



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.11

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890756

(22) Дата подачи заявки
2016.09.16

(54) АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮТСЯ С TL1A

(31) **62/220,442**

(32) **2015.09.18**

(33) **US**

(43) **2018.08.31**

(86) **PCT/US2016/052040**

(87) **WO 2017/049024 2017.03.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕФАЛОН ЛЛС (US)

(72) Изобретатель:
**Пултон Линн Дороти, Поллард
Мэтью, Дойл Энтони Дж., Кукси
Бриджит Энн, Пэнд Ваня, Кларк Адам
Уильям (AU)**

(74) Представитель:
Купцова М.В., Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A1-2013044298
RAJPAL A. ET AL.: "A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 102, № 24, 1 June 2005 (2005-06-01), p. 8466-8471, XP002347095, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0503543102, p. 8466

DAUGHERTY P.S. ET AL.: "Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF

SCIENCES, US, vol. 97, № 5, 29 February 2000 (2000-02-29), p. 2029-2034, XP002413824, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.030527597, p. 2029
STEIDL S. ET AL.: "In vitro affinity maturation of human GM-CSF antibodies by targeted CDR-diversification", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 46, № 1, 1 November 2008 (2008-11-01), p. 135-144, XP025472134, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2008.07.013 [retrieved on 2008-08-21], p. 15

YANG W-P ET AL.: "CDR WALKING MUTAGENESIS FOR THE AFFINITY MATURATION OF A POTENT HUMAN ANTI-HIV-1 ANTIBODY INTO THE PICOMOLAR RANGE", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 254, 1 January 1995 (1995-01-01), p. 392-403, XP000199739, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1006/JMBI.1995.0626, p. 392

Holger E. Thie: "Affinity maturation by random mutagenesis and phage display", in: "Antibody Engineering Vol. 1", 1 January 2010 (2010-01-01), Springer, Berlin, Heidelberg, DE, XP55310998, vol. 1, p. 397-409, 397

KI-HWAN CHANG ET AL.: "Affinity Maturation of an Epidermal Growth Factor Receptor Targeting Human Monoclonal Antibody ER414 by CDR Mutation", IMMUNE NETWORK, vol. 12, № 4, 1 January 2012 (2012-01-01), p. 155, XP55192051, ISSN: 1598-2629, DOI: 10.4110/in.2012.12.4.155, p. 155

WO-A1-2014160883

(57) Предложены рекомбинантно экспрессируемые варианты антител, которые обладают повышенной аффинностью к TL1A и повышенной активностью относительно исходного антитела, из которого они были получены. Указанные антитела ингибируют взаимодействие между TL1A и рецептором смерти 3 (DR3). Указанные антитела или их композиции могут применяться для лечения одного или более из следующих заболеваний: астмы, ХОБЛ, легочного фиброза, кистозного фиброза, воспалительного заболевания кишечника, заболевания желудочно-кишечного тракта, связанного с кистозным фиброзом, болезни Крона, колита, язвенного колита, синдрома раздраженного кишечника, эозинофильного эзофагита, атопического дерматита, экземы, склеродермии, артрита или ревматоидного артрита.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/220442, поданной 18 сентября 2015 г., содержание которой включено в данное описание посредством ссылки в полном объеме и для всех целей.

Перечень последовательностей

Данная заявка включает перечень последовательностей, представленный в электронном виде в виде текстового файла с именем TL1A_ST25, созданного 18 сентября 2015 г. и размером 89000 байт. Перечень последовательностей включен в данный документ посредством ссылки.

Область техники

Данное раскрытие относится в целом к области конструирования антител. Более конкретно, данное раскрытие относится к вариантам антител, которые специфически связываются с TL1A и которые ингибируют взаимодействие между TL1A и рецептором смерти 3 (DR3). В некоторых аспектах антитела также ингибируют взаимодействие между TL1A и рецептором-приманкой 3 (DcR3). Антитела обладают улучшенной активностью по сравнению с исходным антителом, из которого были получены варианты.

Уровень техники

Различные публикации, включая патенты, опубликованные заявки, номера доступа, технические статьи и научные статьи приводятся в описании. Каждая из этих цитируемых публикаций включена в качестве ссылки в полном объеме и для всех целей в этом документе.

ФНО-подобный лиганд 1A (TL1A, син. 15 член суперсемейства ФНО (TNFSF15); TL1 и VEGI) является членом надсемейства фактора некроза опухолей, который экспрессируется антиген-презентирующими клетками (включая дендритные клетки, В-клетки и макрофаги), CD4+ и CD8+ Т-клетками и эндотелиальными клетками. TL1A может быть экспрессирован на поверхности клетки или секретирован как растворимый цитокин. Рецептор для TL1A, рецептор смерти 3 (DR3) экспрессируется различными клетками, включая CD4+ и CD8+ Т-клетки, NK-клетки, NKT-клетки и FOXP3+ регуляторные Т-клетки (Treg) и врожденные лимфоидные клетки 2 типа и 3 типа (ILC2 и ILC3).

TL1A также может связывать рецептор-приманку (DcR3), который является конкурентным ингибитором DR3. DcR3 также действует как рецептор-приманка для Fas-лиганда (Fas-L) и лимфотоксин-подобного индуцибельного белка, который конкурирует с гликопротеином D за связывание медиатора проникновения вируса герпеса на Т-клетках (LIGHT - лимфотоксин-подобный индуцибельный белок). Соответственно DcR3 является важным регулятором нескольких путей сигналинга.

Путь сигналинга TL1A/DR3 был вовлечен в несколько биологических систем, которые связаны с заболеваниями человека. Например, было показано, что TL1A играет роль в иммунитете, ангиогенезе и гомеостазе барьерных тканей. Было показано, что ингибирование взаимодействия TL1A с DR3 способствует терапевтическому эффекту в нескольких иммуноопосредованных патологических состояниях, таких как экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ, модель рассеянного склероза), колит, язвенный колит, болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника, заболевание кожи, астма и артрит.

Соответственно соединения, которые ингибируют активность TL1A, пригодны, например, для их терапевтического, профилактического, диагностического и прогностического применения.

Краткое описание сущности изобретения

В данном описании предложено рекомбинантное антитело, содержащее CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, при условии, что если варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, варибельная область легкой цепи не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых аспектах антитело содержит CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых аспектах антитело содержит CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых аспектах антитело содержит CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых аспектах антитело содержит CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую

кислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

Такие рекомбинантные антитела предпочтительно являются полноразмерными и предпочтительно являются моноклональными. Такие рекомбинантные антитела связываются с TL1A с повышенной аффинностью относительно антитела, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Такие рекомбинантные антитела обладают повышенной активностью по сравнению с антителом, имеющим переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 10 раз выше активности антитела, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 12 раз выше активности антитела, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 13 раз выше активности антитела, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 15 раз выше активности антитела, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 20 раз выше активности антитела, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 25 раз выше активности антитела, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 27 раз выше активности антитела, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 40 раз выше активности антитела, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Кратность повышения активности можно определять в соответствии с анализом TL1A-индуцированной каспазной активности в клетках TF-1.

Такие рекомбинантные антитела могут содержать константную область тяжелой цепи IgG1 человека, константную область тяжелой цепи IgG2 человека или константную область тяжелой цепи IgG4 человека или любые их аллотипы. Константная область тяжелой цепи IgG1 человека может содержать SEQ ID NO: 42, или SEQ ID NO: 43 (Δ K IgG1 человека), или SEQ ID NO: 44 (IgG1 человека с YTE), или SEQ ID NO: 64 (IgG1 человека с YTE и Δ K), или SEQ ID NO: 63 (IgG1 человека с L234A, L235A, G237A), или SEQ ID NO: 62 (IgG1 человека с L234A, L235A, G237A и Δ K), или SEQ ID NO: 65 (IgG1 человека с L235A и G237A), или SEQ ID NO: 66 (IgG1 человека с L235A, G237A и Δ K). Константная область тяжелой цепи IgG2 человека может содержать SEQ ID NO: 67, или SEQ ID NO: 70 (Δ K IgG2 человека), или SEQ ID NO: 71 (IgG2 человека с A330S, P331S), или SEQ ID NO: 68 (IgG2 человека с A330S, P331S и Δ K). Константная область IgG4 тяжелой цепи IgG4 человека может содержать SEQ ID NO: 45 или SEQ ID NO: 46 (IgG4 человека с S228P и Δ K), или SEQ ID NO: 47 (IgG4 человека с S228P и YTE), или SEQ ID NO: 69 (IgG4 человека с S228P, YTE и Δ K). Понятно, что тяжелую цепь IgG4 можно использовать без стабилизирующей замены S228P (например, IgG4 только с YTE или IgG4 с YTE и Δ K или IgG4 только с Δ K).

Рекомбинантные антитела могут содержать константную область легкой цепи лямбда человека или ее аллотип. Константная область легкой цепи лямбда человека может содержать SEQ ID NO: 48.

Такие рекомбинантные антитела связываются с TL1A человека и могут связываться с TL1A приматов, отличных от человека, или TL1A млекопитающего, отличного от человека, такого как мышь, крыса, морская свинка, кошка, собака, кролик или свинья.

Такие рекомбинантные антитела могут быть использованы в способе лечения заболевания дыхательных путей, способе лечения заболевания желудочно-кишечного тракта, способе лечения заболевания кожи или способе лечения артрита, или могут быть использованы для лечения заболевания дыхательных путей, заболевания желудочно-кишечного тракта, заболевания кожи или артрита, или могут быть использованы для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания дыхательных путей, заболевания желудочно-кишечного тракта, заболевания кожи или артрита. Заболевание дыхательных путей может включать одно или более из астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), ле-

гочного фиброза, саркоидоза легких, аллергического ринита или кистозного фиброза. Заболевание желудочно-кишечного тракта может включать одно или более из воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, колита, язвенного колита, эозинофильного эзофагита или синдрома раздраженного кишечника, или заболевания, или патологического состояния желудочно-кишечного тракта, связанного с кистозным фиброзом. Артрит может включать ревматоидный артрит. Заболевание кожи может включать одно или более из атопического дерматита, экземы и склеродермии.

Людей, приматов, отличных от человека, или млекопитающих, отличных от человека, нуждающихся в таких методах лечения, можно лечить с помощью антител или композиции, содержащей антитела, например, путем введения антител или их композиции субъекту. Введение может быть парентеральным, например подкожным и/или внутривенным.

Такие рекомбинантные антитела могут быть использованы в способе выявления TL1A на поверхности моноклеарных клеток периферической крови (МКПК). Способы включают приведение в контакт антитела, которое связывается с TL1A, как описано или приведено в данном документе в качестве примера, с МКПК, полученными от субъекта, и выявлением антитела, связанного с TL1A, на поверхности МКПК. Способы могут дополнительно включать количественное определение уровня TL1A на МКПК. Способы могут дополнительно включать получение МКПК от субъекта.

Такие рекомбинантные антитела могут быть использованы в способе выявления TL1A в сыворотке крови. Способы включают приведение в контакт антитела, которое связывается с TL1A, как описано или приведено в данном документе в качестве примера, с сывороткой крови, полученной от субъекта, и выявлением антитела, связанного с TL1A, в сыворотке. Способы могут дополнительно включать количественное определение уровня TL1A в сыворотке крови. Способы могут дополнительно включать получение сыворотки из крови, полученной от субъекта. Способы могут дополнительно включать получение крови от субъекта.

Предложены полинуклеотиды, кодирующие одну или более переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи таких антител. Полинуклеотиды могут дополнительно кодировать константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи.

В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, например последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 58. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, например последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 50. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 59. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, например последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 54. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, например последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 55. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, например последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 56. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, например последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 57.

В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, например последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 49. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 52. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, например последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 53. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, например последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 54. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 7, например последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 55. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую варируемую область легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, например последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 56.

Предложены векторы, содержащие один или более таких полинуклеотидов. Предложены клетки, трансформированные одним или более такими полинуклеотидами или такими векторами. Трансформированные клетки могут принадлежать млекопитающим и предпочтительно являются клетками-хозяевами экспрессии млекопитающих, такими как клетки CHO, клетки NSO или клетки HEK293.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показаны положения и идентичности каждой из одиночных аминокислотных замен, сделанных в областях CDR1 или CDR2, или к выбранным аминокислотным остаткам, смежным с CDR2 варируемой области тяжелой цепи исходного антитела (320-179). Заключенные в рамки области представляют собой CDR в соответствии с системой нумерации AbM.

На фиг. 2 показаны положения и идентичности каждой из отдельных аминокислотных замен, сделанных в областях CDR1 или CDR3 варируемой области легкой цепи исходного антитела (320-179). Заключенные в рамки области представляют собой CDR в соответствии с системой нумерации AbM.

На фиг. 3 показано выравнивание тяжелых цепей вариантов антитела против TL1A.

На фиг. 4 показано выравнивание легких цепей вариантов анти-TL1A-связывающего антитела.

На фиг. 5 показано сравнение фазы диссоциации TL1A вариантов антител против TL1A, измеренных с помощью SPR (поверхностный плазмонный резонанс).

На фиг. 6 показаны результаты анализа активности каспазы клеток TF-1 с вариантами антител против TL1A.

На фиг. 7 показаны результаты анализов активности каспазы клеток TF-1 с использованием различных антител против TL1A по сравнению с исходным антителом 320-179.

На фиг. 8 показано, что антитело 320-587 обладает превосходной активностью TL1A в анализе активности каспазы TF-1 по сравнению с другими известными антителами против TL1A в нескольких разных экспериментах.

На фиг. 9 показаны различные антитела против TL1A, которые ингибируют связывание TL1A с DR3 по сравнению с изотипическим контролем, как измерено в формате ИФА.

На фиг. 10 показано, что исходное антитело 320-179 не ингибирует связывание TL1A с DcR3, тогда как варианты антител против TL1A ингибируют взаимодействие TL1A-DcR3.

На фиг. 11 показано, что антитело 320-587 перекрестно реагирует и связывается с TL1A разных видов; указанное антитело связывается с TL1A всех испытываемых видов.

На фиг. 12A-12D показаны результаты введения антитела 320-587 в TNBS-индуцированной модели колита (TNBS - тринитробензолсульфоновая кислота) крыс, демонстрирующей, что антитело значительно облегчает симптомы колита.

На фиг. 13 показано, что антитело 320-587 выявляет TL1A человека, выделяющееся из человеческих МКПК, стимулированных иммунными комплексами, в ИФА.

На фиг. 14 показано, что антитело 320-587 выявляет популяцию человеческих МКПК, которые экспрессируют мембранные TL1A на их поверхности, в анализе методом проточной цитометрии.

На фиг. 15 показано, что у крыс, имеющих острую OVA-индуцированную астму (OVA-овальбумин), получавших лечение антителом 320-587, значительно снижался уровень эозинофилов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ).

На фиг. 16A-16D показано, что у морских свинок с острой OVA-индуцированной астмой, которую лечили при помощи антитела 320-587, имелись улучшения по эозинофилам в ЖБАЛ (фиг. 16A), макрофагам в ЖБАЛ (фиг. 16B), гиперреактивности верхних дыхательных путей после ранней астматической реакции (фиг. 16C), и выраженности ранней астматической реакции (фиг. 16D).

На фиг. 17A-17E показано, что у крыс с хронической OVA-индуцированной астмой, которую лечили при помощи антитела 320-587, имелись улучшения по эозинофилам в ЖБАЛ (фиг. 17A), макрофагам в ЖБАЛ (фиг. 17B), ИЛ-13 в ЖБАЛ (фиг. 17C), гиперплазии бокаловидных клеток, оцениваемой при помощи ШИК-реакции (фиг. 17D), и утолщению слизистой оболочки, оцениваемому на срезах, окрашенных H&E (гематоксилин и эозин) (фиг. 17E).

На фиг. 18 показана доза овальбумина, необходимая для удвоения обструкции дыхательных путей.

На фиг. 19 показано, что у крыс с TNBS-индуцированным колитом, который лечили при помощи антитела 320-587, имелось положительное влияние на фиброз в области изъязвлений.

На фиг. 20A-20E показано сравнение крыс с TNBS-индуцированным колитом с DNBS-индуцированным колитом (DNBS - динитробензолсульфоновая кислота), которых лечили при помощи антитела 320-587, и проявления эффекта на 7 и 14 сутки на отношении масса/длина толстой кишки (фиг. 20A), фиброз толстой кишки (фиг. 20B), инфильтрат толстой кишки (фиг. 20C) и повреждение толстой кишки (фиг. 20D). На фиг. 20E показаны репрезентативные срезы области изъязвлений на 7 и 14 сутки.

На фиг. 21A-21C показано, что у крыс с DSS-индуцированным колитом, который лечили при помощи антитела 320-587, имелись улучшения по изменению массы во время введения DSS (фиг. 21A),

клиническим показателям во время введения DSS (фиг. 21B) и отношению масса/длина толстой кишки (фиг. 21C).

На фиг. 22 показаны изменения уровня TL1A-индуцированных внутрибрюшинных цитокинов в ответ на лечение 320-587.

Подробное описание сущности изобретения

Различные термины, относящиеся к аспектам раскрытия, используются в описании и формуле изобретения. Такие термины должны иметь свое обычное значение в данной области техники, если не указано иное. Другие конкретно определенные термины должны толковаться в соответствии с определением, представленным в данном документе.

В некоторых случаях термины "субъект" и "пациент" используются в данном документе взаимозаменяемо и включают любое животное. Предпочтительными являются млекопитающие, в том числе компаньоны (например, кошка, собака) и сельскохозяйственные виды млекопитающих (например, свиньи, лошади, коровы), а также грызуны, включая мышей, кроликов и крыс, морских свинок и других грызунов. Приматы, отличные от человека, такие как яванские макаки, более предпочтительны и люди наиболее предпочтительны.

Молекула, такая как антитело, была "выделена", если она была изменена и/или удалена из ее естественной среды рукой человека.

Как используется в данном документе, формы единственного числа включают формы множественного числа, если прямо не указано иное.

"Специфичность" в контексте взаимодействий антитело-антиген необязательно является абсолютным определением, но может представлять собой относительный термин, означающий степень селективности антитела к антиген-положительной клетке по сравнению с антиген-отрицательной клеткой. Специфичность антитела для антиген-положительной клетки опосредуется вариabельными областями антитела и обычно определяющими комплементарность областями (CDR) антитела. Конструкция может иметь от 100 до 1000-кратной специфичности для антиген-положительных клеток по сравнению с антиген-отрицательными клетками.

Используемый в данном документе термин "рекомбинантный" включает экспрессию генов, полученных при помощи генной инженерии или иным образом путем лабораторных манипуляций.

В раскрытии представлены варианты антител против TL1A, содержащие рекомбинантно измененную вариabельную область тяжелой и/или легкой цепи антитела 320-179, таким образом, что варианты антител специфически связываются с TL1A. Эти варианты антител 320-179 ингибируют способность TL1A взаимодействовать с DR3 и в некоторых аспектах также с DcR3 и, кроме того, ингибируют сигналинг, вызванный взаимодействием TL1A с DR3. Эти антитела обладают повышенной эффективностью по сравнению с антителом 320-179. Эти антитела обладают повышенной аффинностью к TL1A по сравнению с антителом 320-179.

Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 10 раз выше активности антитела, имеющего вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 12 раз выше активности антитела, имеющего вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 13 раз выше активности антитела, имеющего вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 15 раз выше активности антитела, имеющего вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 20 раз выше активности антитела, имеющего вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 25 раз выше активности антитела, имеющего вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 27 раз выше активности антитела, имеющего вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Повышенная активность может быть по меньшей мере примерно в 40 раз выше активности антитела, имеющего вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Кратность повышения активности можно определить, например, путем измерения высвобождения каспазы в TL1A-индуцированном апоптозе в анализе клеток TF-1.

