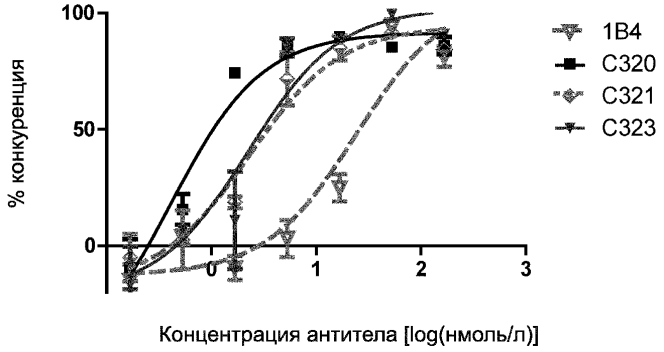
Фиг. 1H



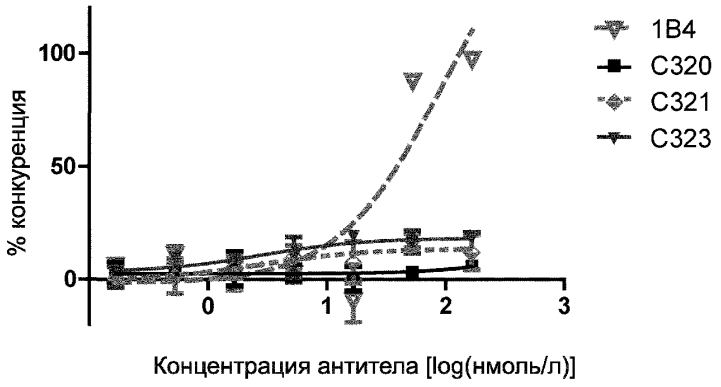

Фиг. 2



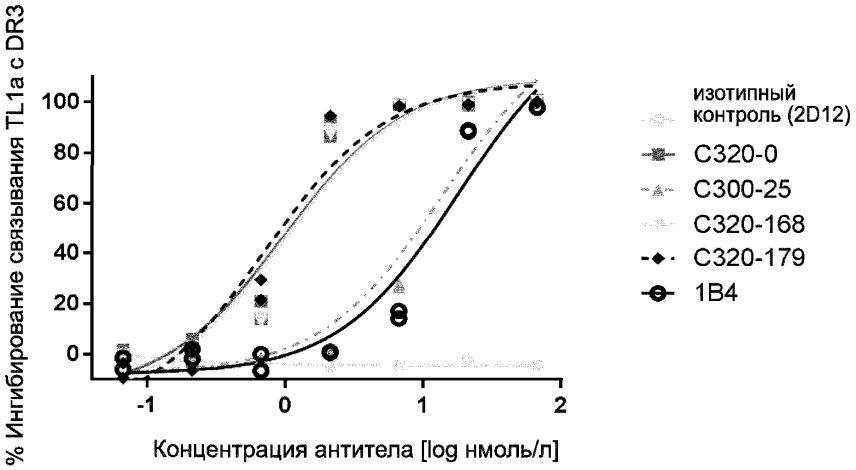

Фиг. 3



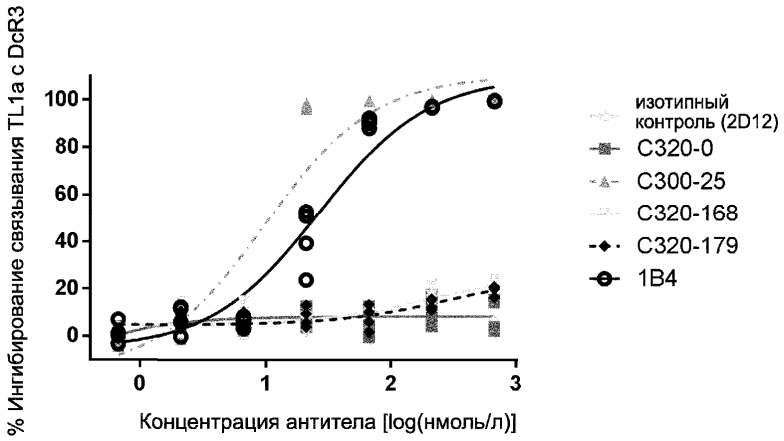

Фиг. 4A



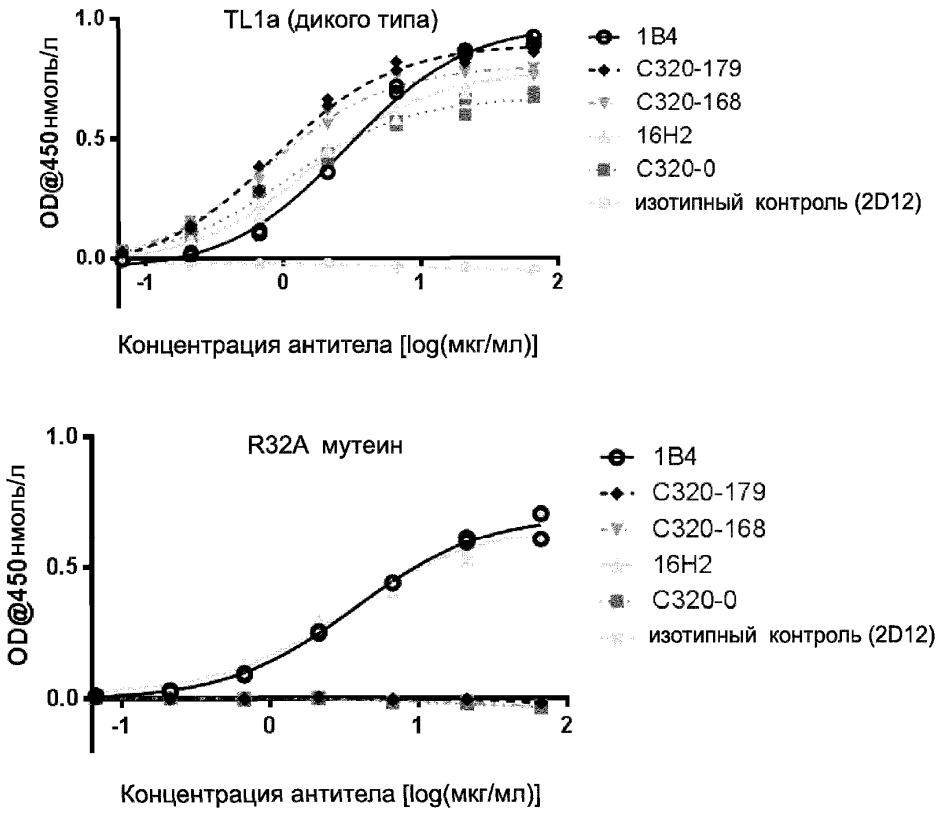

Фиг. 4B



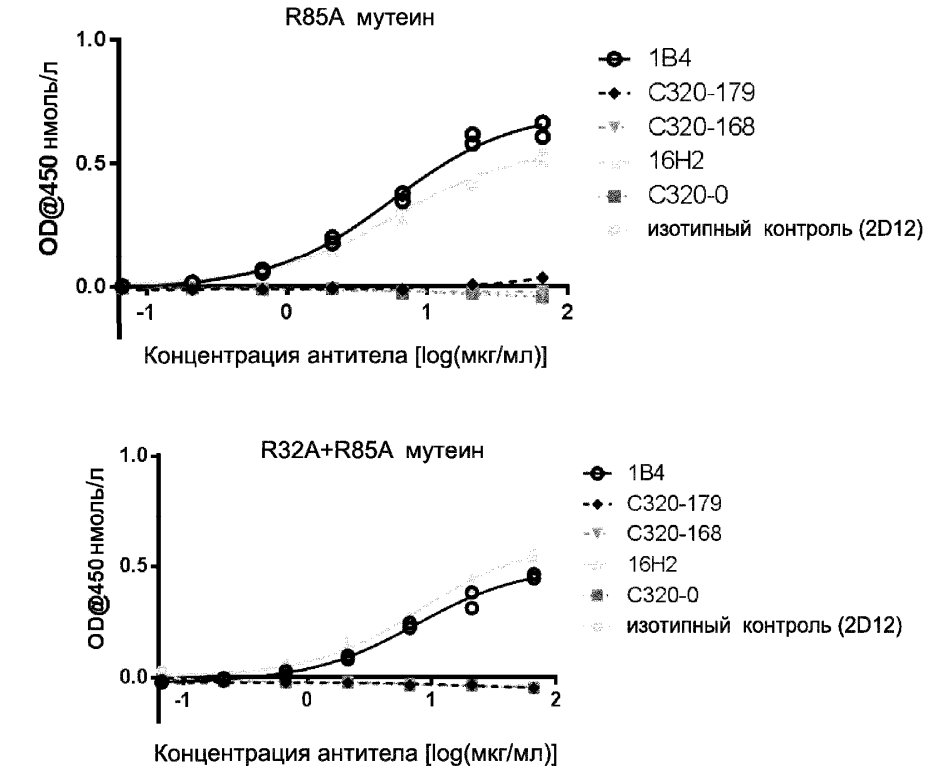

Фиг. 4C



