

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991005 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.12.07

(54) АНТИТЕЛА И ПОЛИПЕПТИДЫ, НАПРАВЛЕННЫЕ ПРОТИВ CD127

(31) 16306655.8

(32) 2016.12.09

(33) EP

(86) PCT/EP2017/081911

(87) WO 2018/104483 2018.06.14

(71) Заявитель:
ОСЕ ИММУНОТЕРАПЬЮТИКС
(FR)

(72) Изобретатель:
Пуарье Николя, Мари Каролина,
Ванхове Бернард, Тепенье Виржини
(FR)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к области антител, подходящих для терапевтического и диагностического применения, нацеленных на CD127, альфа-цепь рецептора IL7, и предусматривает, в частности, гуманизированные моноклональные антитела против CD127, в частности CD127 человека, их терапевтические и диагностические применения.

A1

201991005

201991005

A1

АНТИТЕЛА И ПОЛИПЕПТИДЫ, НАПРАВЛЕННЫЕ ПРОТИВ CD127

[1] Изобретение относится к области полипептидов или антител, подходящих для терапевтического и диагностического применения, нацеленных на CD127, альфа-цепь рецептора IL7, и обеспечивает, в частности, гуманизированные моноклональные антитела против CD127, в частности CD127 человека, их терапевтическое и диагностическое применение.

Краткое описание изобретения

[2] Альфа-цепь (или субъединица) рецептора интерлейкина-7 (IL-7) обозначается как CD127 или p90 IL-7R или IL-7Rальфа или IL-7Rα (иногда также обозначается IL-7Ra). В конкретном аспекте изобретения антитела, в частности моноклональные антитела, предложенные в настоящем документе, направлены против альфа-цепи рецептора человеческого IL-7, экспрессируемого на клетках человека. В конкретном аспекте изобретения антитела, предложенные в настоящем документе, обладают антагонистическими свойствами для взаимодействия IL-7-IL-7R, способны проявлять цитотоксическую активность в отношении CD127-положительных клеток, но не увеличивают созревание дендритных клеток (DC), индуцированное TSLP. В частности, антитела, предложенные в настоящем документе, распознают человеческий эпитоп CD127, содержащий последовательности из сайта 2b в CD127, в частности этот эпитоп содержит человеческие последовательности CD127 домена D1 и сайта 2b CD127, в частности этот эпитоп содержит по меньшей мере одну последовательность из D1 и по меньшей мере одну последовательность из сайта 2b, предпочтительно из третьего бета-слоя сайта 2b в CD127. В дополнение или в качестве альтернативы, в конкретном аспекте изобретения, антитела, предложенные в настоящем документе, не индуцируют интернализацию CD127 и/или ингибируют индуцированную IL7 интернализацию CD127. В конкретном аспекте изобретения антитела, предложенные в настоящем документе, являются гуманизированными и содержат по меньшей мере 80% и предпочтительно по меньшей мере 84% или по меньшей мере 85% человеческих остатков. В конкретном аспекте изобретения антитела, предложенные в настоящем документе, оказывают быстрое воздействие на эффекторные Т-клетки памяти, длительное действие на эффекторные Т-клетки памяти или, предпочтительно, быстрое и длительное действие на эффекторные Т-клетки памяти. В конкретном аспекте изобретения антитела, предложенные в настоящем документе, позволяют их эффективное продуцирование. В конкретном аспекте изобретения для оценки вероятности ответа могут быть измерены уровни экспрессии CD127, IL-7 и/или TSLP, в частности, с использованием антител против CD127, предложенных в настоящем документе. В дополнение к антителам, предложенным в настоящем документе, в частности, в качестве средств для получения антител и/или для применений, подобных указанным антителам, предложены полипептиды, в частности вариабельные домены легкой цепи антитела или легкие цепи антитела, антигенсвязывающие фрагменты и молекулы-миметики таких антител и полинуклеотидов.

[3] Авторы настоящего изобретения стремились получить усовершенствованные

гуманизированные антитела по сравнению с антителами N13B2-h1, N13B2-h2 и N13B2-h3, раскрытыми в WO 2015/189302. Хотя известно, что некоторые остатки в каркасных последовательностях переменных доменов, включая остатки в зоне Вернье, канонические остатки, остатки на границе VH/VL и т.д., являются критическими в структуре антитела и не подлежат мутации для сохранения биохимической и биологической активности антитела, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что некоторые мутации в каркасной последовательности переменного домена легкой цепи N13B2, включая некоторые из таких критических остатков, позволяют увеличивать содержание остатков человека (выше, чем N13B2-h3 и вплоть до 86,3%) и повысить продуцирование (до 4 раз выше, чем у N13B2-h3) при сохранении всех функциональных возможностей.

[4] Эти мутации состоят из 16 аминокислотных замен в каркасной последовательности переменного домена легкой цепи N13B2 и, в частности, дополнительно в замене остатка валина в положении 48 остатком лейцина (V48L) и/или в замене остатка фенилаланина в положении 87 остатком тирозина (F87Y). Эти положения и любые положения аминокислот для цепей антител, предложенных в настоящем документе, если не указано иное, обозначены с использованием нумерации Кабат. В настоящем документе предложены усовершенствованные переменные домены легкой цепи антитела, состоящие из следующих последовательностей:

- SEQ ID No: 9 (включая указанные 16 аминокислотных замен - указанный переменный домен легкой цепи антитела в дальнейшем обозначен N13B2-hVL3);
- SEQ ID No: 10 (включая указанные 16 аминокислотных замен и, кроме того, с мутацией V48L - указанный переменный домен легкой цепи антитела в дальнейшем обозначен N13B2-hVL4);
- SEQ ID No: 11 (включая указанные 16 аминокислотных замен и, кроме того, с мутацией F87Y - указанный переменный домен легкой цепи антитела в дальнейшем обозначен N13B2-hVL5); и
- SEQ ID No: 12 (включая указанные 16 аминокислотных замен и, кроме того, обе мутации V48L и F87Y) - указанный переменный домен легкой цепи антитела обозначен в дальнейшем N13B2-hVL6).

[5] Таким образом, переменный домен легкой цепи антитела, обозначенный в настоящем документе N13B2-hVL3, содержит все CDR из N13B2-h3, указанные 16 аминокислотных замен и исходные остатки из N13B2 в критических положениях 48 и 87 (то есть соответственно V и F) в человеческих каркасных последовательностях и имеет последовательность SEQ ID No: 9. Переменный домен легкой цепи предпочтительного усовершенствованного антитела, предложенного в настоящем документе, обозначенный N13B2-hVL6, включающий дополнительно обе мутации V48L и F87Y, состоит из последовательности, приведенной в SEQ ID No: 12.