Варианты антител 320-179 специфически связываются с TL1A. Антитела связываются с TL1A человека и могут связываться с одной или более из TL1A яванского макака, TL1A мыши, TL1A крысы, TL1A морской свинки, TL1A кошки, TL1A собаки, TL1A свиньи или TL1A кролика. В некоторых аспектах антитела могут связываться с TL1A нескольких разных видов, например, если эпитоп является общим. В некоторых аспектах TL1A человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, или SEQ ID NO: 33. В некоторых аспектах TL1A яванского макака содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34. В некоторых аспектах TL1A мыши содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35. В некоторых аспектах TL1A крысы содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36. В некоторых аспектах TL1A морской свинки содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых аспектах TL1A кошки содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38. В некоторых аспектах TL1A свиньи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых аспектах TL1A кролика содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. В некоторых аспектах TL1A собаки содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

Варианты антител 320-179 имеют аффинность связывания для эпитопа на TL1A, которая включает равновесную константу диссоциации (K_D), которая может быть измерена при помощи анализа кинетического исключения, такого как анализ KINEXA® (Sapidyne Instruments Inc., Бойсе, Айдахо).

K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, предпочтительно составляет менее чем около 1000 пМ. В некоторых аспектах K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, составляет менее чем около 500 пМ, или менее чем около 400 пМ, или менее чем около 300 пМ, или менее чем около 200 пМ. В некоторых предпочтительных аспектах K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, составляет менее чем около 100 пМ.

K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, может составлять от около 10 пМ до около 100 пМ. K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, может составлять от около 25 пМ до около 75 пМ. K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, может составлять от около 30 пМ до около 60 пМ. K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, может составлять от около 30 пМ до около 50 пМ. K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, может составлять от около 35 пМ до около 50 пМ. K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, может составлять от около 36 пМ до около 46 пМ. K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, может составлять от около 38 пМ до около 44 пМ. K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, может составлять от около 39 пМ до около 43 пМ. K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, может составлять от около 40 пМ до около 45 пМ. K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, может составлять от около 35 пМ до около 42 пМ. K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, может составлять около 40 пМ. K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, может составлять около 41 пМ. K_D для связывания TL1A, определенная при помощи анализа кинетического исключения, может составлять около 42 пМ. Анализ кинетического исключения может использовать молекулу антитела или молекулу TL1A в качестве константного партнера по связыванию, а другую молекулу в качестве титранта.

Варианты антител против TL1A 320-179 предпочтительно способны связываться с TL1A-положительными клетками. Антитело может связываться с TL1A-положительной клеткой со значением $ЭК_{50}$ менее чем около 100 нМ. Антитело может связываться с TL1A-положительной клеткой со значением $ЭК_{50}$ менее чем около 75 нМ. Антитело может связываться с TL1A-положительной клеткой со значением $ЭК_{50}$ менее чем около 50 нМ. Антитело может связываться с TL1A-положительной клеткой со значением $ЭК_{50}$ менее чем около 30 нМ. Антитело может связываться с TL1A-положительной клеткой со значением $ЭК_{50}$ менее чем около 25 нМ. Антитело может связываться с TL1A-положительной клеткой со значением $ЭК_{50}$ менее чем около 20 нМ. Антитело может связываться с TL1A-положительной клеткой со значением $ЭК_{50}$ менее чем около 18 нМ. Антитело может связываться с TL1A-положительной клеткой со значением $ЭК_{50}$ менее чем около 15 нМ. Антитело может связываться с TL1A-положительной клеткой со значением $ЭК_{50}$ менее чем около 13 нМ. Антитело может связываться с TL1A-положительной клеткой со значением $ЭК_{50}$ менее чем около 10 нМ.

Варианты антитела 320-179 предпочтительно являются моноклональными и более предпочтительно представляют собой полноразмерные антитела, содержащие две тяжелые цепи и две легкие цепи. В некоторых аспектах антитела содержат производные, или фрагменты, или части антител, которые сохраняют антигенсвязывающую специфичность, а также предпочтительно сохраняют в большей степени или всю аффинность молекулы исходного антитела 320-179 (например, для TL1A). Например, производные могут содержать по меньшей мере одну переменную область (варибельная область тяжелой цепи или легкой цепи). Другие примеры подходящих производных и фрагментов антител включают без ограниче-

ния антитела с полиэпитопной специфичностью, биспецифические антитела, мультиспецифические антитела, диатела, одноцепочечные молекулы, а также молекулы FAb, F(Ab')₂, Fd, Fabc и Fv, одноцепочечные (Sc) антитела, одноцепочечные Fv-антитела (scFv), отдельные легкие цепи антител, отдельные тяжелые цепи антител, слияния между цепями антител и другими молекулами, мономеры или димеры тяжелой цепи, мономеры или димеры легкой цепи, димеры, состоящие из одной тяжелой и одной легкой цепи, и других мультимеров. Одноцепочечные Fv-антитела могут быть мультивалентными. Все изотипы антител могут быть использованы для получения производных, фрагментов и частей антител. Производные, фрагменты и/или части антитела могут быть рекомбинантно продуцированы и экспрессированы любым типом клеток, прокариотическим или эукариотическим.

В полном размере антитела каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в данном документе как HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначенной как LCVR или VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL можно далее подразделить на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарными областями (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца до C-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Как правило, антигенсвязывающие свойства антитела с меньшей вероятностью могут нарушаться изменениями в последовательностях FR, а не изменениями последовательностей CDR. Молекулы иммуноглобулина могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса.

Варианты антител 320-179 являются полностью человеческими. Полностью человеческие антитела представляют собой те, в которых вся молекула является человеческой или иначе имеет человеческое происхождение, или содержит аминокислотную последовательность, идентичную человеческой форме антитела. Полностью человеческие антитела включают антитела, полученные из библиотеки V-генов человека, например, где рекомбинантно экспрессируются человеческие гены, кодирующие переменные области антител. Полностью человеческие антитела могут экспрессироваться в других организмах (например, мышцах и технологии XenoMouse) или клетках других организмов, трансформированных генами, кодирующими человеческие антитела. Полностью человеческие антитела могут тем не менее содержать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими последовательностями, например мутации, введенные при помощи случайных или сайт-направленных мутаций.

В некоторых аспектах варианты антител 320-179 могут содержать белковые каркасы, происходящие не из иммуноглобулина. Например, можно сделать ссылку на (Ku & Schutz, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92:6552-6556), который описывает белок в виде четырехспирального пучка цитохрома b562, имеющего две петли, расположенные в случайном порядке для создания CDR, которые были выбраны для связывания антигена.

Варианты антител 320-179 могут содержать посттрансляционные модификации или фрагменты, которые могут влиять на активность или стабильность антител. Эти модификации или фрагменты включают без ограничения метилированные, ацетилированные, гликозилированные, сульфатированные, фосфорилированные, карбоксилированные и амидированные фрагменты и другие фрагменты, которые хорошо известны в данной области техники. Фрагменты включают любую химическую группу или комбинации групп, обычно встречающихся в молекулах иммуноглобулина в природе или иным образом добавленных к антителам при помощи рекомбинантных систем экспрессии, включая прокариотические и эукариотические системы экспрессии.

Примеры модификаций боковой цепи, рассматриваемых в описании, включают модификации аминокислотных групп, таких как восстановительное алкилирование реакцией с альдегидом с последующим восстановлением с помощью NaBH₄; амидирование метилацетимидатом; ацилирование ангидридом уксусной кислоты; карбамоилирование аминокислотных групп цианатом; тринитробензилирование аминокислотных групп 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS); ацилирование аминокислотных групп янтарным ангидридом и тетрагидрофталевым ангидридом; и пиридоксильное лизина пиридоксаль-5-фосфатом с последующим восстановлением с помощью NaBH₄.

Гуанидиновая группа остатков аргинина может быть модифицирована путем образования продуктов гетероциклической конденсации с реагентами, такими как 2,3-бутандион, фенилглиоксаль и глиоксаль. Карбоксильная группа может быть модифицирована активированием карбодиимидом посредством образования O-ацелизомочевины с последующим образованием производного, например, соответствующего амида. Сульфидрильные группы могут быть модифицированы такими способами, как карбоксиметилирование с помощью иодуксусной кислоты или иодацетамида; окисление надмуравьиной кислоты до цистеиновой кислоты; образование смешанных дисульфидов с другими тиольными соединениями; реакция с малеимидом, малеиновым ангидридом или другим замещенным малеимидом; образование производных соединения ртути с использованием 4-хлорртутьбензоата, 4-хлорртутьфенилсульфоновой кислоты, хлорида фенилртути, 2-хлорртуть-4-нитрофенола и других соединений ртути; карбамоилирование с

цианатом при щелочном pH. Остатки триптофана могут быть модифицированы, например, окислением N-бромсукцинимидом или алкилированием индольного кольца 2-гидрокси-5-нитробензилбромидом или сульфенилгалогенидами. С другой стороны, остатки тирозина могут быть изменены путем нитрования тетранитрометаном с образованием производного 3-нитротирозина. Модификацию имидазольного кольца гистидинового остатка можно осуществить путем алкилирования производными иодуксусной кислоты или N-карбэтоксилированием диэтилпирокарбонатом.

Варианты антител 320-179 могут включать модификации, которые модулируют время полужизни и биораспределение в сыворотке крови, включая без ограничения модификации, которые модулируют взаимодействие антитела с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), рецептором, который играет ключевую роль в защите IgG от катаболизма и поддержании высокой концентрации антител в сыворотке. Модификации, модулирующие время полужизни в сыворотке крови, могут происходить в Fc-области IgG1, IgG2 или IgG4, включая тройную замену M252Y/S254T/T256E (замены "YTE" с нумерацией в соответствии с системой нумерации ЕС (Edelman, G.M. et al. (1969), Proc. Natl. Acad., USA, 63, 78-85)), как описано в патенте США № 7083784. Другие замены могут происходить в положениях 250 и 428, см., например, патент США № 1211191, а также в положениях 307, 380 и 434, см., например, публикацию PCT № WO 00/042072. Примеры аминокислотных замен константной области, которые модулируют связывание с Fc-рецепторами и последующей функцией, опосредованной этими рецепторами, включая связывание FcRn и время полужизни в сыворотке крови, описаны в публикации США № 2009/0142340, 2009/0068175 и 2009/0092599. Антитела любого класса могут иметь C-концевой лизин тяжелой цепи, опущенный или удаленный для уменьшения гетерогенности (ΔK). Замена S228P (нумерация ЕС) в IgG4 человека может стабилизировать обмен Fab-фрагментами антитела *in vivo* (Labrin et al. (2009), Nature Biotechnology, 27:8, 767-773), и эта замена может присутствовать одновременно с модификациями YTE и/или ΔK.

Варианты антител 320-179 содержат константные домены человека. Константные домены тяжелой цепи предпочтительно представляют собой константные домены IgG1, IgG2 или IgG4 человека. Константные домены легкой цепи предпочтительно представляют собой константные домены лямбда человека. Подходящий домен лямбда человека содержит SEQ ID NO: 48.

Константные области тяжелой цепи IgG1 человека, которые могут использоваться с вариантами антител 320-179, могут быть выбраны из IgG1 человека (SEQ ID NO: 42), IgG1 человека (ΔK) (SEQ ID NO: 43), IgG1 человека 252Y/254T/256E (SEQ ID NO: 44), IgG1 человека 252Y/254T/256E (ΔK) (SEQ ID NO: 64), IgG1 человека L234A/L235A/G237A (SEQ ID NO: 63), IgG1 человека L234A/L235A/G237A (ΔK) (SEQ ID NO: 62), IgG1 человека L235A/G237A (SEQ ID NO: 65) и IgG1 человека L235A/G237A (ΔK) (SEQ ID NO: 66). Константные области тяжелой цепи IgG2 человека, которые могут быть использованы с вариантами антител 320-119, могут быть выбраны из IgG2 человека с или без ΔK (SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 70) и IgG2 человека A330S/P331S с или без (ΔK) (SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 68). Константные области тяжелой цепи IgG4 человека, которые могут быть использованы с вариантами антител 320-179, могут быть выбраны из IgG4 человека S228P (SEQ ID NO: 45), IgG4 человека S228P (ΔK) (SEQ ID NO: 46), IgG4 человека 228P/252Y/254T/256E (SEQ ID NO: 47) и IgG4 человека 228P/252Y/254T/256E (ΔK) (SEQ ID NO: 69).

Варианты антител 320-179 могут быть помечены, связаны или конъюгированы с любыми химическими или биомолекулярными фрагментами. Меченые антитела могут найти применение в терапевтических, диагностических или фундаментальных исследованиях. Такие метки/конъюгаты могут быть обнаруживаемыми, например флуорохромы, электрохемилюминесцентные зонды, квантовые точки, радиоактивные метки, ферменты, флуоресцентные белки, люминесцентные белки и биотин. Метки/конъюгаты могут быть химиотерапевтическими агентами, токсинами, изотопами и другими агентами, используемыми для лечения таких патологических состояний, например уничтожения раковых клеток. Химиотерапевтические агенты могут быть любыми, которые пригодны для целей, для которых используется антитело.

Антитела могут быть дериватизированы известными защищающими/блокирующими группами для предотвращения протеолитического расщепления или повышения активности или стабильности.

Полинуклеотидные последовательности, которые кодируют антитела и их субдомены (например, FR и CDR), представлены в описании. Полинуклеотиды включают, но не ограничиваются ими, РНК, ДНК, кДНК, гибриды РНК и ДНК и одно-, двух- или трехцепочечные цепи РНК, ДНК или их гибридов. Полинуклеотиды могут содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариabельную область тяжелой цепи, и/или вариabельную область легкой цепи варианта антитела 320-179, как описано или приведено в данном документе в качестве примера. Комплементарные цепи полинуклеотидных последовательностей также входят в объем раскрытия.

Полинуклеотид может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариabельную область тяжелой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. Полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 51.

прекращение транскрипции и трансляции.

Векторы экспрессии, особенно векторы экспрессии для млекопитающих, могут содержать один или более нетранскрибируемых элементов, таких как точка начала репликации, подходящий промотор и энхансер, связанный с экспрессируемым геном, другие 5'- или 3'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, 5'- или 3'-нетранслируемые последовательности (такие как необходимые сайты связывания рибосом), сайт полиаденилирования, участок донора и акцептора сплайсинга или последовательности терминации транскрипции. Также может быть включена точка начала репликации, которая дает возможность реплицировать в конкретном хозяине.

Векторы могут быть использованы для трансформации любого из широкого набора клеток-хозяев, хорошо известных специалистам в данной области техники, и предпочтительно клеток-хозяев, способных экспрессировать антитела. Векторы включают без ограничения плазмиды, фагемиды, космиды, бактериальные искусственные хромосомы (BAC), дрожжевые искусственные хромосомы (YAC) и бакуловирус, а также другие бактериальные, эукариотические, дрожжевые и вирусные векторы. Подходящие клетки-хозяева включают без ограничения клетки CHO, клетки NS0, клетки HEK293 или любую известную или продуцируемую эукариотическую клеточную линию, а также включают бактерии, дрожжи и клетки насекомых.

Антитела также могут быть получены клетками гибридомы; способы получения гибридом хорошо известны и разработаны в данной области техники.

В раскрытии также представлены композиции, содержащие варианты антител 320-179. Композиции могут содержать любое из антител, описанное и/или проиллюстрированное в данном документе примерами, и приемлемого носителя, такого как фармацевтически приемлемый носитель. Подходящие носители включают любые среды, которые не влияют на биологическую активность антитела и предпочтительно не токсичны для хозяина, которому он вводится. Композиции могут быть составлены для введения субъекту в любой подходящей лекарственной форме.

Варианты антител 320-179 могут быть использованы для лечения заболеваний дыхательных путей, заболевания желудочно-кишечного тракта, артрита или заболевания кожи у субъекта. Таким образом, раскрытие включает методы лечения. В общем способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении заболевания дыхательных путей, заболевания желудочно-кишечного тракта, артрита или заболевания кожи, так что заболевание респираторных путей, заболевание желудочно-кишечного тракта, артрит или заболевание кожи лечится. Вариант антитела 320-179 может содержать любое антитело, описанное или приведенное в данном документе в качестве примера. Введение может включать подкожное введение антитела. Введение может включать внутривенное введение антитела. Субъект предпочтительно является человеком. Субъект может быть приматом, отличным от человека, таким как яванский макак, или может быть млекопитающим, таким как мышь, крыса, морская свинья, кошка, свинья, кролик или собака.

В тех аспектах, при которых необходимо лечить заболевание дыхательных путей, способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении заболевания дыхательных путей. Заболевание дыхательных путей может включать одно или более из астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), легочного фиброза, саркоидоза легких, аллергического ринита или кистозного фиброза. Так, например, в некоторых аспектах способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении астмы, таким образом, что астма лечится у субъекта. В некоторых аспектах способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении ХОБЛ, таким образом, что ХОБЛ лечится у субъекта. В некоторых аспектах способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении легочного фиброза, таким образом, что легочный фиброз лечится у субъекта. В некоторых аспектах способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении саркоидоза легких, таким образом, что саркоидоз легких лечится у субъекта. В некоторых аспектах способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении аллергического ринита, таким образом, что аллергический ринит лечится у субъекта. В некоторых аспектах способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении кистозного фиброза, таким образом, что кистозный фиброз лечится у субъекта.

В тех аспектах, при которых необходимо лечить заболевание желудочно-кишечного тракта, способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении заболевания желудочно-кишечного тракта. Заболевание желудочно-кишечного тракта может включать одно или более из следующего списка: воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона, колит, язвенный колит, синдром раздраженного кишечника (IBS), эозинофильный эзофагит, или заболевание, или патологическое состояние желудочно-кишечного тракта, связанное с кистозным фиброзом. Так, например, в некоторых аспектах способы включают введение варианту антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении IBD, таким образом, что IBD лечится у субъекта. В некоторых аспектах способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении болезни Крона, таким образом, что болезнь Крона лечится у субъекта. В

некоторых аспектах способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении колита, таким образом, что колит лечится у субъекта. В некоторых аспектах способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении язвенного колита, таким образом, что язвенный колит лечится у субъекта. В некоторых аспектах способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении IBS, таким образом, что IBS лечится у субъекта. В некоторых аспектах способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении эозинофильного эзофагита, таким образом, что эозинофильный эзофагит лечится у субъекта. В некоторых аспектах способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении заболевания или патологического состояния желудочно-кишечного тракта, связанного с кистозным фиброзом, таким образом, что заболевание или патологическое состояние желудочно-кишечного тракта, связанное с кистозным фиброзом, лечится у субъекта.

В тех аспектах, при которых необходимо лечить артрит, способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении артрита. Артрит может включать ревматоидный артрит. Так, например, в некоторых аспектах способы включают введение варианту антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении ревматоидного артрита, таким образом, что ревматоидный артрит лечится у субъекта.

В тех аспектах, при которых необходимо лечить заболевание кожи, способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении заболевания кожи. Заболевание кожи может включать одно или более из атопического дерматита, экземы или склеродермии. Так, например, в некоторых аспектах способы включают введение варианту антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении атопического дерматита, таким образом, что атопический дерматит лечится у субъекта. В некоторых аспектах способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении экземы, таким образом, что экзема лечится у субъекта. В некоторых аспектах способы включают введение варианта антитела 320-179 или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении склеродермии, таким образом, что склеродермия лечится у субъекта.

Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы при получении лекарственного средства для использования при лечении заболевания респираторных путей. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы при получении лекарственного средства для использования при лечении заболевания желудочно-кишечного тракта. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы при получении лекарственного средства для использования при лечении артрита. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы при получении лекарственного средства для использования при лечении заболевания кожи. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примеров в данном документе, могут быть использованы при получении лекарственного средства для применения при лечении любого заболевания из астмы, ХОБЛ, легочного фиброза, саркоидоза легких, аллергического ринита, кистозного фиброза, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, колита, язвенного колита, синдрома раздраженного кишечника, эозинофильного эзофагита, заболевания или патологического состояния желудочно-кишечного тракта, связанного с кистозным фиброзом, артрита, ревматоидного артрита, атопического дерматита, экземы или склеродермии.

Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения заболевания дыхательных путей. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения заболевания желудочно-кишечного тракта. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения астмы. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения заболевания кожи. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения ХОБЛ. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения легочного фиброза. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения саркоидоза легких. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения аллергического ринита. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения кистозного фиброза. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения воспалительного заболевания кишечника. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения болезни Крона. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения колита. Варианты антител 320-179, описанные или

приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения язвенного колита. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для эозинофильного эзофагита. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения заболевания или патологического состояния желудочно-кишечного тракта, связанного с кистозным фиброзом. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения синдрома раздраженного кишечника. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения ревматоидного артрита. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения атопического дерматита. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения экземы. Варианты антител 320-179, описанные или приведенные в качестве примера в данном документе, могут быть использованы для лечения склеродермии.

Также предложен способ *in vitro* для выявления TL1A в образце ткани, выделенном от субъекта, включающий приведение в контакт антитела по любому из пп.1-19 с образцом ткани, выделенным от субъекта, с образованием комплекса антитело-TL1A, и выявления комплекса в образце ткани.

Вариант антитела 320-179 можно использовать для выявления TL1A-положительных клеток, например, в образце ткани, полученном от субъекта. Антитела могут использоваться для выявления TL1A-положительных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), например МКПК, полученных от субъекта. Антитела могут использоваться для выявления TL1A в сыворотке крови. Такие способы могут быть осуществлены *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* или *in situ*. В общем способы включают приведение в контакт любого из вариантов антител 320-179, описанных или проиллюстрированных в данном документе, с тканью или клетками, например МКПК, выделенными от субъекта, с образованием комплекса антитело-TL1A и выявления комплекса в ткани или на клетках. Антитело может быть помечено детектируемой меткой. Антитело может быть обнаружено вторичным антителом, которое помечено детектируемой меткой. Ткань может содержать или может быть биологической жидкостью, такой как кровь или сыворотка крови. Ткань может содержать или может быть тканями дыхательного тракта, таким как ткань легкого, мокрота, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, желудочно-кишечная ткань или желудочно-кишечная промывная жидкость. Ткань может содержать или может быть кожей или тканью кожи. Ткань может содержать или может быть тканью любого сустава в организме. Способ может дополнительно включать выделение ткани от субъекта. Такие методы могут быть количественными, например количественное определение уровня TL1A в ткани, количественное определение уровня TL1A-положительных клеток или количественное определение уровня TL1A на клетках или количественное определение уровня TL1A в сыворотке.

В раскрытии также предложены наборы, содержащие любой из вариантов антител 320-179, описанных и приведенных в качестве примеров в данном документе. Наборы могут использоваться для обеспечения антител и других агентов для применения в диагностике, фундаментальных исследованиях или терапевтических методах, наряду с другими. В некоторых аспектах наборы содержат любые одно или более из вариантов антител 320-179, описанных или приведенных в качестве примера в данном документе, и инструкции для использования одного или более антител в способе лечения заболевания дыхательных путей, в способе лечения заболевания желудочно-кишечного тракта, или в способе лечения артрита.

Следующие примеры приведены для более подробного описания раскрытия. Они предназначены для иллюстрации, а не для ограничения раскрытия.

Пример 1. Материалы и методы.

Положения аминокислот в этих примерах нумеруются в соответствии с системой нумерации Kabat. CDR определяют в соответствии с методом AbM системы определения CDR в этом документе.

1.1. Генерация вариантов пучков.

Аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей антитела 320-179 (SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно) использовали в качестве матриц для разработки указанных вариантов. 320-179 был ранее описан в публикации США № 2014/0255302 (VH представляет собой SEQ ID NO: 186, а VL представляет собой SEQ ID NO: 199 в этой публикации) как 320-179 (также описано как C320-179). Это антитело обладало благоприятными биофизическими свойствами, являлось мощным ингибитором TL1A и имело низкий прогнозируемый профиль иммуногенности.

Варианты антител 320-179 были сделаны путем замены одной из группы из девяти типичных аминокислот - A, S, Q, D, H, K, L, W, Y - по одной в каждом аминокислотном положении CDR (как определено при помощи номенклатуры AbM) в CDR1 легкой цепи (CDR-L1), CDR3 легкой цепи (CDR-L3), CDR1 тяжелой цепи (CDR-H1) и CDR2 тяжелой цепи (CDR-H2). Варианты антител, включающие A, S, Q, D, H, K, L, W, Y, также были сделаны в положениях 59 и 60 в варибельной области тяжелой цепи и в положении 79 в варибельной области легкой цепи. Полный список всех сгенерированных однозамещенных вариантов антител показан на фиг. 1 (варибельная область тяжелой цепи) и фиг. 2 (варибельная область легкой цепи) соответственно.

1.2. Конструирование векторов, экспрессирующих антитела.

Варианты вариабельных областей были получены путем обратной транскрипции аминокислотных последовательностей в последовательности ДНК, которые впоследствии были синтезированы de novo путем сборки синтетических олигонуклеотидов. Варианты V_H субклонировали в вектор экспрессии млекопитающих, содержащий константную область человека для получения полноразмерных тяжелых цепей антител (C_H1 тяжелой цепи IgG1 человека, шарнирный участок, домены C_H2 и C_H3) (например, UniProt № P01857). Аналогично варианты V_L субклонировали в вектор экспрессии млекопитающих, содержащий константную область легкой цепи лямбда человека для получения лямбда-цепей полноразмерных антител (SwissProt № P0CG05.1). В некоторых случаях полноразмерная тяжелая цепь и в отдельности легкая цепь были обратно переведены в последовательности ДНК и впоследствии синтезированы de novo путем сборки синтетических олигонуклеотидов.

1.3. Экспрессия вариантов антител.

Антитела были получены путем совместной трансфекции тяжелых и легких цепей антител в клетки EXPI293® (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния). За сутки до трансфекции было определено количество клеток, необходимых для эксперимента. Для каждой 20 мл трансфекции требовалось $3,6 \times 10^7$ клеток в 20 мл среды EXPI293® Expression Medium. В день до трансфекции клетки высевали с плотностью $0,9 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37°C в увлажненной атмосфере с 8% CO₂ в воздухе на орбитальном шейкере, вращающемся со скоростью 200 об/мин. В день трансфекции количество клеток и их жизнеспособность определяли с использованием автоматизированного счетчика клеток. Использовали культуры с более чем 98% жизнеспособными клетками. Для каждой 20 мл трансфекции комплексы липид-ДНК получали путем разбавления 10 мкг ДНК тяжелой цепи и 10 мкг ДНК легкой цепи в среде OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) (№ 31985)-062 до общего объема 1,0 мл. 54 мкл EXPIFECTAMINE® 293 Reagent (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) разбавляли в среде OPTI-MEM® I до общего объема 1,0 мл. Оба флакона осторожно перемешивали и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. После инкубации разбавленную ДНК смешивали с разбавленным EXPIFECTAMINE® 293 Reagent и реакционной смесью ДНК-EXPIFECTAMINE® 293 Reagent и инкубировали еще 20 мин при комнатной температуре, чтобы образовать комплексы ДНК-EXPIFECTAMINE® 293 Reagent. После инкубации к каждой 50 мл биореакторной трубке (TPP Techno Plastic Products AG) добавляли 2 мл комплекса ДНК-EXPIFECTAMINE® 293 Reagent. В отрицательную контрольную пробирку вместо комплекса ДНК-EXPIFECTAMINE® 293 Reagent добавляли 2 мл среды OPTI-MEM® I (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния).

Клетки инкубировали в инкубаторе при температуре 37°C с увлажненной атмосферой 8% CO₂ в воздухе на орбитальном шейкере, вращающемся со скоростью 200 об/мин. Примерно через 16-18 ч после трансфекции к каждому биореактору добавляли 100 мкл EXPIFECTAMINE® 293 Transfection Enhancer 1 и 1,0 мл EXPIFECTAMINE® 293 Transfection Enhancer 2. Антитела собирали примерно через 72 ч после трансфекции.

1.4. Очистка вариантов антител.

Каждый вариант антител экспрессировали в клетках EXPI293® в 20 мл клеточной культуры. Культуры центрифугировали в 50 мл пробирках фирмы Falcon при 3000×g в течение 20 мин и супернатанты фильтровали с использованием 0,22 мкм фильтра (Corning). Супернатанты очищали с использованием робота Gilson ASPEC GX274. Вкратце картриджи SPE (твердофазная экстракция) (Agilent, 12131014), заполненные 1,2 мл смолы с протеином A MABSELECT SURE® (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Уппсала, Швеция) были предварительно уравновешены 3 объемами колонки 1X PBS. 18 мл супернатанта пропускали через колонки, а затем промывали 4 мл 1X PBS. Каждую колонку предварительно элюировали 0,9 мл 0,1 М лимонной кислоты при pH 2,9. Очищенные антитела элюировали 2 мл 0,1 М лимонной кислоты, при pH 2,9. Антитела обессоливали в PBS Sørensens (59,5 mM KH₂PO₄, 7,3 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 145,4 mM NaCl (pH ~5.8)) с использованием колонок PD-10 (GE Healthcare).

1.5. Экспрессия антитела и связывание антигена, как определено при помощи SPR (поверхностный плазмонный резонанс).

Используя сенсорные чипы CM5 (GE Healthcare), протеин A (Pierce) был соединен с поверхностью чипа с использованием набора для аминного сопряжения (GE Healthcare). Протеин A был соединен с проточной кюветой 1 и 2 (или альтернативно 3 и 4) с использованием BIACORE® T200. Супернатанты из клеток EXPI-293®, содержащие антитело или альтернативно очищенные антитела (как описано в 1.4), пропускали через поверхность проточной кюветы 2, тогда как буфер (HBS-EP) пропускали через проточную кювету 1. Количество супернатанта или очищенного белка (а также концентрация), вводимое во время стадии захвата, варьировалось между прогонами и указано в заголовке табл. 3-11. В конце введения супернатанта или очищенного антитела измеряли изменение в единицах ответа. Это значение было указано как уровень захвата в табл. 3-11. Чтобы определить, является ли TL1A связанным с антителом, TL1A затем пропускали через проточные кюветы 1 и 2, а единицы ответа измеряли до конца введения TL1A (фаза ассоциации). Это значение обозначается как уровень связывания TL1A (раннего) в табл. 3-11.

Единицы ответа измеряли до окончания фазы диссоциации. Это значение помечено как уровень связывания TL1A (позднего) в табл. 3-11 и является мерой количества антитела, которое было потеряно с поверхности чипа в результате диссоциации комплекса TL1A-антитела. Сенсограммы были дважды стандартизированы (проточная кювета 2 вычитается из проточной кюветы 1 и контрольного буфера). Поскольку для скрининга имелось большое количество вариантов антител, их проверяли в разных прогонах (табл. 3-11). В каждом случае (кроме прогона 3) для сравнения было включено исходное антитело 320-179. Ниже приводится краткое описание условий, используемых в каждом прогоне.

Таблица 1

Прогон #	Супернатант	Белок	Приблизительный уровень захвата (ЕО)	Конц. образца TL1A (мкг/мл)	Уровень связывания TL1A (раннего) на момент времени	Уровень связывания TL1A (позднего) на момент времени	Примечания
1		x	400	10	59	590	Антитело, разведенное до 2 мкг/мл, переменное время захвата
2	x		1000	10	44	220	Супернатант, разведенный в подвижный буфер, переменное время захвата
2		x	400	10	44	590	Антитело, разведенное до 2 мкг/мл, переменное время захвата
3	x		вариабельная	10	59	590	Супернатант, разведенный в подвижном буфере, захват 60 с
4		x	500	5	44	220	Антитело, разведенное до 2 мкг/мл в подвижном буфере
5	x		100	5	44	220	Супернатант, разведенный в подвижном буфере,
6		x	вариабельная	5	44	170	Антитело, разведенное до 2 мкг/мл в подвижном буфере и захваченное в течение 45 с
7*		x	400	5	44	220	Антитело, разведенное до ок. 2 мкг/мл
8		x	400	5	44	590	Антитело, разведенное до 2
							мкг/мл, переменное время захвата
9		x	400	5	44	590	Антитело, разведенное до 2 мкг/мл, переменное время захвата

* Этот прогон был выполнен на Biacore® A100.

Связывание антитела против TL1A с различными видами TL1A также определяли с использованием SPR. Антитело против TL1A захватывали на поверхности протеина А. TL1A от человека, крысы, мыши, кролика, морской свинки, обезьяны свиньи, собаки, кошки или яванского макака пропускали по поверхности и измеряли единицы ответа.

1.6. Получение TL1A.

TL1A человека получали в системе экспрессии для млекопитающего EXPI293®, используя конструкцию экспрессии ДНК, кодирующую внеклеточный домен (ECD) TL1A человека с N-концевым HIS и

меткой FLAG. Другие виды форм TL1A были созданы на основе перечня последовательностей из общедоступных баз данных. Они приведены ниже.

Таблица 2

Виды TL1A	Ссылка на общедоступную базу данных	SEQ ID NO:
Человек	UniProt: O95150	31
Яванский макак	SEQ ID NO: 125 из Публикация США № 2014/0255302	34
Мышь	UniProt: Q5UBV8	35
Крыса	UniProt: Q8K3Y7	36
Морская свинка	UniProt: H0VFN8	37
Кошка	NCBI: XP_003995828.1	38
Свинья	UniProt: I3LL00	39
Кролик	UniProt: G1T1T1	40
Собака	UniProt: J9P221	41

Супернатант культуры, содержащий секретируемый белок TL1A, собирали центрифугированием при 2000×g в течение 10 мин для удаления клеток. Белок TL1A очищали из супернатанта с использованием колонки HP HISTRAP® (GE Healthcare). Элюированный белок подвергали буферному обмену в PBS с использованием колонки HILOAD® 16/60 Superdex 200 для препаративной степени чистоты (GE Healthcare) и фракции ~70 кДа, разделяли гель-фильтрацией на колонке HILOAD® 26/60 SUPERDEX® 200 для препаративной степени чистоты (GE Healthcare).

1.7. Анализ активности клеточной линии TF-1.

Чтобы определить, какие антитела против TL1A функционально нейтрализуют биологическую активность TL1A, антитела тестировали на их способность нейтрализовать апоптоз, индуцированный TL1A, в линии клеток TF-1. Клеточная линия эритролейкоза человека TF-1 (ATCC: CRL-2003) поддерживали в культуре в стандартных условиях. Клетки TF-1 ($7,5 \times 10^4$ /лунку) инкубировали в непрозрачных 96-луночных планшетах (Greiner) с 100 нг/мл человеческого TL1A и 10 мкг/мл циклогексимида для индуцирования апоптоза. Тестируемые антитела в концентрации 10 мкг/мл (66,7 нМ) или менее добавляли к планшетам и инкубировали в течение 4-5 ч. Затем индукцию апоптоза оценивали с использованием набора Homogeneous Caspases Kit (Roche) в соответствии с инструкциями производителя.

Данные были нормализованы по экспрессии в процентах от максимального апоптоза (уровни апоптоза, достигаемые TL1A человека плюс циклогексимид в отсутствие антитела против TL1A).

1.8. Селективность к рецепторам у наиболее активных антител.

TL1A связывается как с его родственным сигнальным рецептором DR3, так и с рецептором-приманкой DcR3, который также служит рецептором-приманкой для членов семейства ФНО Fas-L и LIGHT. Антитела оценивали на их способность ингибировать связывание TL1A с его рецепторами в конкурентном ИФА. Химеру DR3/Fc (R&D Systems) или химеру DcR3/Fc (R&D Systems) наносили на 96-луночный планшет (Maxisorp, Nunc) в концентрации 2 мкг/мл. Серийно разведенные тестовые антитела предварительно инкубировали с 1 мкг/мл биотинилированным в одном сайте TL1A человека в течение 30 мин, затем добавляли к лункам, покрытым DR3/Fc или DcR3/Fc. Связанный TL1A был выявлен с использованием стрептавидин-пероксидазы хрена 1:2000 (BD Pharmingen). Данные были нормализованы по экспрессии в виде процента от максимального связывания TL1A с рецептором при отсутствии антитела против TL1A.

1.9. Анализ кинетического исключения.

Этим анализом измеряют свободную концентрацию одного из партнеров по связыванию без нарушения равновесия. Растворы могут быть приготовлены в автономном режиме с использованием немодифицированных белков в растворе, а значения измерения аффинности можно считать через несколько суток после смешивания, чтобы обеспечить достижение равновесия. В анализе кинетического исключения один интерактант (называемый постоянным связывающим партнером, или CBP) удерживается в постоянной концентрации, а другой (называемый титрантом) разводится последовательно. Анализ кинетического исключения могут быть использованы для определения константы диссоциации (K_D) и аффинности взаимодействия антитело-антиген. В типичном анализе кинетического исключения титрант иммобилизуют на шарики (например, шарики сефарозы или ПММА (полиметилметакрилат)) и используют для захвата свободного CBP в растворе. Затем вторичный меченый зонд используется для количе-

ственной оценки количества захваченного СВР. Анализ кинетического исключения описан в Darling, RK et al. (2004), ASSAY and Drug Development Technol., 2(6):647-57.

Компоненты объединяли и позволяли им достичь равновесия. Затем для количественной оценки свободной фракции СВР использовали кинетический анализ исключения. Кривые равновесия с несколькими концентрациями СВР анализировали с использованием метода анализа п-кривой в программном обеспечении KinExA® Pro (версия 4.1.11, Sapidyne) для получения надежных значений K_D . Взаимодействие 320-587 для TL1A человека исследовали с использованием двух направлений:

(1) СВР представляет собой 320-587, титрант представляет собой TL1A;

(2) СВР представляет собой TL1A, титрант представляет собой 320-587.

Пример 2. Результаты эксперимента.

2.1. Выбор TL1A-связывающих вариантов с эквивалентной или улучшенной скоростью диссоциации по сравнению С320-179.

Варианты антител 320-179 были сконструированы и экспрессированы, как описано выше. Супернатанты EXPI293® (Life Technologies Corp.) каждого варианта оценивали при помощи BIACORE® (GE Healthcare) и полученные данные сравнивали с данными исходного антитела 320-179. В отдельном эксперименте антитела очищали с использованием хроматографии на протеине А (см. 1.4) и в экспериментах BIACORE® (GE Healthcare) использовали очищенные антитела. В табл. 3-11 показан уровень экспрессии каждого варианта, а также их связывание с TL1A в ранний и поздний момент времени. В более поздних сериях (табл. 10 и 11) тестировали варианты антител, содержащие более одной аминокислотной замены.

Таблица 3

Эксперимент SPR - прогон 1 -
антитела против TL1A, связывающиеся с TL1A

Антитело	Замена в VH относительно 320-179	Замена в VL относительно 320-179	Уровень захвата	Уровень связывания TL1A (раннего)	Уровень связывания TL1A (позднего)
				Очищенное антитело	
320-179	Отсутствует	Отсутствует	410	140	117
320-184*	Отсутствует	L79A	414	141	118
320-185*	Отсутствует	L79S	401	137	114
320-186*	Отсутствует	L79Q	398	136	113
320-187*	Отсутствует	L79D	388	134	112
320-188*	Отсутствует	L79H	397	136	113
320-189*	Отсутствует	L79K	393	130	107
320-190*	Отсутствует	L79W	395	136	113
320-191*	Отсутствует	L79Y	408	140	117

* указывает на антитела, которые были выбраны для анализа активности.