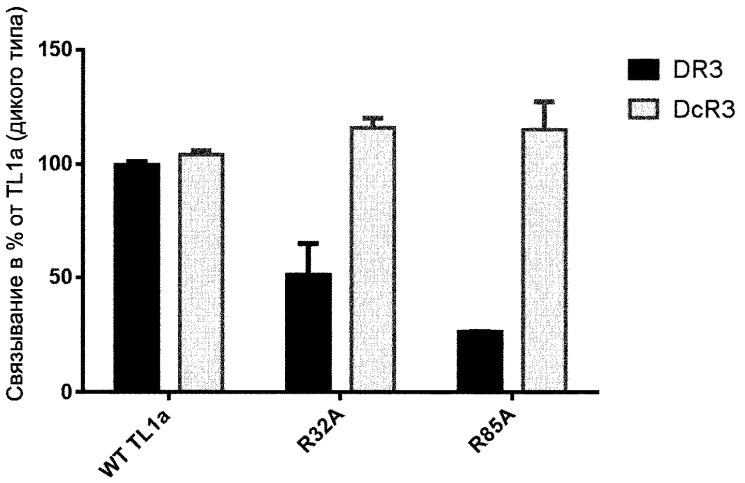

Фиг. 4D


TL1a (дикого типа)
OD@450 нмоль/л
1.0
0.5
0.0
-1
0
1
2
Концентрация антитела [log(мкг/мл)]
1B4
C320-179
C320-168
16H2
C320-0
изотипный контроль (2D12)
R32A мутеин
OD@450 нмоль/л
1.0
0.5
0.0
-1
0
1
2
Концентрация антитела [log(мкг/мл)]
1B4
C320-179
C320-168
16H2
C320-0
изотипный контроль (2D12)

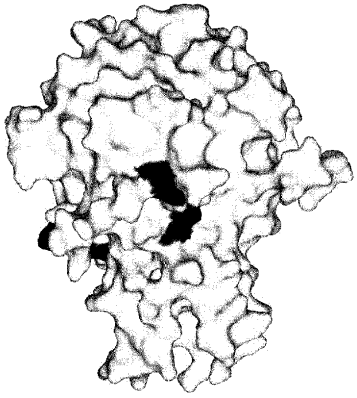
Фиг. 5A


R85A мутеин
OD@450 нмоль/л
1.0
0.5
0.0
-1
0
1
2
Концентрация антитела [log(мкг/мл)]
1B4
C320-179
C320-168
16H2
C320-0
изотипный контроль (2D12)
R32A+R85A мутеин
OD@450 нмоль/л
1.0
0.5
0.0
-1
0
1
2
Концентрация антитела [log(мкг/мл)]
1B4
C320-179
C320-168
16H2
C320-0
изотипный контроль (2D12)