[6] Для специалиста будет неожиданным, что указанные мутации, особенно в таких

положениях в каркасах переменного домена легкой цепи, не влияют на аффинность антитела с CD127: V48 является каноническим остатком, а F87 расположен на границе VH/VL; мутация таких остатков, как известно специалисту и описано, например, в Clark, 2014, должна влиять на аффинность и/или стабильность антитела. Используемый в настоящем документе термин "канонический" остаток относится к остатку в CDR или каркасе, который определяет конкретную каноническую структуру CDR, как определено Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901- 907 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227: 799 (1992). Согласно Chothia et al., критические части CDR многих антител имеют почти идентичные конформации пептидного остова, несмотря на большое разнообразие на уровне аминокислотной последовательности. Каждая каноническая структура определяет прежде всего набор торсионных углов пептидного остова для смежного сегмента аминокислотных остатков, образующих петлю. Невозможно было предвидеть, что введение раскрытых в изобретении мутаций в обоих положениях приведет к улучшению продуцирования, при этом сохраняя свойства связывания и, что весьма полезно, другие функциональные свойства этих антител.

[7] Соответственно, в данном документе предложен полипептид, подходящий, в частности, для получения таких антител, в частности переменного домена легкой цепи антитела или легкой цепи антитела, состоящего из последовательности, в частности до 250 аминокислот, включающей или состоящий из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; или SEQ ID NO: 11; или SEQ ID NO: 12, или его антигенсвязывающий фрагмент, или его молекулу-миметик антитела, согласно приведенному ниже определению. В конкретном аспекте изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, предложенным в данном документе, в частности к гуманизированным моноклональным антителам, специфически связывающимся с CD127, в частности с человеческим CD127, и содержат:

- легкую цепь антитела, содержащую, или переменный домен легкой цепи антитела, состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 9; SEQ ID No: 10; SEQ ID No: 11; SEQ ID No: 12; в частности SEQ ID No: 12; и
- переменный домен тяжелой цепи антитела, содержащий три CDR, состоящие из последовательностей, приведенных в SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2 и SEQ ID No: 3, в частности переменный домен тяжелой цепи антитела, состоящий из последовательности, приведенной в SEQ ID No: 7.

В предпочтительном варианте реализации изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, предложенным в данном документе, в частности к гуманизированным моноклональным антителам, которые специфически связываются с CD127, в частности с человеческим CD127, и содержат:

- переменный домен легкой цепи, состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10, SEQ ID No: 11 и SEQ ID No: 12, в

частности SEQ ID No: 12; и

- переменный домен тяжелой цепи, содержащий три CDR, состоящие из последовательностей, приведенных в SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2 и SEQ ID No: 3, в частности переменный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности, указанной в SEQ ID No: 7.

[8] В конкретном аспекте изобретения антитело, предложенное в настоящем документе, содержит легкую цепь с переменным доменом, как указано выше, и константный домен, состоящий из последовательности, выбранной из SEQ ID No: 27 или 28, предпочтительно SEQ ID No: 27, и тяжелую цепь с переменным доменом, как указано выше, и константным доменом, состоящим из последовательности, указанной в SEQ ID No: 26.

[9] Также в настоящем документе предложен выделенный полипептид, состоящий из последовательности до 250 аминокислот, конкретно до 217, до 214, до 211, более конкретно, до 200, до 175, до 150, до 135, до 120, до 107, и еще более конкретно, до 100, до 90, до 80, до 74, до 70, до 60 аминокислот, причем указанная последовательность включает или состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из:

- SEQ ID No: 9 (CDR-области из N13B2-h3 в каркасных последовательностях человека);
- SEQ ID No: 10 (CDR-области из N13B2-h3 в каркасных последовательностях человека, включая мутацию V48L);
- SEQ ID No: 11 (CDR-области из N13B2-h3 в каркасных последовательностях человека, включая мутацию F87Y);
- SEQ ID No: 12 (CDR-области из N13B2-h3 в каркасных последовательностях человека, включая обе мутации V48L и F87Y); и
- соответствующий антигенсвязывающий фрагмент, в частности указанный фрагмент, содержащий три CDR, состоящие из последовательностей, приведенных в SEQ ID No: 4, SEQ ID No: 5 и SEQ ID No: 6, более конкретно фрагмент, содержащий по меньшей мере 74 аминокислоты, включая аминокислоты с 24 по 97 из SEQ ID No: 12.

[10] В настоящем документе также предложены полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, предложенные в настоящем документе, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению. Такие полинуклеотиды кодируют, в частности, полипептиды, содержащие или состоящие из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-12, а также кодируют полипептиды, содержащие или состоящие из последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 1-3, в частности SEQ ID No: 7, и могут также кодировать полипептиды, содержащие или состоящие из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26-28. В частности, указанные полинуклеотиды содержат или состоят из комбинации по меньшей мере двух выделенных последовательностей (молекул) нуклеиновых кислот, причем первая выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит или состоит из последовательности,

выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15-18; в частности SEQ ID No: 18; указанная комбинация также содержит или состоит из второй выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 13 и SEQ ID NO: 29-31, в частности SEQ ID No. 13.

[11] В частности, полипептид по изобретению содержит вариабельный домен легкой цепи антитела или легкую цепь антитела, причем указанный полипептид содержит по меньшей мере 84% и более конкретно по меньшей мере 85% человеческих остатков. Указанный полипептид может представлять собой антигенсвязывающий фрагмент и/или молекулу-миметик антитела из антитела, раскрытого в данном документе.

[12] В настоящем документе также представлены композиции, содержащие указанные полипептиды, в частности вариабельные домены легкой цепи антитела или легкие цепи антитела, антитела, антигенсвязывающий фрагмент или соответствующую молекулу-миметик антитела, способы получения указанных антител, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие указанные полипептиды и антитела, и применения указанных полипептидов, антител и композиций.

[13] Соответственно, полипептиды, вариабельные домены легкой цепи антитела, легкие цепи антитела, антитела, антигенсвязывающие фрагменты, молекулы-миметики антитела и композиция, предложенные в настоящем документе, могут быть предназначены и/или быть подходящими для применения с целью лечения состояния, диагностированного у пациента-человека, которое возникает в результате патогенеза, связанного с лимфопозом, когда указанному патогенезу способствуют сигнальные пути IL-7, особенно когда увеличение созревания, точнее, активация костимулирующих молекул дендритных клеток является нежелательным.

Подробное описание изобретения

Биохимия

[14] CD127 является общим для рецептора IL-7 (IL-7R) и для рецептора TSLP (TSLPR). IL-7R состоит из гетеродимера CD127 и общей гамма-цепи (γ c) рецепторов интерлейкина. Общая гамма-цепь γ c иногда обозначается в настоящем документе и в литературе как CD132. IL-7R связывается интерлейкином 7. Рецептор TSLP представляет собой гетеродимер CD127 и фактора 2, подобного рецептору цитокинов (CRLF2). Рецептор TSLP связывается TSLP. В литературе TSLPR иногда используется для обозначения как цепи рецептора CRLF2, так и комплекса CD127/CRLF2. Во избежание путаницы в дальнейшем TSLPR обычно обозначает комплекс.