Таблица 4

Эксперимент SPR - прогон 2 - антитела против TL1A, связывающиеся с TL1A

Антитело	Замена в VH относительно 320-179	Замена в VL относительно 320-179	Уровень захвата	Уровень связывания TL1A (раннего)	Уровень связывания TL1A (позднего)	Уровни связывания		
						Уровень захвата	Уровень связывания TL1A (раннего)	Уровень связывания TL1A (позднего)
			Супернатант			Очищенное антитело		
320-179	Отсутствует	Отсутствует	1133	287	261	410	140	117
320-192	Отсутствует	T24A	960	238	218	-	-	-
320-193	Отсутствует	T24S	990	249	227	409	103	91
320-194	Отсутствует	T24Q	974	247	226	398	76	64
320-195	Отсутствует	T24D	992	249	227	-	-	-
320-196	Отсутствует	T24H	995	250	228	-	-	-
320-197	Отсутствует	T24K	1017	255	232	401	105	94
320-198*	Отсутствует	T24L	1023	262	241	-	-	-
320-199	Отсутствует	T24W	1050	251	233	404	97	85
320-200	Отсутствует	T24Y	1027	251	231	-	-	-
320-201*	Отсутствует	S25A	990	274	252	393	73	57
320-202*	Отсутствует	S25Q	1034	234	214	-	-	-
320-203	Отсутствует	S25D	977	61	24	407	65	35
320-204	Отсутствует	S25H	1003	193	155	-	-	-
320-205*	Отсутствует	S25K	1025	290	271	401	70	51
320-206	Отсутствует	S25L	1000	257	235	-	-	-
320-207*	Отсутствует	S25W	1022	268	243	-	-	-
320-208	Отсутствует	S25Y	1034	222	199	-	-	-
320-209*	Отсутствует	S26A	1007	222	200	-	-	-
320-210	Отсутствует	S26Q	1033	225	202	-	-	-
320-211*	Отсутствует	S26D	1025	206	164	392	80	64
320-212	Отсутствует	S26H	1013	226	205	-	-	-
320-213*	Отсутствует	S26K	1052	218	194	422	79	65
320-214	Отсутствует	S26L	1038	221	196	-	-	-
320-215	Отсутствует	S26W	1021	220	199	-	-	-
320-216	Отсутствует	S26Y	1010	171	147	-	-	-
320-217	Отсутствует	S27A	1076	258	235	-	-	-
320-218	Отсутствует	S27Q	1081	239	218	412	92	80
320-219*	Отсутствует	S27D	1061	243	220	-	-	-
320-220	Отсутствует	S27H	1049	253	230	-	-	-
320-221	Отсутствует	S27K	1063	225	207	413	99	89
320-222	Отсутствует	S27L	1037	156	96	-	-	-
320-223	Отсутствует	S27W	1061	143	66	-	-	-
320-224	Отсутствует	S27Y	1055	198	153	-	-	-
320-225	Отсутствует	S27aA	1066	267	243	-	-	-
320-226*	Отсутствует	S27aQ	1035	250	228	-	-	-
320-227	Отсутствует	S27aD	1022	242	218	-	-	-
320-228	Отсутствует	S27aH	1072	259	235	-	-	-
320-229*	Отсутствует	S27aK	1057	268	251	-	-	-
320-230	Отсутствует	S27aL	1087	245	223	-	-	-
320-231	Отсутствует	S27aW	1078	271	243	-	-	-
320-232	Отсутствует	S27aY	1051	261	235	-	-	-
320-233	Отсутствует	D27bA	1118	255	235	409	48	16
320-234	Отсутствует	D27bS	1089	262	239	-	-	-
320-235	Отсутствует	D27bQ	1110	256	236	-	-	-
320-236	Отсутствует	D27bH	1085	254	232	415	5	6
320-237	Отсутствует	D27bK	1073	240	221	398	10	8
320-238	Отсутствует	D27bL	1106	221	191	-	-	-
320-239	Отсутствует	D27bW	1079	212	163	-	-	-
320-240	Отсутствует	D27bY	1089	230	196	-	-	-
320-241*	Отсутствует	I27cA	1092	179	122	-	-	-
320-242	Отсутствует	I27cS	1076	124	49	-	-	-
320-243	Отсутствует	I27cQ	1065	71	26	-	-	-

320-244*	Отсутствует	I27cD	1083	21	20	-	-	-
320-245*	Отсутствует	I27cH	1084	59	26	-	-	-
320-246	Отсутствует	I27cK	1089	32	23	-	-	-
320-247	Отсутствует	I27cL	1078	205	162	-	-	-
320-248	Отсутствует	I27cW	1110	96	30	-	-	-
320-249	Отсутствует	I27cY	1096	77	28	-	-	-
320-250	Отсутствует	G28A	1104	180	115	-	-	-
320-251	Отсутствует	G28S	1085	134	50	-	-	-

* указывает на антитела, которые были выбраны для анализа активности.

Таблица 5

Эксперимент SPR - прогон 3 -
антитела против TL1A, связывающиеся с TL1A

Антитело	Замена в VH относительно 320-179	Замена в VL относительно 320-179	Уровень захвата	Уровень связывания TL1A (раннего)	Уровень связывания TL1A (позднего)
				Супернатант	
320-252	Отсутствует	G28Q	996	20	9
320-253	Отсутствует	G28D	1073	6	6
320-254	Отсутствует	G28H	1021	17	8
320-255	Отсутствует	G28K	842	24	8
320-256	Отсутствует	G28L	1055	30	10
320-257	Отсутствует	G28W	981	83	18
320-258	Отсутствует	G28Y	823	9	6
320-259	Отсутствует	A29S	824	194	179
320-260	Отсутствует	A29Q	836	182	165
320-261	Отсутствует	A29D	956	86	29
320-262	Отсутствует	A29H	891	209	190
320-263*	Отсутствует	A29K	848	121	123
320-264	Отсутствует	A29L	831	199	184
320-265	Отсутствует	A29W	1057	168	69
320-266	Отсутствует	A29Y	934	218	192
320-267*	Отсутствует	G30A	1148	299	297
320-268	Отсутствует	G30S	392	28	7
320-269	Отсутствует	G30Q	764	126	93
320-270	Отсутствует	G30D	511	9	5
320-271	Отсутствует	G30H	1067	106	30
320-272	Отсутствует	G30K	935	5	5
320-273	Отсутствует	G30L	710	4	4
320-274	Отсутствует	G30W	796	12	7
320-275	Отсутствует	G30Y	751	44	10
320-276	Отсутствует	L31A	1273	244	215
320-277*	Отсутствует	L31S	1741	387	361
320-278*	Отсутствует	L31Q	1696	389	374
320-279	Отсутствует	L31D	561	144	128
320-280*	Отсутствует	L31H	881	228	211
320-281	Отсутствует	L31K	321	22	6
320-282	Отсутствует	L31W	811	75	16
320-283	Отсутствует	L31Y	317	2	3
320-284	Отсутствует	G32A	374	1	2
320-285	Отсутствует	G32S	400	1	2
320-286	Отсутствует	G32Q	576	1	4
320-287	Отсутствует	G32D	339	0	2

320-288	Отсутствует	G32H	422	1	3
320-289	Отсутствует	G32K	463	1	3
320-290	Отсутствует	G32L	361	1	2
320-291	Отсутствует	G32W	414	2	3
320-292	Отсутствует	G32Y	423	111	94
320-293	Отсутствует	V33A	421	104	86
320-294	Отсутствует	V33S	419	79	61
320-295	Отсутствует	V33Q	414	109	94
320-296	Отсутствует	V33D	428	118	104
320-297*	Отсутствует	V33H	420	95	77
320-298	Отсутствует	V33K	416	114	100
320-299	Отсутствует	V33L	420	51	13
320-300	Отсутствует	H34W	417	111	95
320-301	Отсутствует	H34Y	456	108	96
320-302*	Отсутствует	H34A	423	99	74
320-303	Отсутствует	H34S	408	71	32
320-304	Отсутствует	H34Q	401	103	82
320-305	Отсутствует	H34D	424	34	10
320-306	Отсутствует	H34K	452	147	133
320-307*	Отсутствует	H34L	873	216	200
320-308	Отсутствует	H34W	458	106	73
320-309	Отсутствует	H34Y	255	47	40
320-310	Отсутствует	Q89A	348	70	62
320-311	Отсутствует	Q89S	0	0	0

* указывает на антитела, которые были выбраны для анализа активности.

Таблица 6

Эксперимент SPR - прогон 4 -
антитела против TL1A, связывающиеся с TL1A

Антитело	Замена в VH относительно 320-179	Замена в VL относительно 320-179	Уровень захвата	Уровень связывания TL1A (раннего)	Уровень связывания TL1A (позднего)
				Очищенное антитело	
320-179	Отсутствует	Отсутствует	616	177	163
320-312	Отсутствует	Q89D	529	10	10
320-313*	Отсутствует	Q89H	502	141	132
320-314*	Отсутствует	Q89K	598	165	158
320-315	Отсутствует	Q89L	515	85	82

320-316	Отсутствует	Q89W	535	65	62
320-317	Отсутствует	Q89Y	570	86	83
320-318*	Отсутствует	S90A	578	160	149
320-319	Отсутствует	S90Q	523	18	14
320-320	Отсутствует	S90D	534	31	17
320-321	Отсутствует	S90H	491	16	13
320-322	Отсутствует	S90K	450	17	14
320-323	Отсутствует	S90W	490	14	13
320-324	Отсутствует	S90Y	528	13	12
320-325	Отсутствует	Y91A	491	95	83
320-326*	Отсутствует	Y91S	550	126	120
320-327	Отсутствует	Y91Q	493	130	119
320-328*	Отсутствует	Y91H	542	155	146
320-329	Отсутствует	Y91K	600	9	11
320-330	Отсутствует	Y91L	600	139	119
320-331*	Отсутствует	Y91W	615	173	176
320-332	Отсутствует	D92A	531	66	44
320-333	Отсутствует	D92S	559	95	67
320-334	Отсутствует	D92Q	543	15	14
320-335	Отсутствует	D92H	581	15	14
320-336	Отсутствует	D92K	484	11	11
320-337	Отсутствует	D92L	475	21	15
320-338	Отсутствует	D92W	548	9	11
320-339	Отсутствует	D92Y	509	10	11
320-340	Отсутствует	G93A	548	145	132
320-341	Отсутствует	G93S	560	149	135
320-342	Отсутствует	G93Q	560	152	139
320-343	Отсутствует	G93D	545	121	90
320-344	Отсутствует	G93H	529	117	87
320-345*	Отсутствует	G93K	637	163	154
320-346	Отсутствует	G93L	526	126	107
320-347	Отсутствует	G93W	560	149	130
320-348	Отсутствует	G93Y	541	144	127
320-349	Отсутствует	T94A	556	112	88
320-350	Отсутствует	T94S	502	130	118
320-351	Отсутствует	T94Q	553	112	83

320-352	Отсутствует	T94D	568	101	63
320-353	Отсутствует	T94H	558	97	73
320-354	Отсутствует	T94K	536	53	30
320-355	Отсутствует	T94L	526	102	76
320-356	Отсутствует	T94W	486	109	86
320-357	Отсутствует	T94Y	563	119	91
320-358	Отсутствует	L95A	501	82	50
320-359	Отсутствует	L95S	503	57	27
320-360	Отсутствует	L95Q	554	86	53
320-361*	Отсутствует	L95D	477	12	11
320-362	Отсутствует	L95H	522	8	9
320-363	Отсутствует	L95Y	566	17	16
320-364	Отсутствует	S95aA	516	124	109
320-365	Отсутствует	S95aQ	536	141	128
320-366	Отсутствует	S95aD	487	62	31
320-367	Отсутствует	S95aH	595	119	116
320-368	Отсутствует	S95aK	602	50	26
320-369	Отсутствует	S95aL	503	89	60
320-370	Отсутствует	S95aW	570	66	39
320-371	Отсутствует	S95aY	576	92	70

* указывает на антитела, которые были выбраны для анализа активности.

Таблица 7

Эксперимент SPR - прогон 5 -
антитела против TL1A, связывающиеся с TL1A

Антитело	Замена в VH относительно 320-179	Замена в VL относительно 320-179	Уровень захвата	Уровень связывания TL1A (раннего)	Уровень связывания TL1A (позднего)
				Супернатант	
320-179	Отсутствует	Отсутствует	83	11	10
320-372	Отсутствует	A96S	106	1	0
320-373	Отсутствует	A96Q	99	-1	-1
320-374	Отсутствует	A96D	98	1	0
320-375	Отсутствует	A96H	108	-2	-1
320-376	Отсутствует	A96K	98	3	1
320-377	Отсутствует	A96L	101	-1	-1
320-378	Отсутствует	A96W	105	-1	-1
320-379	Отсутствует	A96Y	105	3	1
320-380	Отсутствует	L97A	104	1	1
320-381	Отсутствует	L97S	97	3	1
320-382	Отсутствует	L97Q	106	0	0

320-383	Отсутствует	L97D	102	3	1
320-384	Отсутствует	L97H	98	3	2
320-385	Отсутствует	L97K	108	1	1
320-386	Отсутствует	L97W	104	1	0
320-387	Отсутствует	L97Y	97	11	10
320-388	G26A	Отсутствует	110	14	13
320-389	G26S	Отсутствует	105	12	11
320-390	G26Q	Отсутствует	100	12	11
320-391	G26D	Отсутствует	106	14	13
320-392	G26H	Отсутствует	109	12	11
320-393	G26K	Отсутствует	100	12	11
320-394	G26L	Отсутствует	106	13	12
320-395	G26W	Отсутствует	104	13	12
320-396	G26Y	Отсутствует	104	12	11
320-397	Y27A	Отсутствует	109	12	12
320-398	Y27S	Отсутствует	110	12	11
320-399	Y27Q	Отсутствует	105	10	10
320-400	Y27D	Отсутствует	106	11	11
320-401	Y27H	Отсутствует	100	11	10
320-402	Y27L	Отсутствует	98	11	10
320-403	Y27W	Отсутствует	84	11	10
320-404	T28A	Отсутствует	84	11	10
320-405	T28S	Отсутствует	79	10	9
320-406	T28Q	Отсутствует	82	8	7
320-407	T28D	Отсутствует	88	12	11
320-408	T28H	Отсутствует	81	13	12
320-409	T28K	Отсутствует	83	10	10
320-410	T28L	Отсутствует	86	11	10
320-411	T28W	Отсутствует	82	10	9
320-412	T28Y	Отсутствует	89	10	9
320-413	F29A	Отсутствует	89	9	8
320-414	F29S	Отсутствует	78	7	7
320-415	F29Q	Отсутствует	85	5	4
320-416	F29D	Отсутствует	81	9	8
320-417	F29H	Отсутствует	85	9	8
320-418	F29K	Отсутствует	85	10	9
320-419	F29L	Отсутствует	83	11	9
320-420	F29W	Отсутствует	85	11	10
320-421	F28Y	Отсутствует	81	9	8
320-422	T30A	Отсутствует	80	10	9
320-423	T30S	Отсутствует	86	10	10
320-424	T30Q	Отсутствует	86	11	10
320-425	T30D	Отсутствует	89	14	12
320-426	T30H	Отсутствует	84	10	9
320-427	T30K	Отсутствует	88	11	10
320-428	T30L	Отсутствует	88	11	10
320-429	T30W	Отсутствует	90	12	11
320-430	T30Y	Отсутствует	85	6	6
320-431	S31A	Отсутствует	85	6	6

Эксперимент SPR - прогон 6 -
антитела против TL1A, связывающиеся с TL1A

Антитело	Замена в VH относительно 320-179	Замена в VL относительно 320-179	Уровень захвата	Уровень связывания TL1A (раннего)	Уровень связывания TL1A (позднего)
				Очищенное антитело	
320-179	Отсутствует	Отсутствует	449	111	102
320-432	S31Q	Отсутствует	466	116	106
320-433	S31D	Отсутствует	412	90	83
320-434	S31K	Отсутствует	473	125	113
320-435	S31L	Отсутствует	384	92	83
320-436	S31W	Отсутствует	525	129	118
320-437	S31Y	Отсутствует	501	119	109
320-438	Y32A	Отсутствует	468	126	116
320-439	Y32S	Отсутствует	464	119	108
320-440	Y32Q	Отсутствует	408	108	97
320-441	Y32D	Отсутствует	388	80	67
320-442	Y32H	Отсутствует	490	124	113
320-443*	Y32K	Отсутствует	438	114	103
320-444	Y32L	Отсутствует	458	107	95
320-445*	Y32W	Отсутствует	442	116	106
320-446	D33A	Отсутствует	469	18	8
320-447	D33S	Отсутствует	503	37	13
320-448	D33Q	Отсутствует	482	7	6
320-449	D33H	Отсутствует	483	76	59
320-450	D33K	Отсутствует	536	1	3
320-451	D33L	Отсутствует	497	19	8
320-452	D33W	Отсутствует	445	84	78
320-453	D33Y	Отсутствует	449	111	104
320-454	I34A	Отсутствует	189	43	37
320-455	I34S	Отсутствует	144	27	23
320-456	I34Q	Отсутствует	214	52	46
320-457	I34D	Отсутствует	55	6	4
320-458	I34H	Отсутствует	239	59	53
320-459	I34K	Отсутствует	93	20	17
320-460	I34L	Отсутствует	441	114	105
320-461	I34W	Отсутствует	465	87	82
320-462	I34Y	Отсутствует	373	58	52
320-463*	N35A	Отсутствует	462	102	101
320-464*	N35S	Отсутствует	600	130	124
320-465	N35Q	Отсутствует	476	92	78
320-466	N35D	Отсутствует	360	93	86
320-467	N35H	Отсутствует	350	44	24
320-468	N35K	Отсутствует	200	2	2
320-469	N35L	Отсутствует	315	69	61
320-470	N35W	Отсутствует	329	2	3
320-471	N35Y	Отсутствует	312	3	4
320-472	Отсутствует	S90L	467	23	10
320-473	Отсутствует	Y91D	453	69	55
320-474	Отсутствует	L95K	596	2	4
320-475	Отсутствует	L95W	727	8	8
320-476	Y27K	Отсутствует	560	128	118

320-477*	S31H	Отсутствует	576	148	136
320-478	A60L	Отсутствует	379	85	77
320-479	A60W	Отсутствует	277	61	54
320-480	A60Y	Отсутствует	319	79	73
320-483	W50A	Отсутствует	492	4	6
320-484	W50S	Отсутствует	555	3	6
320-485	W50Q	Отсутствует	460	3	5
320-486	W50D	Отсутствует	178	1	2
320-487	W50H	Отсутствует	237	2	3
320-488	W50K	Отсутствует	293	1	2
320-489	W50L	Отсутствует	337	4	5
320-490	W50Y	Отсутствует	393	14	8
320-491	L51S	Отсутствует	356	85	76

* указывает на антитела, которые были выбраны для анализа активности.