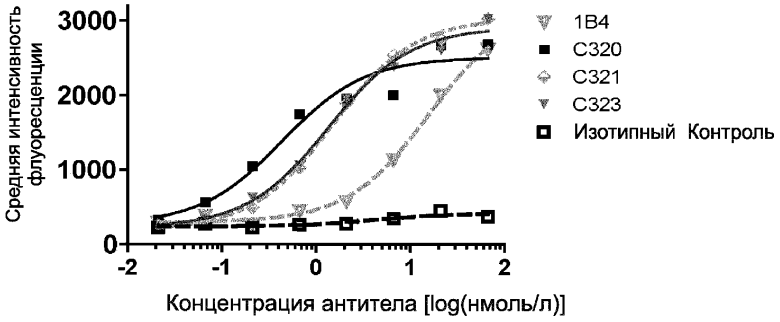
Фиг. 5B



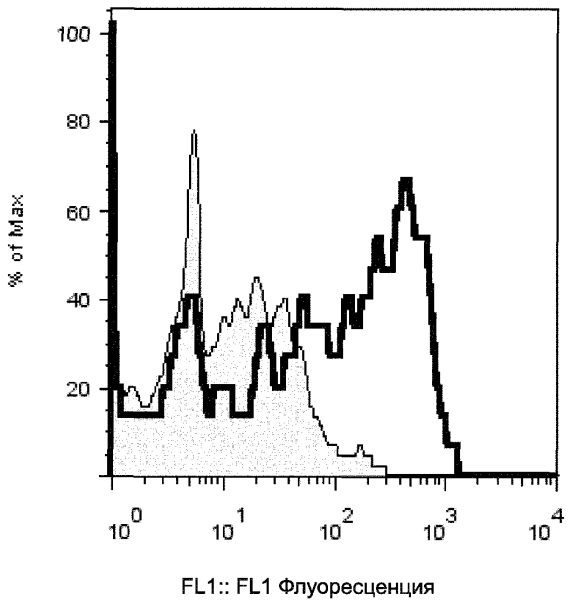

Фиг. 5C



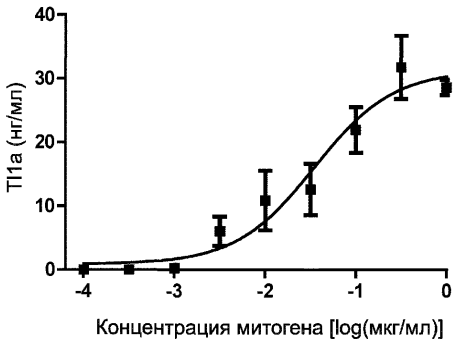
Фиг. 5D



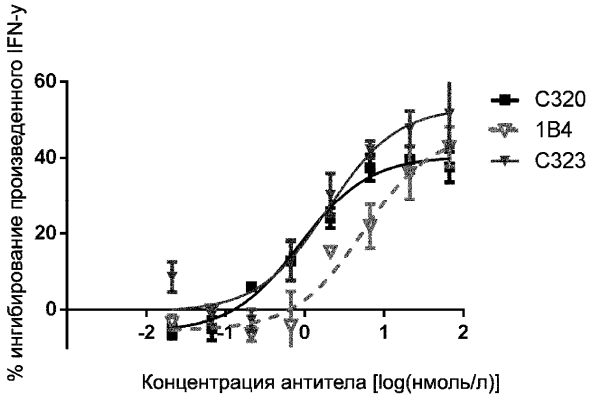

Фиг. 6



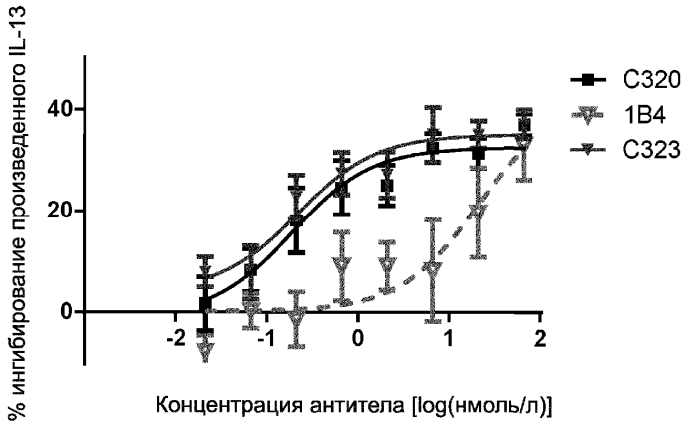

Фиг. 7А




Фиг. 7В




Фиг. 8А




Фиг. 8B

```
                                                   CDR1                                  CDR2
C320 вариабельная область легкой цепи QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC AGSSSDIGAGLGVH WYQQLPGTAPKLLIY GYYNRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGL
IGLV1-40*01                           ...................... T....N....YD.. ............... .NS.... ......................

                                                   CDR3
C320 вариабельная область легкой цепи LPEDEGDYYC QSYDGTLSAL FGGGTKLTVLG
IGLV1-40*01                           QA...A.... ....SS..GX XXXXXXXXXXX
```

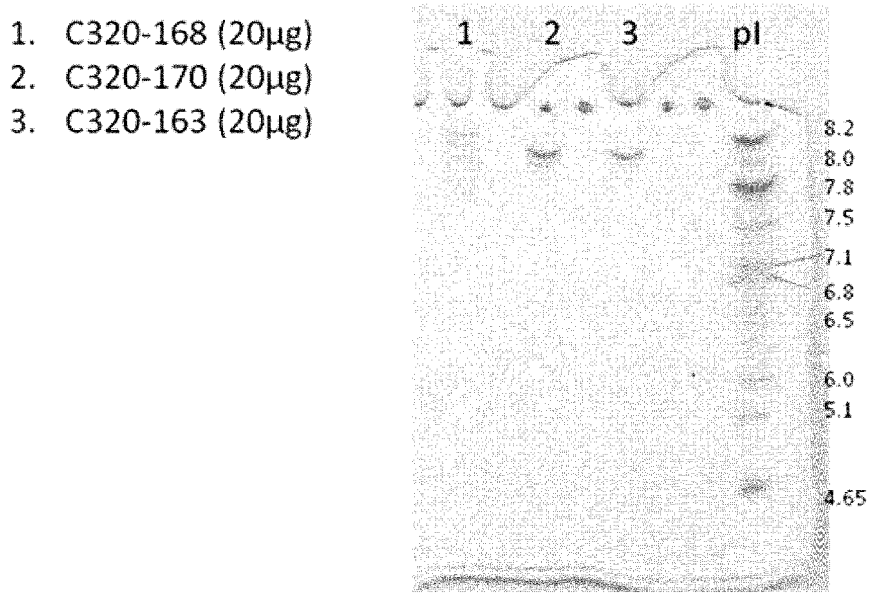
Фиг. 9A

```
                                        CDR1                                CDR2
C320        QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYDIN WVRQATGQGLEWMG WMNPNSGNTGYAQKFQG RVTMTRNTSISTAY
C320-162    ......................... .......... .....P........ .L............... .........A.....
C320-163    ......................... .......... .....P........ ................. ......ADR.T....
C320-164    ......................... .......... .....P........ .L............... ...............
C320-165    ......................... .......... .....P........ .L............... ...............
C320-166    ......................... .......... .....P........ .L............... ...............
C320-167    ......................... .......... .....P........ .L............... ...............
C320-168    ......................... .......... .....P........ .L............... ...............
C320-169    ......................... .......... .....P........ .L............... ...............