[15] CD127 (номер доступа Swiss Prot P16871) может существовать в четырех изоформах. Каноническая изоформа, также называемая H20 (Swiss Prot P16871.1), представляет собой однопроходный трансмембранный белок и содержит 459 аминокислот состоящих, от N- до C-конца, из сигнального пептида из 20 аминокислот, внеклеточного домена из 219 аминокислот,

трансмембранного домена из 25 аминокислот и внутриклеточного домена из 195 аминокислот. Другие изоформы имеют общую последовательность (или большую часть) внеклеточного домена H20 и демонстрируют различные С-концевые последовательности. Изоформы 2 и 4 являются секретируемыми (Swiss Prot P16871-4 и P16871-3), в то время как изоформа 3 (Swiss Prot P16871-2) также является трансмембранным белком. Сообщается, что CD127 имеет последовательность SEQ ID No: 21, а его внеклеточный домен, когда сигнальный пептид удален, имеет последовательность SEQ ID No: 22. Если не указано иное, используемая в настоящем документе нумерация для аминокислот CD127, представляет собой нумерацию из SEQ ID No: 22.

[16] CD127 представляет собой рецептор из класса гомологии цитокиновых рецепторов I (CRH I). Как хорошо известно в данной области, внеклеточный домен этих рецепторов состоит из двух доменов фибронектина 3, называемых D1 и D2. Точная кристаллографическая структура CD127 была опубликована и обсуждена, например, в McElroy et al., 2009; McElroy et al., 2012 и Walsh, 2012 и, в частности, была раскрыта в виде данных о структуре белка в базе данных белков Коллаборации по исследованию структурной биоинформатики (RCSB PDB) с номером доступа 3UP1. Обычно считается, что D1 участвует в связывании с IL-7, тогда как D2 участвует в связывании с γ -цепью (а также с IL-7). Важно, что сайт 2b домена D2 содержит три бета-слоя, включая следующие последовательности SEQ ID No: 32 (FDLSVIYRE); SEQ ID No: 33 (NDFVVTFNST) и SEQ ID No: 34 (TKLTLLQR). Таким образом, сайт 2b домена D2 включен между аминокислотами 109 и 180 SEQ ID No: 22 (см. Walsh, 2012; Verstraete, K. *et al.*, Nature Com 2017). Сайт 2b домена D2 также может быть определен как включенный между аминокислотами 109 и 173 SEQ ID No: 22. Сайт 2b домена D2 также может быть определен как включенный между аминокислотами 113 и 180 SEQ ID No: 22. Сайт 2b домена D2 также может быть определен как включенный между аминокислотами 113 и 173 SEQ ID No: 22. В частности, сайт 2b домена D2 включает, в частности, состоит, по существу, из аминокислот 109-133 SEQ ID No: 22, в частности от 109 до 127, где первые два бета-слоя локализованы; и аминокислот с 166 по 180 SEQ ID No: 22, где третий бета-слой локализован. Более конкретно, сайт 2b состоит в основном из аминокислот от 113 до 133, в частности от 113 до 127, SEQ ID No: 22 и из аминокислот от 166 до 180 из SEQ ID No: 22. В частности, сайт 2b состоит по существу из аминокислот от 109 до 133, в частности от 109 до 127, из SEQ ID No: 22 и аминокислот от 166 до 173 из SEQ ID No: 22. Более конкретно, сайт 2b состоит по существу из аминокислот от 113 до 133, в частности 113-127, из SEQ ID No: 22 и аминокислот 166-173 из SEQ ID No: 22. Сайт 2b домена D2 является критическим для взаимодействия CD127- γ , в частности, для разрешения или увеличения связывания CD127 с γ в присутствии IL-7. В частности, мутации в P112 и L115, которые были идентифицированы у пациентов, страдающих от тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID), как полагают, дестабилизируют гидрофобное ядро домена D2, что, вероятно, приводит к их патогенным признакам.

Как указано выше, сайт 2b состоит, по существу, из аминокислот 109-180 из SEQ ID No: 22, или

состоит, по существу, из аминокислот 109-173 из SEQ ID No. 22, или состоит, по существу, из аминокислот 113-180 из SEQ ID 22 или состоит, по существу, из аминокислот 113-173 из SEQ ID No. 22. Специалист поймет, что концы такого домена не обязательно могут быть однозначно определены с точностью до одного основания, и что сайт 2b можно понимать, как содержащий на одном или обоих концах упомянутой последовательности (ей) на 1, 2 или 3 больше или меньше аминокислот. Следовательно, при упоминании в настоящем документе сайта 2b или CD127, следует понимать, что это относится к последовательности CD127, начинающейся в положении 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 или 113 и заканчивающейся в положении 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179 или 180 или SEQ ID No: 22; в частности, к такой последовательности, которая, как полагают или показано, составляет существенно важный сайт связывания с γ с-цепью IL7-R, в частности, в присутствии IL-7. Более конкретно, когда в настоящем документе упоминается сайт 2b CD127, следует понимать, что это относится к последовательности CD127, начинающейся в положении 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 или 113 и заканчивающейся в положении 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 или 133 SEQ ID No: 22, но также и к последовательности CD127, начинающейся в положении 162, 163, 164, 165 или 166 и заканчивающейся в положении 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179 или 180 из SEQ ID No: 22. Следует отметить, что три бета-слоя, как определено в настоящем документе, могут содержать эпитопные последовательности, специфичные для антител или антигенсвязывающих фрагментов или антигенсвязывающего миметика в соответствии с изобретением. Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и антигенсвязывающие миметики по изобретению могут быть способны специфически связываться с SEQ ID No: 32, SEQ ID No: 33 и/или SEQ ID No: 34. Кроме того, аминокислотная последовательность, содержащая в по меньшей мере, часть одного бета-слоя и некоторых смежных аминокислот, локализованных на одном конце любого бета-слоя, также может представлять собой последовательность эпитопа, специфичную для антитела по изобретению. В качестве примера, последовательность SEQ ID No: 35 (TLLQRKLQPAAMYEI) содержит последние пять аминокислот третьего бета-слоя и десять дополнительных аминокислот, локализованных вне третьего бета-слоя. В качестве другого примера, SEQ ID No: 96 (RKLQPAAM) содержит одну аминокислоту, локализованную в третьем бета-слое, и семь дополнительных аминокислот, локализованных вне третьего бета-слоя. В частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик по изобретению могут специфически связываться с R173 SEQ ID No: 22. В частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик согласно изобретению могут специфически связываться по меньшей мере с одной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 32; SEQ ID No: 33; SEQ ID No: 34, SEQ ID No: 35 и SEQ ID No: 96. В частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик по изобретению могут специфически связываться по меньшей мере с одной последовательностью, выбранной из группы состоящий из SEQ ID No: 36 (LVEVKCLNFR); SEQ ID No: 37 (ICGALVEVKCLNFR) и SEQ ID No: 38 (LVEVKCLNFRK). В качестве альтернативы или