Таблица 9

Эксперимент SPR - прогон 7 -
антитела против TL1A, связывающиеся с TL1A

Антитело	Замена в VH относительно 320-179	Замена в VL относительно 320-179	Уровень захвата	Уровень связывания TL1A (раннего)	Уровень связывания TL1A (позднего)
				Очищенное антитело	
320-179	Отсутствует	Отсутствует	301	61	56
320-492	L51Q	Отсутствует	439	89	82
320-493	L51D	Отсутствует	242	48	46
320-494	L51H	Отсутствует	811	150	138
320-495	L51K	Отсутствует	466	84	77
320-496	L51W	Отсутствует	581	93	87
320-497	N52A	Отсутствует	727	135	125
320-498	N52S	Отсутствует	485	90	82
320-499	N52Q	Отсутствует	551	122	113
320-500	N52D	Отсутствует	472	69	53
320-501	N52H	Отсутствует	533	118	108
320-502	N52K	Отсутствует	659	88	59
320-503	N52W	Отсутствует	484	41	6
320-504	N52Y	Отсутствует	500	88	65
320-505	P52aA	Отсутствует	570	118	110
320-506	P52aS	Отсутствует	444	97	89
320-507	P52aQ	Отсутствует	181	27	24
320-508	P52aD	Отсутствует	203	19	12
320-509	P52aH	Отсутствует	290	52	47
320-510	P52aK	Отсутствует	289	44	33
320-511	P52aL	Отсутствует	581	106	98
320-512	P52aW	Отсутствует	746	126	118
320-513	P52aY	Отсутствует	585	99	90
320-514	N53A	Отсутствует	516	96	88
320-515	N53S	Отсутствует	375	73	67
320-516	N53Q	Отсутствует	461	92	86
320-517	N53D	Отсутствует	493	55	50
320-518	N53H	Отсутствует	882	169	153
320-519	N53K	Отсутствует	993	217	196
320-520	N53L	Отсутствует	1016	174	162
320-521	N53W	Отсутствует	830	166	152
320-522	N53Y	Отсутствует	693	141	129

320-523	S54A	Отсутствует	476	88	82
320-524	S54Q	Отсутствует	292	55	49
320-525	S54D	Отсутствует	437	33	17
320-526	S54H	Отсутствует	672	134	124
320-527	S54K	Отсутствует	578	146	136
320-528	S54L	Отсутствует	829	121	108
320-529	S54W	Отсутствует	605	94	83
320-530	S54Y	Отсутствует	425	77	67
320-531	G55A	Отсутствует	331	66	61
320-532	G55S	Отсутствует	648	10	7
320-533	G55Q	Отсутствует	441	93	86
320-534	G55D	Отсутствует	647	109	102
320-535	G55H	Отсутствует	637	126	115
320-536	G55K	Отсутствует	553	115	105
320-537	G55L	Отсутствует	717	133	123
320-538	G55W	Отсутствует	318	54	49
320-539	N56A	Отсутствует	859	172	159
320-540	N56S	Отсутствует	500	100	92
320-541	N56Q	Отсутствует	504	94	84
320-542	N56D	Отсутствует	839	97	86
320-543	N56H	Отсутствует	597	138	126
320-544	N56K	Отсутствует	690	120	112
320-545	N56L	Отсутствует	518	109	100
320-546	N56W	Отсутствует	341	67	61
320-547*	N56Y	Отсутствует	318	77	75
320-548	T57A	Отсутствует	335	74	68
320-549	T57S	Отсутствует	269	50	45
320-550	T57Q	Отсутствует	635	112	103
320-551	T57D	Отсутствует	280	44	36
320-552	T57H	Отсутствует	595	104	97
320-553	T57K	Отсутствует	494	84	78
320-554	T57L	Отсутствует	506	66	51
320-555	T57W	Отсутствует	674	62	30
320-556	T57Y	Отсутствует	634	100	90
320-557	G58A	Отсутствует	378	26	6
320-558	G58S	Отсутствует	463	3	2
320-559	G58Q	Отсутствует	535	9	5
320-560	G58D	Отсутствует	907	36	9
320-561	G58H	Отсутствует	539	14	6

320-562	G58K	Отсутствует	326	2	1
320-563	G58L	Отсутствует	258	2	2
320-564	G58W	Отсутствует	345	72	67
320-565	G58Y	Отсутствует	545	43	12
320-566	Y59A	Отсутствует	720	120	110
320-567	Y59S	Отсутствует	590	96	86
320-568	Y59Q	Отсутствует	688	115	107
320-569	Y59D	Отсутствует	408	79	73
320-570	Y59H	Отсутствует	435	79	72
320-571	Y59K	Отсутствует	394	78	72
320-572	A60S	Отсутствует	459	98	90
320-573	A60Q	Отсутствует	338	67	62
320-574	A60D	Отсутствует	693	140	130
320-575	A60H	Отсутствует	581	121	110
320-576	A60K	Отсутствует	479	90	83
320-577	L51A	Отсутствует	479	98	90
320-578	L51Y	Отсутствует	415	83	77
320-579	N52L	Отсутствует	214	46	41
320-580	G55Y	Отсутствует	261	51	47
320-581	Y59L	Отсутствует	337	70	65
320-582	Y59W	Отсутствует	453	67	52

* указывает на антитела, которые были выбраны для анализа активности.

Таблица 10
Эксперимент SPR - прогон 8 - антитела против TL1A, связывающиеся с TL1A

Анти-тело	Замена в VH относительно 320-179	Замена в VL относительно 320-179	Уровень захвата	Уровень связывания TL1A (раннего)	Уровень связывания TL1A (позднего)
				Очищенное антитело	
320-179	Отсутствует	Отсутствует	402	98	86
320-583*	Отсутствует	G30A, Y91W	404	108	103
320-584*	Отсутствует	L31S, Y91W	399	103	98
320-585*	Отсутствует	L31Q, Y91W	406	116	109
320-586*	Отсутствует	H34L, Y91W	405	108	103
320-587*	N56Y	Y91W	402	123	122
320-588*	N56Y	G30A	409	128	123
320-589*	N56Y	L31S	399	120	109
320-590*	N56Y	L31Q	405	130	121
320-591*	N56Y	H34L	399	132	124
320-592*	N56Y	G30A, Y91W	408	128	129
320-593*	N56Y	L31S, Y91W	405	126	124
320-594*	N56Y	L31Q, Y91W	407	134	132
320-595*	N56Y	H34L, Y91W	403	129	128

* указывает на антитела, которые были выбраны для анализа активности.

Таблица 11

Эксперимент SPR - прогон 9 -
антитела против TL1A, связывающиеся с TL1A

Антитело	Замена в VH относительно 320-179	Замена в VL относительно 320-179	Уровень захвата	Уровень связывания TL1A (раннего)	Уровень связывания TL1A (позднего)
				Очищенное антитело	
320-179	Отсутствует	Отсутствует	402	108	98
320-596	Отсутствует	Y91F	405	95	85
320-597	Отсутствует	L31Q, Y91F	401	115	105
320-598	Отсутствует	H34L, Y91F	403	112	101
320-599	Отсутствует	L31S, Y91F	411	113	103
320-600	Отсутствует	G30A, Y91F	399	111	104
320-601*	N56Y	Y91F	409	121	120
320-602	N56Y	L31Q, Y91F	399	131	125
320-603	N56Y	H34L, Y91F	394	126	118
320-605	N56Y	G30A, Y91F	399	125	120
320-611*	N56Y	Y91W, G93K	397	125	127
320-612	Отсутствует	Y91W, G93Y	400	126	120
320-613*	N56Y	Y91W, G93Y	408	135	131
320-614	N56Y	G93K	401	122	111
320-615	N56Y	G93Y	393	113	108
320-616	N56Y	G93A	396	120	112

* указывает на антитела, которые были выбраны для анализа активности.

Антитела, которые имели уровни захвата, сходные или лучше, чем у 320-179, а также значения уровня связывания TL1A (раннего) и уровня связывания TL1A (позднего), которые были в подобном диапазоне, были взяты для анализа активности. Эти варианты указаны штриховкой в табл. 3-11. Сравнение скорости диссоциации, измеренной при помощи SPR для нескольких антител, показано на фиг. 5. Некоторые из антител диссоциировали с меньшей скоростью, чем исходное антитело 320-179.

2.2. Антитела против TL1A с улучшенной активностью в клеточном анализе.

Для определения того, коррелируют ли улучшенная скорость диссоциации с усиленной активностью очищенного антитела, варианты исследовали в анализе TL1A-индуцированной активности каспазы в клетках TF-1. Эффективные антитела действуют путем связывания с TL1A и ингибируют активацию TL1A рецептора DR3. Этот рецептор запускает путь апоптоза, в котором каспазы активируются и могут быть обнаружены с использованием коммерческих реагентов. В каждом эксперименте вариант антитела сравнивали с 320-179 по кратности улучшения активности. Результаты приведены в табл. 12.

Таблица 12

Анализ TL1A-индуцированной каспазной активности в клетках TF-1. Ингибирование антителами против TL1A

Антитело	Замена в VH относительно 320-179	Замена в VL относительно 320-179	ИК ₅₀ антитела (мкг/мл)	ИК ₅₀ 320-179 (мкг/мл)	Кратность улучшения
320-184	Отсутствует	L79A	0,010	0,030	3
320-185	Отсутствует	L79S	0,020	0,030	2
320-186	Отсутствует	L79Q	0,030	0,030	1
320-187	Отсутствует	L79D	0,020	0,040	2
320-188	Отсутствует	L79H	0,010	0,040	4
320-189	Отсутствует	L79K	0,110	0,040	0
320-190	Отсутствует	L79W	0,020	0,040	2
320-191	Отсутствует	L79Y	0,020	0,040	2
320-198	Отсутствует	T24L	0,010	0,010	1

320-201	Отсутствует	S25A	0,005	0,010	2
320-202	Отсутствует	S25Q	0,010	0,010	1
320-205	Отсутствует	S25K	0,020	0,030	2
320-207	Отсутствует	S25W	0,007	0,020	3
320-209	Отсутствует	S26A	0,040	0,020	1
320-211	Отсутствует	S26D	0,010	0,030	3
320-213	Отсутствует	S26K	0,070	0,030	0
320-219	Отсутствует	S27D	0,020	0,030	2
320-226	Отсутствует	S27aQ	0,030	0,020	1
320-229	Отсутствует	S27aK	0,040	0,060	2
320-241	Отсутствует	I27cA	0,020	0,010	1
320-244	Отсутствует	I27cD	5,030	0,010	0
320-245	Отсутствует	I27cH	0,540	0,010	0
320-263	Отсутствует	A29K	0,003	0,010	3
320-267	Отсутствует	G30A	0,010	0,040	4
320-277	Отсутствует	L31S	0,003	0,010	3
320-278	Отсутствует	L31Q	0,010	0,020	2
320-280	Отсутствует	L31H	0,006	0,020	3
320-297	Отсутствует	V33H	0,005	0,020	4
320-302	Отсутствует	H34A	0,010	0,020	2
320-307	Отсутствует	H34L	0,010	0,040	4
320-313	Отсутствует	Q89H	0,020	0,030	2
320-314	Отсутствует	Q89K	0,020	0,030	2
320-318	Отсутствует	S90A	0,020	0,050	3
320-326	Отсутствует	Y91S	0,030	0,050	2
320-328	Отсутствует	Y91H	0,020	0,020	1
320-331	Отсутствует	Y91W	0,002	0,020	10
320-345	Отсутствует	G93K	0,020	0,010	1
320-361	Отсутствует	L95D	0,010	0,010	1
320-443	Y32K	Отсутствует	0,060	0,060	1
320-445	Y32W	Отсутствует	0,030	0,060	2
320-463	N35A	Отсутствует	0,020	0,050	3
320-464	N35S	Отсутствует	0,030	0,050	2
320-477	S31H	Отсутствует	0,030	0,040	1
320-547	N56Y	Отсутствует	0,004	0,040	10
320-583	Отсутствует	G30A, Y91W	0,003	0,080	27
320-584	Отсутствует	L31S, Y91W	0,008	0,080	10
320-585	Отсутствует	L31Q, Y91W	0,003	0,040	13
320-586	Отсутствует	H34L, Y91W	0,002	0,050	25
320-587	N56Y	Y91W	0,001	0,040	40
320-588	N56Y	G30A	0,004	0,020	5
320-589	N56Y	L31S	0,020	0,020	1
320-590	N56Y	L31Q	0,006	0,020	3
320-591	N56Y	H34L	0,002	0,020	10
320-592	N56Y	G30A, Y91W	0,003	0,020	7
320-593	N56Y	L31S, Y91W	0,004	0,060	15
320-594	N56Y	L31Q, Y91W	0,005	0,060	12
320-595	N56Y	H34L, Y91W	0,003	0,060	20
320-601	N56Y	Y91F	0,002	0,020	10
320-611	N56Y	Y91W, G93K	0,005	0,040	8
320-613	N56Y	Y91W, G93Y	0,010	0,040	4

** Для нескольких антител с кратностью улучшения, превышающей 10-кратное повышение в активности, проводили до n=7 анализов. Результаты соответствовали данным, приведенным в этой таблице. На фиг. 7 показаны n=4 повторов нескольких антител с улучшенной активностью по сравнению с 320-179.

Как показано в табл. 12 и на фиг. 6, некоторые из тестируемых антител с одной заменой обладают превосходной активностью по сравнению с 320-179. Из всех тестируемых вариантов антитела с одной заменой два имели более чем 10-кратное повышение активности по сравнению с 320-179. Этими вариантами являлись 320-331 (который содержал замену Y91W в вариательной области легкой цепи) и 320-547 (который содержал замену N56Y в вариательной области тяжелой цепи) (фиг. 6). Этот результат является неожиданным, поскольку, как правило, CDR3 VH антитела преимущественно участвует в связывании антител, тогда как наоборот замена N56Y оказывает существенное влияние на связывание в CDR2 VH антитела. Когда были сделаны варианты с Y91W из VL или отдельно N56Y в VH с другими заменами, которые улучшали активность, были получены высокоактивные антитела. Когда замена Y91W в VL была объединена с заменой N56Y в VH в одном антителе, 320-587, кратность увеличения активности по сравнению с 320-179 составляла 40. На фиг. 7 показаны четыре разных повторных эксперимента, демонстри-

рующих увеличение активности четырех антител 320-587, 320-591, 320-592 и 320-601 по сравнению с 320-179. Последовательности этих антител с повышенной активностью по сравнению с 320-179 показаны на фиг. 3 (вариабельная область тяжелой цепи) и на фиг. 4 (вариабельная область легкой цепи).

Проведено сравнение активности 320-587 по сравнению с другими ранее описанными антителами против TL1A. Эти ранее описанные антитела включают антитело 1681N, описанное в патенте США № 8642741 (VH представляет собой SEQ ID NO: 18, VL представляет собой SEQ ID NO: 26), антитело VH5/VL1 из публикации США № 2014/0308271 (VH представляет собой SEQ ID NO: 24, VL представляет собой SEQ ID NO: 17), гуманизованное 1B4, как описано в патенте США № 8263743 (VH представляет собой SEQ ID NO: 74, VL представляет собой SEQ ID NO: 75) и 320-168 (также называемое C320-168), как описано в публикации США № 2014/0255302A1 (VH представляет собой SEQ ID NO: 181, VL представляет собой SEQ ID NO: 194). На фиг. 8 показано, что 320.587 обладает превосходной эффективностью в анализе на основе клеток по сравнению с этими ранее описанными антителами, что делает его наиболее эффективным антителом против TL1A.

2.3. Анализ конкурентного связывания с рецепторами DR3 и DcR3.

Антитела, которые проявляли повышенную активность по сравнению с 320-179, подвергали скринингу на их способность ингибировать связывание TL1A с его сигнальным рецептором DR3 или рецептором-приманкой DcR3. Все тестируемые антитела против TL1A показали ингибирование связывания TL1A с DR3 по сравнению с изотипическим контролем (фиг. 9). Это подтверждает, что антитела ингибируют активность TL1A, блокируя взаимодействие TL1A-DR3.

В предыдущих экспериментах, описанных в публикации США № 2014/0255302A1 (пример 4), антитело 320-179 (320-179) тестировали в анализе конкурентного связывания с рецепторами и показали, что оно селективно ингибирует связывание TL1A с DR3, но не с DcR3 (фиг. 10). В экспериментах, представленных в данном документе на фиг. 10, снова показано, что 320-179 не ингибирует взаимодействие TL1A-DcR3. Это контрастирует с протестированными улучшенными антителами против TL1A. Антитела с улучшенной активностью в анализе клеток TF-1 (как описано в разделе 2.2), включая антитело 320-587, закономерно ингибировали взаимодействие TL1A-DcR3.

Таким образом, исходное антитело 320-179 способно ингибировать взаимодействие TL1A-DR3, но не взаимодействие TL1A-DcR3. Несколько антител с повышенной эффективностью, таких как 320-267 (VH представляет собой SEQ ID NO: 1, VL представляет собой SEQ ID NO: 11), 320-277 (VH представляет собой SEQ ID NO: 1, VL представляет собой SEQ ID NO: 12), 320-278 (VH представляет собой SEQ ID NO: 1, VL представляет собой SEQ ID NO: 13) и 320-591 (VH представляет собой SEQ ID NO: 3, VL представляет собой SEQ ID NO: 9) ингибирует взаимодействие TL1a-DR3, но не взаимодействие TL1A-DcR3. Несколько антител с повышенной активностью, таких как 320-331, 320-547, 320-583, 320-584, 320-585, 320-586, 320-587 и варианты этих антител, способны ингибировать взаимодействия как TL1A-DR3, так и TL1A-DcR3.

2.4. Видовая перекрестная реактивность 320-587 была проверена на их способность связываться с рекомбинантно продуцируемым TL1A от разных видов. Антитело связывало TL1A всех испытуемых видов (фиг. 11). Связывание 320-587 с TL1A человека, крысы, морской свинки, собаки, кошки, яванского макака имело медленную скорость диссоциации, что указывало на высокое аффинное взаимодействие. Антитело связывало TL1A мыши и кролика и обладало быстрой скоростью диссоциации.

2.5. Доклинические модели эффективности для тестирования антител против TL1A на следующих животных моделях заболевания.

Астма - аллерген-индуцированная астма. Грызуна (мышь, крысу или морскую свинку) сенсибилизировали внутрикожной инъекцией овальбумина (OVA), особенно OVA, полученного из куриных яиц, с добавлением квасцов, а затем стимулировали по меньшей мере через 2 недели путем опрыскивания распыленным OVA, вызывая симптомы астмы, включая гиперреактивность дыхательных путей, приток эозинофилов и увеличение производства цитокинов (например, Hylkema et al., 2002, Clin. Exp. Immunol., 129:390-96). Такая модель может быть изменена путем повторной стимуляции, чтобы обеспечить профиль более хронической болезни с увеличением ремоделирования дыхательных путей и индукции фиброза (например, Bos et al., 2007, Eur. Respir. J., 30:653-661). Альтернативные аллергены, такие как пылевой клещ, также могут быть использованы (например, Lambert et al., 1998, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 157:1991-9). Альтернативно примат, отличный от человека (например, яванский макак), может быть сенсибилизирован и подвергнут стимуляции экзогенным антигеном, таким как *Ascaris suum*, что приводит к гиперреактивности дыхательных путей, притоку эозинофилов и увеличению продуцирования цитокинов (например, Wegner et al., 1991, J. Allergy Clin. Immunol., 87:835-41).

ХОБЛ - воспаление дыхательных путей, вызванных дымом. Грызун (мышь, крыса или морская свинка) будет подвергаться воздействию сигаретного дыма 3-7 раз в неделю в течение как минимум 4 недель, что приводит к легочному заболеванию, сходному с ХОБЛ, которое характеризуется скоплением в легких нейтрофилов, увеличением продукции воспалительных цитокинов, фиброзом легких и легкой гипертензией (например, Davis et al. (2012), PLoS One, 7:e33304). Более тяжелая форма заболевания может быть вызвана внесением повторной бактериальной или вирусной инфекции в легкие во время воздействия дыма (например, Li et al. (2012), Biol. Pharm. Bull., 35:1752-60). Грызуны с ХОБЛ, индуциро-

ванными дымом, будут получать лечение антителами против TL1A и проверены на эффективность лечения.

Легочный фиброз - блеомицин-индуцированный легочный фиброз. Грызун (мышь, крыса или морская свинка) будет получать лечение блеомицином или путем интратрахеальной/интраназальной инстилляции или путем внутривенной инъекции один или два раза в неделю в течение по меньшей мере 3 недель. Эта методика индуцирует значительный и стабильный легочный фиброз (например, Pinart et al. (2009), *Resp. Physiol., Neurobiol.*, 166:41-46). Грызуны с блеомицин-индуцированным легочным фиброзом будут получать лечение антителами против TL1A и будут проверены на эффективность лечения.

Кистозный фиброз - хорьковая модель с нокаутом CFTR (трансмембранный регулятор кистозного фиброза). У хорьков, гомозиготных по нокаутному гену или с известными мутациями, связанными с болезнью, CFTR (ген, являющийся причиной кистозного фиброза) спонтанно развивается заболевание подобное кистозному фиброзу, характеризующееся обструкцией слизистых оболочек дыхательных путей, ателектазом, интерстициальной пневмонией и повторными легочными инфекциями с прогрессирующей бактериальной колонизацией легких (например, Sun et al. (2014), *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 50:502-12). CFTR^{-/-} хорьки будут получать лечение антителами против TL1a и будут проверены на эффективность лечения.

Синдром раздраженного кишечника - стресс-индуцированная висцеральная гиперчувствительность. Стресс будут индуцировать у крыс или разлучением новорожденного с матерью (например, Coutinho et al. (2002), *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 282:G307-16), или ограничение двигательных функций взрослых (например, Shen et al. (2010), *J. Neurogastroenterol. Motil.*, 16:281-90). Ожидается, что это приведет к измененной перистальтики толстой кишки и висцеральной гиперчувствительности, подобной той, которая наблюдается у пациентов с IBS. Крысы, подвергнутые стрессу, будут получать лечение антителами против TL1A и будут проверены на эффективность лечения.