C320-170    ......................... .......... .....P........ ................. ......ADR.T....
C320-171    ......................... .......... .....P........ ................. ......ADR.T....
C320-172    ......................... .......... .....P........ ................. ......ADR.T....
C320-179    ......................... .......... .....P........ .L............... ......ADR.T....
C320-183    ......................... .......... .....P........ .L............... ......ADR.T....

Консенсус   ......................... .......... .....X........ .X............... ......XXXXX....
                                                     T         M                       RNTSI
                                                     P         L                       ADRAT

                                        CDR3
C320        MELSSLRSEDTAVYYCAR EVPDTASFEY WGQGTLVTVSS
C320-162    .................. ...E...... ........... SEQ ID NO: 175
C320-163    .................. .......... ........... SEQ ID NO: 176
C320-164    .................. ...E..... ........... SEQ ID NO: 177
C320-165    .................. ...E...... ........... SEQ ID NO: 178
C320-166    .................. ...E...... ........... SEQ ID NO: 179
C320-167    .................. ...E...... ........... SEQ ID NO: 180
C320-168    .................. ...E..A... ........... SEQ ID NO: 181
C320-169    .................. ...E..A... ........... SEQ ID NO: 182
C320-170    .................. .......... ........... SEQ ID NO: 183
C320-171    .................. .......... ........... SEQ ID NO: 184
C320 172    .................. .......... ........... SEQ ID NO: 185
C320-179    .................. ...E..A... ........... SEQ ID NO: 186
C320-183    .................. ...E..A... ........... SEQ ID NO: 187

Консенсус   .................. ...X..X... ........... SEQ ID NO: 173
                                  D  S
                                  E  A
```