дополнения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик по изобретению могут специфически связываться по меньшей мере с одной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 39 (KKFLLIG); SEQ ID No: 40 (KKFLLIGKSN) и SEQ ID No: 41 (FIETKKFLLIG). SEQ ID No: 36 - SEQ ID No: 41 локализованы в домене D1 из CD127 и представляют собой эпитопные последовательности, распознаваемые антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или молекулой-миметиком антитела в соответствии с изобретением. В альтернативном или дополнительном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или молекула-миметик антитела согласно изобретению могут специфически связываться по меньшей мере с одной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 42 (CLNFR) и SEQ ID No: 43 (FIETKKF). Эти две последовательности представляют собой эпитопные последовательности, локализованные в домене D1 из CD127. В конкретном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик по изобретению могут специфически связываться по меньшей мере с одной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 32; SEQ ID No: 33; SEQ ID No: 34, SEQ ID No: 35 и SEQ ID No: 96, в частности, из группы, состоящей из SEQ ID No: 34, SEQ ID No: 35 и SEQ ID No: 96; и по меньшей мере одной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 37; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 39; SEQ ID No: 40; SEQ ID No: 41; SEQ ID No: 42 и SEQ ID No: 43, в частности, из группы, состоящей из SEQ ID No: 42 и SEQ ID No: 43. В предпочтительном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик могут специфически связываться с SEQ ID No: 34 и по меньшей мере с одной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 42 и SEQ ID No: 43, в частности, с SEQ ID No: 42 и SEQ ID No: 43. В предпочтительном варианте реализации изобретения антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик могут специфически связываться с SEQ ID No: 35 и по меньшей мере с одной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 42 и SEQ ID No: 43, в частности, с SEQ ID No: 42 и SEQ ID No: 43. В предпочтительном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик могут специфически связываться с SEQ ID No: 96 и по меньшей мере с одной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 42 и SEQ ID No: 43, в частности с SEQ ID No: 42 и SEQ ID No: 43. В предпочтительном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик могут специфически связываться с обеими последовательностями SEQ ID No: 35 и SEQ ID No: 96. В предпочтительном варианте реализации изобретения антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик могут специфически связываться с обеими последовательностями SEQ ID No: 42. и SEQ ID No: 43. В конкретном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик по изобретению могут специфически распознавать по меньшей

мере третий бета-слой сайта 2b домена D2 CD127. Третий бета-слой предпочтительно определяется как локализованный между аминокислотами 166 и 173 SEQ ID No: 22, что соответствует SEQ ID No. 34, и более конкретно, третий бета-слой соответствует SEQ ID No. 34. В более конкретном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик в соответствии с изобретением могут специфически распознавать по меньшей мере два из бета-слоев, локализованных в сайте 2b домена D2, и более конкретно, антитело или антиген-связывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик согласно изобретению могут специфически распознавать три бета-слоя, локализованных в сайте 2b домена D2, согласно определению выше. В более конкретном варианте реализации изобретения антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик могут специфически распознавать по меньшей мере один бета-слой, локализованный в сайте 2b домена D2, в частности третий бета-слой, соответствующий SEQ ID No. 34, и связываются по меньшей мере с одной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 37; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 39; SEQ ID No: 40; SEQ ID No: 41; SEQ ID No: 42 и SEQ ID No: 43. В предпочтительном варианте реализации изобретения антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик могут специфически распознавать по меньшей мере третий бета-слой, соответствующий SEQ ID No: 34, и по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 42 и SEQ ID No: 43, в частности, с SEQ ID No: 42 и SEQ ID No: 43. В более конкретном варианте реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик могут специфически распознавать линейный пептид или линейный эпитоп, состоящий из аминокислот SEQ ID No: 35. В дополнение или в качестве альтернативы, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик могут специфически распознавать конформационный пептид или конформационный эпитоп, состоящий из аминокислот с последовательностью ID № 96. В более конкретном варианте реализации антитело или антигенсвязывающее фрагмент или антигенсвязывающий миметик могут специфически распознавать линейный эпитоп или линейный пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID No: 35 и конформационный эпитоп или конформационный пептид SEQ ID No: 96.

[17] Передача сигналов IL-7R. Связывание IL-7 с IL-7R запускает активацию нескольких сигнальных путей, включая Янус-киназы (JAK)-1 и -3, трансдуктор сигнала и активатор транскрипции 5 (STAT5) и фосфатидилинозол-3-киназу (PI3-k). Сообщается, что пути STAT1 и STAT3 активированы, хотя они не являются основными путями. Активация пути STAT5 необходима для индукции антиапоптотического белка Bcl-2 и предотвращения проникновения проапоптотического белка Bax в митохондрию и, таким образом, для выживания развивающихся в тимусе предшественников Т-клеток. Активация пути PI3-k приводит к фосфорилированию и цитоплазматическому удержанию проапоптотического белка Bad.

[18] Передача сигналов TSLPR. Тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP) представляет собой цитокин эпителиальных клеток, который активен при лимфопоезе и, в частности, участвует в регуляции развития клеток иммунной системы, причем эта регуляция влияет, в частности, на созревание указанных клеток. TSLP человека (номер доступа Genbank AF338732) является фактором, который вызывает поляризацию дендритных клеток и способствует пролиферации и дифференцировке Т- и В-клеток. TSLP также подавляет образование клеток Treg (Lei et al., 2011).

[19] Было показано, что сигнальные пути, индуцированные TSLP, на молекулярном уровне отличаются от индуцированных IL-7 путей. В частности, хотя связывание TSLP с его рецептором также активирует Jak-1, оно не активирует Jak-3, но активирует Jak-2. Эти различия согласуются с наблюдением, что Jak-1 ассоциируется с CD127, общим для обоих рецепторов, в то время как Jak-2 ассоциируется с CRLF2 и Jak-3 с γc (Rochman et al., 2010). Также сообщается об активации пути STAT5 для передачи сигналов, индуцированной TSLP (Zhong et al., 2014). Одним из основных эффектов TSLP является то, что он приводит к активации дендритных клеток, индуцируя сверхэкспрессию костимулирующих молекул, таких как CD80, тем самым стимулируя опосредованные ТН-2 воспалительные реакции (Reche et al., 2001).

Клеточная биология

[20] Термин "CD127-положительные клетки" обозначает клетки, экспрессирующие CD127 на своей клеточной поверхности. В большинстве случаев CD127-положительные клетки экспрессируют CD127 в комплексе, образующем IL-7R (IL-7R-положительные клетки), и/или в комплексе, образующем TSLPR (TSLPR-положительные клетки). CD127 экспрессируется различными клетками, в том числе как Т-клетками памяти, так и наивными Т-клетками. CD127, в частности, экспрессируется эффекторными Т-клетками (Teff), в том числе покоящимися и Т-клетками памяти, и незрелыми В-клетками, но в частности не экспрессируется покоящимися природными регуляторными Т-клетками (природными Treg). CD127 необходим для стимулирования дифференцировки тимоцитов и клональной экспансии лимфоцитов.