Ревматоидный артрит - коллаген-индуцированный артрит. Грызун (мышь, крыса или морская свинка) будет иммунизирован и стимулирован коллагеном в адьюванте. У животных развивается двусторонний отек ног и эритема, воспалительный инфильтрат в области суставов и повреждение суставов (например, Bendele et al. (1999), *Toxicol. Pathol.*, 27:134-42). Грызуны с коллагеном-индуцированным артритом будут получать лечение антителами против TL1A и будут проверены на эффективность лечения.

Эозинофильный эзофагит - интраназальный эозинофильный эзофагит, индуцированный *Aspergillus fumigatus*. У мышей, подвергшихся повторной интраназальной инстилляцией *A. fumigatus*, развивается выраженная эозинофилия пищевода, эпителиальная дисплазия и гиперплазия и свободные эозинофильные гранулы (например, Mishra et al. (2001), *J. Clin. Invest.*, 107:83-90). Аналогичным образом повторное воздействие аэрозоля с овальбумином в течение двух недель у сенсibilизированных морских свинок вызывает эозинофилию пищевода с инфильтрацией как эозинофилов, так и тучных клеток в эпителиальный слой (например, Liu et al. (2015), *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 308:G482-488). Мышей или морских свинок с эозинофильным эзофагитом будут лечить антителами против TL1A и проверять на эффективность лечения.

2.6. Использование антител против TL1A при выявлении образцов, содержащих TL1A, антитела согласно раскрытию могут быть использованы для выявления TL1A в образцах человека. 320-587 использовали для выявления TL1A человека, секретируемого из человеческих МКПК, стимулированных иммунными комплексами (фиг. 13) в формате ИФА. 320-587 также использовали для обнаружения популяции человеческих МКПК, которые экспрессируют мембранный TL1A на их поверхности в экспериментах по проточной цитометрии (фиг. 14).

2.7. Определение аффинности связывания антитела против TL1A с TL1A человека при помощи анализа кинетического исключения.

Время достижения равновесия с 320-587 как СВР. Сначала измеряли скорость K_{on} для взаимодействия 320-587/TL1A. Вкратце раствор получали путем смешивания 320-587 и TL1A, а аликвоты удаляли в различные моменты времени в течение 3 ч. Свободный 320-587 был захвачен путем пропускания раствора через колонку, заполненную шариками сефарозы, покрытыми 20 мкг/мл TL1A. Захваченный 320-587 был выявлен с использованием Alexa Fluor® 647-конъюгированного антитела против иммуноглобулина человека (0,5 мкг/мл). Этот анализ повторяли два раза, получая скорости K_{on} $8,35 \times 10^5$ и $7,45 \times 10^5$ Ms^{-1} со средней скоростью K_{on} $7,90 \times 10^5$ Ms^{-1} . Затем скорость K_{on} использовали для оценки времени, необходимого для достижения равновесия при различных концентрациях 320-587, используя инструмент для получения теоретической кривой связывания, представленный на веб-сайте Sapidyne (www.Sapidyne.com).

Определение K_D с использованием 320-587 как СВР. СВР, 320-587, разводили в аналитическом буфере (DPBS (фосфатно-солевой буфер Дюльбекко), дополненном 1 мг/мл BSA (бычий сывороточный альбумин)) до конечных концентраций 15, 50 и 150 пМ. Титрант TL1A человека разбавляли в аналитическом буфере для создания серии концентраций 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 и 3000 пМ. Используя время достижения равновесия, определенное выше, кривым, которые содержали или 50, или 150 пМ 320-587, позволили прийти к равновесию в инкубаторе при 25°C в течение 2 суток. Кривым, которые

содержали 15 пМ 320-587, позволили прийти к равновесию в инкубаторе при 25°C в течение 3 суток. После периода уравнивания свободную фракцию 320-587 в каждой реакции количественно определяли, как описано выше. Значения K_D определяли с использованием анализа n-кривой кривых равновесия, генерируемых с 15, 50 и 150 пМ 320-587.

Время достижения равновесия с TL1A как СВР. Время достижения равновесия в этой ориентации оценивали с использованием K_{on} для взаимодействия 320-587/TL1A, определенного как описано выше в 2.8. В этом формате свободную фракцию TL1A захватывали путем пропускания раствора через колонку, заполненной шариками ПММА, покрытыми 30 мкг/мл 320-587. Захваченный TL1A был выявлен с использованием антитела против 6x-his DyLight 650 (0,75 мкг/мл). Этот анализ повторяли два раза, получая скорости K_{on} $6,11 \times 10^5$ и $5,74 \times 10^5$ Ms^{-1} со средней скоростью K_{on} $5,93 \times 10^5$ Ms^{-1} .

Определение K_D с использованием TL1A как СВР. СВР, человеческий TL1A, разводили в буфере для анализа до конечных концентраций 30, 100 и 300 пМ. Титрант 320-587 разбавляли в аналитическом буфере для создания серии концентраций 0,05, 0,15, 0,5, 1,5, 5, 15, 50, 150, 500, 1500 и 5000 пМ.

Используя время достижения равновесия, определенное выше, всем кривым позволили прийти к равновесию в инкубаторе при 25°C в течение 3 суток. После периода уравнивания свободную фракцию TL1A в каждой реакции количественно определяли, как описано выше. Значения K_D определяли с использованием анализа n-кривой кривых равновесия, генерируемых с 30, 100 и 300 пМ TL1A.

Хорошее соответствие наблюдали для двух методов KinExA, а также относительно низкой % ошибкой. Значение K_D для взаимодействия TL1A с 320-587, определяемое с использованием 320-587 в качестве СВР, составляло $40,97 \pm 8,33$ пМ (табл. 13), тогда как K_D , полученный с использованием TL1A в качестве СВР, составляла $41,52 \pm 13,5$ пМ (табл. 14).

Таблица 13

Аффинность. Шарика сефарозы, покрытые TL1A; 320-587 как СВР

Анализ №	K_D (пМ)	% ошибка
1	40,43	4,57
2	52,03	5,61
3	46,31	4,76
4	32,42	3,74
5	33,66	3,9
Среднее	40,97	
SD (стандартное отклонение)	8,33	
% CV (Коэффициент вариации)	20	

Таблица 14

Аффинность. Шарика ПММА, покрытые 320-587; TL1A как СВР

Анализ №	K_D (пМ)	% ошибка
1	33,39	5,33
2	57,1	5,51
3	34,07	3,9
Среднее	41,52	
SD (стандартное отклонение)	13,5	
% CV (Коэффициент вариации)	33	

3.0. Доклинические модели эффективности для тестирования антител против TL1a.

3.0.1. Астма.

Острая овальбумин-индуцированная астма у крыс. Серых крыс сенсibilizировали OVA при помощи и/п инъекции на 0 сутки, а затем стимулировали аэрозолем OVA ежедневно на 35-42 сутки. Крыс лечили антителом 320-587 или носителем при помощи в/в инъекции на 14, 21, 28 и 35 сутки. Жидкость бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ) оценивали на общие и дифференцированные клетки на 43-е сутки. Было обнаружено, что лечение значительно снижает количество эозинофилов в ЖБАЛ (фиг. 15).

Хроническая овальбумин-индуцированная астма у крыс. Крыс сенсibilizировали с использованием OVA с добавлением квасцов при помощи и/п инъекции на 0 и 7 сутки, а затем стимулировали аэрозолем с OVA два раза в неделю в течение 3 недель, начиная с 14 и до 31 суток, и 5 суток подряд с 37 по 42 сутки. Животных лечили антителом 320-587 или носителем при помощи в/в инъекций на 24, 29, 34 и 39 сутки. ЖБАЛ оценивали на общие и дифференцированные клетки и панель цитокинов на 43-е сутки. Срезы легких окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) и шифф-йодной кислотой (ШИК) и оценивали по ряду патологий. Лечение 320-587 значительно уменьшало эозинофилы и макрофаги ЖБАЛ (фиг. 17A и 17B), ИЛ-4 и ИЛ-13 ЖБАЛ (фиг. 17C), гиперплазию бокаловидных клеток (фиг. 17D) и толщину бронхиального эпителиального слоя (фиг. 17E) по сравнению с носителем.

Острая овальбумин-индуцированная астма у морских свинок. Самцы морских свинок Dunkin Hart-

леу были сенсibilизированы овальбумином, после чего им была сделана операция по установке баллонного катетера для измерения функции легких и ранних и поздних астматических реакций. На 16, 20, 24 и 28 сутки животных получали и/п инъекции с антителом 320-587 или носителем. Стимуляция аэрозолем с овальбумином (0,05-0,1%) проводили через 30 мин после последнего лечения. Реактивность дыхательных путей (AHR) к гистамину измеряли за 24 ч до стимуляции, через 6 ч после стимуляции (сразу после ранней астматической реакции) и через 24 ч после стимуляции (сразу после поздней астматической реакции). Природу и продолжительность ранних и поздних астматических реакций также регистрировали путем онлайн-регистрации функции легких в течение всего 24-часового периода. Животных умерщвляли через 25 ч после стимуляции и проводили бронхоальвеолярный лаваж. ЖБАЛ оценивали на общие и дифференцированные клетки. Лечение с помощью 320-587 значительно уменьшало количество как эозинофилов, так и макрофагов в ЖБАЛ (фиг. 16А и 16В), а также улучшение AHR после ранней астматической реакции (фиг. 16С) и общей величину ранней астматической реакции (фиг. 16D) по сравнению с носителем.

Хроническая овальбумин-индуцированная астма у морских свинок. Самцы морских свинок Dunkin Hartley были сенсibilизированы овальбумином, а через 4 недели после этого стимулировали овальбумином еженедельно в течение 12 недель. Стимуляцию овальбумином (0,05-0,5%) проводили путем ингаляции аэрозольного раствора до тех пор, пока не определили обструкцию дыхательных путей. Животные получали лечение антителом 320-587 или носителем при помощи и/п инъекций каждые 5 суток, начиная с 8-й недели стимуляции овальбумином. Функцию дыхательных путей с помощью реактивности дыхательных путей к гистамину измеряли до первичной стимуляции, за 24 ч до конечной стимуляции и через 6 ч после конечной стимуляции. Несмотря на то что никакого эффекта на AHR, вызванного стимуляцией гистамином, не наблюдали, антитело 320-587 значительно уменьшало аллергическую реакцию на OVA, так как для индуцирования обструкции дыхательных путей были необходимы постепенно возрастающие дозы OVA (фиг. 18).

Считается, что различия в терапевтическом эффекте антител, наблюдаемом в моделях острой и хронической астмы у морских свинок, являются следствием самой модели. Считается, что в хронической модели степень AHR уменьшается со временем и, соответственно, становится менее чувствительной к лечению. В данной области острая модель обычно используется для наблюдения сложных эффектов реактивности дыхательных путей, а хроническая модель обычно используется для наблюдения сложных эффектов ремоделирования дыхательных путей. Оценки ремоделирования продолжаются. Тем не менее было удивительно наблюдать антитела, имеющие влияние на реакцию на аллерген, хотя на этой стадии антитело практически не влияло на абсолютный AHR (ответ на гистамин), это значительно уменьшило прямой аллергический ответ на антиген.

3.0.2. Воспалительное заболевание кишечника.

TNBS-индуцированный колит у крыс. Крыс получали однократную дозу тринитробензолсульфоновой кислоты в этаноле путем внутриванальной инстилляции. Контрольные животные получали эквивалентный объем этанола. В течение 7 суток у животных развился очаговой колит, характеризующийся изъязвлением толстой кишки с воспалительным инфильтратом и различной степенью фиброза (например, в Wirtz et al. (2007), Nat. Protoc., 2:541-546). Введение 320-587 значительно уменьшило множественные симптомы заболевания, включая толщину толстой кишки (фиг. 12А), количество и тяжесть спаек (фиг. 12В), а также количество и тяжесть стриктур (фиг. 12С), что привело к значительно более легкому течению заболевания, чем у животных, получавших или носитель, или связанное с изотипически сходным нерелевантным антителом (фиг. 12D). Уменьшенный фиброз толстой кишки (фиг. 19) также наблюдали у животных, получавших лечение 320-587.

Сравнение болезни через 7 и 14 суток при DNBS-индуцированном колите у крыс. Колит индуцировали, как описано выше, используя динитробензолсульфоновую кислоту (DNBS) вместо TNBS, а крысы, используемые в экспериментах DNBS, были крысами линии Wistar. Животных лечили антителом 320-587 или носителем при помощи в/в инъекций на 1 и 8 сутки. Группы оценивали по колитам на 7 и 14 сутки после введения DNBS и тяжести заболевания между двумя точками времени. Лечение антителом 320-587 имело ограниченный эффект на 7-е сутки, но на 14-е сутки животные, получавшие лечение антителом 320-587, показали значительное улучшение в массе и длине толстой кишки (фиг. 20А), фиброзе (фиг. 20В), воспалительном инфильтрате (фиг. 20С) и повреждении толстой кишки (фиг. 20D). Репрезентативные срезы язвы ободочной кишки (фиг. 20Е) демонстрируют степень восстановления повреждений и уменьшения фиброза через 14 суток. На 7- и 14-е сутки животные, получавшие носитель, имели обширный воспалительный инфильтрат и фиброз со значительной потерей кишечной архитектуры. Напротив, животные, получавшие лечение 320-587, показали значительный воспалительный инфильтрат, фиброз и потерю кишечной архитектуры на 7-е сутки, но эти эффекты в значительной степени изменились за 14 суток.

Различия, наблюдаемые в терапевтических эффектах антител, наблюдаемых в моделях TNBS и DNBS, как полагают, возникли из-за использования различных линий крыс (Sprague-Dawley для TNBS против Wistar для DNBS). У каждой линии крыс есть различия в их ответах на иммунизацию, так что считается, что кинетика их реакции в этих моделях различна. Кроме того, TNBS и DNBS отличаются

структурно и, как полагают, вызывают изменения в течении заболевания.

Хронический (21-суточный) DSS-индуцированный колит у крыс. Крысам давали декстран сульфата натрия (DSS) в концентрации 5% мас./об. в питьевой воде в течение 7 суток, затем 2% мас./об. в питьевой воде в течение еще 14 суток. У животных развилась диарея, диффузное воспаление толстой кишки, гиперплазия бокаловидных клеток и повреждение эпителия крипт и язвы (например, Randhawa et al. (2014), Korean J. Physiol. Pharmacol., 18:279-88). Крыс лечили антителом 320-587 или носителем путем внутривенной инъекции на 5, 12 и 19 сутки. Животных взвешивали и оценивали на клинические проявления болезни (диарея и скрытая кровь) ежедневно, а массу и длину толстой кишки оценивали на 21 сутки. Лечение антителом 320-587 существенно изменило DSS-индуцированное замедление прироста веса (фиг. 21A), улучшило клинические симптомы заболевания (фиг. 21B) и улучшило массу и длину толстой кишки (фиг. 21C).

Индукция внутрибрюшинных цитокинов при помощи рекомбинантного TL1A человека. Внутрибрюшинная инъекция рекомбинантного мышшиного TL1A может индуцировать продуцирование воспалительных цитокинов, таких как ИЛ-5. В этом исследовании мыши получали разовую или антитела 320-587, или носителя, а через час получали 40 мкг/мышь рекомбинантного TL1A человека (rhTL1A). Через 6 ч после введения rhTL1A получали перитонеальный лаваж и оценивали перитонеальную жидкость на содержание цитокинов и хемокинов с помощью мультиплексного анализа. Лечение антителом 320-587 значительно уменьшало перитонеальные концентрации цитокинов Г-КСФ (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), ИЛ-1b, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-17 и хемокинов IP-10, KC (хемокина кератиноцитов), МХБ-1 (моноцитарный хемоаттрактантный белок-1), МБВ-1a, МБВ-1b, МБВ-2 (МБВ - воспалительный белок макрофагов) (фиг. 22).

Раскрытие изобретения не ограничивается вариантами осуществления, описанными и проиллюстрированными примерами выше, но допускает изменения и модификации в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, при условии, что аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи одновременно не являются аминокислотной последовательностью переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, содержащей указанные последовательности указанных CDR1, CDR2, CDR3 переменной области тяжелой цепи, и последовательностью переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 2, содержащей указанные последовательности указанных CDR1, CDR2, CDR3 переменной области легкой цепи, причем указанное антитело специфически связывается с ФНО-подобным лигандом 1A (TL1A).

2. Рекомбинантное антитело по п.1, отличающееся тем, что CDR2 переменной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDR1 переменной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и CDR3 переменной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

3. Рекомбинантное антитело по п.1 или 2, содержащее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

4. Рекомбинантное антитело по п.1 или 2, содержащее переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

5. Рекомбинантное антитело по п.1, содержащее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

6. Рекомбинантное антитело по любому из пп.1-3, содержащее переменную область тяжелой цепи, включающую триптофан (W) на месте остатка 91.

7. Рекомбинантное антитело по п.1, где

(a) CDR2 переменной области тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, а CDR3 переменной области легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

(b) CDR2 переменной области тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, а CDR3 переменной области легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(c) CDR2 переменной области тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, CDR1 переменной области легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, а CDR3 переменной области легкой цепи включает аминокислотную последователь-

взаимодействие TL1A с рецептором смерти 3 (DR3).

10. Рекомбинантное антитело по любому из пп.1-9, отличающееся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.

11. Рекомбинантное антитело по любому из пп.1-10, отличающееся тем, что антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1 человека.

12. Рекомбинантное антитело по п.11, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 66.

13. Рекомбинантное антитело по любому из пп.1-10, отличающееся тем, что антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG4 человека.

14. Рекомбинантное антитело по п.13, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи IgG4 человека содержит SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 69.

15. Рекомбинантное антитело по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG2 человека.

16. Рекомбинантное антитело по п.15, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи IgG2 человека содержит SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71.

17. Рекомбинантное антитело по любому из пп.1-16, отличающееся тем, что антитело содержит константную область легкой цепи лямбда антитела человека.

18. Рекомбинантное антитело по п.17, отличающееся тем, что константная область легкой цепи лямбда антитела человека содержит SEQ ID NO: 48.

19. Рекомбинантное антитело по п.17, отличающееся тем, что антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

20. Рекомбинантное антитело по п.11 или 19, отличающееся тем, что рекомбинантное антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

21. Рекомбинантное антитело по любому из пп.1-20, отличающееся тем, что K_D для TL1A составляет от около 30 пМ до около 60 пМ, как измерено при помощи анализа кинетического исключения.

22. Рекомбинантное антитело по любому из пп.1-21, отличающееся тем, что K_D для TL1A составляет от около 35 пМ до около 50 пМ, как измерено при помощи анализа кинетического исключения.

23. Рекомбинантное антитело по любому из пп.1-22, отличающееся тем, что K_D для TL1A составляет от около 35 пМ до около 42 пМ, как измерено при помощи анализа кинетического исключения.

24. Рекомбинантное антитело по любому из пп.1-23, отличающееся тем, что TL1A представляет собой TL1A человека.

25. Рекомбинантное антитело по любому из пп.1-23, отличающееся тем, что TL1A представляет собой TL1A примата, отличного от человека.

26. Рекомбинантное антитело по любому из пп.1-23, отличающееся тем, что TL1A представляет собой TL1A млекопитающего, отличного от человека.

27. Рекомбинантное антитело по п.26, отличающееся тем, что млекопитающее, отличное от человека, представляет собой мышь, крысу, кролика, морскую свинку, кошку, собаку или свинью.

28. Композиция для связывания TL1A, содержащая рекомбинантное антитело по любому из пп.1-27 и фармацевтически приемлемый носитель.

29. Применение рекомбинантного антитела по любому из пп.1-27 для лечения заболевания дыхательных путей.

30. Применение по п.29, в котором заболевание дыхательных путей является астмой, ХОБЛ, саркоидозом легких, аллергическим ринитом или легочным фиброзом.