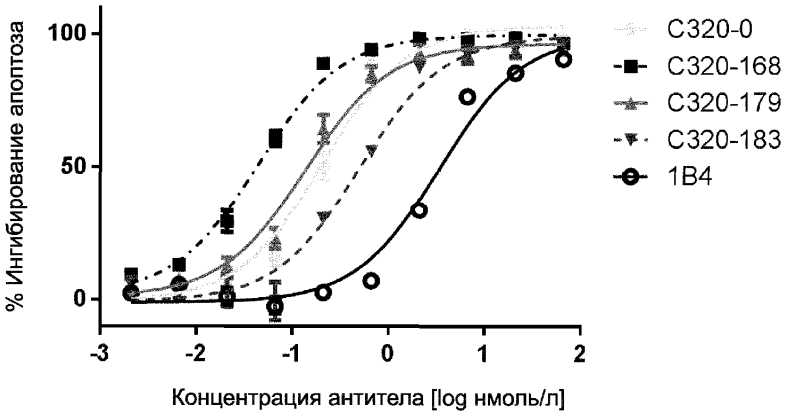
Фиг. 9B

```
                                        CDR1                                CDR2
C320        QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC  AGSSSDIGAGLGVH  WYQQLPGTAPKLLIY  GYYNRPS  GVPDRFSGSKSGTSASLAITGL
C320-162    ......................  ..............  ...............  .......  ..................T....
C320-163    ......................  ..............  ...............  .......  ..................T....
C320-164    ......................  .S............  ...............  .......  ..................T....
C320-165    ......................  TS............  ...............  .......  ..................T....
C320-166    ......................  T.............  ...............  .......  ..................T....
C320-167    ......................  ..............  ...............  .......  ..................T....
C320-168    ......................  TS............  ...............  .......  ..................T....
C320-169    ......................  ..............  ...............  .......  ..................T....
C320-170    ......................  TS............  ...............  .......  ..................T....
C320-171    ......................  TS............  ..............P.  .......  ..................T....
C320-172    ......................  TS............  ..............E.  .......  ..................T....
C320-179    ......................  TS............  ..............E.  .......  ..................T....
C320-183    ......................  TS............  ..............G.  .......  ..................T....

Консенсус   ......................  XX............  ..............X.  .......  ..................X....
                                    AG                             Y                                A
                                    TS                             P                                T
                                                                E
                                                                 G

                        CDR3
C320        LPEDEGDYYC  QSYDGTLSAL  FGGGTKLTVLG
C320-162    ..........  ..........  ...........   SEQ ID NO: 188
C320-163    ..........  ..........  ...........   SEQ ID NO: 189
C320-164    ..........  ..........  ...........   SEQ ID NO: 190
C320-165    ..........  ..........  ...........   SEQ ID NO: 191
C320-166    ..........  ..........  ...........   SEQ ID NO: 192
C320-167    ..........  ..........  ...........   SEQ ID NO: 193
C320-168    ..........  ..........  ...........   SEQ ID NO: 194
C320-169    ..........  ..........  ...........   SEQ ID NO: 195
C320-170    ..........  ..........  ...........   SEQ ID NO: 196
C320-171    ..........  ..........  ...........   SEQ ID NO: 197
C320-172    ..........  ..........  ...........   SEQ ID NO: 198
C320-179    ..........  ..........  ...........   SEQ ID NO: 199
C320-183    ..........  ..........  ...........   SEQ ID NO: 200

Консенсус   ..........  ..........  ...........   SEQ ID NO: 174
```