[21] Важность пути IL7-CD127 для гомеостаза наивных Т-клеток подчеркивается несколькими недавними исследованиями, показывающими, что уровни экспрессии мембраносвязанного CD127 на обычных CD4⁺ Т-клетках коррелируют с частотами недавних эмигрантов тимуса (RTE)-CD4⁺ Т-клеток у здоровых людей и ВИЧ-инфицированных пациентов, а также у пациентов с РС (Albuquerque et al., 2007) (Broux et al., 2010). CD127 также является компонентом рецептора TSLP. Было продемонстрировано, что секреция TSLP тельцами Хассалла, структурами, состоящими из эпителиальных клеток в мозговом веществе тимуса, кондиционирует CD11c⁺миелоидные дендритные клетки (MDC) для индукции дифференцировки тимоцитов в Treg (Watanabe et al., 2005a). Соответственно, сигналы от рецептора IL-7 необходимы для развития Treg, как показано у мышей, нокаутных по CD127 (Mazzucchelli et al., 2008). В работе Haas et al., 2011, авторы продемонстрировали снижение экспрессии CD127 на обычных Т-клетках и повышенный уровень

IL-7 в плазме, а также снижение частот недавних эмигрантов тимуса-Treg и функции Treg при РС без явного генетического влияния (Haas et al., 2011).

[22] Рассмотрение вопроса о том, как IL-7 регулирует миграцию своих родственных рецепторов через мембрану, имеет решающее значение для глубокого понимания роли IL-7/IL-7R в функции лимфоцитов. Предыдущие исследования показали, что стимуляция Т-клеток IL-7 приводит к поверхностной понижающей модуляции CD127 в течение 30 минут, возможно, из-за интернализации рецептора. Было показано, что в более поздние моменты времени (2-6 часов) IL-7 индуцирует транскрипционное подавление CD127. Тем не менее, фактическую динамику интернализации CD127 и регуляции механизмов переноса IL-7 еще предстоит выяснить (Henriques et al., 2010). Было также высказано предположение, что IL-7-индуцированная передача сигналов зависит от интернализации CD127 и что последующая деградация рецептора зависит от активности JAK3 и опосредуется как протеасомами, так и лизосомами.

Патофизиология

[23] Дендритные клетки экспрессируют высокие уровни костимулирующих молекул после созревания, таких как CD80, что стимулирует опосредованные Т-клетками иммунные ответы. Они также продуцируют цитокин TARC (CCL17), который индуцирует хемотаксис в Т-клетках. В таковом качестве, зрелые дендритные клетки вносят вклад в физиопатологию некоторых иммуноопосредованных заболеваний, в которых проявляются ответы Т-клеток, например, при астме, ревматоидном артрите, колите, рассеянном склерозе и увеите. Зрелые дендритные клетки также играют ключевую роль в процессе отторжения клеток, тканей или аллотрансплантатов органов. Поэтому многие терапевтические стратегии направлены на предотвращение созревания дендритных клеток.

[24] Наличие или отсутствие костимулирующих молекул на антиген-презентирующих клетках (APC), таких как дендритные клетки, значительно влияет на качественный и количественный характер иммунного ответа. Сверхэкспрессия CD80 дендритными клетками вызывает созревание DC и увеличивает активацию Т-клеток памяти (Bour-Jordan et al., 2011). Механистически взаимодействие CD28 с CD80 занимает центральный кластер иммунологического синапса и колокализуется с вовлеченным TCR, тем самым стабилизируя иммунный синапс (Dustin and Shaw, 1999) (Grakoui et al., 1999). Взаимодействие между CD28 и CD80 фактически создает соответствующее пространственное распределение для TCR для эффективного взаимодействия с молекулами HLA (Shaw and Dustin, 1997).

[25] Рассеянный склероз (РС) - это воспалительное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы (ЦНС). Появление демиелинизирующих бляшек в ЦНС у пациентов с РС ассоциировано с воспалительным инфильтратом, в основном состоящим из макрофагов и Т-лимфоцитов. На механистическом уровне РС рассматривается как аутоиммунное заболевание. РС обычно рассматривается как заболевание, в первую очередь опосредованное CD4+ Т-клетками.

Определенные субпопуляции CD4+: Th1 и совсем недавно Th17 были названы причастными к патофизиологии заболевания. В настоящее время пока трудно присвоить конкретные роли каждой подгруппе Th1 и Th17. Кроме того, в настоящее время ингибирование переноса лейкоцитов за счет антагонизма альфа4 ($\alpha 4$)-интегрина подтверждено в качестве терапевтического подхода для лечения воспалительных заболеваний, таких как РС и воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), а также для лечения атеросклероза (Zhi et al., 2014). $\alpha 4\beta 7$ экспрессируется на более ограниченном наборе лейкоцитов, включая активированный макрофаг, субпопуляции лимфоцитов, NK-клетки, тучные клетки и эозинофилы.

[26] Человеческий IL-7 индуцирует сильную экспрессию интегринов $\alpha 4$ и $\beta 7$ *in vitro* на Т-лимфоцитах человека и резко увеличивает частоту Т-лимфоцитов человека, экспрессирующих интегрин $\alpha 4$, $\beta 7$ и $\alpha 4\beta 7$, которые необходимы для хоминга и удержания Т-лимфоцитов в нелимфоидных тканях, таких как кишечник, мозг и кожа (Denucci et al., 2009; Gorfu et al., 2009).

[27] Наивные Т-клетки частично ответственны за острое отторжение трансплантированных органов и тканей. Эти клетки могут контролироваться современными иммунодепрессантами (ингибиторами кальциневрина) и моноклональными антителами, которые блокируют костимуляцию (антиадгезивные, ингибиторы CD80/86). Т-клетки памяти также ответственны за отторжение трансплантата. Т-клетки памяти накапливаются у человека благодаря приобретенной иммунной истории, в основном - прежним реакциям на вирусы. Было показано, что Т-клетки памяти могут реактивироваться аллоантигенами в результате "гетерологичного иммунитета", который является перекрестной реакцией нашей антивирусной защиты с аллоантигенами (Adams et al., 2003). Гетерологичный иммунитет представляет собой мощный барьер для индукции толерантности, поскольку Т-клетки памяти, в отличие от наивных Т-клеток, запрограммированы на быструю активацию, с уменьшенной потребностью в костимулирующих сигналах. Т-клетки памяти также могут быть вовлечены в хроническое отторжение. Помимо своей роли в трансплантации органов и тканей, наивные Т-клетки и Т-клетки памяти также несут часть ответственности за многие аутоиммунные заболевания. Это касается язвенного колита (Shinohara et al., 2011), ревматоидного артрита, псориаза или болезни "трансплантат против хозяина".

