

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039084**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.01

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201892440

(22) Дата подачи заявки
2017.05.05

(54) **АНТИТЕЛА К TL1A И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/333,470**

(32) **2016.05.09**

(33) **US**

(43) **2019.04.30**

(86) **PCT/US2017/031281**

(87) **WO 2017/196663 2017.11.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БРИСТОЛ-МАЙЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:
Пэшайн Ачал, Чен Гуодонг (US)

(74) Представитель:
**Глухарёва А.О., Лыу Т.Н., Угрюмов
В.М., Дементьев В.Н., Строкова О.В.,
Христофоров А.А., Гизатуллина Е.М.
(RU)**

(56) **US-A1-2012114654**
WO-A1-2015073580
WO-A1-2013044298
WO-A1-2014106602
WO-A2-2009064854
US-A1-2012079611
US-A1-2011217310

**CHENYANG ZHAN ET AL.: "Biochemical
and Structural Characterization of the Human
TL1A Ectodomain", BIOCHEMISTRY, vol. 48,
no. 32, 18 August 2009 (2009-08-18), pages
7636-7645, XP055174305, ISSN: 0006-2960, DOI:
10.1021/bi900031w, the whole document**

(57) Раскрыты антитела, которые специфически связываются с членом 15 суперсемейства рецепторов TNF (TNFSF15), также известного как TL1A. Также раскрыты способы получения и применения антител к TL1A.

B1

039084

039084

B1

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение направлено на антитела против TL1A и способы изготовления и применения таких антител. Предполагается, что антитела являются особенно пригодными в лечении заболеваний иммунной системы.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Белки, которые структурно связаны с фактором некроза опухоли (TNF), собирательно обозначаются как суперсемейство TNF. TL1A, член суперсемейства TNF, представляет собой TNF-подобный цитокин, который связывается с рецептором домена смерти (DR) 3 и представляет костимулирующие сигналы к активированным лимфоцитам. В результате этого взаимодействия TL1A индуцирует секрецию IFN-гамма и, таким образом, может принимать участие в образовании эффекторных ответов Т-хелперов 1 типа.

TL1A представляет собой трансмембранный белок II типа и был обозначен членом 15 суперсемейства TNF (TNFSF15). TL1A экспрессируется преимущественно эндотелиальными клетками и моноцитами, и его экспрессия индуцируется TNF- α и IL-1 α (Migone et al., *Immunity*, 16: 479-92 (2002)). TL1A активируется в результате действия провоспалительных цитокинов TNF и IL-1 и также в результате действия иммунных комплексов (IC) (Hsu et al., *Exp. Cell Res.*, 292: 241-51 (2004)).

TL1A опосредует передачу сигнала с помощью своего когнатного рецептора DR3, рецептора смерти, активность которого, как известно, индуцирует как факторы смерти, так и выживания. Предполагается, что TL1A, аналогично TNF, также циркулирует в качестве гомотримерной растворимой формы (Kim et al., *J. Immunol. Methods*, 298(1-2): 1-8 (March 2005)).

TL1A связывается с высокой аффинностью с рецептором смерти 3 (DR3), который является членом семейства рецепторов TNF, содержащих домен смерти, и также называется Wsl-1, Apo-3, TRAMP и LARD, и в настоящее время обозначается член 25 суперсемейства рецепторов TNF (TNFRSF25). В зависимости от клеточного контекста связывание DR3 TL1A может активировать один из двух сигнальных путей, активацию фактора транскрипции NF- κ B или активацию каспаз и апоптоз. TL1A участвует в костимуляции Т-клеток и поляризации Th1. В активированных Т-клетках TL1A функционирует специфически с помощью своего связанного с поверхностью рецептора DR3 в целях активации выживаемости клеток и секреции провоспалительных цитокинов. Секретируемый рецептор-ловушка 3 (DcR3), растворимый белок суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), блокирует активацию TL1A (Kim et al., "Identification of naturally secreted soluble form of TL1A, a TNF-like cytokine," *J Immunol Methods*, 298:1-8 (2005)).

Таким образом, в данной области техники сохраняется потребность в композициях, которые могут быть использованы в лечении различных воспалительных и иммунных заболеваний и нарушений, таких как аллергия/астма, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника, системная красная волчанка (SLE), псориаз, сахарный диабет 1 типа и отторжения трансплантата. Настоящее изобретение, направленное на моноклональные антитела против TL1A, удовлетворяет эту потребность.

Краткое описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение направлено на выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с TL1A человека и блокируют связывание с DR3, тем самым ингибируя иммуностимулирующий сигнал, который иным образом возник бы в TL1A-экспрессирующих клетках.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание с TL1A человека с антителом 10A4.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TL1A в эпитопе, содержащем один или несколько остатков 102-116 (SEQ ID NO:16) или 166-180 (SEQ ID NO: 17).

Настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TL1A в эпитопе, содержащем один или несколько из остатков ¹⁶⁹QAGR¹⁷² и один или несколько из остатков ¹¹³KNQF¹¹⁶. Вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TL1A в эпитопе, содержащем последовательность ¹⁶⁹QAGR¹⁷² или ¹¹³KNQF¹¹⁶. Вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TL1A в эпитопе, содержащем последовательность ¹⁶⁹QAGR¹⁷² и ¹¹³KNQF¹¹⁶.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело к TL1A или его антигенсвязывающий фрагмент, который по сути ингибирует связывание TL1A человека с DR3. Вариант осуществления по настоящему изобретению предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается как с TL1A человека, так и с макака-крабоеда.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TL1A, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDRH1, показанную в SEQ ID NO: 7; последовательность CDRH2, показанную в SEQ ID NO: 8; и последовательность CDRH3, показанную в SEQ ID NO: 9.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TL1A, содержащим вариabельный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDRL1, показанную в SEQ ID NO: 12; последовательность CDRL3, показанную в SEQ ID NO: 13; и последовательность CDRL3, показанную в SEQ ID NO: 14.

Вариант осуществления по настоящему изобретению предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TL1A, содержащий вариabельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDRH1, показанную в SEQ ID NO: 7; последовательность CDRH2, показанную в SEQ ID NO: 8; и последовательность CDRH3, показанную в SEQ ID NO: 9, и вариabельный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDRL1, показанную в SEQ ID NO: 12; последовательность CDRL2, показанную в SEQ ID NO: 13; и последовательность CDRL3, показанную в SEQ ID NO: 14.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий одну или несколько тяжелых цепей и одну или несколько легких цепей, при этом тяжелая цепь содержит вариabельный участок тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичный последовательности SEQ ID NO: 6; и легкая цепь содержит вариabельный участок легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичный последовательности SEQ ID NO: 11.

Настоящее изобретение предусматривает способ получения антитела к TL1A или его антигенсвязывающего фрагмента, предусматривающий культивирование клетки-хозяина, трансформированной вектором экспрессии, кодирующим вариabельный участок тяжелой и/или легкой цепи антитела или фрагмент в условиях, которые способствуют получению антитела или фрагмента, и очистку антитела из клетки.

Вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает способ выявления наличия TL1A в образце, предусматривающий приведение образца в контакт с антителом к TL1A или антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению в условиях, которые способствуют образованию комплекса между антителом или фрагментом и TL1A, и выявление образования комплекса.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 изображено титрование моноклонального антитела 10A4.F7 в клетках CHO TL1A. Разведения антитела TL1A инкубировали с 10^5 клеток CHO TL1A в 100 мкл буфера FACS в течение 1 ч. Клетки промывали два раза буфером FACS и связывание антитела выявляли с помощью окрашивания антителом к Gig человека с PE (поверхностно-специфическим) и оценивали с помощью FACS. EC50 составляет 0,40 нМ.

На фиг. 2 изображено ингибирование связывания TL1A с клетками CHO hDR3 антителом 10A4.F7. TL1A SH6 при 200 нг/мл (50 мкл) инкубировали с разведениями антитела 10A4.F7 (50 мкл) или контрольного антитела IgG1 (все реагенты в буфере FACS). Смесь инкубировали в течение 30 мин и затем добавляли к 10^5 клеткам CHO hDR3 в 100 мкл буфера FACS и инкубировали в течение 1 ч. Клетки промывали дважды в буфере FACS и связывание TL1A с клетками CHO DR3 выявляли по окрашиванию антителом к 6xHis с PE (R&D systems) и оценивали с помощью FACS. IC50 в этом эксперименте составлял 0,524 нМ.

На фиг. 3 представлена сенсограмма Nu-TL1A-His (250, 200, 150, 100 и 50 н) с 10A4.F7, захваченным на поверхности G-белка.

На фиг. 4 изображена диаграмма со сгруппированными данными.

На фиг. 5 изображена физическая стабильность 10A4.F7 на основании DSC.

На фиг. 6 изображена нуклеотидная (SEQ ID NO: 1) и аминокислотная последовательность легкой цепи каппа TL1A.2-g4P (SEQ ID NO: 2).

На фиг. 7 изображена нуклеотидная (SEQ ID NO: 3) и аминокислотная последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 4).

На фиг. 8 изображена нуклеотидная (SEQ ID NO: 5) и аминокислотная последовательность VH1-участка 10A4.F7 (SEQ ID NO: 6). Указаны CDRH1, (SEQ ID NO: 7), CDRH2 (SEQ ID NO: 8) и CDRH3 (SEQ ID NO: 9).

На фиг. 9 изображена нуклеотидная (SEQ ID NO: 10) и аминокислотная последовательность 10A4.F7 VL1-участка 10A4.F7 (SEQ ID NO: 11). Указаны CDRL1, (SEQ ID NO: 12), CDRL2 (SEQ ID NO: 13) и CDRL3 (SEQ ID NO: 14).

На фиг. 10 изображено картирование эпитопа 10A4 с помощью HDX-MS. Подчеркнуты участки эпитопов. Указаны аминокислоты 85-101, (SEQ ID NO: 15), 102-116 (SEQ ID NO: 16) и 166-180 (SEQ ID NO: 17).

На фиг. 11 изображены иллюстративные кинетические кривые HDX двух пептидных участков, аминокислоты 102-116 и 166-180 TL1A характеризовались значимой защитой 10A4 (синяя кривая и красная кривая). С другой стороны, не относящийся к эпитопу участок 72-84 (SEQ ID NO: 18) характеризовался отсутствием изменений захвата дейтерия при связывании mAb.

На фиг. 12 изображены два участка TL1A, которые были выявлены с помощью HDX, картированные в структуре TL1A.

На фиг. 13 изображен тример TL1A в модели FAB (красный = Н-цепь, розовый = L-цепь) в случае mAb 10A4, характеризующийся тем, что непрерывному эпитопу в TL1A требуются взаимодействия как

от тяжелой, так и от легкой цепей. Пептидный участок 1 (в цвете фуксии) и пептидный участок 2 (в синем цвете) образуют непрерывный эпитоп, претерпевающий воздействие растворителя.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

В настоящем изобретении раскрыты выделенные антитела, в частности, моноклональные антитела, например, моноклональные антитела человека, которые специфически связываются с TL1A человека и блокируют связывание с DR3, тем самым ингибируя иммуностимулирующий сигнал, который иным образом возник бы в TL1A-экспрессирующих клетках. В настоящем документе предусмотрены выделенные антитела, способы изготовления таких антител и фармацевтических композиций, разработанных в целях содержания антител или фрагментов. Также в настоящем документе предусмотрены способы применения антител для иммунной супрессии, в отдельности или в комбинации с другими иммуносупрессивными средствами. Соответственно антитела к huTL1A, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в лечении широкого ряда терапевтических применений, в том числе, например, лечении заболеваний иммунной системы.

Определения

Термин "антитело", используемый в настоящем документе, может включать в себя целые антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты (т.е., "антигенсвязывающие участки") или их одиночные цепи. Термин "антитело" относится в одном варианте осуществления к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, или его антигенсвязывающему участку. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного участка тяжелой цепи (сокращенно названного в настоящем документе как V_H) и константного участка тяжелой цепи. В определенных встречающихся в природе антителах IgG, IgD и IgA константный участок тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. В определенных встречающихся в природе антителах каждая легкая цепь состоит из переменного участка легкой цепи (сокращенно названного в настоящем документе как V_L) и константного участка легкой цепи. Константный участок легкой цепи состоит из одного домена, CL. V_H - и V_L -участки могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждый V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех каркасных участков (FR), упорядоченных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные участки тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные участки антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q) классической системы комплемента.

Антитела в типичном случае специфически связываются со своим когнатным антигеном с высокой аффинностью, отображенной константой диссоциации (K_D) от 10^7 до 10^{11} М или менее. Считается, что любое значение K_D , большее чем приблизительно 10^6 М, как правило, указывает на неспецифическое связывание. Используемое в настоящем документе антитело, которое "связывается специфически" с антигеном, относится к антителу, которое связывается с антигеном и по сути идентичным антигенам с высокой аффинностью, которая означает наличие значения K_D , составляющего 10^7 М или менее, предпочтительно 10^8 М или менее, даже более предпочтительно 5×10^9 М или менее, и наиболее предпочтительно от 10^8 М до 10^{10} М или менее, однако не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами. Антиген является "по сути идентичным" определенному антигену, если он характеризуется высокой степенью идентичности последовательности определенному антигену, например, если он по меньшей степени на 80%, по меньшей степени на 90%, предпочтительно по меньшей степени на 95%, более предпочтительно по меньшей степени на 97% или даже более предпочтительно по меньшей степени на 99% идентичен последовательности определенного антигена. В качестве примера антитело, которое специфически связывается с TL1A человека, может также перекрестно реагировать с TL1A от определенных видов приматов, не относящихся к человеку (например, макака-крабоеда), но также может перекрестно не реагировать с TL1A от других видов или с антигеном, отличным от TL1A.

Имуноглобулин может принадлежать к любому из общеизвестных изотипов, в том числе без ограничения IgA, секреторному IgA, IgG и IgM. Изотип IgG подразделяется на подклассы у определенных видов: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у человека, и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мыши. Имуноглобулины, например IgG1 человека, существуют в нескольких аллотипах, которые отличаются друг от друга не больше, чем несколькими аминокислотами. Термин "антитело" может включать в себя, в качестве примера, моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие антитела и антитела, не относящиеся к человеку; полностью синтетические антитела; и одноцепочечные антитела.

Термин "антигенсвязывающий участок" или "антигенсвязывающий фрагмент", используемый в настоящем документе, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, TL1A человека). Примеры связывающих фрагментов, охватываемых в объеме термина "антигенсвязывающий участок/фрагмент" антитела включают в себя (i) Fab-фрагмент - одновалентный фрагмент, состоящий из V_L -, V_H -, CL- и CH1-доменов; (ii)

P(ab')₂-фрагмент - двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из V_H- и CH1-доменов; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из V_L- и V_H-доменов одного плеча антитела, и (v) dAb-фрагмент (Ward et al, (1989) Nature 341:544-546), состоящий из V_H-домена. Выделенная определяющая комплементарность область (CDR) или комбинация из двух или более выделенных CDR, соединенных синтетическим линкером, может содержать антигенсвязывающий домен антитела, если способен связывать антиген.

Если не указано иное, термин "фрагмент" при использовании с отсылкой на антитело, например, как в пункте формулы изобретения, относится к антигенсвязывающему фрагменту антитела таким образом, что "антитело или фрагмент" имеет то же самое значение, что и "антитело или его антигенсвязывающий фрагмент".

Термин "моноклональное антитело", используемый в настоящем документе, относится к антителу, которое характеризуется единственной специфичностью и аффинностью связывания с определенным эпитопом, или композицией антитела, в которой все антитела характеризуются единственной специфичностью и аффинностью связывания с определенным эпитопом. В типичном случае такие моноклональные антитела будут происходить из одной клетки или нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, и будут образовываться без намеренного введения каких-либо изменений последовательностей. Соответственно термин "человеческое моноклональное антитело" относится к моноклональному антителу, которое имеет переменные и необязательные константные участки, полученные из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии человека. В одном варианте осуществления человеческие моноклональные антитела получают с помощью гибридомы, например, получают с помощью слияния В-клетки, полученной из трансгенного или трансхромосомного животного, не относящегося к человеку (например, трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи человека), с иммортализованной клеткой.

Термин "рекомбинантное человеческое антитело", используемый в настоящем документе, включает в себя все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью рекомбинантных средств, например (а) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным либо трансхромосомным по генам человеческих иммуноглобулинов, или гибридомы, полученной из них, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (с) антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных человеческих антител, и (d) антитела, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные с помощью любых других средств, которые включают в себя сплайсинг последовательностей генов человеческих иммуноглобулинов с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные участки, в которых используются определенные иммуноглобулиновые последовательности зародышевой линии человека, кодируются генами зародышевой линии, однако включают в себя последующие реаранжировки и мутации, которые возникают, например, во время созревания антител. Как известно в данной области (см., например, Lonberg (2005) Nature Biotech. 23(9): 1117-1125), вариабельный участок содержит антигенсвязывающий домен, который кодируется различными генами, которые реаранжируются с образованием антитела, специфического в отношении чужеродного антигена. Помимо реаранжировки, вариабельный участок может быть дополнительно модифицирован с помощью нескольких одиночных изменений аминокислот (обозначаемых как соматическая мутация или гипермутация) с повышением аффинности антитела к чужеродному антигену. Константный участок будет меняться при дополнительном ответе на антиген (например, переключении изотипа). Таким образом, реаранжированные и соматически мутировавшие в ответ на антиген последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуноглобулиновые полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи, могут быть не идентичными исходным последовательностям зародышевой линии, однако вместо этого будут по сути идентичными или аналогичными (т.е., быть по меньшей мере на 80% идентичными).

Термин "человеческое" антитело (HuMAb) относится к антителу, имеющему переменные участки, в которых как каркасные, так и CDR-участки, происходят из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии человека. Помимо этого, если антитело содержит константный участок, то константный участок также происходит из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела, описанные в настоящем документе, могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые иммуноглобулиновыми последовательностями зародышевой линии человека (например, мутации, вводимые с помощью случайного либо сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*). Однако термин "человеческое антитело", используемый в настоящем документе, не включает в себя антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего, такого как мышь, привиты на каркасные последовательности человека. Термины "человеческие" антитела и "полностью человеческие" антитела используются синонимично.

Фразы "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфическое в отношении антигена" используются в настоящем документе взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфически связывается с антигеном".

Предполагается, что термин "выделенное антитело", используемый в настоящем документе, относится к антителу, которое по сути не содержит других антител, имеющих отличные антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с TL1A, по сути не содержит антител, которые специфически связывают антитела, отличные от TL1A). Выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом TL1A, может, однако иметь перекрестную реактивность с другими белками TL1A от других видов.

Используемый в настоящем документе термин антитело, которое "ингибирует связывание TL1A с DR3", относится к антителу, которое ингибирует связывание TL1A человека с DR3 человека с EC50, составляющей приблизительно 1 мкг/мл или менее, такой как приблизительно 0,9 мкг/мл или менее, приблизительно 0,85 мкг/мл или менее, приблизительно 0,8 мкг/мл или менее, приблизительно 0,75 мкг/мл или менее, приблизительно 0,7 мкг/мл или менее, приблизительно 0,65 мкг/мл или менее, приблизительно 0,6 мкг/мл или менее, приблизительно 0,55 мкг/мл или менее, приблизительно 0,5 мкг/мл или менее, приблизительно 0,45 мкг/мл или менее, приблизительно 0,4 мкг/мл или менее, приблизительно 0,35 мкг/мл или менее, приблизительно 0,3 мкг/мл или менее, приблизительно 0,25 мкг/мл или менее, приблизительно 0,2 мкг/мл или менее, приблизительно 0,15 мкг/мл или менее или приблизительно 0,1 мкг/мл или менее в способах, признанных в данной области техники, например, в анализе клеточного связывания на основе FACS.

Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к участку антигена (например, TL1A), с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы в белковых антигенах могут быть образованы как из прилегающих аминокислот (обычно линейный эпитоп), так и из неприлегающих аминокислот, соединенных с помощью третичного фолдинга белка (обычно конформационный эпитоп). Эпитопы, образованные из прилегающих аминокислот, в типичном случае, однако не всегда, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные с помощью третичного фолдинга, в типичном случае утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп в типичном случае включает в себя по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Термин "картирование эпитопа" относится к процессу идентификации молекулярных детерминант антигена, участвующего в распознавании комплекса антитело-антиген. Способы определения того, какие эпитопы связываются с определенным антителом, хорошо известны в данной области техники и включают в себя, например, анализы на основе иммуноблоттинга и иммунопреципитации, в которых накладываются или прилегающие пептиды (например, из TL1A) исследуют в отношении реактивности с определенным антителом (например, антителом к TL1A); рентгенокристаллографию; 2-мерный ядерный магнитный резонанс; дрожжевой дисплей; и HDX-MS (см. Пример 8 в настоящем документе); (см., например, Epitope Mapping Protocols в *Methods in Molecular Biology*, vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Термин "связывается с тем же самым эпитопом" в отношении двух или более антител означает, что антитела связываются с тем же самым сегментом аминокислотных остатков, что и определяется с помощью определенного способа. Методики определения того, связываются ли антитела с "тем же самым эпитопом TL1A", что и антитела, описанные в настоящем документе, включают в себя, например, способы картирования эпитопа, такие как рентгенологические анализы кристаллов комплексов антиген-антитело, которые обеспечивает атомное разрешение эпитопа, и масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS) (см. Пример 8 в настоящем документе). В других способах контролируют связывание антитела с антигенными фрагментами (например, протеолитическими фрагментами) или с мутировавшими вариантами антигена, в которых утрата связывания в результате модификации аминокислотного остатка в антигенной последовательности считается доказательством эпитопного компонента, такие как аланин-сканирующий мутагенез (Cunningham & Wells (1985) *Science* 244:1081) или дрожжевой дисплей вариантов мутантных целевых последовательностей. Кроме этого, также могут быть использованы компьютерные комбинаторные способы картирования эпитопа. Эти способы основаны на способности антитела, представляющего интерес, аффинно выделять специфические короткие пептиды из комбинаторных пептидных библиотек фагового дисплея. Предполагается, что антитела, имеющие те же самые или близкородственные VH- и VL-последовательности или те же самые последовательности CDR1, 2 и 3 связываются с одним и тем же эпитопом.