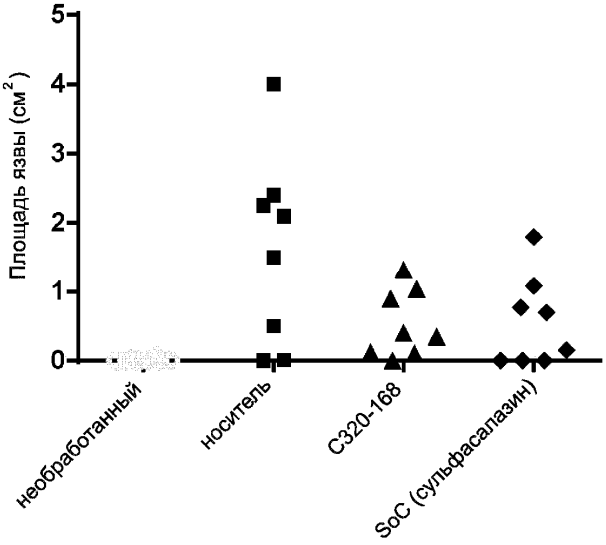
Фиг. 9C



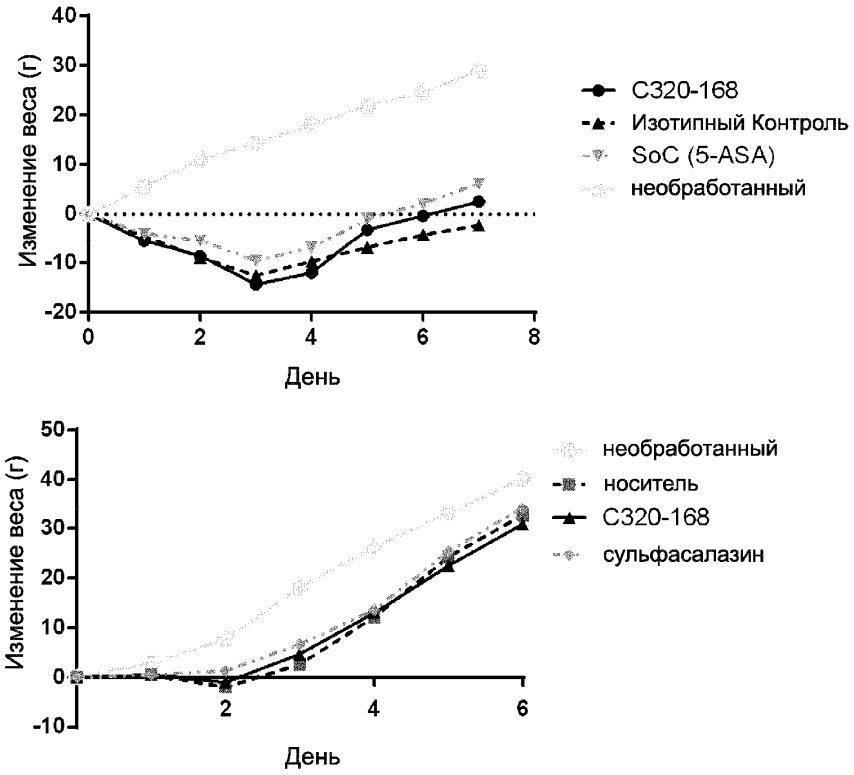

Фиг. 9D



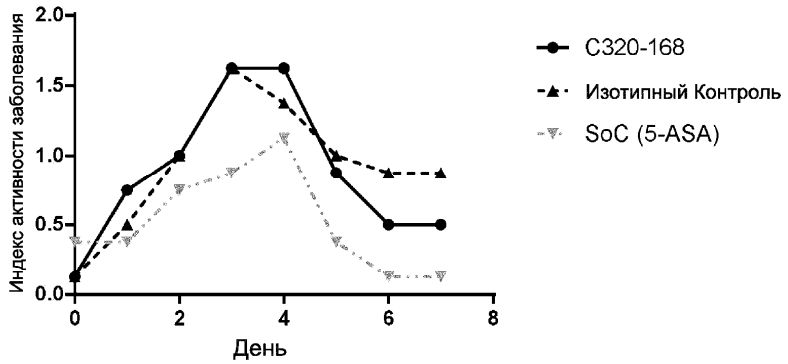

Фиг. 9E