[28] Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), такие как язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (CD), представляют собой хронические рецидивирующие желудочно-кишечные расстройства, характеризующиеся хроническим кишечным воспалением, дисрегулируемыми иммунными ответами на микробиоту кишечника и дисфункцию эпителиального барьера (Khor et al., 2011; Abraham and Cho, 2009). Уровни заболеваемости и распространенности ВЗК во всем мире растут, причем эти заболевания ассоциированы с выраженной заболеваемостью и оказывают значительное влияние на качество жизни и трудоспособность (Danese and Fiocchi, 2011; Baumgart and Sandborn, 2012). Современные общепринятые способы лечения направлены на ослабление воспаления с поэтапным использованием противовоспалительных агентов, иммунодепрессантов и

биологических агентов, нацеленных на воспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли альфа (TNF α). Ключевой особенностью ВЗК также является быстрый рекрутинг и длительная персистенция лейкоцитов в месте воспаления, чему способствует взаимодействие интегринов с родственными рецепторами, экспрессируемыми эндотелиальными клетками, приводящее к клеточной адгезии и трансмиграции (Adams and Eksteen, 2006; Agace, 2006). Инновационные способы лечения нацеливаются на эту "входную дверь" в кишечник с помощью молекул антиадгезии, в частности нацеливаются на кишечно-специфический путь интегринов $\alpha 4\beta 7$ (Feagan et al., 2013; Sandbom et al., 2013)^{7,8}. Однако эти способы лечения не поддерживают ремиссию более чем у половины пациентов, и рецидивирующие вспышки возникают у высокой доли первичных ответивших. Также развиваются оппортунистические инфекции как следствие общей иммуносупрессии. Таким образом, одна из основных целей заключается в создании новых способов лечения ВЗК и выявлении маркеров, определяющих вероятность хроничности, ответа и рецидивов ВЗК.

[29] Кроме того, было показано, что некоторые злокачественные клетки также демонстрируют IL-7R. Это верно для кожной лимфомы Сезари (60% из них) или детского острого лимфобластного лейкоза, при котором примерно в 15% случаев развивается мутация с усилением функции в CD127, что делает эти опухоли частично зависимыми от IL-7 (Shochat et al., 2011).

[30] Истощение Т-лимфоцитов было очевидным иммуносупрессивным подходом для противодействия отторжению аллотрансплантата или борьбе с аутоиммунитетом. Однако полное истощение Т-клеток может быть не благоприятным для индукции иммунологической толерантности. Про-толерогенный подход может включать в себя нацеливание на субпопуляции Т-клеток или селективно активированные Т-клетки без модификации Treg-клеток (Haudebourg et al., 2009). Таким образом, CD127 можно рассматривать как потенциально привлекательную терапевтическую мишень для моноклональных антител (Mab), нацеленных на модулирование иммунных ответов, поскольку такие моноклональные антитела могут обладать способностью истощать эффектор, но не регуляторные лимфоциты. Соответственно, было предположено, что они могут проявлять эффективность при трансплантации, аутоиммунитете (Michel et al., 2008) и злокачественных новообразованиях путем антагонистического доступа IL-7 к IL-7-R и, таким образом, ограничения функции и роста Т- и В-клеток.

[31] Терапия моноклональным антителом против клеток CD127+, которая препятствует пути IL-7, могла бы достичь этой цели путем устранения/нейтрализации наивных Т-клеток и Т-клеток памяти и/или уменьшения их количества при сохранении клеток Treg или путем устранения или уменьшения количества CD127-положительных злокачественных клеток. Однако терапия моноклональным антителом против клеток CD127+ может действовать как обоюдоострый меч, если она приводит к активации дендритных клеток. Действительно, CD127 также экспрессируется дендритными клетками в ассоциации с CRLF2, образуя рецептор TSLP. В присутствии TSLP

дендритные клетки активируются и стимулируют опосредованные Т-клетками иммунные ответы. Некоторые моноклональные антитела против CD127, предположительно, путем изменения способа взаимодействия TSLP с рецептором TSLP, обладают способностью увеличивать созревание дендритных клеток, индуцированное TSLP. Как следствие, терапия моноклональным антителом против CD127, которая не будет увеличивать созревание дендритных клеток, индуцированное TSLP, будет обеспечивать терапевтическое преимущество. Это дало бы преимущество в виде блокирования IL7R без недостатка, связанного с активацией дендритных клеток в воспаленном окружении, содержащем TSLP.

[32] В публикации (Rasaré et al., 2009) авторы проанализировали интересность альфа-рецептора IL-7 (IL7R α) в качестве потенциальной терапевтической мишени при трансплантации. Рассмотрев экспрессию IL-7R α на различных Т-клетках и клетках, реагирующих на IL-7, авторы определили, может ли нацеливание на Т-клетки памяти, экспрессирующие IL-7R α , продлить выживаемость аллотрансплантата у мышей, и пришли к выводу, что нацеливание на IL-7 или IL-7R α будет с пользой сберегать клетки Treg. Среди перспектив авторы указали, что нацеливание либо на IL-7, либо на IL-7R α в терапевтическом лечении может иметь различные последствия для выживания клеток, экспрессирующих CD127, и может вызывать разные типы лимфопении. Вопрос об эффектах антител, которые будут направлены против IL-7R α в зависимости от того, будут ли они блокирующими или нейтрализующими, или цитотоксическими антителами, также был поставлен с концептуальной точки зрения. Авторы, тем не менее, не показали, что получили и проанализировали такие антитела, а скорее выразили необходимость дальнейших исследований, чтобы оценить актуальность этой гипотезы.

[33] Ввиду недостатков доступных терапевтических подходов при связанных с иммунитетом заболеваниях и других заболеваниях, связанных с IL-7/IL-7R α , таких как различные виды рака, включая некоторые виды рака молочной железы, все еще существует потребность в дополнительных лекарственных препаратах, особенно для кандидатов, активных в отношении более селективных мишеней с целью контроля, например, модулирования иммунной активации у людей.