31. Применение рекомбинантного антитела по любому из пп.1-27 для лечения кистозного фиброза.

32. Применение рекомбинантного антитела по любому из пп.1-27 для лечения заболевания желудочно-кишечного тракта.

33. Применение по п.32, в котором заболеванием желудочно-кишечного тракта является воспалительное заболевание кишечника, колит или язвенный колит, синдром раздраженного кишечника или болезнь Крона.

34. Применение по п.32, в котором заболеванием желудочно-кишечного тракта является эозинофильный эзофагит.

35. Применение по п.31 или 32 для лечения заболевания желудочно-кишечного тракта, связанного с кистозным фиброзом.

36. Применение рекомбинантного антитела по любому из пп.1-27 для лечения артрита или ревматоидного артрита.

37. Применение рекомбинантного антитела по любому из пп.1-27 для лечения заболевания кожи.

38. Применение по п.37, в котором заболеванием кожи является атопический дерматит, экзема или склеродермия.

39. Трансформированная клетка, которая экспрессирует антитело по любому из пп.1-27, где эта клетка содержит экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий указанное антитело.

40. Трансформированная клетка по п.39, отличающаяся тем, что клетка представляет собой клетку

млекопитающего.

41. Трансформированная клетка по п.39, отличающаяся тем, что клетка млекопитающего представляет собой клетку яичника китайского хомячка.

42. Трансформированная клетка по п.39, отличающаяся тем, что клетка млекопитающего представляет собой клетку НЕК 293.

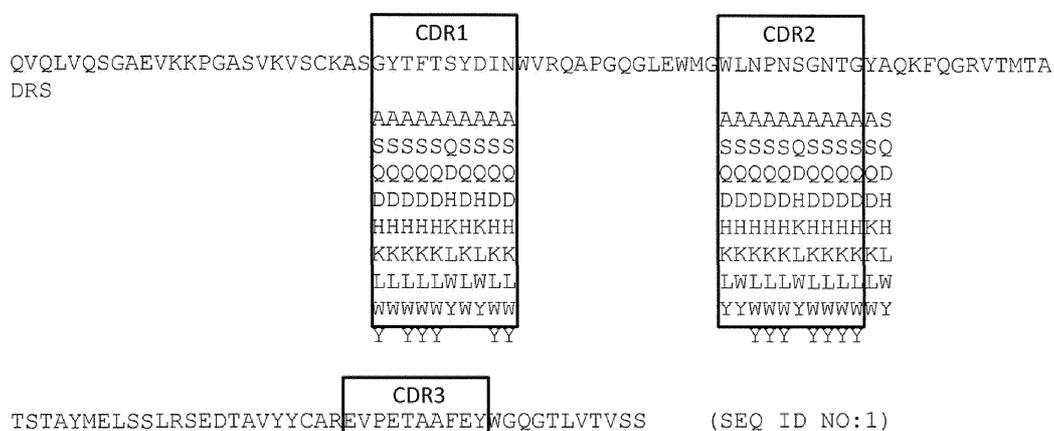
43. Применение по любому из пп.29-38, отличающееся тем, что антитело предназначено для внутривенного или подкожного введения.

44. Полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи антитела по п.1, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела по п.1, причем эта переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

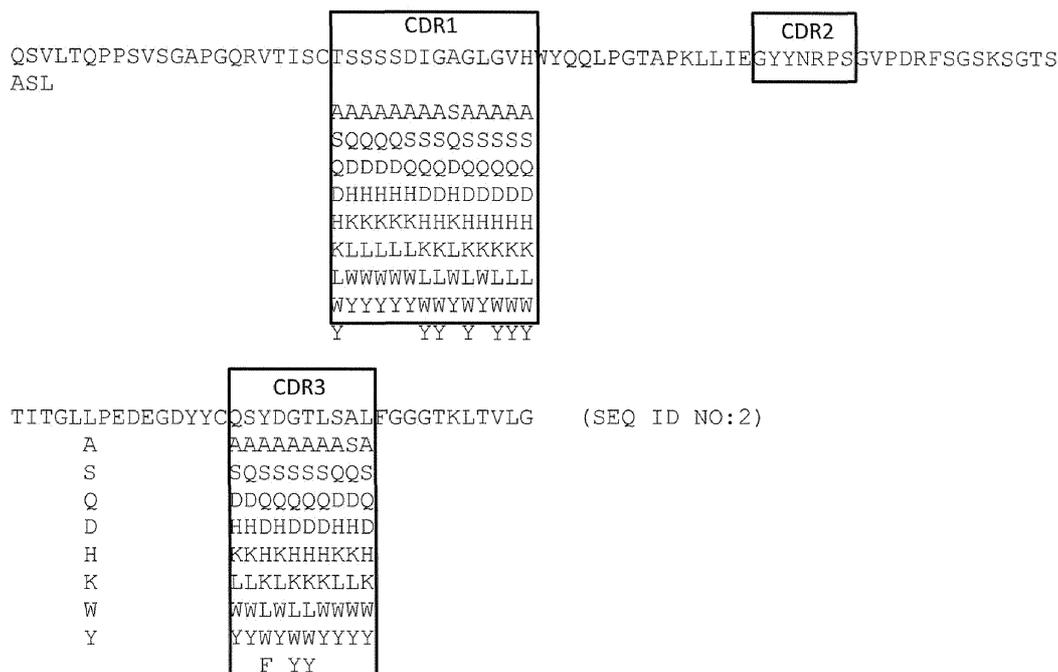
45. Полинуклеотид по п.44, отличающийся тем, что полинуклеотид дополнительно содержит вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

46. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по п.44 или 45.

47. Трансформированная клетка для продуцирования переменной области тяжелой цепи антитела, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменной области легкой цепи антитела, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, где указанная клетка содержит вектор по п.46, содержащий полинуклеотид по п.45.



Фиг. 1



Фиг. 2

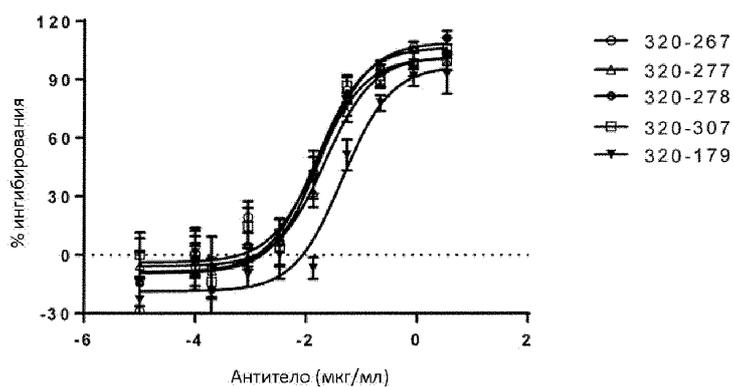
	10	20	30	40	50	60	
179VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV	SCKASGYTFTSYDINWVRQ	APGQGLEWMGWLNPNSGNT	GYA	QK	FQGRVT	
267VH	
277VH	
278VH	
307VH	
331VH	
547VH	Y
583VH	
584VH	
585VH	
586VH	
587VH	Y
591VH	Y
592VH	Y
593VH	Y
594VH	Y
595VH	Y
601VH	Y
	70	80	90	100	110		
179VH	MTADRSTSTAYMELSSLRSE	TAVYYCAREVPETA	AFFEYWGQGLVTVSS				SEQ ID NO:1
267VH	SEQ ID NO:1
277VH	SEQ ID NO:1
278VH	SEQ ID NO:1
307VH	SEQ ID NO:1
331VH	SEQ ID NO:1
547VH	SEQ ID NO:3
583VH	SEQ ID NO:1
584VH	SEQ ID NO:1
585VH	SEQ ID NO:1
586VH	SEQ ID NO:1
587VH	SEQ ID NO:3
591VH	SEQ ID NO:3
592VH	SEQ ID NO:3
593VH	SEQ ID NO:3
594VH	SEQ ID NO:3
595VH	SEQ ID NO:3
601VH	SEQ ID NO:3

Фиг. 3

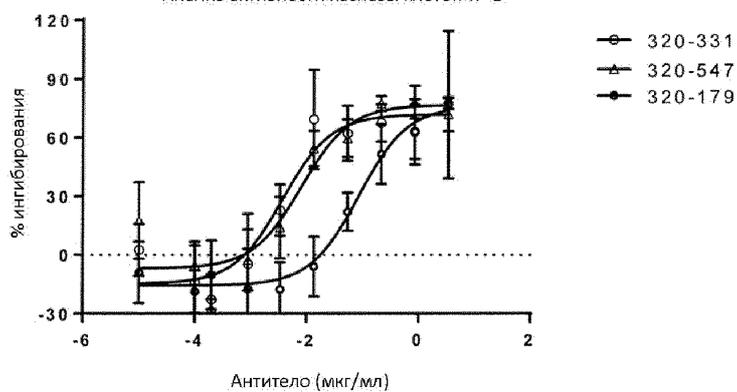
	10	20	30	40	50	60	
179VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTI	SCTSSSSDIGAGLVH	HWYQQLPGTAPKLLIEGY	YNRPSGVPDRFS			
267VL	A	
277VL	S	
278VL	Q	
307VL	L	
331VL	
547VL	
583VL	A	
584VL	S	
585VL	Q	
586VL	L	
587VL	
591VL	L	
592VL	A	
593VL	S	
594VL	Q	
595VL	L	
601VL	

Фиг. 4

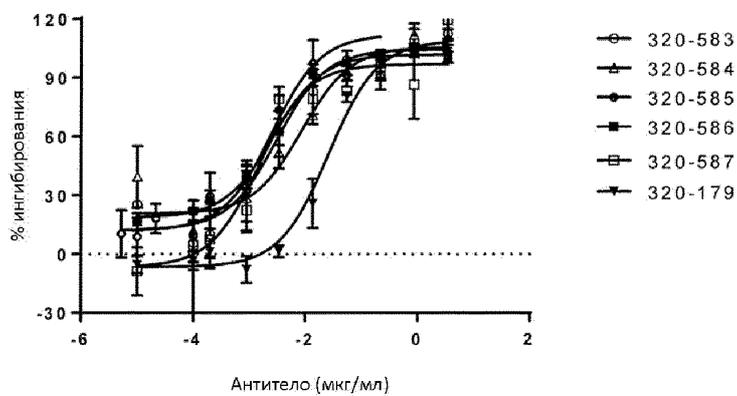
Анализ активности каспазы клеток TF-1



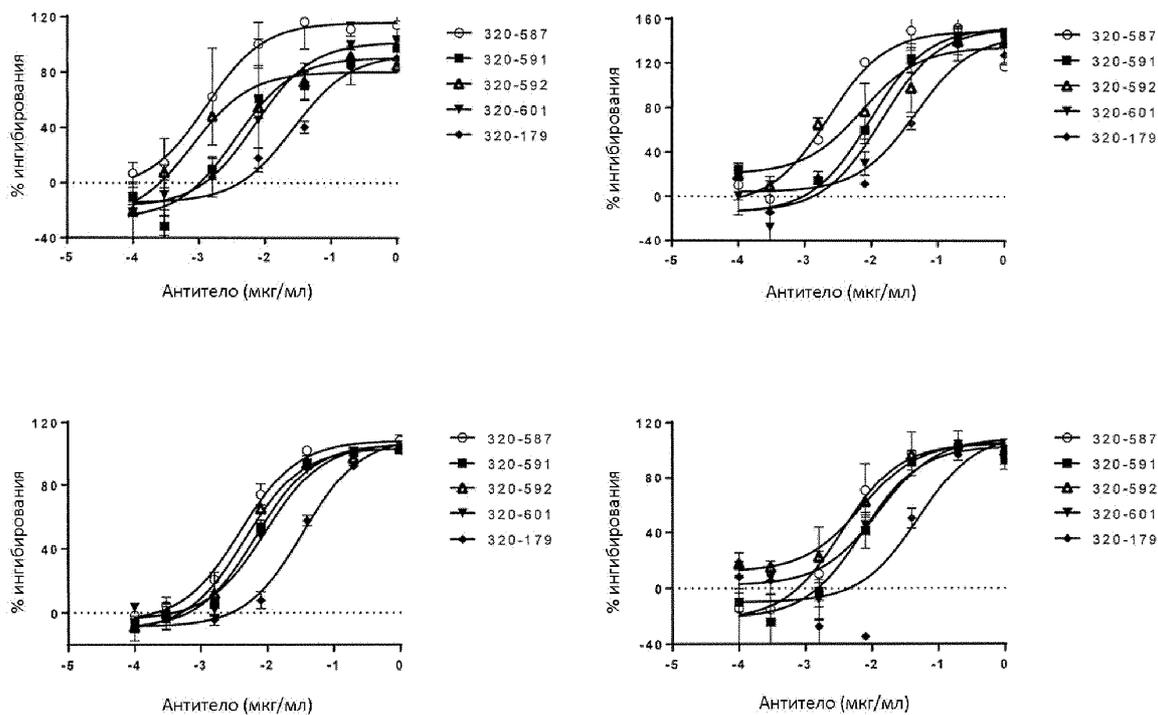
Анализ активности каспазы клеток TF-1



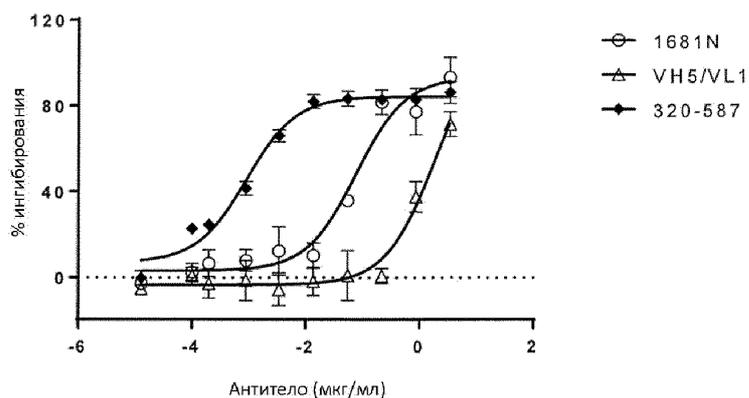
Анализ активности каспазы клеток TF-1



Фиг. 6

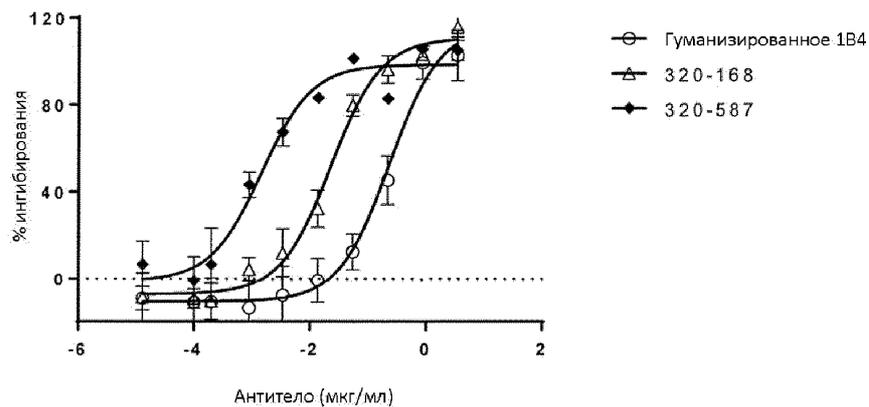


Фиг. 7



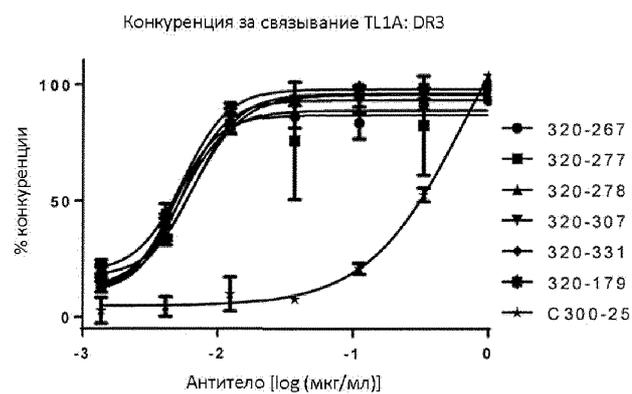
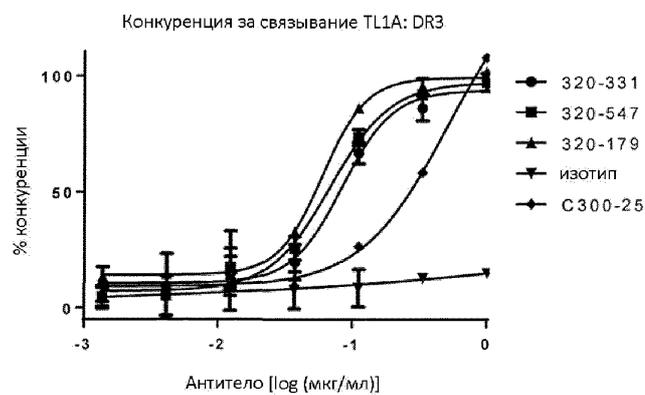
Антитело	ИК ₅₀ (мкг/мл)	Кратность повышения по сравнению с 320-587
320-587	0.00091	
1681N	0.077	85
VH5/VL1	1.876	2062

Фиг. 8

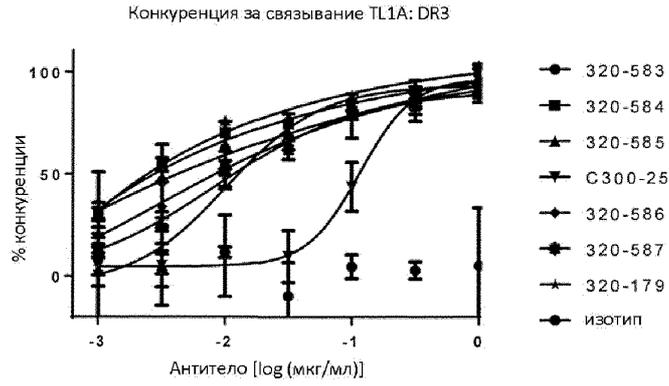


Антитело	ИК ₅₀ (мкг/мл)	Кратность повышения по сравнению с 320-587
320-587	0.0015	
320-168	0.023	15.3
VH5/VL1	0.23	153

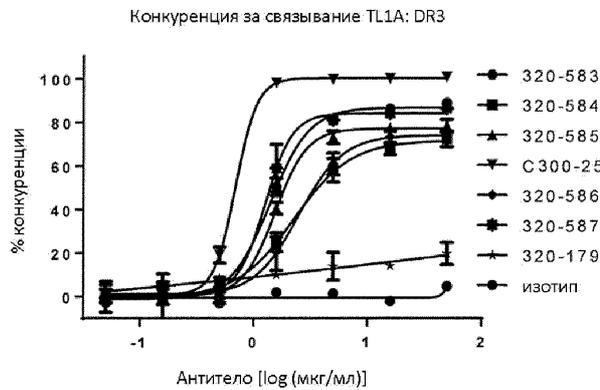
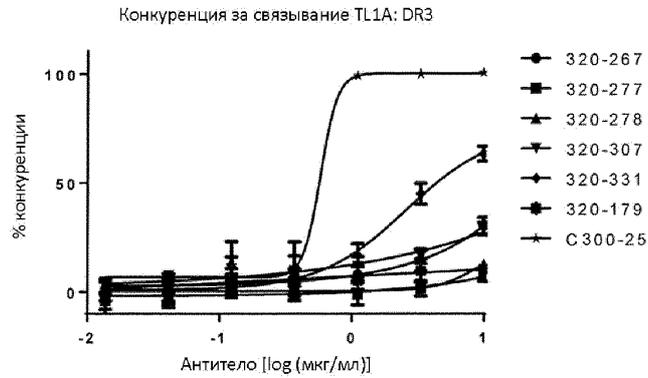
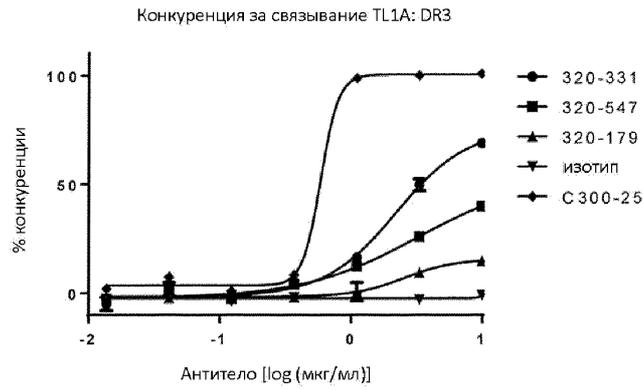
Фиг. 8 (продолжение)