Антитела, которые "конкурируют с другим антителом за связывание с мишенью", относятся к антителам которые ингибируют (частично или полностью) связывание другого антитела с мишенью. Конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мишенью, т.е., ингибирует ли и в какой степени одно антитело связывание другого антитела с мишенью, может быть определено с помощью известных конкурентных экспериментов. В определенных вариантах осуществления антитело конкурирует с другим антителом и ингибирует его связывание с мишенью по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Уровень ингибирования или конкуренции может быть различным в зависимости от того, какое антитело является "блокирующим антителом" (т.е., холодным антителом, которое ингибирует первым с мишенью). Конкурентные анализы можно проводить, как описано, например, в Ed Harlow and David Lane, *Cold Spring Harb. Protoc*; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277, или в Главе 11 "Using Antibodies" Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Конкури-

рующие антитела связываются с тем же самым эпитопом, накладываемым эпитопом или прилегающими эпитопами (например, как следует из стерического затруднения).

Другие конкурентные связывающие анализы включают в себя твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуоферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahli et al. (1983) *Methods in Enzymology* 9:242); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см. Kirkland et al. (1986) *J. Immunol.* 137:3614); твердофазный прямой анализ с использованием меток, твердофазный прямой сэндвич-анализ с использованием меток (см. Harglow and Lane (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный прямой RIA с использованием меток с использованием метки I-125 (см. Morel et al. (1988) *Mol. Immunol.* 25(1):7); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (Cheung et al. (1990) *Virology* 176:546); и прямой RIA с использованием меток (Moldenhauer et al. (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77).

Используемые в настоящем документе термины "специфическое связывание", "селективное связывание", "селективно связывается" и "специфически связывается" относятся к связыванию антител с эпитопом предварительно определенного антигена, однако не с другими антигенами. В типичном случае антитело (i) связывается с равновесной константной диссоциацией (K_D), составляющей примерно менее чем 10^{-7} M, такой как примерно менее чем 10^8 M, 10^9 M или 10^{10} M или даже ниже, при определении, например, с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в инструменте плазмонного поверхностного резонанса BIACORE 2000 с помощью предварительно определенного антигена, например рекомбинантного TL1A человека, в качестве аналита, и антитела в качестве лиганда, или с помощью анализа Скэтчарда связывания антитела с антиген-положительными клетками, и (ii) связывается с предварительно определенным антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, чем его аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от предварительно определенного антигена или близкородственного антигена. Соответственно антитело, которое "специфически связывается с TL1A человека", относится к антителу, которое связывается с растворимым или связанным с клеткой TL1A человека с K_D , составляющей 10^{-7} M или менее, такой как примерно менее чем 10^8 M, 10^9 M или 10^{10} M или даже менее. Антитело, которое "перекрестно реагирует с TL1A макака-крабеода" относится к антителу, которое связывается с TL1A макака-крабеода с K_D , составляющей 10^{-7} M или менее, такой как примерно менее чем 10^8 M, 10^9 M или 10^{10} M или даже ниже.

Термин " k_{assoc} " или " k_a ", используемый в настоящем документе, относится к константе скорости ассоциации определенного взаимодействия антитело-антиген, в то время как термин " k_{dis} " или " k_d ", используемый в настоящем документе, относится к константе скорости диссоциации определенного взаимодействия антитело-антиген. Термин " K_D ", используемый в настоящем документе, относится к равновесной константе диссоциации, которую получают из соотношения k_d к k_a (т.е., k_d/k_a) и выражают в виде молярной концентрации (M). Значения K_D в случае антител могут быть определены с помощью способов, общепринятых в данной области техники. Предпочтительным способом определения K_D антитела является использованием поверхностного плазмонного резонанса, предпочтительно использование биосенсорной системы, такой как система поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® или проточная цитометрия и анализ Скэтчарда.

Термин "EC50" в контексте анализа *in vitro* или *in vivo* с использованием антитела или его антиген-связывающего фрагмента относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которая индуцирует ответ, который составляет 50% от максимального ответа, т.е., половину между максимальным ответом и исходным уровнем.

Термин "связывается с иммобилизованным TL1A" относится к способности антитела, описанного в настоящем документе, связываться с TL1A, например, экспрессируемого на поверхности клетки или прикрепленного к твердой подложке.

Термин "перекрестно реагирует", используемый в настоящем документе, относится к способности антитела, описанного в настоящем документе, связываться с TL1A от другого вида. Например, антитело, описанное в настоящем документе, которое связывает TL1A человека, может также связывать TL1A от других видов (например, TL1A макака-крабеода). Используемая в настоящем документе перекрестная реактивность может быть измерена с помощью выявления специфической реактивности с очищенным антигеном в анализах связывания (например, SPR, ELISA) или связывания или иным образом функционального взаимодействия с клетками, физиологически экспрессирующими TL1A. Способы определения перекрестной реактивности включают в себя стандартные анализы связывания, описанные, например, с помощью анализа плазмонного поверхностного резонанса (SPR) BIACORE® с использованием инструмента BIACORE® 2000 SPR (Biacore AB, Упсала, Швеция) или методик проточной цитометрии.

Термин "встречающийся в природе", используемый в настоящем документе, используемый в отношении объекта, относится к тому факту, что объект может быть обнаружен в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (в том числе вирусах), которая была выделена из источника в природе и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории, встречается в природе.

Термин "полипептид" относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно связан-

ных аминокислотных остатка, без верхнего ограничения по длине цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как без ограничения гликозилирование, фосфорилирование или сульфидную связь. "Белок" может содержать один или несколько полипептидов.

Предусмотрено, что термин "молекула нуклеиновой кислоты", используемый в настоящем документе, включает в себя молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двуцепочечной и может представлять собой кДНК.

Также предусмотрены "консервативные модификации последовательности" в отношении последовательности антитела, предусмотренного в настоящем документе, т.е., модификации нуклеотидной или аминокислотной последовательности, которые не устраняют связывание антитела, кодируемого нуклеотидной последовательностью, или содержащего аминокислотную последовательность, с антигеном. Например, модификации могут быть введены с помощью стандартных методик, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные модификации последовательности включают в себя консервативные аминокислотные замены, в которых аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. В данной области техники были определены семейства аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи. Эти семейства включают в себя аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, прогнозируемый остаток заменимой аминокислоты в антителе к TL1A предпочтительно замещен другим аминокислотным остатком из того же самого семейства боковых аминокислот. Способы идентификации нуклеотидных и консервативных аминокислотных замен, которые не устраняют связывание антигена, хорошо известны в данной области техники. См., например, Brummell et al., *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); и Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997).

Альтернативно в другом варианте осуществления могут быть введены мутации во всей или части последовательности, кодирующей антитело к TL1A, например, с помощью насыщающего мутагенеза, и полученные в результате антитела к TL1A могут быть подвергнуты скринингу в отношении повышенной активности связывания.

В случае нуклеиновых кислот термин «значительная гомология» указывает на то, что две нуклеиновые кислоты или их обозначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении являются идентичными соответствующим нуклеотидным вставкам или делециям, по меньшей мере приблизительно у 80% нуклеотидов, обычно по меньшей мере приблизительно у 90-95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно у 98-99,5% нуклеотидов. Альтернативно значительная гомология существует, если сегменты будут гибридизоваться при определенных условиях гибридизации с комплементарной нитью.

В случае полипептидов термин «значительная гомология» указывает на то, что два полипептида или их обозначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении являются идентичными соответствующим аминокислотным вставкам или делециям, по меньшей мере приблизительно у 80% аминокислот, обычно по меньшей мере приблизительно у 90-95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно у 98-99,5% аминокислот.

Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от числа идентичных положений, разделяемых последовательностями, когда последовательности оптимально выравнены (т.е., % гомологии = число идентичных положений/общее число положений × 100) по отношению к оптимальному выравниванию, определенному с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, который необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно выполнить с помощью математического алгоритма, описанного в неограничивающих примерах ниже.

Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен с помощью программы GAP в пакете программ GCG (доступном по адресу <http://www.gcg.com>) с использованием матрицы NWSgapdna.CMP, а также штрафа за открытие гэпа 40, 50, 60, 70 или 80 и штрафа за удлинение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями также может быть определен с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за удлинение гэпа 12 и штрафа за гэп 4. Помимо этого процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с помощью алгоритма Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в программном обеспечении GCG (доступном по адресу <http://www.gcg.com>), с помощью либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, и штрафа за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и штрафа за удлинение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Последовательности нуклеиновой кислоты и белка, описанные в настоящем документе, могут дополнительно быть использованы в качестве "поисковой последовательности" для выполнения поиска по отношению к базам данных общего пользования, например, для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски могут осуществлять с помощью программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) из Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Поиски нуклеотидов в BLAST могут быть выполнены с помощью программы NBLAST, балл = 100, длина слова = 12 с получением нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты, описанным в настоящем документе. Поиски белков в BLAST могут быть выполнены с помощью программы XBLAST, балл = 50, длина слова = 3, с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам, описанным в настоящем документе. Для получения гэпированных выравниваний для сравнительных целей может быть использован Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) по умолчанию. См. www.ncbi.nlm.nih.gov.

Нуклеиновые кислоты могут находиться в целых клетках, в клеточном лизате либо в частично очищенном либо очень чистом виде. Нуклеиновую кислоту "выделяют" или "делают фактически чистой" при очистке от других клеточных компонентов или других загрязнителей, например, других клеточных нуклеиновых кислот (например, других частей хромосомы) или белков с помощью стандартных методик, в том числе щелочной/SDS обработки, разделения в CsCl, колоночной хроматографии, электрофореза в агарозном геле и других, хорошо известных в данной области техники методик. См., F. Ausubel, et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

Нуклеиновые кислоты, например, кДНК, могут мутировать в соответствии со стандартными методиками с получением генных последовательностей. В случае кодирующих последовательностей эти мутации при необходимости могут влиять на аминокислотную последовательность. В частности, предусмотрены последовательности ДНК, по сути гомологичные или полученные из нативных V, D, J, константные, переключатели и другие такие последовательности, описанные в настоящем документе.

Предполагается, что термин "вектор", применяемый в настоящем документе, обозначает молекулу нуклеиновой кислоты, способную к транспорту другой нуклеиновой кислоты, с которой она была соединена. Одним типом вектора является "плазмида", которая относится к кольцевой двухнитевой петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, при этом в вирусный геном могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомные векторы у млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и, тем самым, реплицироваться вместе с геномом хозяина. Более того, определенные векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы обозначаются в настоящем документе как "рекомбинантные векторы экспрессии" (или просто "векторы экспрессии") в целом, используемые векторы экспрессии в методиках рекомбинантной ДНК часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании термины "плазмида" и "вектор" можно использовать взаимозаменяемо, поскольку плазмида является наиболее распространенной формой вектора. Однако также включены и другие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, ретровирусы, дефектные по репликации, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), выполняющие эквивалентные функции.

Предполагается, что термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин"), используемый в настоящем документе, относится к клетке, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая в природе не присутствует в клетке, а также может представлять собой клетку, в которую рекомбинантный вектор экспрессии был введен. Следует понимать, что такие термины, как предполагается, относятся не только к определенной рассматриваемой клетке, но и к потомству такой клетки. Поскольку в последующих поколениях могут иметь место определенные модификации вследствие мутации либо влияния окружающей среды, такое потомство в действительности может не быть идентичным родительской клетке, но по-прежнему быть включенным в объем термина "клетка-хозяин", используемого в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин "антиген" относится к любому природному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид или гаптен. Антиген может представлять собой TL1A или его фрагмент, как в форме конструкции растворимого белка, так и в виде экспрессируемого на поверхности клетки.

Термин "иммуномодулятор" или "иммунорегулятор" относится к средству, например компоненту сигнального пути, который может быть включен в модулирование, регуляцию или модификацию иммунного ответа. "Модулирование", "регуляция" или "модификация" иммунного ответа относится к любому изменению в клетке иммунной системы или в активности такой клетки (например, эффекторной Т-клетки). Такая модуляция включает в себя стимуляцию или подавление иммунной системы, которое может проявляться по повышению или снижению числа различных типов клеток, повышению или снижению активности этих клеток или любым другим изменениям, которые могут происходить в иммунной

системе. "Иммуномодулирующая мишень" или "иммунорегулирующая мишень" представляет собой иммуномодулятор, на который происходит целенаправленное воздействие в результате связывания, и активность которого изменяется в результате связывания с веществом, средством, фрагментом, соединением или молекулой. Иммунорегулирующие мишени включают в себя, например, рецепторы на поверхности клетки ("иммуномодулирующие рецепторы") и лиганды рецепторов ("иммуномодулирующие лиганды").

Используемый в настоящем документе термин "введение" относится к физическому введению композиции, содержащей терапевтическое средство, субъекту с помощью любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Предпочтительные способы введения антител, описанных в настоящем документе, включают внутривенное, интраперитонеальное, внутримышечное, подкожное, спинальное или другие парентеральные способы введения, например, с помощью инъекции или инфузии. Фраза "парентеральное введение", используемая в настоящем документе, означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно с помощью инъекции, и включает в себя без ограничения внутривенную, интраперитонеальную, внутримышечную, внутриартериальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, внутрикапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, интрадермальную, трансрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастеральную инъекцию или инфузию, а также электропорацию *in vivo*. Альтернативно антитело, описанное в настоящем документе, может быть введено с помощью непарентерального способа, такого как местного, эпидермального или слизистого способа введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение может также осуществляться, например, один раз, несколько раз и/или в течение одного или нескольких длительных периодов времени.

Используемые в настоящем документе термины "ингибирует" или "блокирует" (например, относящиеся к ингибированию/блокированию связывания TL1A с DR3) используются взаимозаменяемо и охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование. В некоторых вариантах осуществления антитело к TL1A ингибирует связывание DR3 с TL1A по меньшей мере на приблизительно 50%, например, по меньшей мере на приблизительно 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100%.

Термины "лечить", "лечебный" и "лечение", используемые в настоящем документе, относятся к любому типу вмешательства или способу, осуществляемому в отношении активного средства или его введения субъекту в целях обращения, облегчения, нормализации, ингибирования или замедления или предупреждения прогрессирования, развития, тяжести или повторного развития симптома, осложнения, состояния или биохимических показателей, ассоциированных с заболеванием. Профилактика относится к введению субъекту, который не имеет заболевания, в целях предупреждения появления заболевания или сведения к минимуму его эффектов, если оно имеется.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяется в виде количества, достаточного для достижения или, по меньшей мере, для частичного достижения необходимого эффекта. "Терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная дозировка" лекарственного или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при использовании в отдельности или в комбинации с другим терапевтическим средством, способствует регрессии заболевания, подтверждаемой снижением тяжести симптомов заболевания, повышением частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждением ухудшения или нарушения вследствие поражения заболеванием. "Профилактически эффективное количество" или "профилактически эффективная дозировка" лекарственного средства представляет собой количество лекарственного средства, которое при введении в отдельности или в комбинации с другим терапевтическим средством субъекту с риском развития заболевания или, испытывающему повторное развитие заболевания, ингибирует развитие или повторное развитие заболевания. Способность терапевтического или профилактического средства способствовать регрессии заболевания или ингибировать развитие или повторное развитие заболевания может быть оценено с помощью ряда способов, известных практикующему специалисту в данной области техники, например, у людей-субъектов во время клинических исследований, в системах животных моделей, предсказывающих эффективность у человека, или в результате определения активности средства в анализах *in vitro*.

Термины "пациент" и "субъект" относятся к любому человеку или животному, отличному от человека, которое получает либо профилактическое, либо терапевтическое лечение. Например, способы и композиции, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения заболевания иммунной системы. Термин "животное, отличное от человека" включает в себя всех позвоночных, например млекопитающих и не являющихся млекопитающими животных, таких как приматы, отличные от человека, овца, собака, корова, курсы, амфибии, рептилии и др.

Используемый в настоящем документе термин "заболевание иммунной системы" включает в себя без ограничения псориаз, волчанку (например, красную волчанку, волчаночный нефрит), тиреоидит Хашимото, первичную микседему, болезнь Грейвса, пернициозную анемию, аутоиммунный атрофический гастрит, болезнь Аддисона, сахарный диабет (например, инсулин-зависимый сахарный диабет, сахарный диабет I типа, сахарный диабет II типа), синдром Гудпасчера, миастению гравис, пемфигус, болезнь

Крона, воспалительное заболевание кишечника, симпатическую офтальмию, аутоиммунный увеит, рассеянный склероз, аутоиммунную гемолитическую анемию, идиопатическую тромбоцитопению, первичный билиарный цирроз, гепатит хронического действия, язвенный колит, синдром Шегрена, ревматоидные заболевания, полимиозит, склеродермия и смешанную болезнь соединительной ткани.

Используемый в настоящем документе термин "ревматоидные заболевания" означает любое заболевание, которое поражает суставы, костную ткань, мягкие ткани или спинной мозг (Mathies, H. 1983 Rheuma) и включает в себя воспалительный ревматизм, дегенеративный ревматизм, внесуставный ревматизм и коллагеновые болезни. Кроме того, ревматоидные заболевания включают в себя без ограничения хронический полиартрит, псориаз, артропатию, анкилозирующий спондилит, ревматоидный артрит, узелковый панартерит, системную красную волчанку, прогрессирующую системную склеродермию, плечелопаточный периартрит, уратный артрит, хондрокальциноз, дерматомиозит, мышечный ревматизм, миозит и миогелоз. Известно, что некоторые ревматические заболевания являются аутоиммунными заболеваниями, вызванными измененным иммунным ответом субъекта.

Различные аспекты, описанные в настоящем документе, описаны далее подробно в следующих подразделах.

I. Антитела к TL1A

В настоящей заявке раскрыты полностью человеческие антитела к huTL1A, имеющие необходимые свойства для применения в качестве терапевтического средства в лечении заболеваний иммунной системы. Эти свойства включают способность связываться с TL1A человека с высокой аффинностью, способность связываться с TL1A макака-крабоеда и способность блокирования связывание DR3 (и, тем самым, передачу сигнала).

Антитело к TL1A, раскрытое в настоящем документе с помощью последовательности, связывается со специфическими эпитопами TL1A человека, определенными, как описано в примере 8 и 9. Соответственно другие антитела, которые связывается с тем же самым или близкородственными эпитопами, вероятно, разделяли бы эти необходимые свойства.

Помимо этого антитело 10A4.F7.2E8 связывается с TL1A макака-крабоеда, который является удобным при выполнении исследований по токсичности для поддержки разрешения регуляторного органа для применения антитела в качестве терапевтического средства для человека. Другие антитела к TL1A, которые связываются с тем же самым или аналогичными эпитопами, что и 10A4.F7.2E8, вероятно, разделяют это предпочтительное свойство связывания с TL1A макака-крабоеда. Антитела, связывающиеся с аналогичными эпитопами, могут быть разработаны с помощью выполнения конкурентных исследований или с помощью определения их эпитопов непосредственно.

Антитела к TL1A, которые конкурируют с антителами к huTL1A, раскрытыми в настоящем документе

Антитела к huTL1A, которые конкурируют с антителом по настоящему изобретению, за связывание с huTL1A, таким как 10A4.F7.2E8, могут быть индуцированы с помощью протоколов иммунизации, аналогичных таковым, описанным в настоящем документе (Пример 1). Антитела, которые конкурируют за связывание с антителами к huTL1A, описанными в настоящем документе, могут быть также получены с помощью иммунизации мышей TL1A человека или конструкцией, содержащей ее внеклеточный домен (остатки 72-251 SEQ ID NO: 19), или с помощью иммунизации фрагментом TL1A человека, содержащим эпитоп, связанный с антителом к TL1A, раскрытым в настоящем документе (например, 10A4.F7.2E8). Образующиеся в результате антитела могут подлежать скринингу на способность блокировать связывание 10A4.F7.2E8 с TL1A человека с помощью способов, известных в данной области техники, например, блокирования связывания со слитым белком внеклеточного домена TL1A и Fc-домена иммуноглобулина в ELISA, или блокирования способности связываться с клетками, экспрессирующими huTL1A на своей поверхности, например, с помощью FACS. В различных вариантах осуществления исследуемое антитело приводят в контакт со слитым белком TL1A-Fc (или с клетками, экспрессирующими huTL1A на своей поверхности) до, во время или после добавления 10A4.F7.2E8. Антитела, которые снижают связывание 10A4.F7.2E8 с TL1A (либо в виде Fc-слияния, либо на клетке), в частности, при примерно стехиометрических концентрациях, вероятно, связываются с тем же самым, перекрывающимися или прилегающими эпитопами, и, тем самым, разделяют необходимые функциональные свойства 10A4.F7.2E8.