[34] В этом контексте моноклональные антитела против IL-7R α , обладающие антагонистическими свойствами в отношении IL-7R α , были раскрыты в WO2010/017468, и их гуманизированные версии - в WO2011/094259 с целью лечения аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз. Считается, что описанные антитела являются антагонистом для связывания IL-7 с его рецептором и активны против размножения и выживания клеток Th17 и Th1, для которых, как было сказано, требуется взаимодействие IL-7 с рецептором CD127. Влияние этих антител на созревание иммунных клеток, и в частности дендритных клеток, не рассматривалось. Кроме того, сообщается, что эти антитела не ингибируют TSLP-индуцированную выработку TARC (стр.107 WO 2011/094259). Аналогично, анти-CD127-антитела, описанные в WO2011/104687 или в

WO2013/056984, которые предполагаются для применения при лечении диабета, волчанки, ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний, не обсуждались в отношении их возможного влияния на созревание дендритных клеток, и об их взаимодействии с TSLP-индуцированной передачей сигналов не сообщалось. Кроме того, как опубликовано Kern et al. (Kern et al., 2013; Kern et al., 2015) и как показано в настоящем документе, анти-CD127-антитела предшествующего уровня техники индуцируют интернализацию рецептора. Поскольку антагонистические анти-CD127-антитела, которые также индуцируют интернализацию CD127, не способны контролировать гиперчувствительность кожного типа IV, тогда как антагонистические анти-CD127-антитела, которые не индуцируют интернализацию, способны на это, возможно, что процесс интернализации активирует сигнальный путь, смягчая антагонистический эффект антитела. Наконец, антитела предшествующего уровня техники распознают эпитоп, который не содержит никакой последовательности из сайта 2b CD127 (то есть, в частности, из аминокислот 109-180 SEQ ID No: 22 или, в частности, из аминокислот 109-17 из SEQ ID No: 22 или, в частности, из аминокислот 113-180 из SEQ ID No: 22 или, в частности, из аминокислот 113-173 из SEQ ID No: 22); и не было показано, что они нарушает связывание CD127 с γ -цепью IL7-R.

[35] Таким образом, несмотря на недавний интерес к разработке антител против CD127, усилия, были сосредоточены на ингибировании IL7-индуцированной передачи сигналов IL-7R. Вместе с тем, TSLP и TSLPR также оказались вовлеченными в ряд патологий. Было показано, что TSLP играет некую роль в заболеваниях кожи и легких (He and Geha, 2010) и ассоциируется с различными патологиями, включая воспалительные заболевания дыхательных путей и атопический дерматит у человека и мышей (Ying et al., 2008) (Jariwala et al. 2011). Кроме того, было показано, что TSLP ассоциируется с регуляцией кишечного иммунитета и воспаления (Taylor et al., 2009). Другие патологии, включающие TSLP и TSLPR, включают В-клеточный лейкоз у детей (van Bodegom et al., 2012), аллергические заболевания легких и кожи, аутоиммунные заболевания (Roan et al., 2012) и рак, включая рак молочной железы (Olkhanud et al., 2011).

[36] Антитела, которые не проявляют эффекта увеличения созревания дендритных клеток и/или которые не вызывают интернализацию CD127 и/или которые ингибируют интернализацию, индуцированную IL7, были раскрыты в WO 2015/189302. Указанные антитела, названные N13B2 (химерное антитело), N13B2-h1, N13B2-h2 и N13B2-h3 (гуманизированное N13B2) в указанной заявке и далее в настоящем документе, имеют высокую эффективность, особенно *in vivo*, и, в частности, как было показано, быстро воздействуют на эффекторные Т-клетки памяти, как определено далее. Однако указанные антитела гуманизированы в ограниченной степени, и их эффективность продуцирования также ограничена. Более того, не сообщалось о длительном воздействии указанных антител на эффекторные Т-клетки памяти.

[37] Изобретение относится к инструментам для конструирования новых антител, подходящих в качестве терапевтических кандидатов для введения пациентам с заболеванием, включающим

сигнальные пути IL-7, или с риском такого заболевания. Согласно различным подходам, предложенным в настоящем документе, такие средства улучшают приготовление антител, предназначенных для введения людям-хозяевам. Такие средства включают, в частности, гуманизированные, в частности моноклональные, антитела, которые содержат все CDR-последовательности N13B2-h3.

[38] Такие полипептиды (или полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды) предложены, в частности, для получения антител (или их антигенсвязывающих фрагментов) и/или в виде антител (или их антигенсвязывающих фрагментов), в частности, которые специфически связываются с CD127; указанные антитела, в частности моноклональные антитела, содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий три CDR-последовательности VHCDR1, приведенные в SEQ ID No: 1, VHCDR2, приведенные в SEQ ID No: 2, и VHCDR3, указанные в SEQ ID No: 3. в частности, указанный переменный домен тяжелой цепи состоит из последовательности, указанной в SEQ ID No: 7, или имеет указанную последовательность с дополнительными мутациями, в частности заменой, делецией или вставкой четырех остатков, предпочтительно трех или двух остатков и даже более предпочтительно одного остатка, предпочтительно, где указанные мутации не находятся ни в последовательностях CDR, ни в канонических положениях или положениях Верны каркасных последовательностей.

[39] Антитела, предложенные в настоящем документе, предпочтительно представляют собой моноклональные антитела, что означает, что композиция этих антител является гомогенной, в частности - идентичной, с точки зрения антигенсвязывающей специфичности и, соответственно, с точки зрения состава переменной области.

[40] Изобретение относится к антителам, которые имеют общие CDR с антителом N13B2-h3, но имеют отличающуюся структуру переменного домена легкой цепи. Авторы настоящего изобретения неожиданно показали, что антитела, содержащие совпадающие CDR переменного домена легкой цепи N13B2-h3, т.е. CDR с SEQ ID No: 4 и 5 и 6, но содержащие другую последовательность переменного домена легкой цепи, т.е. SEQ ID No: 9; SEQ ID No: 10; SEQ ID No: 11 или SEQ ID No: 12; будучи в значительной степени гуманизированными, обеспечивают высокое продуцирование по сравнению с N13B2-h3 (до 4 раз выше), сохраняя при этом все функциональные особенности.

[41] Изобретение относится к средствам, целесообразным в этом контексте, включающим, в частности, специфические моноклональные антитела против IL-7R α . В частных вариантах реализации указанные антитела вносятся только отрицательно в путь TSLP. Соответственно, в предпочтительных воплощениях указанные антитела не увеличивают вызванное TSLP созревание дендритных клеток. В дополнение или в качестве альтернативы, в частных вариантах реализации, указанные антитела не индуцируют интернализацию CD127 и/или ингибируют индуцированную IL7 интернализацию CD127. В частных вариантах реализации указанные антитела объединяют эти

свойства, связанные с созревaniem DC и/или интернализацией, с антагонистической активностью в отношении передачи сигналов IL-7/IL-7-R. В частных вариантах реализации указанные антитела ингибируют индуцированную IL7 экспрессию интегринов $\alpha 4$, $\beta 7$ и $\alpha 4/\beta 7$ в Т-клетках, в частности *in vivo*. В частных вариантах реализации указанные антитела оказывают цитотоксическое действие против клеток-мишеней CD127+, которое физически уменьшают их количество (сокращение субпопуляции). В дополнение или в качестве альтернативы, в частных вариантах реализации указанные антитела включают по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 84% или более чем 84% и даже более предпочтительно по меньшей мере 85% человеческих остатков, согласно приведенному ниже определению. В дополнение или в качестве альтернативы, в частных вариантах реализации указанные антитела вырабатываются по меньшей мере так же эффективно, как N13B2-h3, предпочтительно по меньшей мере в два раза эффективнее, согласно приведенному ниже определению. В дополнение или в качестве альтернативы, в частных вариантах реализации указанные антитела оказывают быстрое и/или длительное действие на эффекторные Т-клетки памяти.