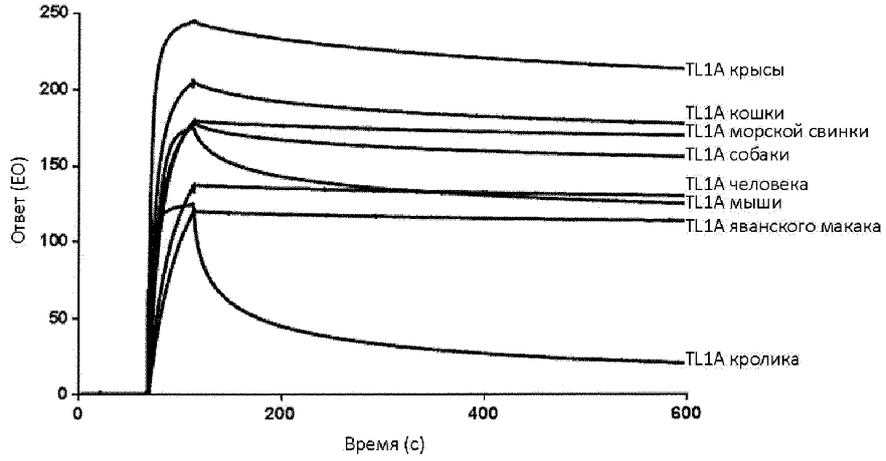
Фиг. 9



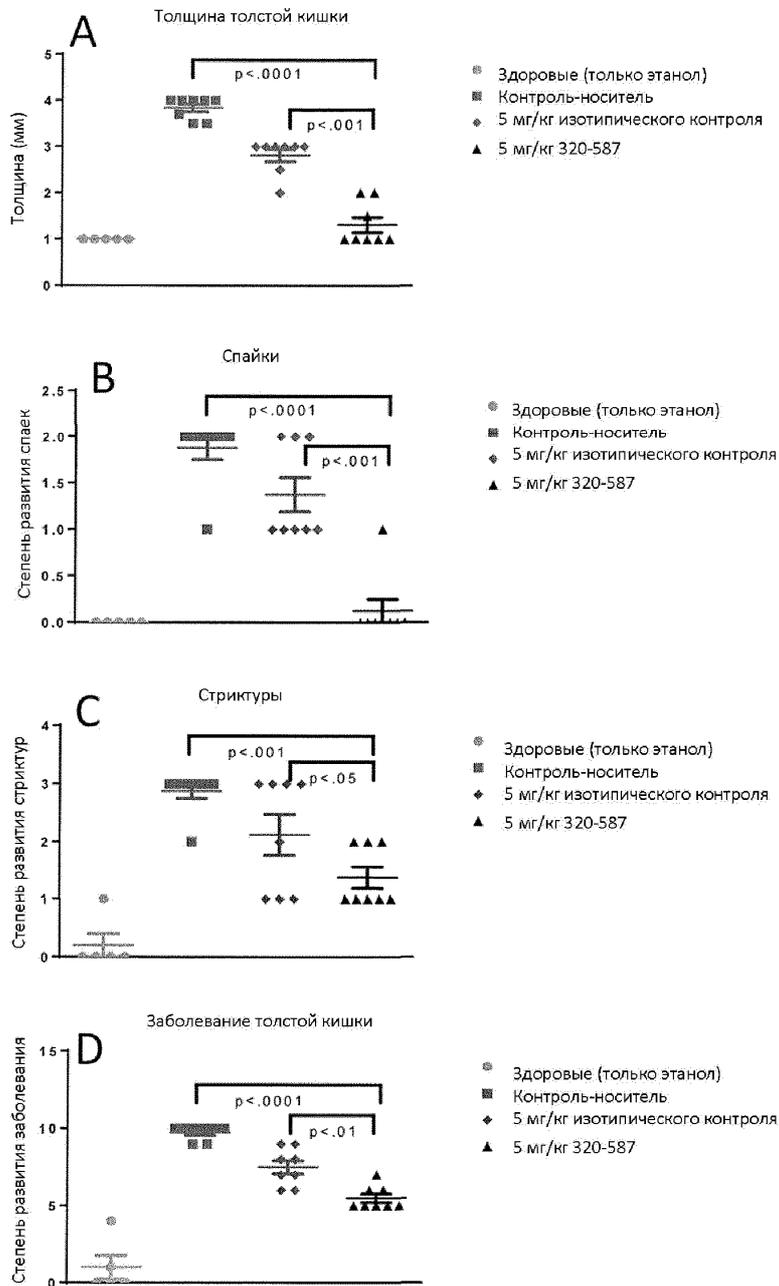
Фиг. 9 (продолжение)



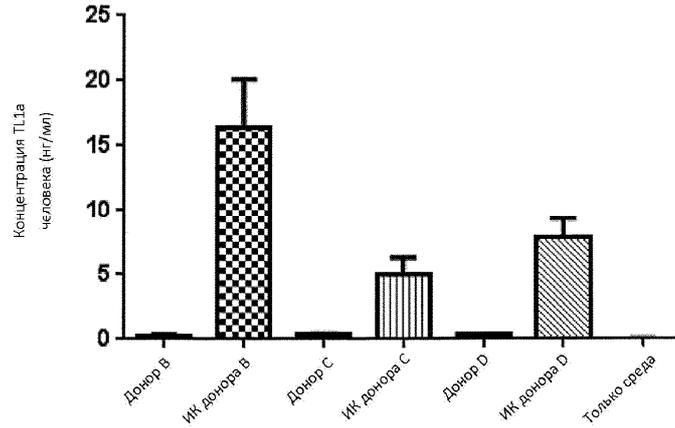
Фиг. 10



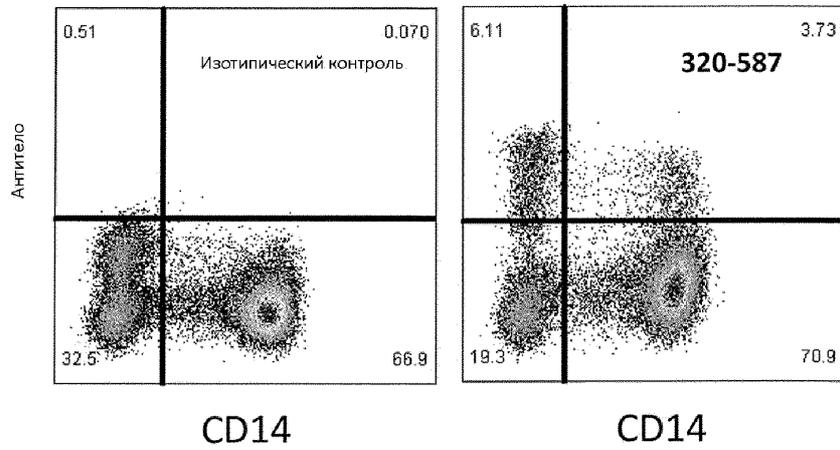
Фиг. 11



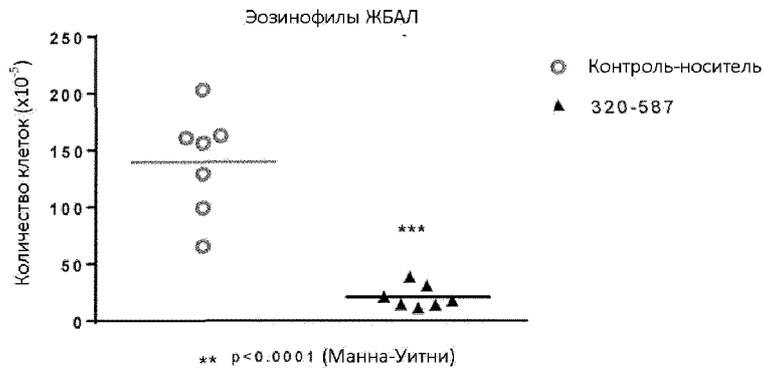
Фиг. 12



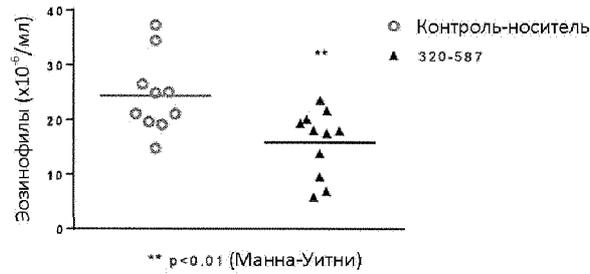
Фиг. 13



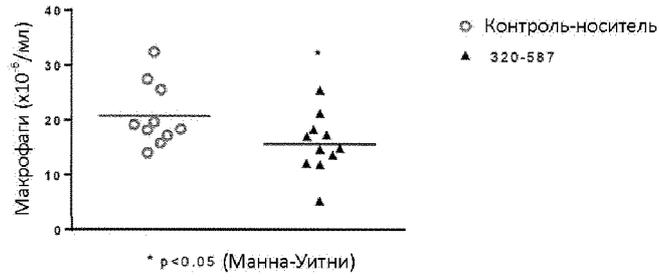
Фиг. 14



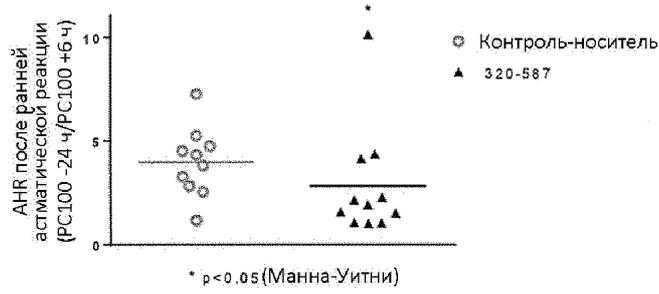
Фиг. 15



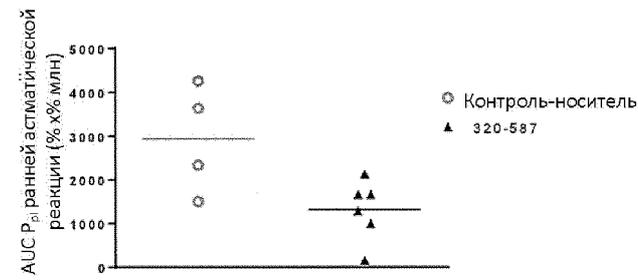
Фиг. 16А



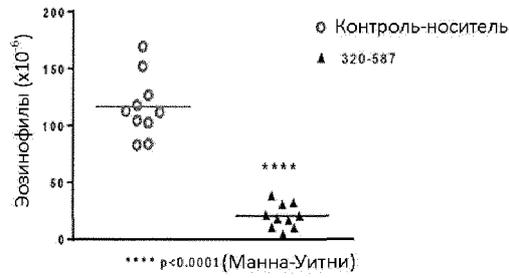
Фиг. 16В



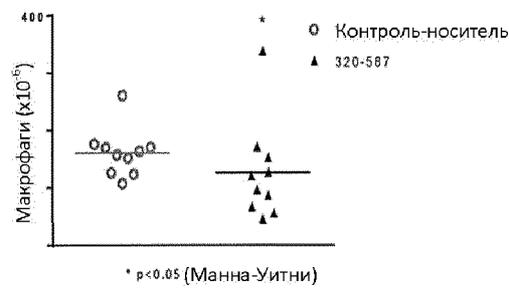
Фиг. 16С



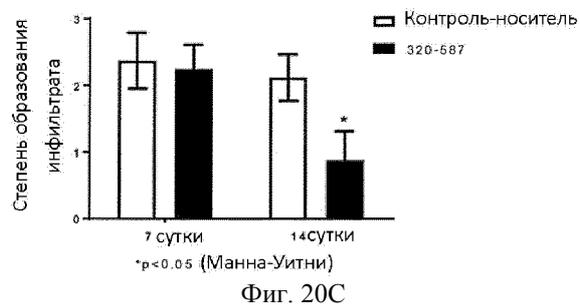
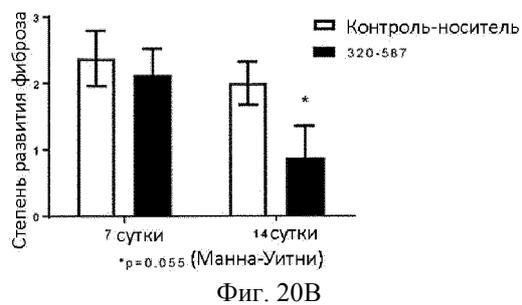
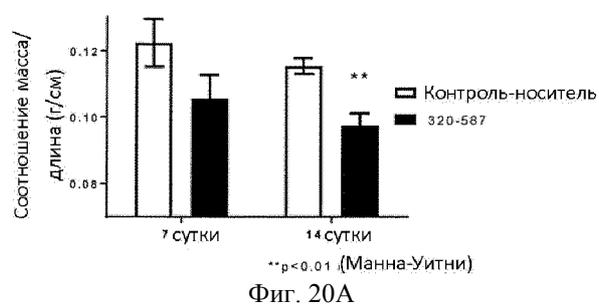
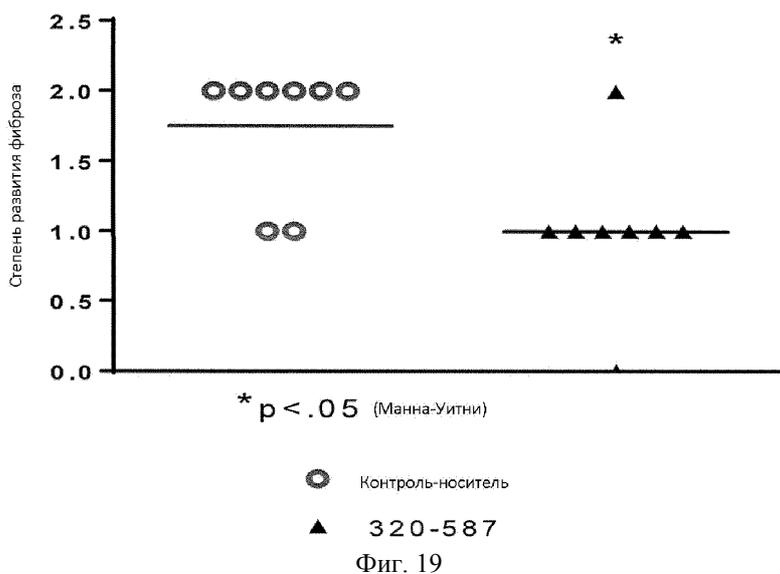
Фиг. 16D

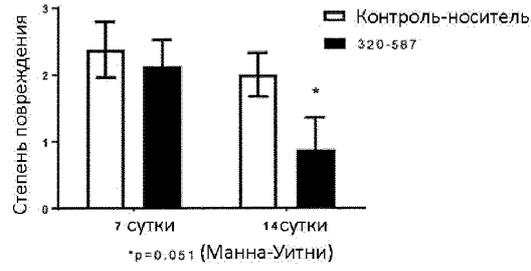


Фиг. 17А

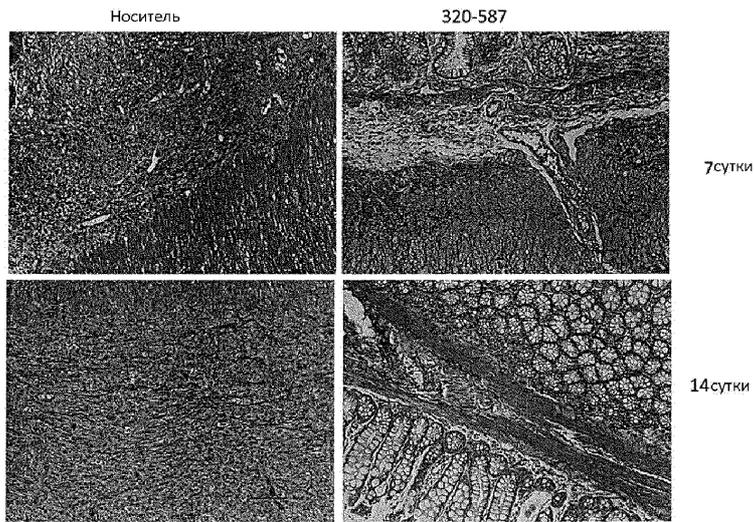


Фиг. 17В

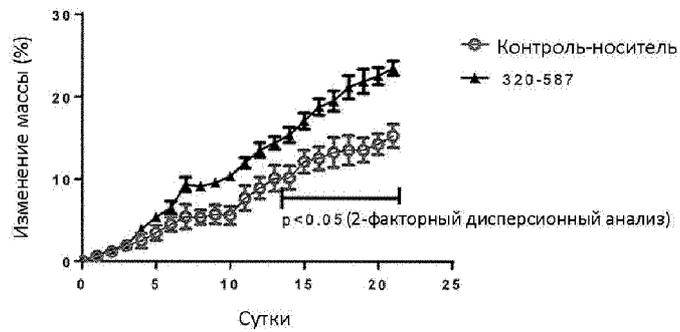




Фиг. 20D



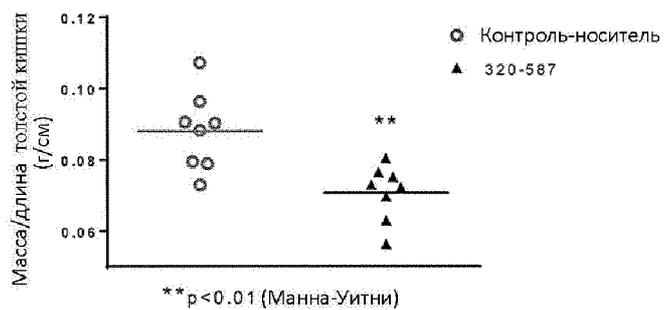
Фиг. 20E



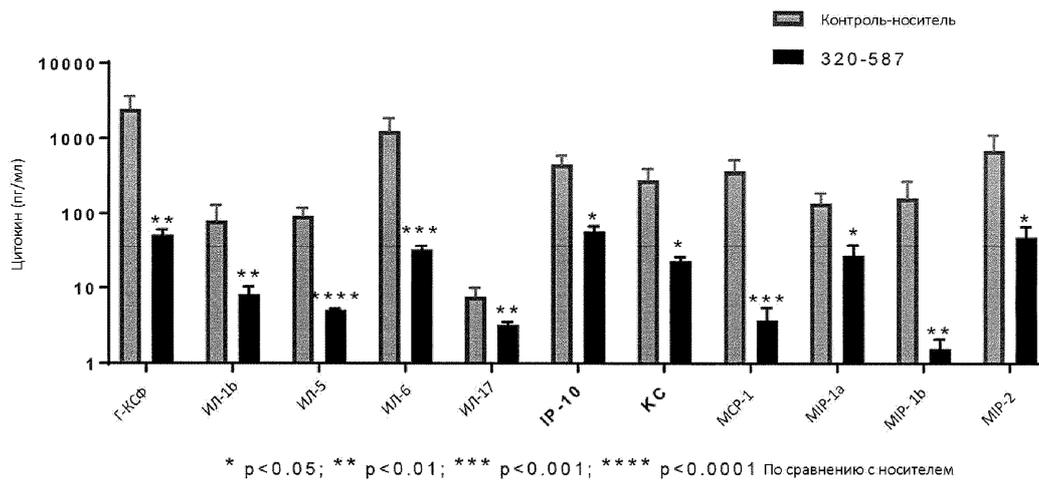
Фиг. 21A



Фиг. 21B



Фиг. 21С



Фиг. 22