Конкурирующие антитела также могут быть идентифицированы с помощью других способов, известных в данной области техники. Например, могут быть использованы стандартные анализы ELISA или конкурентные анализы ELISA, в которых рекомбинантную белковую конструкцию TL1A человека иммобилизуют на планшете, добавляют различные концентрации немеченого первого антитела, планшет промывают, добавляют второе антитело, промывают и измеряют количество связанной метки. Если возрастающие концентрации немеченого (первого) антитела (также обозначаемого как "блокирующее антитело") ингибируют связывание меченого (второго) антитела, то считается, что первое антитело ингибирует связывание второго антитела с мишенью на планшете, или считается, что оно конкурирует за связывание второго антитела. Дополнительно или альтернативно анализ SPR BIACORE® может быть использован для оценки способности антител конкурировать. Способность исследуемого антитела ингибировать связывание антитела к huTL1A, описанного в настоящем документе, с TL1A, показывает, что ис-

следуемое антитело может конкурировать с антителом за связывание с TL1A.

Соответственно в настоящем документе предусмотрены антитела к TL1A, которые ингибируют связывание антител к huTL1A, описанных в настоящем документе, с TL1A, на клетках, по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% и/или связывание которых с TL1A на клетках ингибируется по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, например, измеренное с помощью ELISA или FACS.

В типичном случае тот же самый эксперимент затем проводят в обратном порядке, т.е., первое антитело представляет собой второе антитело, а второе антитело представляет собой первое антитело. В определенных вариантах осуществления антитело, по меньшей мере, частично (например, по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90%) или полностью (100%) блокирует связывание другого антитела с мишенью, например TL1A человека или его фрагмента вне зависимости от того, происходит ли ингибирование, когда одно или другое антитело является первым антителом. Первое и второе антитело "перекрестно блокируют" связывание друг друга с мишенью, если антитела конкурируют друг с другом обоими путями, т.е. в конкурентных экспериментах, в которых первое антитело добавляют первым, и в конкурентных экспериментах, в которых второе антитело добавляют первым.

Считается, что антитела к huTL1A конкурируют с антителами к huTL1A, раскрытыми в настоящем документе, если они ингибируют связывание 10A4.F7.2E8 с TL1A человека по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или на 100% в случае, если присутствуют примерно в равных концентрациях.

Антитела к TL1A, которые связываются с тем же самым эпитопом

Антитела к huTL1A, которые связываются с тем же самым эпитопом или аналогичными эпитопами, что и антитела, раскрытые в настоящем документе, могут быть индуцированы во время протоколов иммунизации, аналогично таковым, описанным в настоящем документе (Пример 1). Образующиеся в результате антитела могут подлежать скринингу в отношении высокой аффинности связывания с TL1A человека (Пример 4). Затем определенные антитела могут быть изучены в способе масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS) (Пример 8) для определения точного эпитопа, связанного с антителом. Антитела, которые связываются с тем же самым или аналогичными эпитопами TL1A человека, что и антитело 10A4.F7.2E8, вероятно, разделяют необходимые функциональные свойства 10A4.F7.2E8.

Определения эпитопов могут быть выполнены с помощью любого способа, известного в данной области техники. Эпитопы, описанные в настоящем документе, были определены с помощью HDX-MS и компьютерного способа, описанного в примере 8 и 9, и представлены на фиг. 10-12. В различных вариантах осуществления считается, что антитела к huTL1A связываются с тем же самым эпитопом, что и mAb к huTL1A, раскрытое в настоящем документе, например, 10A4.F7.2E8, если они образуют контакт с одним или несколькими из тех же самых остатков по меньшей мере в одном участке huTL1A, приводимого в контакт 10A4.F7.2E8; если они образуют контакт с множеством из остатков по меньшей мере в одном участке huTL1A, приводимого в контакт 10A4.F7.2E8; если они образуют контакт с множеством из остатков в каждом участке huTL1A, приводимого в контакт 10A4.F7.2E8; если они образуют контакт с множеством из участков по всей длине huTL1A, приводимого в контакт 10A4.F7.2E8; если они образуют контакт во всех из отдаленных участков TL1A человека, приводимого в контакт 10A4.F7.2E8; если они образуют контакт со всеми из остатков в любом участке TL1A человека, приводимого в контакт 10A4.F7.2E8; или если они образуют контакт со всеми остатками во всех участках, приводимых в контакт 10A4.F7.2E8. "Участки" эпитопа представляют собой кластеры в первичной последовательности, которые приводят в контакт антителами 10A4.F7.2E8, например, предусмотренными в SEQ ID NO: 16 и 17.

Измерения HDX-MS в отношении 10A4 в TL1A указывают на то, что 10A4 характеризуется непрерывным эпитопом, состоящим из двух пептидных участков в TL1A в участке 1, имеющем наиболее значительные изменения захвата дейтерия (фиг. 10 и 11):

Пептидный участок 1 (166-180): EIRQAGRPNKPSIT (SEQ ID NO: 17).

Пептидный участок 2 (102-116): TVVRQTPTQHFKNQF (SEQ ID NO: 16).

Потенциальные участки эпитопа были перекрестно проверены с помощью измерений HDX-MS в Fab 10A4 в TL1A. С помощью дейтерированной пептидной фрагментации в MS дополнительно уточнили пространственное разрешение эпитопа относительно следующего: эпитоп 1 ¹⁶⁹QAGR¹⁷² и эпитоп 2 ¹¹³KNQF¹¹⁶.

Методики определения антител, которые связываются с "тем же самым эпитопом TL1A", что и антитела, описанные в настоящем документе, включают в себя рентгенологические анализы кристаллов комплексов антиген-антитело, которые обеспечивают атомное разрешение эпитопа. В других способах контролируют связывание антитела с антигенными фрагментами или мутировавшими вариантами антигена, в которых утрата связывания в результате модификации аминокислотного остатка в антигенной последовательности считается доказательством эпитопного компонента. Кроме этого также могут быть использованы компьютерные комбинаторные способы картирования эпитопа. Способы могут также основываться на способности антитела, представляющего интерес, аффинно выделять специфические короткие пептиды (либо в нативной трехмерной форме, либо в денатурированной форме) из комбинатор-

ных пептидных библиотек фагового дисплея. Затем пептиды рассматриваются в качестве лидерных последовательностей для определения эпитопа, соответствующего антителу, используемому для скрининга пептидной библиотеки. В случае картирования эпитопа также были разработаны компьютерные алгоритмы, которые, как было показано, картируют конформационные непрерывные эпитопы (см. Пример 9).

Эпитоп или участок, содержащий эпитоп, также подлежит идентификации в результате скрининга связывания с рядом перекрывающихся пептидов, составляющих TL1A. Альтернативно может быть использован способ Jespers et al. (1994) *Biotechnology* 12:899 для направления отбора антител, имеющих тот же самый эпитоп и, тем самым, аналогичные свойства с антителами к TL1A, описанными в настоящем документе. С помощью фагового дисплея вначале тяжелую цепь антитела к TL1A спаривают с репертуаром из (предпочтительно человеческих) легких цепей для отбора TL1A-связывающего антитела, и затем новую легкую цепь спаривают с репертуаром из (предпочтительно человеческих) тяжелых цепей для отбора (предпочтительно человеческого) TL1A-связывающего антитела, имеющего тот же самый эпитоп или участок эпитопа, что и антитело к huTL1A, описанное в настоящем документе. Альтернативно варианты антитела, описанного в настоящем документе, могут быть получены с помощью мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелой и легкой цепи антитела.

Аланин-сканирующий мутагенез, описанный Cunningham & Wells (1989) *Science* 244: 1081, или некоторая другая форма точечного мутагенеза аминокислотных остатков в TL1A также может быть использована для определения функционального эпитопа в случае антитела к TL1A.

Эпитоп или участок эпитопа ("участок эпитопа" представляет собой участок, содержащий эпитоп или перекрывающийся с эпитопом), связанный специфическим антителом, также может быть определен с помощью оценки связывания антитела с пептидами, содержащими фрагменты TL1A. Ряд перекрывающихся пептидов, содержащих в себе последовательность TL1A (например, TL1A человека), может быть синтезирован и подвергнут скринингу в отношении связывания, например, в прямом ELISA, конкурентном ELISA (в котором пептид оценивают в отношении его способности предупреждать связывание антитела с TL1A, связанным с лункой микротитрационного планшета), или на чипе. В таких способах скрининга пептидов можно не выявить некоторые непрерывные функциональные эпитопы, т.е., функциональные эпитопы, которые включают аминокислотные остатки, которые не являются прилегающими в первичной последовательности полипептидной цепи TL1A.

Эпитоп может быть также идентифицирован с помощью футпринтинга белка на основе MS, такого как быстрое фотохимическое окисление белков (FPOP). FPOP может быть проведен, как описано, например, в Hambley & Gross (2005) *J. American Soc. Mass Spectrometry* 16:2057, способы которого специфически включены в настоящий документ посредством ссылки.

Эпитоп, связанный антителами к TL1A, также может быть определен с помощью структурных способов, таких как рентгенологическое определение кристаллической структуры (например, WO 2005/044853), молекулярное моделирование и ядерно-магнитная резонансная (NMR) спектроскопия, в том числе NMR определение скоростей обмена H-D лабильных амидных водородов в TL1A в свободном состоянии и в связанном в комплексе с антителом, представляющем интерес (Zinn-Justin et al. (1992) *Biochemistry* 31:11335; Zinn-Justin et al. (1993) *Biochemistry* 32:6884).

Что касается рентгенологической кристаллографии, то кристаллизация может быть выполнена с помощью любого из известных способов в данной области техники (например, Giege et al. (1994) *Acta Crystallogr. D* 50:339; McPherson (1990) *Eur. J. Biochem.* 189:1), в том числе микрообъема (например, Chayen (1997) *Structure* 5:1269), диффузии пара в висючей капле (например, McPherson (1976) *J. Biol. Chem.* 251:6300), затравки и диализа. Желательно применять белковый препарат, имеющий концентрацию, составляющую по меньшей мере приблизительно 1 мг/мл и предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/мл. Кристаллизацию можно достичь эффективнее всего в растворе преципитирующего средства, содержащего полиэтиленгликоль 1000-20000 (ПЭГ; средняя молекулярная масса, варьирующая от приблизительно 1000 до приблизительно 20000 Да), предпочтительно от приблизительно 5000 до приблизительно 7000 Да, более предпочтительно приблизительно 6000 Да, с концентрациями, варьирующими от приблизительно 10 до приблизительно 30% (мас./об.). Также может быть желательным включать средство, стабилизирующее белок, например глицерин, в концентрации, варьирующей от приблизительно 0,5 до приблизительно 20%. Подходящая соль, такая как хлорид натрия, хлорид лития или цитрат натрия, также может быть необходимой в растворе преципитирующего средства, предпочтительно в концентрации, варьирующей от приблизительно 1 мМ до приблизительно 1000 мМ. Преципитирующее средство является предпочтительно забуференным до pH от приблизительно 3,0 до приблизительно 5,0, предпочтительно приблизительно 4,0. Конкретные буферы, пригодные в растворе преципитирующего средства могут меняться и хорошо известны в данной области техники (Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York). Примеры пригодных буферов включают в себя без ограничения HEPES, Tris, MES и ацетатный буфер. Кристаллы могут быть выращены при широком диапазоне температур, в том числе 2°C, 4°C, 8°C и 26°C.

Кристаллы антитело:антиген могут быть изучены с помощью хорошо известных рентгенографических методик и могут быть уточнены с помощью компьютерной программы, такой как X-PLOR (Йельский университет, 1992, распространенной с помощью Molecular Simulations, Inc.; см., например, Blundell

& Johnson (1985) Meth. Enzymol. 114 & 115, H. W. Wyckoff et al., eds., Academic Press; публикация заявки на патент США №2004/0014194), и BUSTER (Bricogne (1993) Acta Cryst. D49:37-60; Bricogne (1997) Meth. Enzymol. 276A:361-423, Carter & Sweet, eds.; Roversi et al. (2000) Acta Cryst. D56:1313-1323), раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте.

Антитела к TL1A, которые связываются с высокой аффинностью

В некоторых вариантах осуществления антитела к huTL1A по настоящему изобретению связываются с huTL1A с высокой аффинностью, аналогично антителам к huTL1A, раскрытым в настоящем документе, повышая их вероятность быть эффективными терапевтическими средствами. В различных вариантах осуществления антитела к huTL1A по настоящему изобретению связываются с huTL1A с K_D , составляющим менее чем 10, 5, 2, 1 нМ, 300 пМ или 100 пМ. В других вариантах осуществления антитела к huTL1A по настоящему изобретению связываются с huTL1A с K_D , составляющим от 2 нМ до 100 пМ. Стандартные анализы для оценки связывающей способности антител в отношении huTL1A включают в себя ELISA, вестерн-блоттинг, анализ SPR BIACORE® и RIA.

Варианты последовательностей антител к TL1A

Некоторая вариабельность последовательностей антитела, раскрываемых в настоящем документе, может быть допустимой, и при этом все еще сохраняются необходимые свойства антитела. Области CDR обозначены с помощью системы Кабат (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Соответственно настоящее изобретение дополнительно предусматривает антитела к huTL1A, содержащие последовательности CDR, которые по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям CDR антител, раскрытых в настоящем документе (например, 10A4.F7.2E8). Настоящее изобретение также предусматривает антитела к huTL1A, содержащие последовательности вариабельного домена тяжелой и/или легкой цепи, которые по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям вариабельного домена тяжелой и/или легкой цепи антител, раскрытых в настоящем документе (например, 10A4.F7.2E8).

Антитела к TL1A, полученные из одинаковых самых зародышевых линий

Учитывая, что антигенсвязывающая специфичность определяется преимущественно CDR, антитела, разделяющие последовательности CDR с антителами, раскрытыми в настоящем документе (например, 10A4.F7.2E8), вероятно, разделяют свои необходимые свойства.

В определенных вариантах осуществления антитела к huTL1A по настоящему изобретению содержат вариабельный участок тяжелой цепи, полученный из определенного иммуноглобулинового гена тяжелой цепи зародышевой линии человека, и/или вариабельный участок легкой цепи из определенного иммуноглобулинового гена легкой цепи зародышевой линии человека. Антитело 10A4 имеет тяжелую цепь, полученную из зародышевых линий человека V4-39, D4-17 и JH3, и легкую цепь из зародышевых линий VK1 и JK4. Другие антитела, которые связываются с TL1A человека, и получены из некоторых или всех из этих последовательностей зародышевой линии, вероятно, являются очень близкородственными по последовательности, особенно таковые, полученные из генов одинакового V-участка, и, таким образом, предполагается, что разделяют одинаковые необходимые свойства.

Используемое в настоящем документе человеческое антитело содержит вариабельные участки тяжелой или легкой цепи, которые "получены из" определенной последовательности зародышевой линии, если вариабельные участки антитела получены из системы, которая использует иммуноглобулиновые гены зародышевой линии человека, и последовательность антитела является достаточно близкой к зародышевой линии, которая более вероятно получена из определенной зародышевой линии, а не из любой другой. Такие системы включают иммунизацию трансгенной мыши, несущей иммуноглобулиновые гены человека, антигеном, представляющим интерес, или скрининг геной библиотеки иммуноглобулинов человека, представленных на фаге, с использованием антигена, представляющего интерес. Иммуноглобулиновая последовательность (иммуноглобулиновые последовательности) зародышевой линии человека, из которой (которых) последовательность антитела "получена", может (могут) быть идентифицирована (идентифицированы) с помощью сравнения аминокислотной последовательности человеческого антитела с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека и отбора иммуноглобулиновой последовательности зародышевой линии человека, которая является наиболее близкой по последовательности (например, с максимальным % идентичности) последовательности человеческого антитела. Человеческое антитело, которое "получено из" определенной иммуноглобулиновой последовательности зародышевой линии человека, может содержать аминокислотные отличия по сравнению с последовательностью зародышевой линии, в результате, например, встречающихся в природе соматических мутаций или целенаправленного введения сайт-направленной мутации. В то же время определенное человеческое антитело в типичном случае по меньшей мере на 90% идентично по аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности, кодируемой иммуноглобулиновым геном зародышевой линии человека (например, V-участкам), и содержит аминокислотные остатки, которые идентифицируют человеческое антитело как человеческое при сравнении с иммуноглобулиновыми аминокислотными последовательностями зародышевой линии других видов (например, последовательностями зародышевой линии мыши). В определенных случаях человеческое антитело может быть по

меньшей мере на 95% или даже по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентичным по аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности, кодируемой иммуноглобулиновым геном зародышевой линии (например, V-участкам). В типичном случае человеческое антитело, полученное из определенной последовательности зародышевой линии человека, будет характеризоваться не более чем 10 аминокислотными отличиями по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой иммуноглобулиновым геном зародышевой линии человека (например, V-участками). В определенных случаях человеческое антитело может характеризоваться не более чем 5 или даже не более чем 4, 3, 2 или 1 аминокислотным отличием по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой иммуноглобулиновым геном зародышевой линии (например, V-участками).

II. Сконструированные и модифицированные антитела

VH- и VL-участки

Также предусмотрены сконструированные и модифицированные антитела, которые могут быть получены с помощью антитела, имеющего одну или несколько из V_H- и/или V_L-последовательностей, раскрытых в настоящем документе, в качестве исходного материала для конструирования модифицированного антитела, при этом модифицированное антитело может иметь измененные свойства по сравнению с исходным антителом. Антитело может быть сконструировано с помощью модификации одного или нескольких остатков в одном или обоих варибельных участках (т.е., V_H и/или V_L), например, в одной или нескольких областях CDR и/или в одном или нескольких каркасных участках. Дополнительно или альтернативно антитело может быть сконструировано с помощью модификации остатков в константном участке(константных участках), например, в целях изменения эффекторной функции(эффекторных функций) антитела.

Одним типом конструирования варибельного участка, который может быть выполнен, является привитие CDR. Такое привитие является особенно пригодным при гуманизации антител к TL1A, отличных от человеческих, которые конкурируют за связывание с антителами к huTL1A, раскрытыми в настоящем документе, и/или связываются с тем же самым эпитопом, что и антитела к huTL1A, раскрытые в настоящем документе. Антитела взаимодействуют с целевыми антигенами преимущественно с помощью аминокислотных остатков, которые расположены в шести определяющих комплементарность областях (CDR) тяжелой и легкой цепи. По этой причине, аминокислотные последовательности в CDR являются более разнообразными между отдельными антителами, чем последовательности за пределами CDR. Поскольку последовательности CDR отвечают за большинство взаимодействий антитело-антиген, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства специфических эталонных антител с помощью конструирования векторов экспрессии, которые включают последовательности CDR из специфического эталонного антитела, привитого на каркасные последовательности из другого антитела с другими свойствами (см., например, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; патент США №5225539 от Winter и патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 от Queen et al.)

Такие каркасные последовательности могут быть получены из баз данных ДНК общего пользования или опубликованных литературных источников, которые включают генные последовательности антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК зародышевой линии в случае генов варибельного участка тяжелой и легкой цепи человека могут быть найдены в базе данных последовательностей зародышевой линии человека "Vbase" (доступной в интернете по адресу www.mrc-sre.cam.ac.uk/vbase), а также в Kabat E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; и Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; содержание каждого из которых явным образом включено в настоящий документ посредством ссылки.

Предпочтительные каркасные последовательности для применения в антителах, описанных в настоящем документе, представляют собой таковые, которые являются структурно аналогичными каркасным последовательностям, используемым антителами, описанными в настоящем документе. Последовательности CDR1, 2 и 3 V_H и последовательности CDR1, 2 и 3 V_L могут быть привиты на каркасные участки, которые имеют идентичную последовательность таковой, встречающейся в иммуноглобулиновом гене зародышевой линии, из которой каркасная последовательность происходит, или последовательности CDR могут быть привиты на каркасные участки, которые содержат до 20, предпочтительно консервативных аминокислотных замен по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было обнаружено, что в определенных случаях предпочтительно подвергать мутациям остатки в каркасных участках в целях сохранения или усиления антигенсвязывающей способности антитела (см., например, патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 от Queen et al.).

Сконструированные антитела, описанные в настоящем документе, включают таковые, в которых были выполнены модификации каркасных остатков в V_H и/или V_L, например, для улучшения свойств антитела. В типичном случае такие каркасные модификации выполняют для снижения иммуногенности антитела. Например, одним подходом является "мутирование к первоначальному виду" одного либо не-

скольких каркасных остатков до соответствующей последовательности зародышевой линии. Более конкретно антитело, которое было подвергнуто соматической мутации, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой антитело получено. Такие остатки могут быть идентифицированы с помощью сравнения каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых антитело получено. Для возврата каркасных последовательностей к конфигурации своей зародышевой линии, соматические мутации могут быть "мутированы к первоначальному виду" к последовательности зародышевой линии, например, с помощью сайт-специфического мутагенеза или ПЦР-опосредованного мутагенеза. Предусмотрено, что такие "мутировавшие к первоначальному виду" антитела также включены.