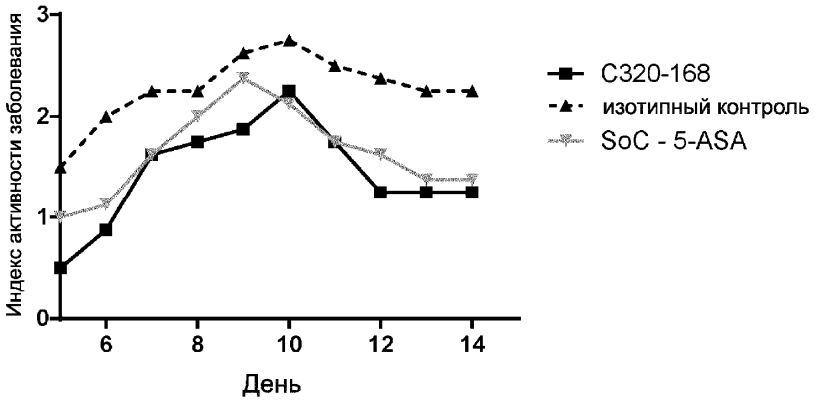

Фиг. 10A



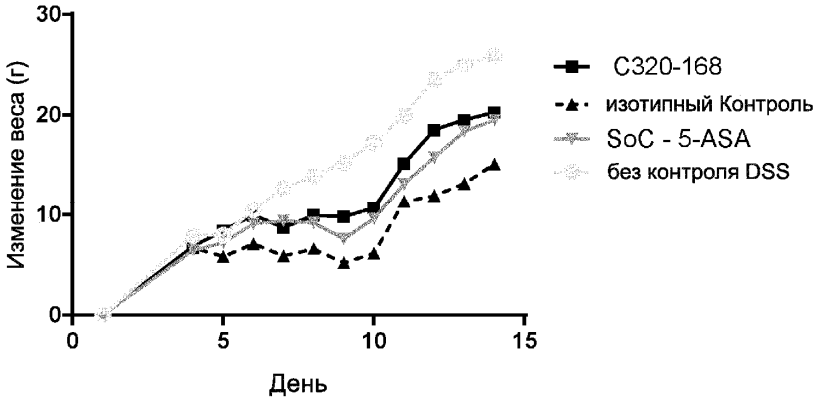

Фиг. 10B



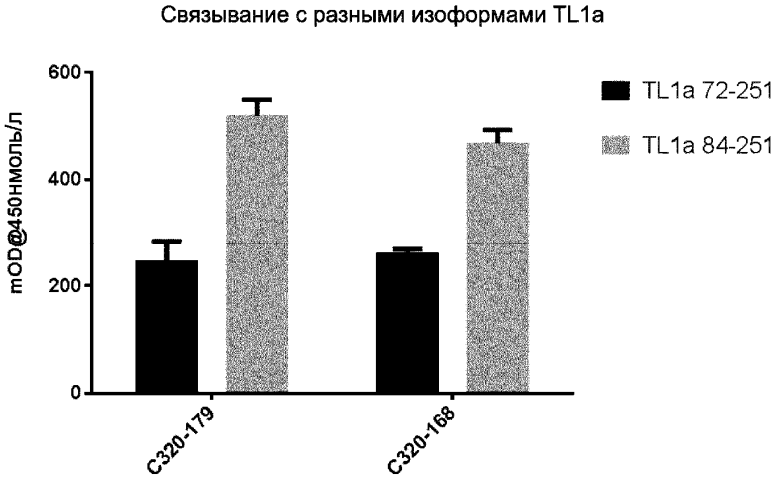

Фиг. 10C




Фиг. 11A




Фиг. 11B




Фиг. 12