Другой тип каркасной модификации включает в себя мутирование одного или нескольких остатков в каркасном участке, или даже в одной или нескольких областях CDR, с удалением Т-клеточных эпитопов в целях, тем самым, снижения потенциальной иммуногенности антитела. Этот подход также обозначается как "деиммунизация" и описан более подробно в патентной публикации США № 20030153043 от Carr et al.

Другой тип модификации варибельного участка представляет собой мутирование аминокислотных остатков в областях CDR в целях улучшения одного или нескольких связывающих свойств (например, аффинности) антитела, представляющего интерес. Сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез может быть выполнен для вставки мутации(мутаций) и влияния на связывание антитела или другое функциональное свойство, представляющее интерес. Предпочтительно вводят консервативные модификации. Мутации могут представлять собой добавления, делеции или предпочтительно замены аминокислот. Кроме того, в типичном случае в CDR области изменены не более чем один, два, три, четыре или пять остатков.

Метиониновые остатки в CDR антител могут быть окислены, приводя к потенциальному химическому распаду и последующему снижению активности антитела. Соответственно также предусмотрены антитела к TL1A, которые имеют один или несколько метиониновых остатков в CDR тяжелой и/или легкой цепи, замещенных аминокислотными остатками, которые не подвергаются окислительному разрушению.

Аналогично участки дезамидирования могут быть удалены из антител к TL1A, в частности, в CDR.

Потенциальные участки гликозилирования в антигенсвязывающем домене предпочтительно устраняют в целях предупреждения гликозилирования, которое может нарушать связывание антигена. См., например, патент США № 5714350.

Fc и модифицированные Fc

Помимо активности терапевтического антитела, возникающего в результате связывания антигенсвязывающего домена с антигеном (например, блокирования когнатного лиганда или рецепторного белка в случае антител-антагонистов или индуцированной передачи сигнала в случае антител-агонистов), Fc-участок антитела взаимодействует с иммунной системой, как правило, сложным образом, чтобы вызвать любое количество биологических эффектов. Эффекторные функции, такие как то, что Fc-участок иммуноглобулина отвечает за многие важные функции антитела, такие как антигензависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), приводят к уничтожению целевых клеток, хотя и в результате разных механизмов. Существует пять основных классов или изоформ константного участка тяжелой цепи (IgA, IgG, IgD, IgE, IgM), каждый с характерными эффекторными функциями. Эти изоформы могут быть дополнительно подразделены на подклассы, например, IgG разделяется на четыре подкласса, известные как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Молекулы IgG взаимодействуют с тремя классами Fc γ -рецепторов (Fc γ R), специфических для антитела класса IgG, а именно, Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Отмечалось, что важные последовательности для связывания IgG с Fc γ R-рецепторами расположены в CH2- и CH3-доменах. На период полужизни антитела в сыворотке крови влияет способность этого антитела связываться с неонатальным Fc-рецептором (FcRn).

Антитела по настоящему изобретению могут содержать варибельные домены по настоящему изобретению в сочетании с константными доменами, содержащими различные Fc-участки, выбранные на основании биологических активностей (при наличии) антитела для предполагаемого применения. Salfeld (2007) Nat. Biotechnol. 25:1369. IgG человека, например, могут быть классифицированы на четыре подкласса, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и каждый из них содержит Fc-участок, имеющий уникальный профиль связывания с одним или несколькими из Fc γ -рецепторов (активирующими рецепторами Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA, Fc γ RIIC (CD32); Fc γ RIIIA и Fc γ RIIIB (CD16), и ингибирующим рецептором Fc γ RIIB), и с первым компонентом комплемента (C1q). IgG1 и IgG3 человека связываются со всеми Fc γ -рецепторами; IgG2 связывается с Fc γ RIIA_{H131}, и с более низкой аффинностью с Fc γ RIIA_{R131} и Fc γ RIIA_{V158}; IgG4 связывается с Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIIB, Fc γ RIIC и Fc γ RIIIA_{V158}; а ингибирующий Fc γ RIIIB-рецептор имеет более низкую аффинность к IgG1, IgG2 и IgG3, чем все другие Fc γ -рецепторы. Bruhns et al. (2009) Blood 113:3716. Исследования показали, что Fc γ RI не связывается с IgG2, а Fc γ RIIIB не связывается с IgG2 или IgG4. (тот же источник). Как правило, в отношении активности ADCC, IgG1 человека \approx IgG3 человека \gg

IgG4 человека \geq IgG2 человека. Как следствие, например, константный домен IgG1, а не IgG2 или IgG4, мог бы быть выбран для применения в лекарственном средстве, в котором необходима ADCC; IgG3 мог бы быть выбран, если бы была необходима активация Fc γ RIIA-экспрессирующих NK-клеток, моноцитов или макрофагов; и IgG4 мог бы быть выбран, если бы антитело подлежало применению для десенсибилизации пациентов с аллергией. IgG4 также может быть выбран, если было бы желательно, чтобы у антитела отсутствовали все эффекторные функции.

Соответственно вариабельные участки антитела к TL1A, описанные в настоящем документе, могут быть связаны (например, ковалентно связаны или слиты) с Fc, например, Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, который может представлять собой любой аллотип или изоаллотип, например, в случае IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); в случае IgG2: G2m, G2m23(n); в случае IgG3: G3m, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m11(b0), G3m5(b1), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t), G3m6(c3), G3m24(c5), G3m26(u), G3m27(v). См., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1). На выбор аллотипа могут влиять потенциальные проблемы, связанные с иммуногенностью, например, в целях сведения к минимуму образования противолечекарственных антител.

Вариабельные участки, описанные в настоящем документе, могут быть связаны с Fc, содержащим одну или несколько модификаций, в типичном случае для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как период полужизни, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, антитело, описанное в настоящем документе, может быть химически модифицировано (например, один или несколько химических фрагментов могут быть присоединены к антителу) или может быть модифицировано с изменением его гликозилирования, с изменением одного или нескольких функциональных свойств антитела. Каждое из этих вариантов осуществления описано более подробно ниже. Нумерация остатков в Fc-участке соответствует EU-индексу Кабат. Варианты последовательностей, раскрытые в настоящем документе, представлены с отсылкой на номер остатка после аминокислоты, которая является замещенной вместо встречающейся в природе аминокислоты, необязательно с предшествующим встречающимся в природе остатком в этом положении. В случае, если несколько аминокислот может присутствовать в определенном положении, например, если последовательности отличаются между встречающимися в природе изо типами, или если несколько мутаций может быть замещено в этом положении, они отделяются косой чертой (например, "X/Y/Z").

Например, можно выполнить модификации в Fc-участке в целях получения варианта Fc с (a) повышенной или сниженной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC), (b) повышенной или сниженной комплемент-опосредованной цитотоксичностью (CDC), (c) повышенной или сниженной аффинностью к C1q и/или (d) повышенной или сниженной аффинностью к Fc-рецептору относительно родительского Fc. Такие варианты Fc-участка будут, как правило, содержать по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в Fc-участке. Считается, что комбинирование аминокислотных модификаций является особенно желательным. Например, Fc-участок варианта может включать две, три, четыре, пять и т.д. замен в нем, например, в конкретных положениях Fc-участка, идентифицированных в настоящем документе. Иллюстративные варианты последовательностей Fc раскрыты в настоящем документе, и они также предусмотрены в патентах США №№5624821; 6277375; 6737056; 6194551; 7317091; 8101720; патентных публикациях PCT WO 00/42072; WO 01/58957; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 и WO 06/020114.

Снижение эффекторной функции

Активность ADCC может быть снижена с помощью модификации Fc-участка. В определенных вариантах осуществления участки, которые нарушают связывание с Fc-рецепторами, могут быть удалены, предпочтительно участки, отличные от связывающих участков рецепторов реутилизации. В других вариантах осуществления Fc-участок может быть модифицирован с удалением участка ADCC. Участки ADCC известны в данной области техники; см., например, Sarmay et al. (1992) *Molec. Immunol.* 29 (5): 633-9 в отношении участков ADCC в IgG1. В одном варианте осуществления вариант G236R и L328R IgG1 человека эффективно устраняет связывание Fc γ R. Horton et al. (2011) *J. Immunol.* 186:4223, и Chu et al. (2008) *Mol. Immunol.* 45:3926. В других вариантах осуществления Fc, характеризующийся сниженным связыванием с Fc γ Rs, содержит аминокислотные замены L234A, L235E и G237A. Gross et al. (2001) *Immunity* 15:289.

Активность CDC также может быть снижена с помощью модификации Fc-участка. Мутации в положениях IgG1 D270, K322, P329 и P331, в частности, аланиновые мутации D270A, K322A, P329A и P331A, значительно снижают способность соответствующего антитела связываться с C1q и активировать комплемент. Idusogie et al. (2000) *J. Immunol.* 164:4178; WO 99/51642. Было показано, что модификация положения 331 IgG1 (например, P331S) снижает связывание комплемента. Tao et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178:661, и Canfield & Morrison (1991) *J. Exp. Med.* 173:1483. В другом примере один или несколько аминокислотных остатков в положениях аминокислот 231-239 изменены в целях снижения способности антитела фиксировать комплемент. WO 94/29351.

В некоторых вариантах осуществления Fc со сниженной фиксацией комплемента имеет аминокислотные замены A330S и P331S. Gross et al. (2001) *Immunity* 15:289.

Для применений в том случае, если эффекторная функция также подлежит устранению, например в случае, если связывание антигена в отдельности является достаточным для получения необходимого терапевтического преимущества, а эффекторная функция приводит только к нежелательным побочным эффектам (или повышает их риск), то могут быть использованы антитела к IgG4, или могут быть разработаны антитела или фрагменты, не имеющие Fc-участка или значительной его части, или Fc может быть мутирован в целях полного устранения гликозилирования (например, N297A). Альтернативно была разработана гибридная конструкция IgG2 человека (C_H1-домен и шарнирный участок) и IgG4 человека (C_H2- и C_H3-домены), которая лишена эффекторной функции, не имеющая способности связываться с FcγRs (аналогично IgG2) и неспособная активировать комплемент (аналогично IgG4). Rother et al. (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:1256. См. также Mueller et al. (1997) *Mol. Immunol.* 34:441; Labrijn et al. (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:479 (описание модификаций Fc в целях снижения эффекторной функции в целом).

В других вариантах осуществления Fc-участок изменен с помощью замещения по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком в целях снижения всех эффекторных функций антитела. Например, одна или несколько аминокислот, выбранные из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, могут быть замещены другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело характеризуется сниженной аффинностью к эффекторному лиганду, но сохраняет антигенсвязывающую способность родительского антитела. Эффекторный лиганд, по отношению к которому изменена аффинность, может представлять собой, например, Fc-рецептор (остатки 234, 235, 236, 237, 297) или компонент C1 комплемента (остатки 297, 318, 320, 322). Патенты США №№ 5624821 и 5648260, оба от Winter et al.

В одной ранней патентной заявке предложены модификации в Fc-участке IgG в целях снижения связывания с FcγRI со снижением ADCC (234A; 235E; 236A; G237A) или в целях блокирования связывания компонента C1q комплемента с устранением CDC (E318A или V/K320A и K322A/Q). WO 88/007089. См. также Duncan & Winter (1988) *Nature* 332:563; Chappel et al. (1991) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 88:9036; и Sondermann et al. (2000) *Nature* 406:267 (описание эффектов этих мутаций на связывание FcγRIII).

Модификации Fc, снижающие эффекторную функцию, также включают в себя замены, вставки и делеции в положениях 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325 и 328, такие как 234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325L и 328R. Вариант Fc может содержать 236R/328R. Другие модификации для снижения взаимодействий FcγR и комплемента включают в себя замены 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331 S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P и 234V. Эти и другие модификации описаны в Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691. Эффекторные функции (активация как ADCC, так и комплемента) могут быть снижены, при этом сохраняется связывание с неонатальным FcR (сохранение времени полужизни) с помощью мутирования остатков IgG в одном или нескольких положениях 233-236 и 327-331, такого как E233P, L234V, L235A, необязательно G236A, A327G, A330S и P331S в IgG1; E233P, F234V, L235A, необязательно G236A в IgG4; а также A330S и P331S в IgG2. См. Armour et al. (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:2613; WO 99/58572. Другие мутации, которые сохраняют эффекторную функцию, включают в себя L234A и L235A в IgG1 (Alegre et al. (1994) *Transplantation* 57:1537); V234A и G237A в IgG2 (Cole et al. (1997) *J. Immunol.* 159:3613; см. также патент США №5834597); а также S228P и L235E в случае IgG4 (Reddy et al. (2000) *J. Immunol.* 164:1925). Другая комбинация мутаций для снижения эффекторной функции в IgG1 человека включает в себя L234F, L235E и P331S. Oganessian et al. (2008) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 64:700. См. в целом Labrijn et al. (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:479. Обнаружено, что дополнительные мутации, которые снижают эффекторную функцию в контексте слитого белка Fc (IgG1) (абатацепта), представляют собой C226S, C229S и P238S (нумерация остатков в соответствии с EU). Davis et al. (2007) *J. Immunol.* 34: 2204.

Другие варианты Fc, имеющие сниженную ADCC и/или CDC, раскрыты в Glaesner et al. (2010) *Diabetes Metab. Res. Rev.* 26:287 (F234A и L235A в целях снижения ADCC и ADCP в IgG4); Hutchins et al. (1995) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 92:11980 (F234A, G237A и E318A в IgG4); An et al. (2009) *MAbs* 1:572, и публикация патентной заявки США 2007/0148167 (H268Q, V309L, A330S и P331S в IgG2); McEarchern et al. (2007) *Blood* 109:1185 (C226S, C229S, E233P, L234V, L235A в IgG1); Vafa et al. (2014) *Methods* 65:114 (V234V, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S в IgG2).

В определенных вариантах осуществления Fc выбирают таким образом, что он не имеет по сути никакой эффекторной функции, т.е., он характеризуется сниженным связыванием с FcγRs и сниженной фиксацией комплемента. Иллюстративный Fc, например, Fc IgG1, который не имеет эффекторной функции, содержит следующие пять мутаций: L234A, L235E, G237A, A330S и P331S. Gross et al. (2001) *Immunity* 15:289. Эти пять замен также можно комбинировать с N297A в целях устранения гликозилирования.

III. Физические свойства антител

Антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать один или несколько участков гликозилирования в варибельном участке либо легкой, либо тяжелой цепи. Такие участки гликозилирова-

ния могут приводить к повышенной иммуногенности антитела или изменению рК антитела в результате измененного связывания антигена (Marshall et al. (1972) *Ann Rev Biochem* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J. Immunol* 172:5489-94; Wallick et al. (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh et al. (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura et al. (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Как известно, гликозилирование возникает в мотивах, содержащих последовательность N-X-S/T. В некоторых случаях предпочтительно иметь антитело к TL1A, которое не содержит гликозилирование переменных участков. Этого можно достичь либо с помощью отбора антител, которые не содержат мотив гликозилирования в переменном участке, либо с помощью мутирования остатков в участке гликозилирования.

В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, не содержат участки изомерии аспарагина. Дезаминирования аспарагина может возникать в последовательностях N-G или D-G и приводить к созданию остатков изоаспарагиновой кислоты, которая вводит петлю в полипептидную цепь и снижает ее стабильность (эффект изоаспарагиновой кислоты).

Каждое антитело будет иметь уникальную изоэлектрическую точку (pI), которая, как правило, находится в диапазоне значений pH от 6 до 9,5. Значение pI в случае антитела IgG4 в типичном случае находится в диапазоне значений pH, составляющих 6-8. Существует предположение, что антитела со значением pI за пределами нормального диапазона, могут иметь некоторый анфолдинг и нестабильность в условиях *in vivo*. Таким образом, предпочтительно иметь антитело к TL1A, которое характеризуется значением pI, которое находится в нормальном диапазоне. Этого можно достичь с помощью отбора антител со значением pI в нормальном диапазоне или с помощью мутирования заряженных поверхностных остатков.

Каждое антитело будет иметь характерную температуру плавления, при этом более высокая температура плавления указывает на в целом более высокую стабильность *in vivo* (Krishnamurthy R and Manning M C (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Как правило, предпочтительно, чтобы T_{M1} (температура исходного анфолдинга) была более чем 60°C, предпочтительно более чем 65°C, даже более предпочтительно более чем 70°C. Точка плавления антитела может быть измерена с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (Chen et al (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) или циркулярного дихроизма (Murray et al. (2002) *J. Chromatogr. Sci.* 40:343-9)(см. фиг. 5).

В предпочтительном варианте осуществления антитела выбирают таким образом, чтобы они быстро не разрушались. Разрушение антитела может быть измерено с помощью капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS (Alexander A J and Hughes D E (1995) *Anal Chem.* 67:3626-32).

В другом предпочтительном варианте осуществления антитела выбирают таким образом, чтобы они имели минимальные эффекты агрегации, которые могут приводить к активации нежелательного иммунного ответа и/или измененным или неблагоприятным фармакокинетическим свойствам. Как правило, антитела являются приемлемыми при агрегации, составляющей 25% или менее, предпочтительно 20% или менее, даже более предпочтительно 15% или менее, даже более предпочтительно 10% или менее и даже более предпочтительно 5% или менее. Агрегация может быть измерена с помощью нескольких методов, в том числе гель-фильтрационной хроматографии (SEC), высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) и светорассеяния.

mAb к TL1A 10A4, в формате изоформа IgG4 человека (10A4-IgG4), характеризовали с помощью нескольких стандартных биофизических методик, и, было показано, что оно характеризуется биофизическими свойствами, типичными для чистого мономерного и стабильного моноклонального антитела. Например, гель-фильтрационная высокоэффективная жидкостная хроматография (SE-HPLC), сопряженная с многоугольным детектором для спектроскопии лазерного рассеяния (MALS), характеризовалась тем, что образцы антитела были более чем на 90% чистыми, при этом основная молекула имела массу, определенную с помощью MALS, составляющую ~140 кДа. Динамическое светорассеяние определяло радиус, составляющий 5,3 нм, что также согласовывалось с тем, что предполагали в случае мономерного антитела в растворе. Данные дифференциальной сканирующей калориметрии также показали, что 10A4-IgG4 характеризуется высокой термостабильностью, при этом 3 различные тепловые переходы имеют значения точки перехода (T_m), составляющие 70,75°C, 84,698°C и 88,50°C.

IV. Молекулы нуклеиновых кислот

Другой аспект, описанный в настоящем документе, относится к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют антитела, описанные в настоящем документе. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по сути чистой форме. Нуклеиновую кислоту "выделяют" или "делают фактически чистой" при очистке от других клеточных компонентов или других загрязнителей, например, других клеточных нуклеиновых кислот (например, другой хромосомной ДНК, например хромосомной ДНК, которая связана с выделенной ДНК в природе) или белков с помощью стандартных методик, в том числе щелочной/SDS обработки, разделения в CsCl, колонной хроматографии, рестрикционных ферментов, электрофореза в агарозном геле и других, хорошо известных в данной области техники методик. См., F. Ausubel, et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Нуклеиновая кислота, описанная в настоящем документе, может представлять собой, например, ДНК или РНК, и может содержать или мо-

жет не содержать интронные последовательности. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

Нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе, могут быть получены с помощью стандартных методик молекулярной биологии. В случае антител, экспрессируемых гибридомами (например, гибридомами, полученными на основе трансгенных мышей, несущих гены человеческих иммуноглобулинов, описанных ниже), к ДНК кодирующие легкую и тяжелую цепи антитела, образуемого гибридомой, могут быть получены с помощью стандартной ПНР-амплификации или методик клонирования кДНК. В случае антител, полученных из библиотеки иммуноглобулиновых генов (например, с помощью методик фагового дисплея), нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, может быть извлечена из библиотеки.

После получения фрагментов ДНК, кодирующих VH- и VL-сегменты, эти фрагменты ДНК в дальнейшем можно обрабатывать с помощью стандартных методик рекомбинантной ДНК, например, в целях преобразования генов переменного участка в гены полноразмерных цепей антител, гены Fab-фрагментов или ген scFv. При этих манипуляциях фрагмент ДНК, кодирующий VL или VH, функционально связывают с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой как константный участок антитела или гибкий линкер. Предполагается, что термин "функционально связан", используемый в данном контексте, означает, что два фрагмента ДНК соединены таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые двумя фрагментами ДНК, остаются внутри рамки считывания.

Выделенная ДНК, кодирующая VH-участок, может быть преобразована в ген полноразмерной тяжелой цепи с помощью функционального связывания ДНК, кодирующей VH, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные участки тяжелой цепи (шарнир, CH1, CH2 и/или CH3). Последовательности генов константного участка тяжелой цепи человека известны в данной области техники (см., например, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) и фрагменты ДНК, содержащие в себе эти участки, могут быть получены с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константный участок тяжелой цепи может представлять собой константный участок IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, например, участок IgG1. В случае гена тяжелой цепи Fab-фрагмента ДНК, кодирующая VH, может быть функционально связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только константный участок CH1 тяжелой цепи.

Выделенная ДНК, кодирующая VL-участок, может быть преобразована в ген полноразмерной легкой цепи (а также ген легкой цепи Fab) с помощью функционального связывания ДНК, кодирующей VL, с другой молекулой ДНК, кодирующей константный участок CL легкой цепи. Последовательности генов константного участка легкой цепи известны в данной области техники (см., например, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) и фрагменты ДНК, содержащие в себе эти участки, могут быть получены с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константный участок легкой цепи может представлять собой константный участок каппа- или лямбда-цепи.

Для создания гена scFv фрагменты ДНК, кодирующие VH и VL, функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность $(Gly_4-Ser)_3$, таким образом, что VH- и VL-последовательности могут быть экспрессированы в виде прилегающего одноцепочечного белка, при этом VL- и VH-участки соединены с помощью гибкого линкера (см., например, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty et al, (1990) *Nature* 348:552-554).

V. Получение антител

Различные антитела по настоящему изобретению, например, таковые, которые конкурируют тот же самый эпитоп или связываются с ним, как антитела к TL1A человека, раскрытые в настоящем документе, могут быть получены с помощью ряда известных методик, таких как стандартные методики гибридизации соматических клеток, описанные Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Несмотря на то, что процедуры гибридизации соматических клеток являются предпочтительными, в принципе могут быть использованы другие методики для получения моноклональных антител, например, вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов, методика фагового дисплея с использованием библиотек генов человеческих антител.

Предпочтительной животной системой для получения гибридом является мышьяная система. Получение гибридом у мыши является очень отработанной процедурой. В данной области техники известны протоколы иммунизации и методики выделения иммунизированных спленоцитов для слияния. Также известны партнеры слияния (например, клетки миеломы мыши) и процедуры слияния.

Химерные или гуманизированные антитела, описанные в настоящем документе, могут быть получены на основании последовательности мышьяного моноклонального антитела, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующая тяжелую и легкую цепь иммуноглобулинов, может быть получена из мышьяной гибридомы, представляющей интерес, и сконструирована в целях содержания иммуноглобулиновых последовательностей, отличных от мышьяных (например, человеческих), с помощью стандартных методик молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела переменные участки мыши мо-

гут быть связаны с константными участками человека с помощью способов, известных в данной области техники (см., например, патент США № 4816567 от Cabilly et al.). Для создания гуманизованного антитела области CDR мыши могут быть включены в каркасный участок человека с помощью способов, известных в данной области техники (см., например, патент США № 5225539 от Winter, и патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 от Queen et al.).

В одном варианте осуществления антитела, описанные в настоящем документе, представляют собой человеческие моноклональные антитела. Такие человеческие моноклональные антитела, направленные против TL1A, могут быть получены с помощью трансгенных либо трансхромосомных мышей, несущих части иммунной системы человека, а не системы мыши. Эти трансгенные и трансхромосомные мыши включают в себя мышей, обозначаемых в настоящем документе как мыши HuMAb и мыши KM соответственно, и образно обозначаемые в настоящем документе как "мыши с Ig человека".

Мышь HuMAb® (Medarex, Inc.) содержит минилокусы гена человеческого иммуноглобулина, которые кодируют ререаранжированные иммуноглобулиновые последовательности тяжелой (μ и γ) и легкой к-цепи человека совместно с целевыми мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы μ - и к-цепи (см., например, Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Соответственно мыши характеризуются сниженной экспрессией IgM или к-цепи мыши, и в ответ на иммунизацию введенные трансгены тяжелой и легкой цепи человека подвергаются переключению класса и соматической мутации с образованием высокоаффинного моноклонального IgGк человека (Lonberg, N. et al. (1994), выше; описано в Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, и Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. NY. Acad. Sci.* 764:536-546). Получение и применение мышей HuMAb и геномных модификаций, переносимых такими мышами, дополнительно описано в Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; и Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; содержание всех из которых включено особым образом в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте. См. дополнительно патенты США №№5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; и 5770429; все от Lonberg and Kay; патент США №5545807 от Surani et al.; публикации PCT №№WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все от Lonberg and Kay; и публикация PCT № WO 01/14424 от Korman et al.

В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, индуцируют с использованием мыши, которая несет последовательности человеческих иммуноглобулинов в трансгенах или трансхромосомах, например, мыши, которая несет трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Такие мыши, обозначаемые в настоящем документе как "мыши KM", подробно описаны в публикации PCT WO 02/43478 от Ishida et al.

Более того, альтернативные системы трансгенных животных, экспрессирующие гены человеческих иммуноглобулинов, доступны в данной области техники и могут быть использованы для индукции антител к TL1A, описанных в настоящем документе. Например, может быть использована альтернативная трансгенная система, обозначаемая как Xenomouse (Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в патентах США №№ 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963 от Kucherlapati et al.

Кроме того, альтернативные системы трансхромосомных животных, экспрессирующие гены человеческих иммуноглобулинов, доступны в данной области техники и могут быть использованы для индукции антител к TL1A, описанных в настоящем документе. Например, могут быть использованы мыши, несущие как трансхромосому тяжелой цепи человека, так и трансхромосому легкой цепи человека, обозначаемые как "мыши TC"; такие мыши описаны в Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Кроме того, коровы, несущие трансхромосомы тяжелой и легкой цепи человека были описаны в данной области техники (Kuroiwa et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) и могут быть использованы для индукции антител к TL1A, описанных в настоящем документе.

Дополнительные мышинные системы, описанные в данной области техники для индукции человеческих антител, например, антител к TL1A, включают в себя (i) мышь VELOCIMMUNE® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), у которой эндогенные переменные участки тяжелой и легкой цепи мыши были замещены посредством гомологичной рекомбинации переменными участками тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанными с эндогенными константными участками мыши, таким образом, что химерные антитела (V человека/С мыши) индуцируются у мышей, и затем преобразуются в полностью человеческие антитела с помощью методик стандартной рекомбинантной ДНК; и (ii) мышь MeMo® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), при этом мышь содержит ререаранжированные переменные участки тяжелой цепи человека и один ререаранжированный переменный участок распространенной легкой цепи человека. Такие мыши и их применение для индуцирования антител описаны, например, в WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861 и US 2012/0073004.

Человеческие моноклональные антитела, описанные в настоящем документе, также могут быть получены с помощью способов фагового дисплея для скрининга библиотек генов человеческих иммуноглобулинов. Такие способы фагового дисплея для выделения человеческих антител разработаны в данной области техники. См., например: патенты США №№ 5223409; 5403484; и 5571698 от Ladner et al.; патенты США №№ 5427908 и 5580717 от Dower et al.; патенты США №№ 5969108 и 6172197 от McCafferty et al.; и патенты США №№ 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081 от Griffiths et al.

Человеческие моноклональные антитела, описанные в настоящем документе, могут быть получены с помощью мышей SCID, в которых иммунные клетки человека были преобразованы таким образом, что при иммунизации может быть получен ответ на человеческое антитело. Такие мыши описаны, например, в патентах США №№ 5476996 и 5698767 от Wilson et al.

Иммунизации

Для получения полностью человеческих антител к TL1A трансгенные или трансхромосомные мыши, содержащие гены человеческих иммуноглобулинов (например, мыши HCo12, HCo7 или KM) могут быть иммунизированы очищенным или обогащенным препаратом антигена TL1A и/или клеткам, экспрессирующими TL1A, описанными в случае других антигенов, например, Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856859; Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851, и WO 98/24884. Альтернативно мыши могут быть иммунизированы ДНК, кодирующей TL1A человека. Предпочтительно при первой инфузии возраст мышей будет составлять 6-16 недель. Например, очищенный или обогащенный препарат (5-50 мкг) рекомбинантного антигена TL1A может быть использован для иммунизации мышей HuMAb интраперитонеально. В случае, если иммунизация с помощью очищенного или обогащенного препарата антигена TL1A не приводит к образованию антител, мыши могут быть также иммунизированы клетками, экспрессирующими TL1A, например, для активации иммунных ответов. Иллюстративные клеточные линии включают в себя TL1A-сверхэкспрессирующие стабильные линии клеток CHO и Raji.

Накопленный опыт в случае различных антигенов показал, что трансгенные мыши HuMAb отвечают эффективнее всего в случае исходной иммунизации интраперитонеально (IP) или подкожно (SC) антигеном в адьюванте Ribi с последующими IP/SC иммунизациями через неделю (в общей сложности до 10) антигеном в адьюванте Ribi. Иммунный ответ можно контролировать в течение протокола иммунизации с помощью образцов плазмы, получаемых с помощью ретроорбитальных кровяных выделений. Плазму можно подвергать скринингу с помощью ELISA и FACS (как описано ниже), а мыши с достаточными титрами человеческого иммуноглобулина к TL1A могут быть использованы для слияний. Мыши могут быть стимулированы внутривенно антигеном за 3 дня до выведения из эксперимента и извлечения селезенки и лимфатических узлов. Предполагается, что для каждой иммунизации может потребоваться осуществление 2-3 слияний. В типичном случае в случае каждого антигена иммунизируют от 6 до 24 мышей. Обычно используют штаммы HCo7, HCo12 и KM. Кроме того, как трансген HCo7, так и трансген HCo12 можно воспроизводить совместно в одной мыши, имеющей два различных трансгена тяжелой цепи человека (HCo7/HCo12).

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к TL1A Для получения гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела, описанные в настоящем документе, спленоциты и/или клетки лимфатических узлов от иммунизированных мышей могут быть выделены и слиты с подходящей иммортализованной клеточной линией, такой как клеточная линия миеломы мыши. Образованные в результате гибридомы могут подлежать скринингу в отношении продукции антигенспецифических антител. Например, суспензии отдельных клеток лимфоцитов селезенки от иммунизированных мышей могут быть слиты с несекретируемыми клетками миеломы мыши Sp2/0 (ATCC, CRL 1581) с 50% ПЭГ. Клетки высевают примерно по 2×10^5 в плоскодонный микротитрационный планшет, с последующей двухнедельной инкубацией в селективной среде, содержащей 10% фетальную сыворотку для клонирования, 18% кондиционированную среду "653", 5% ориген (IGEN), 4 мМ L-глутамин, 1 мМ пирувата натрия, 5 мМ HEPES, 0,055 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 единиц/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина, 50 мг/мл гентамицина и 1X НАТ (Sigma). Примерно через две недели клетки могут быть культивированы в среде, в которой НАТ заменена на НТ. Затем отдельные лунки можно подвергать скринингу с помощью ELISA в отношении человеческих моноклональных антител IgM и IgG. После обширного роста гибридомы среду обычно наблюдают через 10-14 дней. Гибридомы, секретирующие антитела, могут быть пересеяны, подвергнуты повторному скринингу и в случае все еще положительного результата в отношении IgG человека моноклональные антитела могут быть субклонированы по меньшей мере дважды с помощью предельного разведения. Стабильные субклоны затем могут быть культивированы *in vitro* с получением небольших количеств антитела в среде тканевой культуры для характеристики.

Для очистки человеческих моноклональных антител отобранные гибридомы могут быть выращены в двухлитровых роллерных колбах. Супернатанты могут быть отфильтрованы и сконцентрированы перед аффинной хроматографией с белком А-сефарозой (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси). Элюированный IgG может быть проверен с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии в целях обеспечения чистоты. Буферный раствор может быть заменен на PBS, а концентрация может быть определена с помощью OD₂₈₀ с коэффициентом экстинкции, составляющим 1,43. Монокло-

нальные антитела могут быть разделены на аликвоты и храниться при -80°C .

VI. Получение антител

Получение трансфектом, продуцирующих моноклональные антитела к TL1A Антитела по настоящему изобретению, в том числе как специфические антитела, для которых предусмотрены последовательности, так и другие родственные антитела к TL1A, могут быть продуцированы в трансфектоме из клеток-хозяев, с помощью, например, комбинации методик рекомбинантной ДНК и способов трансфекции генов, как хорошо известно в данной области техники (Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

Например, для экспрессии антител или их фрагментов ДНК, кодирующие частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, могут быть получены с помощью стандартных методик молекулярной биологии (например, ПЦР-амплификации или клонирования кДНК с помощью гибридомы, которая экспрессирует антитело, представляющее интерес) и ДНК могут быть включены в векторы экспрессии таким образом, что гены являются функционально связанными с последовательностями контроля транскрипции или трансляции. В данном контексте предполагается, что термин "функционально связанный" означает, что ген антитела лигирован в вектор таким образом, что последовательности контроля транскрипции и трансляции в векторе выполняют свою предполагаемую функцию регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Вектор экспрессии и контрольные последовательности экспрессии выбирают совместимыми с используемой клеткой-хозяином для экспрессии. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела может быть включен в отдельный вектор или оба гена включены в тот же самый вектор экспрессии. Гены антитела включают в вектор(векторы) экспрессии с помощью стандартных способов (например, лигирования комплементарных участков рестрикции в фрагмент гена антитела и вектор, или лигирования тупых концов при отсутствии участков рестрикции). Варибельные участки легкой и тяжелой цепи антител, описанных в настоящем документе, могут быть использованы для создания генов полноразмерных антител любого изотипа антитела с помощью включения их в векторы экспрессии, уже кодирующие константные участки тяжелой цепи и константные участки легкой цепи необходимого изотипа таким образом, что V_H -сегмент функционально связан с C_H -сегментом(сегментами) в векторе, а V_L -сегмент функционально связан с C_L -сегментом в векторе. Дополнительно или альтернативно рекомбинантный вектор экспрессии может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела может быть клонирован в вектор таким образом, что сигнальный пептид связан внутри рамки считывания с аминоконцом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е., сигнальный пептид из белка, не являющегося иммуноглобулином).

Помимо генов цепи антитела, рекомбинантные векторы экспрессии могут нести регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепи антитела в клетке-хозяине. Предполагается, что термин "регуляторная последовательность" включает в себя промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепи антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel (*Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Специалистам в данной области будет понятно, что разработка вектора экспрессии, в том числе выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, уровень экспрессии необходимого белка и т.д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающего включают в себя вирусные элементы, которые направляют высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, полученные из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян 40 (SV40), аденовируса (например, основного позднего промотора аденовируса (AdMLP)) и полиомы. Альтернативно могут быть использованы невирусные регуляторные последовательности, такие как промотор убиквитина или промотор β -глобина. Более того, регуляторные элементы состоят из последовательностей, взятых из различных источников, таких как система промотора $SR\alpha$, которая содержит последовательности из раннего промотора SV40 и длинный концевой повтор вируса Т-клеточного лейкоза человека 1 типа (Takebe, Y. et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

Помимо генов цепи антитела и регуляторных последовательностей рекомбинантные векторы экспрессии могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и селективируемые маркерные гены. Ген селективируемого маркера облегчает выбор клеток-хозяев, в которые вектор был включен (см., например, патенты США №№ 4399216, 4634665 и 5179017, все от Axel et al.). Например, в типичном случае селективируемый маркерный ген придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицину или метотрексату в клетке-хозяине, в которую вектор был включен. Предпочтительные селективируемые маркерные гены включают в себя ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в dhfr-клетках-хозяевах с селекцией/амплификацией по метотрексату) и ген нео (для селекции по G418).

Для экспрессии легкой и тяжелой цепей вектор(векторы) экспрессии, кодирующий(кодирующие) тяжелую и легкую цепи, трансфицируют в клетку-хозяина с помощью стандартных методик. Предпола-

гается, что различные варианты термина "трансфекция" охватывают широкий спектр методик, широко используемых для включения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например, электропорацию, преципитацию фосфатом кальция, трансфекцию с помощью DEAE-декстрана и т.п. Несмотря на то, что теоретически возможно экспрессировать антитела, описанные в настоящем документе, либо в прокариотических, либо в эукариотических клетках-хозяевах, экспрессия антител в эукариотических клетках и наиболее предпочтительно в клетках-хозяевах млекопитающих является наиболее предпочтительной, поскольку такие эукариотические клетки, и, в частности, клетки млекопитающих, более вероятно, чем прокариотические клетки собирают и секретируют должным образом уложенное и иммунологически активное антитело. Описано, что прокариотическая экспрессия генов антитела была неэффективной для продукции большого количества активного антитела (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13). Антитела по настоящему изобретению могут быть также продуцированы в гликоинженерных штаммах дрожжевых грибов *Pichia pastoris*. Li et al. (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:210.

Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител, описанные в настоящем документе, включают в себя клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO) (в том числе клетки dhfr-CHO, описанные в Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, используемые с селективируемым маркером DHFR, например, как описано в R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 759:601-621), клетки миеломы NSO, клетки COS и клетки SP2. В частности, для применения с клетками миеломы NSO другой предпочтительной системой экспрессии является система экспрессии гена GS, раскрытая в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841. В случае, если рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие гены антитела, включают в клетки-хозяева млекопитающих, то антитела продуцируются с помощью культивирования клеток-хозяев в течение времени, достаточного для того, чтобы обеспечить экспрессию антитела в клетках-хозяевах, или более предпочтительно секрецию антитела в среду для культивирования, в которой выращивают клетки-хозяева. Антитела могут быть извлечены из среды для культивирования с помощью стандартных способов очистки белка.

N- и C-концы полипептидных цепей антител по настоящему изобретению могут отличаться от предполагаемой последовательности в результате часто наблюдаемых посттрансляционных модификаций. Например, C-концевые остатки лизина часто отсутствуют в тяжелых цепях антител. Dick et al. (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132. N-концевые остатки глутамин и в меньшей степени остатки глутамата часто преобразуются в остатки полиглутамата как в легкой, так и в тяжелой цепях терапевтических антител. Dick et al. (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97:544; Liu et al. (2011) *JBC* 286:11211; Liu et al. (2011) *J.Biol. Chem.* 286:11211.

VII. Анализы

Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть исследованы в отношении связывания с TL1A, например, с помощью стандартного ELISA. Вкратце, титрационные микропланшеты покрывают очищенным TL1A при 1 мкг/мл в PBS, а затем блокируют 5% альбумином бычьей сыворотки в PBS. Разведения антитела (например, разведения плазмы от иммунизированных TL1A мышей) добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение 1-2 ч при 37°C. Планшеты промывают PBS/Tween и затем инкубируют с вторичным реагентом (например, в случае человеческих антител - реагентом на основе Fc-специфического поликлонального козьего антитела к IgG человека), конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) в течение 1 ч при 37°C. После промывания планшеты исследуют с субстратом ABTS (Moss Inc, продукт ABTS-1000) и анализируют с помощью спектрофотометра при OD 415-495. Сыворотки от иммунизированных мышей затем дополнительно подвергают скринингу с помощью проточной цитометрии в отношении связывания с клеточной линией, экспрессирующей TL1A человека, но не с контрольной клеточной линией, которая не экспрессирует TL1A. Вкратце, связывание антител к TL1A оценивают с помощью инкубирования клеток CHO, экспрессирующих TL1A, с антителом к TL1A в разведении 1:20. Клетки промывают и связывание выявляют с помощью меченого PE Ab к IgG человека. Проточную цитометрию осуществляют с помощью проточного цитометра FACScan (Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния). Предпочтительно мыши, которые образуют максимальные титры, будут использованы для слияний.

Анализ ELISA, описанный выше, может быть использован для скрининга антител и, таким образом, гибридом, которые продуцируют антитела, которые характеризуются положительной реактивностью в отношении иммуногена TL1A. Гибридомы, которые продуцируют антитела, которые связываются, предпочтительно с высокой специфичностью, с TL1A, затем могут быть субклонированы и дополнительно охарактеризованы. Один клон из каждой гибридомы, который сохраняет реактивность родительских клеток (определенную с помощью ELISA), затем может быть выбран для создания банка клеток и для очистки антител.

Для очистки антител к TL1A выбранные гибридомы могут быть выращены в двухлитровых роллерных колбах для очистки моноклональных антител. Супернатанты могут быть отфильтрованы и сконцентрированы перед аффинной хроматографией с белком А-сефарозой (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси). Элюированный IgG может быть проверен с помощью гель-электрофореза и высокоэффектив-

ной жидкостной хроматографии в целях обеспечения чистоты. Буферный раствор может быть заменен на PBS, а концентрация может быть определена с помощью OD₂₈₀ с коэффициентом экстинкции, составляющим 1,43. Моноклональные антитела могут быть разделены на аликвоты и храниться при -80°C.

Для определения того, связываются ли выбранные моноклональные антитела к TL1A с уникальными эпитопами, каждое антитело может быть биотинилировано с помощью коммерчески доступных реагентов (Pierce, Рокфилд, Иллинойс). Связывание биотинилированного mAb может быть выявлено с помощью зонда, меченого стрептавидином. Конкурентные исследования с помощью немеченных моноклональных антител и биотинилированных антител могут быть осуществлены с использованием планшетов для ELISA, покрытых TL1A, как описано выше.

Для определения изотипа очищенных антител изотипирующий ELISA может быть осуществлен с помощью реагентов, специфических к антителам определенного изотипа. Например, для определения изотипа человеческого моноклонального антитела лунки титрационных микропланшетов могут быть покрыты 1 мкг/мл антитела к человеческому иммуноглобулину в течение ночи при 4°C. После блокирования 1% BSA планшеты реагируют с 1 мкг/мл или менее исследуемых моноклональных антител или очищенных изотопических контролей при температуре окружающей среды в течение 1-2 ч. Затем лунки реагируют или с зондами на основе IgG1 человека, или с зондами на основе специфического в отношении IgM человека, конъюгированного с щелочной фосфатазой. Планшеты исследуют и анализируют, как описано выше.

Для исследования связывания моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими TL1A, может быть использована проточная цитометрия, как описано в примере 17. Вкратце, клеточные линии, экспрессирующие связанный с мембраной TL1A (выращенные в стандартных условиях роста), смешивают с различными концентрациями моноклональных антител в PBS, содержащем 0,1% BSA при 4°C в течение 1 ч. После промывания клетки реагируют с меченым фикоэритрином (PE) антителом к IgG при тех же самых условиях, что и окрашивание первичного антитела. Образцы могут быть анализированы с помощью инструмента FACScan с использованием свойств светорассеяния и бокового рассеяния в целях гейтирования одиночных клеток и определения связывания меченых антител. Может быть использован альтернативный анализ с помощью флуоресцентной микроскопии (в дополнение к или вместо) проточной цитометрии. Клетки могут быть окрашены точно, как описано выше, и исследованы с помощью флуоресцентной микроскопии. Этот способ позволяет визуализировать отдельные клетки, однако может характеризоваться сниженной чувствительностью в зависимости от плотности антигена.

Антитела к TL1A могут быть дополнительно исследованы в отношении реактивности с антигеном TL1A с помощью вестерн-блоттинга. Вкратце, клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих TL1A, могут быть получены и подвергнуты воздействию электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецила сульфата натрия. После электрофореза разделенные антигены будут перенесены на нитроцеллюлозные мембраны, заблокированные 20% мышинной сывороткой, и зондированы моноклональными антителами, подлежащими исследованию. Связывание IgG может быть обнаружено с помощью антитела к IgG с щелочной фосфатазой и исследовано с помощью субстратных таблеток BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., Сент-Луис, Миссури).

Способы анализа аффинности связывания, перекрестной реактивности и кинетики связывания различных антител к TL1A включают в себя стандартные анализы, известные в данной области, например, анализ на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) BIACORE® с использованием инструмента BIACORE® 2000 SPR (Biacore AB, Уппсала, Швеция).

В одном варианте осуществления антитело специфически связывается с внеклеточным участком TL1A человека. Антитело может специфически связываться с определенным доменом (например, функциональным доменом) во внеклеточном домене TL1A. В определенном варианте осуществления антитело специфически связывается с участком TL1A, с которым связывается DR3. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывается с внеклеточным участком TL1A человека и внеклеточным участком TL1A макака-крабоеда. Предпочтительно антитело связывается с TL1A человека с высокой аффинностью.

VIII. Композиции

Дополнительно предусмотрены композиции, например, фармацевтические композиции, содержащие одно или комбинацию антител к TL1A или его(их) антигенсвязывающий(антигенсвязывающие) фрагмент(фрагменты), описанные в настоящем документе, разработанные совместно с фармацевтически приемлемым носителем.

В определенных вариантах осуществления композиция содержит антитело к TL1A в концентрации, составляющей по меньшей мере 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200 мг/мл, 1-300 мг/мл или 100-300 мг/мл.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, также могут быть введены в составе комбинированной терапии, т.е., в комбинации с другими средствами. Например, комбинированная терапия может включать в себя антитело к TL1A, описанное в настоящем документе, по меньшей мере с еще одним иммуносупрессивным средством.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает

в себя любые и все растворители, диспергаторы, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие всасывание, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носителем является подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального и эпидермального введения (например, с помощью инъекции или инфузии). В зависимости от способа введения, активное соединение, т.е., антитело, иммуноконъюгат или биспецифическая молекула, может быть покрыто материалом в целях защиты соединения от действия кислот и других природных состояний, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические соединения, описанные в настоящем документе, могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет необходимую биологическую активность родительского соединения и не придает каких-либо нежелательных токсикологических эффектов (см., например, Berge, S. M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Примеры таких солей включают в себя соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Соли присоединения кислоты включают в себя таковые, полученные из нетоксических неорганических кислот, таких как хлористоводородной, азотной, ортофосфорной, серной, бромистоводородной, йодистоводородной, фосфорной и т.п., а также из нетоксических органических кислот, таких как алифатических моно- и дикарбоновых кислот, фенилзамещенных алкановых кислот, гидроксипропановых кислот, ароматических кислот, алифатических и ароматических сульфокислот и т.п. Соли присоединения основания включают в себя таковые, полученные из щелочноземельных металлов, таких как натрия, калия, магния, кальция и т.п., а также из нетоксических органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамина, N-метилглюкамина, хлорпрокаина, холина, диэтаноламина, этилендиамина, прокаина и т.п.

Фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, может включать в себя фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают в себя: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеина гидрохлорид, натрия бисульфат, натрия метабисульфат, натрия сульфит и т.п.; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмиат, бутилированный гидроксипропанол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; (3) металлохелатирующие средства, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбитол, винная кислота, ортофосфорная кислота и т.п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, включают в себя воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.), и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и сложные органические эфиры для инъекций, в том числе, этилолеат. Подходящая текучесть может быть поддержана, например, с помощью применения покрывающих материалов, таких как лецитин, с помощью поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и с помощью применения поверхностно-активных веществ.

Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, увлажняющие средства, эмульгирующие средства и диспергирующие средства. Профилактика наличия микроорганизмов может быть обеспечена как с помощью стерилизационных процедур, см. выше, так и с помощью включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабена, хлоробутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательным включение в композиции изотонических средств, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Помимо этого, длительное всасывание фармацевтической формы для инъекций может быть достигнуто с помощью включения средств, которые задерживают всасывание, таких как алюминия моностеарат и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных растворов для инъекций или дисперсий. Использование таких сред и средств для фармацевтически активных субстанций известно в данной области техники. За исключением случаев, когда любая стандартная среда или средство являются несовместимыми с активным соединением, предусматривается их применение в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции в типичном случае должны быть стерильными и стабильными в условиях изготовления и хранения. Композиция может быть разработана в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой раствор или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), и их подходящие смеси. Подходящая текучесть может поддерживаться, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, с помощью поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительным включение в композицию изотонических средств, таких как сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Длительное всасывание композиций для инъекций может быть достигнуто с помощью включения в композицию средства, которое замедляет всасывание, например, солей моно-

стеарата и желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены с помощью включения активного соединения в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией компонентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизационной микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают с помощью включения активного соединения в стерильную основу, которая содержит основную дисперсную среду и другие необходимые компоненты из таковых, перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые приводят к образованию порошка активного компонента совместно с любым дополнительным необходимым компонентом из его предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

Количество активного компонента, которое может быть комбинировано с материалом-носителем для получения одной лекарственной формы, будет различаться в зависимости от больного, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Количество активного компонента, которое может быть комбинировано с материалом-носителем для получения одной лекарственной формы, будет, как правило, тем количеством композиции, которое приводит к терапевтическому эффекту. Как правило, по стопроцентной шкале, это количество будет меняться от приблизительно 0,01 до приблизительно 99% активного компонента, предпочтительно от приблизительно 0,1 до приблизительно 70%, наиболее предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 30% активного компонента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Режимы дозирования корректируют в целях обеспечения оптимального необходимого ответа (например, терапевтического ответа). Например, может быть введен один болюс, в течение определенного времени могут быть введены несколько распределенных доз или доза может быть пропорционально снижена или повышена в зависимости от потребностей терапевтической ситуации. Особенно предпочтительной является разработка парентеральных композиций в дозированных лекарственных формах в целях облегчения введения и однородности дозировки. Дозированная лекарственная форма, используемая в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве однократных доз для субъектов, которые подлежат лечению; каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанного в целях получения необходимого лечебного эффекта в ассоциации с необходимым фармацевтическим носителем. Определение дозированных лекарственных форм, описанных в настоящем документе, продиктовано и непосредственно зависит от (а) уникальных характеристик активного соединения и определенного терапевтического эффекта, подлежащего достижению, и (б) ограничений, свойственных в области разработки такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидов.

В случае введения антитела диапазоны доз составляют от приблизительно 1 до 100 мг/кг и более обычно от 1 до 5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозы могут составлять 40 мг/кг массы тела, 30 мг/кг массы тела, 20 мг/кг массы тела, 15 мг/кг массы тела, 10 мг/кг массы тела или 5 мг/кг массы тела или в пределах от 1 до 20 мг/кг. Иллюстративный режим лечения предусматривает введение один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз каждые четыре недели, один раз в месяц, один раз каждые 3 месяца или один раз каждые 3-6 месяцев.

Антитело можно вводить в виде состава с длительным высвобождением, в этом случае требуется менее частое введение. Доза и частота изменяются в зависимости от периода полужизни антитела у пациента. Как правило, человеческие антитела характеризуются наиболее длительным периодом полужизни, за ними следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и антитела, не являющиеся человеческими. Доза и частота введения может меняться в зависимости от того, является ли лечение поддерживающим или терапевтическим. При поддерживающих применениях вводят сравнительно низкую дозу через сравнительно редкие интервалы в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение в течение оставшейся части своих жизней. При терапевтических применениях иногда требуется сравнительно высокая доза через сравнительно короткие интервалы до того, как прогрессирование заболевания ослабляется или прекращается, и предпочтительно до того, как пациент проявляет частичную или полную нормализацию симптомов заболевания. После этого пациенту может быть назначен поддерживающий режим.

Уровни фактической дозы активных компонентов в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, могут меняться таким образом, чтобы получить количество активного компонента, которое является эффективным для достижения необходимого терапевтического ответа в случае определенного пациента, композиции или способа введения. Выбранный уровень дозы будет зависеть от ряда фармакокинетических факторов, в том числе активности определенных композиций, описанных в настоящем документе, или их сложного эфира, соли либо амида, способа введения, времени введения, скорости экскреции определенного соединения, подлежащего применению, продолжительности введения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с определенными используемыми композициями, возраста, пола, массы, состояния, общего состояния здоровья и предшествующего анамнеза пациента, подлежащего лечению, и аналогичных факторов, хорошо известных в области медицины.

"Терапевтически эффективная доза" антитела к TL1A, описанная в настоящем документе, предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, повышению частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждению ухудшения или инвалидности в результате поражения заболеванием.

Композицию, описанную в настоящем документе, можно вводить с помощью одного или нескольких способов введения с использованием одного или нескольких из множества способов, известных в данной области техники. Специалисту в данной области будет понятно, что способ и/или режим введения будет меняться в зависимости от необходимых результатов. Предпочтительные способы введения антител, описанных в настоящем документе, включают в себя внутривенные, внутримышечные, интрадермальные, интраперитонеальные, подкожные, спинальные или другие парентеральные способы введения, например, с помощью инъекции или инфузии. Фраза "парентеральное введение", используемая в настоящем документе, означает режимы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно с помощью инъекции, и включает в себя без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, внутриорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастеральную инъекцию и инфузию.

Альтернативно антитело, описанное в настоящем документе, может быть введено с помощью непарентерального способа, такого как местного, эпидермального или слизистого способа введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения можно приготовить с носителями, которые защитят соединение от быстрого высвобождения, в том числе, в виде препарата с контролируемым высвобождением, включая импланты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно применять биodeградирующие, биосовместимые полимеры, в том числе, этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортоэфиры и полимолочную кислоту. Многие способы получения таких составов запатентованы или общеизвестны специалистам в данной области техники. См., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции можно вводить с помощью медицинских изделий, известных в данной области техники. Например, в предпочтительном варианте осуществления терапевтическую композицию, описанную в настоящем документе, можно вводить с помощью безыгольного гиподермического инъектора, такого как изделия, описанные в патентах США №№ 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824; или 4596556. Примеры общеизвестных имплантов и модулей для применения с антителами к TL1A, описанными в настоящем изобретении, включают в себя патент США № 4487603, в котором раскрыт имплантируемый микроинфузионный насос для распределения лекарственного препарата с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, в котором раскрыто терапевтическое изделие для введения лекарственных средств через кожу; патент США № 4447233, в котором раскрыт лекарственный инфузионный насос для доставки лекарственного средства с точной скоростью инфузии; патент США № 4447224, в котором раскрыта имплантируемая инфузионная система с регулятором расхода для непрерывной доставки лекарственных средств; патент США № 4439196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственных средств, имеющая многокамерные компартменты; и патент США № 4475196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственных средств. Эти патенты включены в настоящий документ посредством ссылки. Специалистам в данной области техники известны многие другие такие импланты, системы доставки и модули.

IX. Применения и способы

Антитела, композиции на основе антител и способы, описанные в настоящем документе, имеют многочисленные применения *in vitro* и *in vivo*, в том числе, например, подавление иммунного ответа с помощью блокирования передачи сигнала с помощью TL1A или выявления TL1A. В предпочтительном варианте осуществления антитела, описанные в настоящем документе, представляют собой человеческие антитела. Например, антитела к TL1A, описанные в настоящем документе, можно вводить в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или субъектам-людям, например, *in vivo*, в целях подавления иммунитета при ряде заболеваний. Соответственно в настоящем документе предусмотрены способы модификации иммунного ответа у субъекта, включающие введение субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе, таким образом, что у субъекта модифицируют иммунный ответ. Предпочтительно ответ ингибируют, подавляют или снижают.

Также предусмотрены способы выявления наличия антигена TL1A человека в образце или измерения количества антигена TL1A человека, включающие приведение в контакт образца и контрольного образца с человеческим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с TL1A человека, в условиях, которые способствуют образованию комплекса между антителом или его фрагментом и TL1A человека. Затем выявляют образование комплекса, при этом разница в образовании комплекса между образцом и контрольным образцом указывает на наличие антигена TL1A в образце. Кроме того, антитела к TL1A, описанные в настоящем документе, могут быть

использованы для очистки TL1A человека с помощью иммуноаффинной очистки.

Примеры

Пример 1.

Иммунизация к TL1A и слияние иммунизации КМ

Для получения полностью человеческих моноклональных антител к t11a мышь kmTM иммунизировали (табл. 1) очищенным рекомбинантным антигеном TL1A (R&D Systems 1319-TL/CF).

Таблица 1. Слияние TL1A 2596

| Мышь | | Титр при | | Лимфоциты | Позитивные |
|-------|--------|----------|---------|---------------------|------------|
| Штамм | Мышь | Слияние | Слияние | Слитые | Гибридомы |
| КМ | 238401 | 2596 | 4050 | 5 x 10 ⁷ | 70 |

15 мкг растворимого TL1A совместно с 5 мкг TL1A, меченого TNP в адьюванте Ribⁱ, вводили SC в области коленного сухожилия на 0-е, 5-е, 8-е, 11-е, 15-е и 18-е сутки с последующими слиянием на 22-е сутки.

Смесь 15 мкг нативного антигена и 5 мкг антигена, модифицированного TNP, в адьюванте Ribⁱ вводили в несколько участков коленного сухожилия подкожно (SC) на 0-е, 5-е, 8-е, 11-е, 15-е и 18-е сутки с последующими слияниями В-клеток селезенки и лимфатических узлов на 22-е сутки. TL1A, модифицированный TNP, получали в результате смешивания 5 мкл пикрилсульфоново́й кислоты (Sigma 92822) с 1 мг TL1A в течение 4 ч при 4°C с последующим диализом в течение ночи PBS.

Получение гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела к BTLA

Лимфоциты, выделенные из мышей КМTM, сливали с клеточной линией миеломы мыши с помощью электрослияния. Электрослияние осуществляли с помощью электрического тока в целях выравнивания лимфоцитов и клеток миеломы между электродами в кювете для слияния CytopluseTM, и затем быстро повышая электрический потенциал на клеточных мембранах. Быстрый импульс электрического тока дестабилизировал мембраны, открывая пору между прилегающими клетками. Во время этого процесса мембраны прилегающих клеток сливались, приводя к образованию гибридной клетки миеломы:лимфоцита (гибридомы).

Суспензии отдельных клеток из лимфоцитов от иммунизированных мышей сливали с равным числом несекретирующих клеток миеломы мыши P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) с помощью электрослияния. Клетки высевали примерно по $2,5 \times 10^4$ в плоскодонные микротитрационные планшеты, с последующей инкубацией в селективной среде, содержащей 10% FBS, 3-5% ориген (IGEN), добавки OPI (Sigma O 5003: $1,1 \times 10^{-3}$ М щавелевоуксусной кислоты, $4,5 \times 10^{-4}$ М пирувата натрия, 4 мМ L-глутамин, 0,055 мМ 2-меркаптоэтанол и 1X HAT (Sigma H0262). Примерно через одну неделю клетки культивировали в среде, в которой HAT заменяли на HT (Sigma H0137). Затем отдельные клетки подвергали скринингу с помощью автоматизированного гомогенного анализа для отбора лунок, продуцирующих антитела IgG человека с каппа-цепью. Затем эти позитивные в отношении IgG человека лунки подвергали скринингу с помощью ELISA на покрытых антигеном TL1A планшетах для отбора гибридом, секретирующих специфические в отношении TL1A антитела IgG человека с каппа-цепью. Гибридомы, секретирующие антитела, повторно высевали в 24-луночные планшеты, повторно подвергали скринингу и в случае, если они все еще продуцировали антитела, специфические в отношении TL1A, клетки сохраняли с помощью замораживания при -80°C или в жидком азоте (LN2). Моноклональные антитела к TL1A субклонировали по меньшей мере дважды с помощью предельного разведения. Стабильные субклоны затем культивировали *in vitro* с получением небольших количеств антитела в среде тканевой культуры для дальнейшей характеристики. Замороженные аликвоты субклонов сохраняли с помощью замораживания в LN2.

Протокол наименования, используемый для этой гибридомы, TL1A 2596.10A4.F7.2E8, представлял собой следующее. Антитело являлось специфическим в отношении TL1A и было получено из слияния 2596. Родительский клон выделяли из планшета 10 лунок A4. 10A4.F7 представлял собой субклон родительского клона 10A4, а 10A4.F7.2E8 представлял собой субклон 10A4.F7.

Характеристика связывания антитела с антигеном

Антитела по настоящему раскрытию могли исследовать в отношении связывания с TL1A, например, с помощью стандартного ELISA. Вкратце, титрационные микропланшеты покрывали очищенным TL1A при 1,0 мкг/мл в PBS, а затем блокировали 1% альбумином бычьей сыворотки в PBS/Tween. Разведения антитела (например, разведения плазмы от иммунизированных TL1A мышей или супернатанты клеточных культур) добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали PBS/Tween и затем инкубировали с вторичным реагентом (например, в случае человеческого антител - реагентом на основе Fc-специфического поликлонального козьего антитела к IgG человека), конъюгированным с пероксидазой хрена в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывания планшеты исследовали с помощью субстрата ABTS (2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-

сульфоновой кислоты) (Moss Substrates, 1,46 ммоль/л), и анализировали при OD, составляющей 405.

Анализ ELISA, описанный выше, могли использовать для скрининга гибридом, которые характеризовались положительной реактивностью в отношении иммуногена TL1A. Гибридомы, которые связывались с высокой avidностью с TL1A, субклонировали и дополнительно характеризовали. Один клон из каждой гибридомы, которая сохраняла реактивность родительских клеток (определенную с помощью ELISA), могли отбирать для создания клеточного банка из 5-10 пробирок, сохраняемых при -140°C, и для очистки антител.

Для очистки антител к TL1A выбранные гибридомы могли выращивать в объеме 1-2 л в колбах для культивирования тканей для очистки моноклональных антител. Супернатанты могли фильтровать и концентрировать перед аффинной хроматографией с белком А-сефарозой (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси). Элюированный IgG могли проверять с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии для обеспечения чистоты. Буферный раствор могли заменять на PBS, а концентрацию могли определять с помощью OD₂₈₀ с коэффициентом экстинкции, составляющим 1,43. Моноклональные антитела могли разделять на аликвоты и хранить при -80°C.

Для определения того, связываются ли выбранные моноклональные антитела к TL1A с уникальными эпитопами, каждое антитело могли биотинилировать с помощью коммерчески доступных реагентов (Pierce, Рокфилд, Иллинойс). Конкурентные исследования с помощью немеченных моноклональных антител и биотинилированных антител могли осуществлять с использованием планшетов для ELISA, покрытых TL1A, как описано выше. Связывание биотинилированного mAb могли выявлять с помощью зонда на основе стрептавидина и пероксидазы. Дополнительно аналогичные конкурентные исследования могли проводить с помощью FACS на клетках TL1A-CHO. Связывание антител к TL1A с клетками можно выявлять с помощью зонда на основе антитела к Ig человека с фикоэритрином.

Для определения изотипа очищенных антител изотипирующий ELISA могли осуществлять с помощью реагентов, специфических к антителам определенного изотипа. Например, для определения изотипа человеческого моноклонального антитела лунки микротитрационных планшетов могли покрывать 1 мкг/мл антитела к человеческому иммуноглобулину в течение ночи при 4°C. После блокирования 1% BSA планшеты реагировали с 1 мкг/мл или менее исследуемых моноклональных антител или очищенных изотопических контролей при температуре окружающей среды в течение 1-2 ч. Затем лунки реагировали или с зондами на основе IgG1 человека, или с зондами на основе специфического в отношении IgM человека, конъюгированного с пероксидазой хрена. Планшеты исследовали и анализировали, как описано выше.

Анализы FACS использовали для проверки того, что антитела по настоящему раскрытию связывались с нативным TL1A, экспрессируемым на клетках. Вкратце, разведения антитела в 1% BSA в PBS совместно с 0,5 % азидом натрия (буфер FACS) инкубировали с трансфицированными клетками CHO, экспрессирующими TL1A (10⁵ клеток) в течение 30-60 мин при 4°C. Клетки промывали дважды с помощью центрифугирования, аспирации супернатанта и добавления свежего буфера FACS. Связывание антител с TL1A на клетках выявляли с помощью инкубирования клеток с козым антителом к IgG человека (Fc-специфическому), меченым PE (фикоэритрином), в течение 30 мин при 4°C, промывали клетки 2x, как указано выше, и анализировали с помощью FACS (фиг. 1).

Идентификацию антител к TL1A, которые блокировали связывание TL1A с DR3, также выполняли с помощью FACS с использованием связывания растворимого белка TL1A-SH6 (his-меченого) с hDR3, экспрессируемого на клетках CHO (CHO DR3). Антитела к TL1A или контрольные антитела инкубировали с антигеном SH6 TL1A при 0,1-0,5 мкг/мл в течение 30 мин в буфере FACS и затем клетки CHO hDR3 добавляли к смеси антитела TL1A и инкубировали в течение 30 мин. Клетки промывали и связывание TL1A с клетками CHO hDR3 выявляли с помощью антитела к His с PE с последующим FACS. Блокирующие антитела предупреждали связывание SH6 TL1A с клетками CHO hDR3 (фиг. 2).

Пример 2. Очистка антител к TL1A

Исходное антитело к TL1A из гибридомы, 1490-2596-10A4.F7.2E8, экспрессировали в виде рекомбинантного белка в клетках CHO и обозначали TL1A.2. Данный белок экспрессировали в виде Fc-варианта G4P, а также в виде Fc-варианта G1.1 f. Супернатанты, полученные из клеток CHO, очищали на колонке MabSelectSure с белком А. Вкратце, супернатант CHO загружали на колонку с белком А, которую предварительно уравнивали PBS (фосфатным буферным раствором), pH 7,4. Колонку тщательно промывали PBS после загрузки образца после элюирования связанного белка с помощью 0,1 М цитратного буфера, pH 3,0. Элюированный белок незамедлительно доводили до нейтрального значения pH с помощью добавления соответствующего количества 1 М буфера Tris. Затем образец обменивали на PBS в результате масштабного диализа.

Концентрацию очищенного антитела определяли с помощью измерения поглощения белка при 280 нм. Поглощение, составляющее 1,4 при 280 нм, считали равноценным 1 мг/мл антитела. Чистоту антитела подтверждали с помощью Bioanalyzer, а также способов CE-SDS. Уровни эндотоксина в очищенных образцах измеряли с помощью кинетического способа LAL.

Уровни агрегации определяли с помощью способов SEC-HPLC, а также способов SEC-MALLS.

Идентичность антитела подтверждали с помощью определения N-концевых аминокислотных последовательностей легких и тяжелых цепей антитела с использованием секвенирования Эдмана. Массу легких и тяжелых цепей антитела определяли с помощью способов LC-MS. Гетерогенность антитела оценивали с помощью хроматографии с гидрофобным взаимодействием с использованием колонки TSK Ether 5PW. Олигосахаридный профиль антитела определяли с помощью удаления гликановых структур из антитела с использованием фермента PNGазы F, флуоресцентного мечения олигосахаридов и дополнительного анализа с помощью способа капиллярного электрофореза.

Пример 3. Конструкция и экспрессия вектора

V_K 10A4 амплифицировали с помощью ПЦР, использующей клон V_K MP.106132012-A06 в качестве матрицы, и клонировали в вектор pICOFSCneoK, который содержал сигнальную последовательность остеонектина и константный участок каппа-цепи человека, образуя плазмиду pICOFSCneoK(TL1A.10A4).

V_H 10A4 амплифицировали с помощью ПЦР, использующей клон V_H MP.106132012-E02 в качестве матрицы, и клонировали в вектор pICOFSCpurG4P, который содержал сигнальную последовательность остеонектина и константный участок IgG4-S228P человека, образуя плазмиду pICOFSCpurG4P(TL1A.10A4). Плазмиды pICOFSCpurG4P(TL1A.10A4) и pICOFSCneoK(TL1A.10A4) котрансфицировали в клетки CHO-S и стабильный пул отбирали и повышали для экспрессии TL1A.2-g4P для исследовательского применения.

Пример 4. Протокол для измерения аффинности

Чип с белком G (CM5) изготавливали с помощью покрытия его ~400Rus с использованием ацетатного буфера (pH 2,9). mAb 10A4.F7 (7,5 мкг/мл, 12 мкл) захватывали при скорости потока 10 мкл/мин на поверхности белка G. Антиген Hu-TL1A-His (партия № 50182AS151) при нескольких концентрациях (250, 200, 150, 100 и 50 н.) пропускали над захваченным mAb в течение 5 мин при 25 мкл/мин и оставляли диссоциировать в течение 7,5 мин. Поверхность белка G восстанавливали с помощью 10 мкл 50 mM NaOH и 5 мкл 25 mM HCL при скорости потока 100 мкл/мин. Данные анализировали с помощью Biaevaluation 3.1 (фиг. 3).

Пример 5. Протокол для связывания эпитопа

10A4.A7 (4.6KRUs), 17H11.C2 (6.3KRUs) и 10A6.B6 (9.6KRUs) наносили на чип CM5. mAb титровали со снижением дозы (1:3), начиная с 30 мкг/мл, и инкубировали с 25 н. антигена Hu-TL1A-His в течение ~2 ч. Комплекс антитело-антиген вводили на поверхность, покрытую mAb, в течение 2,5 мин. Поверхность восстанавливали с помощью 25 mM NaOH. Получали график с использованием log [Ab] в зависимости от ответа, где снижение сигнала комплекса антитело-антиген характеризовало ту же самую эпитопную группу (фиг. 4).

Пример 6. Физическая стабильность 10A4.7, определенная с помощью DSC

Физическую стабильность 10A4.7 определяли с помощью DSC (фиг. 5).

Пример 7. Секвенирование переменного участка

Суммарную РНК получали из клона гибридомы 1490.2596.10A4.F7.2E8 и кДНК V_H и V_K получали в двух повторностях. Переменные участки антитела амплифицировали с помощью процедуры быстрой амплификации концов кДНК (RACE) с использованием 3'специфического в отношении человека праймера константного участка, спаренного со смесью 5' универсальных праймеров RACE. Полученные в результате продукты ПЦР, содержащие переменные участки, клонировали в вектор pCR4-TOPO. Образцы TempliPhi получали из клонов TOPO и подвергали секвенированию ДНК. Полученные в результате последовательности ДНК анализировали в отношении реаранжировок внутри рамки считывания и других характеристик антител. Последовательность V_H из клона MP.1_06132012-E02 (фиг. 7 и 8) и последовательность V_K из клона MP.1_06132012-A06 (фиг. 6 и 9) выбирали в качестве типовых последовательностей.

Пример 8. Картирование эпитопа TL1A/10A4 с помощью HDX-MS

С помощью способа масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS) исследовали конформацию белка и конформационную динамику в растворе с помощью мониторинга скорости и степени обмена дейтерия атомов водорода каркасного амида. Уровень HDX зависел от доступности атомов водорода каркасного амида и водородных связей белка. Повышение массы белка при HDX можно было точно измерить с помощью MS. В случае объединения этой методики с ферментативным расщеплением можно было определять структурные изменения на пептидном уровне, обеспечивая различие поверхностных пептидов от таковых, уложенных внутрь. В типичном случае осуществляли мечение дейтерием и последующие эксперименты по гашению с последующим расщеплением пепсином, разделением пептидов в режиме online и MS-анализом.

Картирование эпитопа осуществляли в тримере TL1A с помощью mAb к TL1A (10A4) и в тримере TL1A с помощью Fab 10A4. Перед экспериментами по картированию эпитопа эксперименты без использования дейтерия проводили в целях получения перечня распространенных пептических пептидов для рекомбинантного полноразмерного тримера TL1A человека (4 мкМ) и белкового комплекса тримера TL1A с 10A4 или тримера TL1A с Fab 10A4 (молярное соотношение 1:3), достигая 80% охват последова-

тельности в случае TL1A. В экспериментах HDX-MS 5 мкл каждого образца (TL1A или TL1A с mAb/Fab) разводили в 55 мкл буфера D₂O (10 mM фосфатного буфера, D₂O, pH 7,0) в целях начала реакций мечення. Реакции осуществляли в течение различных периодов времени: 30 с, 5, 20, 60 и 240 мин. К концу каждого периода мечення реакцию гасили с помощью добавления буфера для гашения (100 mM фосфатного буфера с 4M GdnCl, pH 2,5, 1:1, объем/объем) и 50 мкл погашенного образца вводили в систему HDX-MS Waters для анализа. Уровни захвата дейтерия распространенными пептическими пептидами контролировали в отсутствие/в присутствии 10A4 или Fab 10A4 (фиг. 10).

Пример 9. Картирование эпитопа TL1A/10A4 с помощью компьютерного моделирования

С помощью структуры тримера TL1A осуществляли компьютерный анализ. TNF-подобный лиганд 1A (TL1A) связывается со своим когнатным рецептором DR3 и рецептором-ловушкой DcR3. TL1A принадлежит к стандартному семейству лигандов TNF, которое в настоящее время включает в себя восемь других членов: FasL, LIGHT, TNF α , LT α , LT β , TRAIL, RANKL и CD40L.

TL1A человека состоит из 251 аминокислоты: 35 - в цитоплазматическом домене, 24 - в трансмембранном участке и 192 - во внеклеточном домене. Существует два потенциальных N-связанных участка гликозилирования в аминокислотной последовательности TL1A, остатки Asn в положениях 133 и 229. Структура TL1A характеризуется фолдингом по типу рулета, типичным для суперсемейства TNF. Члены суперсемейства TNF представляют собой трансмембранные белки II типа, которые образуют нековалентные гомотримеры, которые принимают фолдинг по типу рулета, типичный для семейства TNF, при этом внутренние и внешние β -складки состоят из A' AHCF и B' BGDE нитей соответственно. Плотный упакованный тример является типичным для суперсемейства TNF. Доступная для растворителя площадь поверхности каждого мономера, скрытого в тримерной сборке, составляет 1977 Å², что сопоставимо с таковым, наблюдаемым в других стабильных тримерных лигандах TNF (TNF α , 2412 Å²; TRAIL, 2261 Å²; CD40L, 2091 Å²). Аналогично другим стандартным лигандам TNF поверхность раздела субъединиц TL1A образуется в результате взаимодействий между краями β -сэндвича в одном мономере (E- и F-нити) и внутренней складкой соседнего мономера (A-, H-, C- и F-нити). Центральная область этой поверхности раздела состояла преимущественно из гидрофобных остатков с F81, Y146, F182 и L184 от каждого мономера, расположенного так, чтобы способствовать образованию гидрофобного кора тримера. Соответствующие остатки в этих четырех положениях в других стандартных лигандах TNF являются, как правило, консервативными и образуют наиболее распространенные внутридоменные гидрофобные контакты.

Два участка TL1A, которые идентифицировали с помощью HDX, картировали в структуре TL1A, фиг. 12. Отдельные мономерные каркасные ленты окрашены в серый, зеленый и желтый цвета. Пептидный участок 1 (в цвете фуксии) и пептидный участок 2 (в синем цвете) образовывали непрерывный эпитоп, претерпевающий воздействие растворителя. На фиг. 13 изображен тример TL1A в модели FАВ (красный = N-цепь, розовый = L-цепь) в случае mAb 10A4, характеризующийся тем, что непрерывному эпитопу в TL1A требуются взаимодействия как от тяжелой, так и от легкой цепей. Компьютерная оценка белковых комплексов показала, что определенные остатки, расположенные на поверхностях раздела белка, могут значительно способствовать энергиям белок-белкового взаимодействия. Было показано, что остатки, которые значительно способствовали белковым взаимодействиям, включали ароматические аминокислоты (Tyr, Phe, Trp), основные аминокислоты (Arg, Lys), кислые аминокислоты (Asp, Glu) и полярные аминокислоты (Gln, Asn, Ser, Thr).

Табл. 2 и 3 содержит компьютерную оценку подвергнутых воздействию аминокислот, соответствующих пептидному участку 1 и 2. В таблицах показано воздействие на боковую цепь и процент воздействия на боковую цепь, который может быть использован для оценки доступности функциональных остатков в этих пептидных участках. В случае пептидного участка 1, табл. 2, интересно отметить, что E¹⁶⁶, R¹⁶⁸, Q¹⁶⁹, R¹⁷² и K¹⁷⁵ имели боковые цепи функциональных аминокислот, которые были подвергнуты крайнему воздействию, 50-97%. Интересно отметить, что существует высокая корреляция с данными в отношении пространственного эпитопа, полученного в результате пептидной фрагментационной MS в случае участка 1 ¹⁶⁹QAGR¹⁷², с наиболее подверженным воздействию остатком Q¹⁶⁹ при 97%. Как R¹⁶⁸, так и R¹⁷² являются проксимальными в отношении Q¹⁶⁹ в структуре TL1A, демонстрируя связь экспериментов с моделированием, трехмерной структурой и HDX.

Таблица 2. Компьютерная оценка подвергнутых воздействию аминокислот, соответствующих пептидному участку 1
SECSEIRQAGRPNKPDSIT

| EIRQAGRPNKPDSIT (166-180) 93-107 - Пептидный участок 1 HDX | | | | |
|--|---------|----------------|----------------|---|
| Молекула | Остаток | Воздействие на | Процент | |
| Критическая | | боковую цепь | воздействия на | |
| функциональная | | | боковую цепь | |
| аминокислота | | | | |
| TL1A_A | E166 | 138,046707 | 0,738218 | X |
| * | | | | |
| TL1A_A | I167 | 80,786659 | 0,416426 | |
| TL1A_A | R168 | 168,333267 | 0,68989 | X |
| * | | | | |
| TL1A_A | Q169 | 184,482407 | 0,97096 | X |
| * | | | | |
| TL1A_A | A170 | 81,956467 | 0,660939 | |
| TL1A_A | G171 | 78,1968 | 0,878616 | |
| TL1A_A | R172 | 126,085464 | 0,516744 | X |
| * | | | | |
| TL1A_A | P173 | 91,752304 | 0,611682 | |
| TL1A_A | N174 | 30,269852 | 0,188012 | |
| TL1A_A | K175 | 168,50209 | 0,787393 | X |
| * | | | | |
| TL1A_A | P176 | 66,328865 | 0,442192 | |
| TL1A_A | D177 | 67,25705 | 0,436734 | |
| TL1A_A | S178 | 67,517006 | 0,535849 | |
| TL1A_A | I179 | 1,554886 | 0,008015 | |
| TL1A_A | T180 | 11,607443 | 0,076365 | |

В случае пептидного участка 2 наиболее подвергнутыми воздействию функциональными остатками являлись H¹¹¹, F¹¹², K¹¹³ и N¹¹⁴. Эти функциональные аминокислоты также очень подвержены воздействию, 62-93%, и образуют вторую крупную структуру непрерывного эпитопа. Функциональные остатки, идентифицированные с помощью моделирования, коррелируют с пространственным эпитопом на основе MS в случае участка 2, идентифицированного с помощью фрагментационной MS ¹¹³KNQF¹¹⁶.

Таблица 3. Компьютерная оценка подвергнутых воздействию аминокислот, соответствующих пептидному участку 2
TR HFKNQFPALH

| TR HFKNQFPALH (107-120) - Наиболее подвергнутый воздействию пептидный участок 2 HDX | | | | |
|---|---------|----------------|----------------|-----|
| Молекула | Остаток | Воздействие на | Процент | |
| Критическая | | боковую цепь | воздействия на | |
| функциональная | | | боковую цепь | |
| аминокислота | | | | |
| TL1A_A | T107 | 92,135231 | 0,606153 | |
| TL1A_A | F108 | 122,209305 | 0,814729 | |
| TL1A_A | T109 | 96,343613 | 0,63384 | X ? |
| TL1A_A | Q110 | 124,388191 | 0,654675 | X ? |
| TL1A_A | H111 | 154,51297 | 0,768721 | X * |
| TL1A_A | F112 | 155,469727 | 0,703483 | X * |
| TL1A_A | K113 | 134,771896 | 0,629775 | X * |
| TL1A_A | N114 | 150,291626 | 0,933488 | X ? |
| TL1A_A | Q115 | 124,734985 | 0,6565 | X * |
| TL1A_A | F116 | 86,689079 | 0,392258 | |
| TL1A_A | P117 | 43,018517 | 0,28679 | |
| TL1A_A | A118 | 24,548649 | 0,197973 | |
| TL1A_A | L119 | 0,518295 | 0,002618 | |
| TL1A_A | H120 | 38,194756 | 0,190024 | |

Совместно структурное моделирование и данные HDX определяли непрерывный эпитоп на поверхности TL1A, который контактировал с паратопом mAb 10A4.

Пример 10. Анализ пролиферации Т-клеток

Антитело на основе кривой доза-эффект TL1A 10A4.F7.2E8 huIgG4 от 1 до 0,219 мкг/мл инкубировали с антителом к CD3 человека (Biolegend 300314) в течение 30 мин при 37°C, 5% CO₂, до добавления обогащенных набором StemCell (19052) CD4+ Т-клеток человека. Через 4 дня после инкубации при 37°C, 5% CO₂, добавляли 3Н-тимидин (0,5 мкCi/лунку) в течение последних 18-20 ч. Планшеты собирали на планшетах Unifilter GF/C (Packard 5007185) с помощью сборщика Filtermate и давали высохнуть. 50 мкл/лунка сцинтиллятора PerkinElmer Microscint-20 добавляли и планшеты считывали на сцинтилляционном счетчике Packard TopCount. Значения EC50 рассчитывали с помощью отложения на графике процента максимального значения за вычетом фонового уровня с использованием компьютерной программы GraphPad Prism.

Таблица 4. Анализ пролиферации Т-клеток, регулируемый антителом к CD3 (Hu CD4+ Т-клетки) (2,45 мг/мл)

| 2,45 мг/мл | EC50 [нМ] | |
|----------------|--------------|--------------|
| <u>эталон.</u> | <u>Донор</u> | <u>Донор</u> |
| <u>ELN</u> | <u>A</u> | <u>B</u> |
| 99103-061 | 0,211 | 2,2 |
| 99103-067 | 0,328 | 1,2 |
| 99103-072 | 0,295 | 0,318 |
| 99103-078 | 0,242 | 0,196 |
| 99103-079 | 0,277 | 0,341 |
| 99103-090 | 0,323 | 0,329 |

Пример 11. Анализ ингибирования PBMC человека IFNg (небольшое количество растворимого TL1A)

Антитело на основе кривой доза-эффект TL1A 10A4.F7.2E8 huIgG4 от 3 мкг/мл до 0,3 нг/мл инкубировали с 50 нг/мл TL1A человека (внутрилабораторного) совместно с 0,25 нг/мл hIL-12 (Peprotech) и 1 нг/мл hIL-18 (R&D Systems) в 96-луночных круглодонных планшетах с PBMC, выделенными из цельной крови человека. После инкубирования в течение ночи при 37°C, 5% CO₂, супернатанты собирали и уровни IFNg исследовали с помощью сопоставимых парных антител для сэндвич-ELISA (Thermo Scientific). Значения EC50 рассчитывали с помощью отложения на графике процента максимального значения за вычетом фонового уровня с использованием компьютерной программы GraphPad Prism.

Таблица 5. TL1A+IL-12+IL-18, регулируемый IFNg (Hu PBMC) (2,45 мг/мл)

| 2,45 мг/мл | EC50 [нМ] | |
|----------------|--------------|--------------|
| <u>эталон.</u> | <u>Донор</u> | <u>Донор</u> |
| <u>ELN</u> | <u>A</u> | <u>B</u> |
| 97305-032 | 0,131 | 0,197 |
| 97305-037 | 0,138 | 0,289 |
| 97305-040 | 0,167 | 0,146 |
| 97305-041 | 0,209 | 0,283 |
| 97305-044 | 0,272 | 0,211 |
| 97305-047 | 0,095 | 0,185 |
| 97305-050 | 0,209 | 0,163 |
| 97305-061 | 0,26 | 0,152 |
| 99932-005481 | 0,301 | 0,196 |

Таблица 6. TL1A+IL-12+IL-18, регулируемые IFNg (Hu PBMC) (5,9 мг/мл)

| 5,9 мг/мл | EC50 [нМ] | |
|----------------|--------------|--------------|
| <u>эталон.</u> | <u>Донор</u> | <u>Донор</u> |
| <u>ELN</u> | <u>A</u> | <u>B</u> |
| 99932-005481 | 0,295 | 0,241 |

Пример 12. Анализ ингибирования PBMC человека IFNg (небольшое количество клеток CHO, экспрессирующих TL1A)

Антитело на основе кривой доза-эффект TL1A 10A4.F7.2E8 huIgG4 от 3 мкг/мл до 0,3 нг/мл инкубировали с облученными клетками CHO, экспрессирующими TL1A, совместно с 0,25 нг/мл hIL-12 (Peprotech) и 1 нг/мл hIL-18 (R&D Systems) в 96-луночных круглодонных планшетах с PBMC, выделенными из цельной крови человека. После инкубирования в течение ночи при 37°C, 5% CO₂, супернатанты собирали и уровни IFNg исследовали с помощью сопоставимых парных антител для сэндвич-ELISA (Thermo Scientific). Значения EC50 рассчитывали с помощью отложения на графике процента максимального значения за вычетом фонового уровня с использованием компьютерной программы GraphPad Prism.

Таблица 7. Клетки CHO, экспрессирующие TL1A, +IL-12+IL-18, регулируемые IFNg (Hu PBMC) (2,45 мг/мл)

| 2,45 мг/мл | EC50 [нМ] | |
|----------------|--------------|--------------|
| <u>эталон.</u> | <u>Донор</u> | <u>Донор</u> |
| <u>ELN</u> | <u>A</u> | <u>B</u> |
| 97305-034 | 0,234 | 0,214 |

Пример 13. Анализ ингибирования Т-клеток человека IFNg

Антитело на основе кривой доза-эффект TL1A 10A4.F7.2E8 huIgG4 от 3 мкг/мл до 0,3 нг/мл инкубировали с 50 нг/мл TL1A человека (внутрилабораторного) совместно с 0,5 нг/мл hIL-12 (Peprotech) и 5 нг/мл hIL-18 (R&D Systems) в 96-луночных круглодонных планшетах с Т-клетками человека, обогащенными Stem Cell (19051). После инкубирования в течение ночи при 37°C, 5% CO₂, супернатанты собирали и уровни IFNg исследовали с помощью сопоставимых парных антител для сэндвич-ELISA (Thermo Scientific). Значения EC50 рассчитывали с помощью отложения на графике процента максимального значения за вычетом фонового уровня с использованием компьютерной программы GraphPad Prism.

Таблица 8. TL1A+IL-12+IL-18, регулируемый IFNg (Hu Т-клетки) (2,45 мг/мл)

| 2,45 мг/мл | EC50 [нМ] | |
|----------------|--------------|--------------|
| <u>эталон.</u> | <u>Донор</u> | <u>Донор</u> |
| <u>ELN</u> | <u>A</u> | <u>B</u> |
| 97305-062 | 0,18 | 0,259 |
| 97305-064 | 0,235 | 0,199 |
| 97305-066 | 0,331 | 0,347 |
| 97305-077 | 0,241 | 0,258 |
| 97305-082 | 0,034 | 0,039 |
| 99932-003797 | 0,355 | 0,312 |
| 99932-004083 | 0,393 | 0,311 |
| 99932-004084 | 0,367 | 0,303 |
| 99932-004439 | 0,185 | 0,194 |
| 99932-004774 | 0,22 | 0,319 |
| 99932-004955 | 0,172 | 0,211 |

Таблица 9. TL1A+IL-12+IL-18, регулируемый IFNg (Hu Т-клетки) (5,9 мг/мл)

| 5,9 мг/мл | EC50 [нМ] | |
|----------------|--------------|--------------|
| <u>эталон.</u> | <u>Донор</u> | <u>Донор</u> |
| <u>ELN</u> | <u>A</u> | <u>B</u> |
| 99932-004774 | 0,171 | 0,243 |
| 99932-004955 | 0,273 | 0,182 |

Таблица 10. TL1A+IL-12+IL-18, регулируемый IFNg (Hu T-клетки) (4,8 мг/мл)

| 4,8 мг/мл | EC50 [нМ] | |
|----------------|--------------|--------------|
| <u>эталон.</u> | <u>Донор</u> | <u>Донор</u> |
| <u>ELN</u> | <u>A</u> | <u>B</u> |
| 97305-082 | 0,162 | 0,143 |
| 99932- | | |
| 003797 | 0,303 | 0,361 |
| 99932- | | |
| 004083 | 0,27 | - |
| 99932- | | |
| 004084 | 0,316 | 0,345 |
| 99932- | | |
| 004439 | 0,262 | 0,157 |
| 99932- | | |
| 004774 | 0,177 | 0,267 |
| 99932- | | |
| 004955 | 0,193 | 0,287 |
| 99932- | 0,216 | 0,138 |
| 005751 | | |

Пример 14. Анализ ингибирования НК-клеток человека IFNg

Антитело на основе кривой доза-эффект TL1A 10A4.F7.2E8 huIgG4 от 3 мкг/мл до 0,3 нг/мл инкубировали с 50 нг/мл TL1A человека (внутрилабораторного) совместно с 0,5 нг/мл hIL-12 (Peprotech) и 1 нг/мл hIL-18 (R&D Systems) в 96-луночных круглодонных планшетах с НК-клетками человека, обогащенными Stem Cell (19055). После инкубирования в течение ночи при 37°C, 5% CO₂, супернатанты собирали и уровни IFNg исследовали с помощью сопоставимых парных антител для сэндвич-ELISA (Thermo Scientific). Значения EC50 рассчитывали с помощью отложения на графике процента максимального значения за вычетом фонового уровня с использованием компьютерной программы GraphPad Prism.

Таблица 11. TL1A+IL-12+IL-18, регулируемый IFNg (Hu NK-клетки) (2,45 мг/мл)

| 2,45 мг/мл | EC50 [нМ] | |
|--------------------|--------------|--------------|
| <u>эталон. ELN</u> | <u>Донор</u> | <u>Донор</u> |
| | <u>A</u> | <u>B</u> |
| 97305-070 | 0,16 | 0,253 |
| 97305-075 | 0,147 | 0,162 |

Пример 15. Анализ ингибирования цельной крови человека IFNg

Антитело на основе кривой доза-эффект TL1A 10A4.F7.2E8 huIgG4 от 3 мкг/мл до 0,3 нг/мл инкубировали с 50 нг/мл TL1A человека (внутрилабораторного) совместно с 0,5 нг/мл hIL-12 (Peprotech) и 5 нг/мл hIL-18 (R&D Systems) в 96-луночных круглодонных планшетах с цельной кровью человека, обработанной гепарином. После инкубирования в течение ночи при 37°C, 5% CO₂, планшеты центрифугировали при 1900 об./мин в течение 10 мин, плазму собирали и уровни IFNg исследовали с помощью сопоставимых парных антител для сэндвич-ELISA (Thermo Scientific). Значения EC50 рассчитывали с помощью отложения на графике процента максимального значения за вычетом фонового уровня с использованием компьютерной программы GraphPad Prism.

Таблица 12. TL1A+IL-12+IL-18, регулируемый IFNg (Hu WB) (2,45 мг/мл)

| 2,45 мг/мл | EC50 [нМ] | |
|----------------|--------------|--------------|
| <u>эталон.</u> | <u>Донор</u> | <u>Донор</u> |
| <u>ELN</u> | <u>A</u> | <u>B</u> |
| 97305-029 | 0,32 | 0,54 |
| 97305-033 | 0,284 | 0,108 |

Пример 16. Анализ ингибирования PBMC IFNg

Антитело на основе кривой доза-эффект TL1A 10A4.F7.2E8 huIgG4 от 3 мкг/мл до 0,3 нг/мл инку-

бировали с 50 нг/мл TL1A макака-крабоеда (внутрилабораторного) совместно с 2 нг/мл hIL-12 (Peprotech) и 5 нг/мл hIL-18 (R&D Systems) в 96-луночных круглодонных планшетах с ПВМС, выделенными из цельной крови макака-крабоеда. После инкубирования в течение ночи при 37°C, 5% CO₂, супернатанты собирали и уровни IFN γ исследовали с помощью набора ELISA для приматов (R&D Systems). Значения EC50 рассчитывали с помощью отложения на графике процента максимального значения за вычетом фонового уровня с использованием компьютерной программы GraphPad Prism.

Таблица 13. TL1A+IL-12+IL-18, регулируемые IFN γ (Суно ПВМС) (2,45 мг/мл)

| 2,45 | | |
|----------------|--------------|--------------|
| мг/мл | EC50 [нМ] | |
| <u>эталон.</u> | <u>Донор</u> | <u>Донор</u> |
| <u>ELN</u> | <u>A</u> | <u>B</u> |
| 97305-067 | 0,122 | 0,164 |
| 97305-071 | 0,154 | 0,133 |
| 97305-074 | 0,105 | 0,129 |
| 97305-076 | 0,097 | 0,093 |

Пример 17. Анализ ингибирования pNFkB человека

Антитело на основе кривой доза-эффект TL1A 10A4.F7.2E8 huIgG4 инкубировали с 0,5 мкг/мл TL1A человека (внутрилабораторного) в течение 15 мин при 37°C; 5% CO₂, с целью кровью человека, обработанной гепарином, в 96-луночных глубоководных планшетах. После стимуляции клетки лизировали/фиксировали, пермеабелизовали и окрашивали соответствующей панелью антител. Измерения осуществляли на проточном цитометре и анализ осуществляли с помощью аналитической компьютерной программы TreeStar's FlowJo. Значения EC50 рассчитывали с помощью компьютерной программы GraphPad Prism.

Таблица 14. Фосфо-NFkB, регулируемый TL1A, в цельной крови человека (2,45 мг/мл)

| 2,45 | | | |
|----------------|--------------|--------------|-----------------------|
| мг/мл | EC50 [нМ] | | |
| <u>эталон.</u> | <u>Донор</u> | <u>Донор</u> | <u>Тип клеток</u> |
| <u>ELN</u> | <u>A</u> | <u>B</u> | |
| A010F-003 | 2,64 | 2,94 | CD4+ Т-клетки |
| A010F-007 | 0,770 | 3,240 | CD4+ Т-клетки |
| | 0,850 | н./о. | CD8+ Т-клетки |
| | 0,830 | н./о. | CD3+CD4-CD8- Т-клетки |

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с TL1A человека (TNF-подобный лиганд 1 A) и содержит:

- a) переменный домен тяжелой цепи, содержащий
 - i) содержащую последовательность SEQ ID NO: 7;
 - ii) CDRH2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 8; и
 - iii) CDRH3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 9; и
- b) переменный домен легкой цепи, содержащий
 - i) CDRL1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 12;
 - ii) CDRL2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 13; и
 - iii) CDRL3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 14.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, который связывается с TL1A в эпитопе, содержащем остатки ¹⁰²TVVVRQTPTQHFKNQF¹¹⁶ (SEQ ID NO: 16) или ¹⁶⁶EIRQAGRPNKPDST¹⁸⁰ (SEQ ID NO: 17).

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, который связывается с TL1A в эпитопе, содержащем остатки ¹⁶⁹QAGR¹⁷² и остатки ¹¹³KNQF¹¹⁶.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, который связывается с TL1A в эпитопе, содержащем последовательность ¹⁶⁹QAGR¹⁷² или ¹¹³KNQF¹¹⁶.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, при этом антитело или фрагмент ингибируют связывание TL1A человека с DR3.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где антитело представляет собой химерное, гуманизированное или человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее тяжелую цепь, которая содержит вариабельный участок, по меньшей мере на 80% идентичный последовательности SEQ ID NO: 6, и легкую цепь, которая содержит вариабельный участок, по меньшей мере на 80% идентичный последовательности SEQ ID NO: 11.

8. Выделенное антитело по п.1, при этом антитело представляет собой:

(a) Fc-вариант IgG4 человека;

(b) Fc-вариант IgG1 человека или IgG3 человека или

(c) Fc-вариант IgG1 человека или IgG3 человека со сниженной или устраненной эффекторной функцией.

9. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельный участок тяжелой и легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из предшествующих пунктов.

10. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.9.

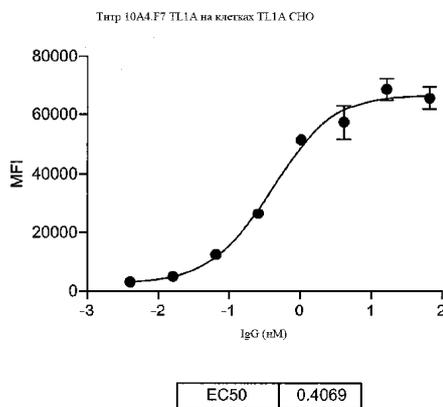
11. Клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии по п.10.

12. Способ получения антитела к TL1A или его антигенсвязывающего фрагмента, предусматривающий культивирование клетки-хозяина по п.11 в условиях, которые способствуют получению антитела или фрагмента, и очистку антитела из клетки.

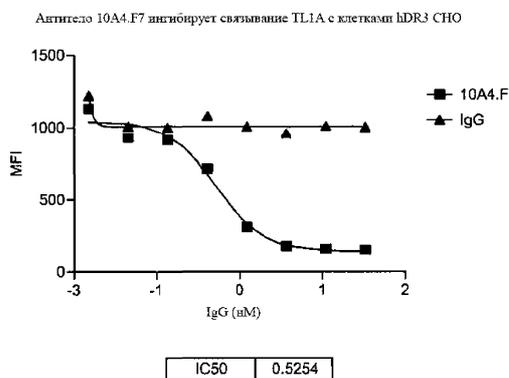
13. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Применение выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8 для изготовления фармацевтической композиции для лечения субъекта с воспалительным или иммунным заболеванием.

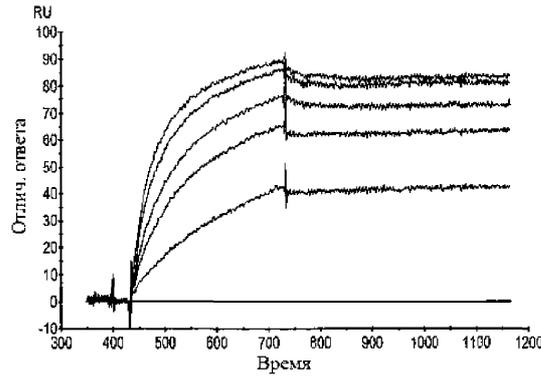
15. Применение по п.14, в котором воспалительное или иммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из аллергии/астмы, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, болезни Крона, воспалительного заболевания кишечника, системной красной волчанки (SLE), псориаза, сахарного диабета 1 типа и отторжения трансплантата.



Фиг. 1



Фиг. 2



Нu-TL1A-His (250, 200, 150, 100 и 50 н.) с 10A4.F7, захваченным на поверхности с G-белком

| mab | KD x 10 ⁻⁹ (M) | ka x 10 ⁴ (1/Me) | kd x 10 ⁻⁴ (1/c) |
|---------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 10A4.F7 | 0.38 | 7.50 | 0.29 |

Фиг. 3

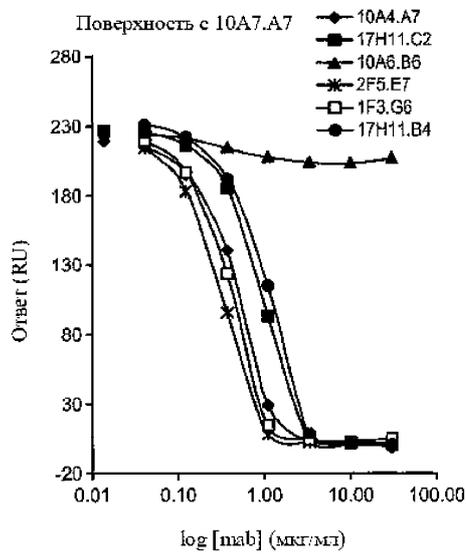
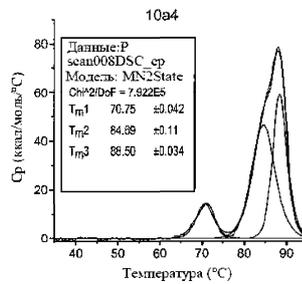


График зависимости log [ab] относительно ответа

Фиг. 4

DSC



| Образец | Tm1 | Tm2 | Tm3 |
|-------------|-------|-------|-------|
| 10A4.F7.2E8 | 70.75 | 84.69 | 88.50 |

Фиг. 5

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности капша-цепи TL1A.2-g4P

A I Q L T Q S P S S I S A S V
 1 GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA

 G D R V T I T C R A S Q G I S
 46 GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC

 S A L A W Y Q Q K P G K A P K
 91 AGT GCT TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG

 L L I Y D A S S L E S G V P S
 136 CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA

 R F S C S G S G T D F T L T I
 181 AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC

 S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
 226 AGC AGC CTG CAG OCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

 F N S Y P L T F G G G T K V E
 271 TTT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG

 I K R T V A A P S V F I F P P
 316 ATC AAA CGT ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA
 S D E Q L K S G T A S V V C L
 361 TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG

 L N N F Y P R E A K V Q W K V
 406 CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG

 D N A L Q S G N S Q E S V T E
 451 GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG

 Q D S K D S T Y S L S S T L T
 496 CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG

 L S K A D Y E K H K V Y A C E
 541 CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA

 V T H Q G L S S P V T K S F N
 586 GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC

 R G E C *
 631 AGG GGA GAG TGT TAG

Фиг. 6

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности тяжелой цепи TL1A.2-g4P

Q L Q L Q E S G P G L V K P S
 1 CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG

 E T L S L T C T V S G G S I S
 46 GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC

 S R S Y Y W G W I R Q P P G K
 91 AGT AGG AGT TAC TAC TGG GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

 G L E W I G S I Y Y N G R T Y
 136 GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TAT TAT AAT GGG AGA ACC TAC

 Y N P S L K S R V T I S V D T
 181 TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC GTA GAC ACG

 S K N Q F S L K L S S V T A A
 226 TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA

 D T A V Y Y C A R E D Y G D Y
 271 GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GAG GAC TAC GGT GAC TAC

 G A F D I W G Q G T M V T V S
 316 GGA GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT

 S A S T K G P S V F P L A P C
 361 TCA GCT AGC ACC AAG GGC CCA TCC GTC TTC CCC CTG GCG CCC TGC
 S R S T S E S T A A L G C L V
 406 TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC CTG GTC

 K D Y F P E P V T V S W N S G
 451 AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC

 A L T S G V H T F P A V L Q S
 496 GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC

 S G L Y S L S S V V T V P S S
 541 TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC

 S L G T K T Y T C N V D H K P
 586 AGC TTG GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC GTA GAT CAC AAG CCC

 S N T K V D K R V E S R Y G P
 631 AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT GAG TCC AAA TAT GGT CCC

 P C P P C P A P E F L G G P S
 676 CCA TGC CCA CCA TGC CCA GCA CCT GAG TTC CTG GGG GGA CCA TCA

 V F L F P P K P K D T L M I S
 721 GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC TCC

 R T P E V T C V V V D V S Q E
 766 CCG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA
 F L Y S R L T V D K S R W Q E
 1216 TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG

 G N V F S C S V M H E A L H N
 1261 GGG AAY GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC

 H Y T Q K S L S L S L G K *
 1306 CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA

Фиг. 7

039084

1490.2596.10A4.F7.2E8-VH1

```

1      Q L Q L Q E S G P G L V K P S E T
      CAG CTG CAC CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC

52     L S L T C T V S G G S I S CDR1 S R S Y
      CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC AGT AGG AGT TAC

103    Y W G W I R Q P P G K G L E W I G
      TAC TGG GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG AIT GGG

154    S I Y Y N G R T Y Y N P S L K S R
      AGT ATC TAT TAT AAT GGG AGA ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA

205    V T I S V D T S K N Q F S L K L S
      GTC ACC ATA TCC GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGS

256    S V T A A D T A V Y Y C A R CDR3 E D Y
      TCT CTG ACC GCC GCA GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GAG GAC TAC

307    G D Y G A F D I W G Q G T M V I V
      GGT GAC TAC GGA GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC

358    S S
      TCT TCA
  
```

Фиг. 8

1490.2596.10A4.F7.2E8-VH1

```

1      A I Q L T Q S P S S L S A S V G D
      GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

52     R V T I T C CDR1 A S Q G I S S A L A
      AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC

103    W Y Q Q K P G K A F K L L I Y CDR2 D A
      TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC

154    S S L E S G V P S R F S G S G S G
      TCC AGT TTG GAA AGT GGC GTC CCA TAC AGG TTC AGC GGC AGI GGA TCT GGG

205    T D F T L T I S S L Q P E D F A T
      ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC ACC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACC

256    Y Y C Q Q F N S Y P L T F G G G T
      TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG AAC

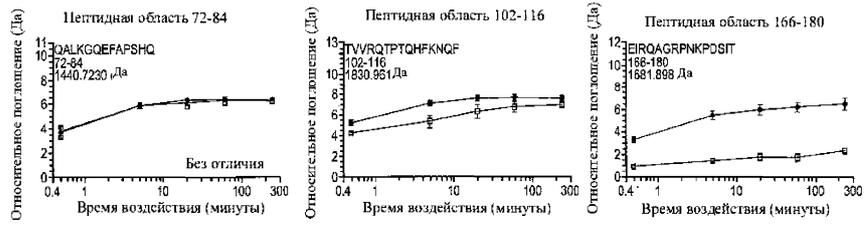
307    K V E I K
      AAG GTG GAG ATC AAA
  
```

Фиг. 9

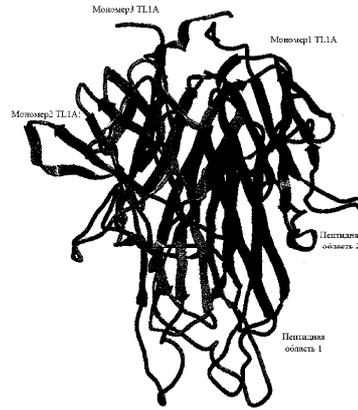
```

1      TSGSSHHHHH HSSGIEGRGS HMGDRMKQIE DKIEEILSKI
50     YHIENEIARI KKLIGERASQ LRAQGEACVQ FQALKGQEFA
90     PSHQQVYAPL RADGDKPRAH LTVVRQTPTQ HFKNQFPALH
130    WEHELGLAFT KNRMNNTYTKF LLIPESGDYF IYSQVTFRGM
170    TSECSEIRQA GRPNKPSIT VVITKVTDSY PEPTQLLMCT
210    KSVCEVGSNW FQPIYLGAMF SLQEGDKLMV NVSDISLVDY
250    TKEDKTFFGA FLL
  
```

Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