[42] В частности, антитела, предложенные в этом документе, содержат вариабельную тяжелую (VH) цепь, содержащую следующие аминокислотные последовательности:

VHCDR1 SEQ ID No: 1;

VHCDR2 SEQ ID No: 2;

VHCDR3 SEQ ID No: 3.

Антитела, предложенные в настоящем документе, предпочтительно содержат цепь VH, состоящую из последовательности, приведенной в SEQ ID No: 7:

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAVSGFTLSDYYMAWIRQAPGKGLEWVSTISASGLRITYPD
SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPLSAHYGFNYFDYWGGQGLTVTVSS.

Указанная вариабельная тяжелая цепь, в частности, связана с константной тяжелой цепью, состоящей из последовательности SEQ ID No: 26, с образованием полной тяжелой цепи антитела.

[43] В частности, антитела, предложенные в настоящем документе, содержат цепь VL, состоящую из последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10, последовательности SEQ ID No: 11 и последовательности SEQ ID No: 12, в частности последовательность SEQ ID No: 12:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRTSEDIYQGLAWYQQKPGKAPKLLLYSANTLHIGVPSRFSG
SGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQYYDYPLAFGGGKVEIK. Указанная вариабельная легкая цепь, в частности, связана с константной легкой цепью, состоящей из последовательности, выбранной из SEQ ID No: 27 и SEQ ID No: 28, в частности SEQ ID No: 27, с образованием полной легкой цепи антитела.

В частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению специфически связывается с CD127, в частности с человеческим CD127, и содержит:

- легкую цепь антитела, содержащую вариабельный домен легкой цепи антитела, состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 9; SEQ ID No: 10; SEQ ID No: 11; SEQ ID No: 12; в частности SEQ ID No: 12; а также
- вариабельный домен тяжелой цепи антитела, содержащий три CDR, состоящие из последовательностей, приведенных в SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2 и SEQ ID No: 3, в частности вариабельный домен тяжелой цепи антитела, состоящий из последовательности, указанной в SEQ ID No: 7.

В более конкретном варианте реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CD127, в частности с человеческим CD127, и содержит:

- вариабельный домен легкой цепи антитела или легкую цепь антитела по изобретению, в частности, состоящие из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10; SEQ ID No: 11 и SEQ ID No: 12, в частности SEQ ID No: 12; и
- вариабельный домен тяжелой цепи антитела, содержащий три CDR, состоящие из последовательностей, приведенных в SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2 и SEQ ID No: 3, в частности вариабельный домен тяжелой цепи антитела, состоящий из последовательности, указанной в SEQ ID No: 7.

Связывание CD127

[44] В соответствии с изобретением термин "связывание" с белком IL-7R α относится к взаимодействию типа антиген-антитело и охватывает свойства "специфического связывания" антител или их антигенсвязывающих фрагментов, причем "специфическое связывание" означает, что антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с белком IL-7R α , в то время как они не связываются или связываются со значительно более слабой аффинностью с другими белками (например, общей γ -цепью рецептора цитокинов). Специфическое связывание предпочтительно устанавливают и/или определяют в физиологических условиях, особенно с точки зрения pH и содержания соли в исследуемом растворе. Связывание и специфичность связывания можно анализировать в соответствии с тестами, раскрытыми в Примерах, и, в частности, можно анализировать с помощью биосенсора, систем Blitz, Biacore, ELISA или вестерн-блот-анализа.

[45] В частных вариантах реализации антитела, предложенные в настоящем документе, нацелены на и связывают альфа-цепь IL-7-R, когда она образует комплекс в рецепторе TSLP (с CCRF2; номер доступа Genbank AF338733; Reche et al., 2001). В частных вариантах реализации антитела, предложенные в настоящем документе, связываются с CD127 в виде выделенного белка с константой аффинности (KD), равной или меньшей 5×10^{-9} М, что может быть определено

биосенсорным анализом, в частности, методом Blitz. В частных вариантах реализации свойства связывания антител устанавливают или определяют с использованием антигена человеческого CD127, содержащего последовательности ер1 (SEQ ID No: 19) и/или ер2 (SEQ ID No: 20). В частных вариантах реализации антиген содержит фрагмент человеческого CD127, содержащий как ер1, так и ер2 (то есть антиген содержит последовательности ер1 и ер2 и интеркалированные последовательности человеческого CD127). В частных вариантах реализации антитела, предложенные в настоящем документе, имеют по меньшей мере такую же аффинность к указанному антигену, что и антитело N13B2-h3, раскрытое в WO 2015/189302, и/или как антитело N13B2-hVL6, раскрытое в данном ID No: 12) и/или что и антитело с VH, имеющей последовательность SEQ ID No: 7, и VL с последовательностью SEQ ID No: 10 или с последовательностью SEQ ID No: 11.

[46] Способы исследования на связывание антител с их мишенью, либо полноразмерным CD127, выделенным, либо в виде TSLPR или IL7R, либо их антигеном, как указано выше, включая, в частности, метод Blitz, известны специалисту в данной области. и проиллюстрированы, в частности, на фиг.3, в примере 3 и примере 4 в настоящем документе и на с. 14, фиг 3, 4 и 6 и в соответствующих пояснениях, а также в примерах 1, 2, 6, 7 в WO 2015/189302.

Отсутствие повышенного TSLP-индуцированного созревания дендритных клеток

[47] Антитела, предложенные в настоящем документе, могут связывать CD127 в рецепторе TSLP (то есть могут связывать CD127, когда он находится в комплексе с CRLF2, образуя рецептор TSLP). Следовательно, антитела, предложенные в настоящем документе, могут вмешиваться в передачу сигналов, вызванную TSLP и/или рецептором TSLP. Предпочтительно антитела, предложенные в настоящем документе, не действуют синергически с TSLP для созревания иммунных клеток, в частности дендритных клеток. Другими словами, антитела по изобретению не увеличивают созревание иммунных клеток, индуцированных TSLP.

[48] Этот эффект особенно желателен для созревания дендритных клеток. Средства для измерения такого эффекта известны специалисту и раскрыты, в частности, в WO 2015/189302 на страницах 16-17 и в Примере 9 оттуда. В частности, антитела, предложенные в настоящем документе, не увеличивают экспрессию CD40 более чем на 50% по сравнению со стимуляцией только TSLP (без антитела). Предпочтительно экспрессия CD40 увеличивается не более чем на 25%, предпочтительно не более чем на 10% и еще более предпочтительно не более чем на 5%. В особенно предпочтительных вариантах реализации экспрессия CD40 в клетках, стимулированных TSLP и указанными антителами, не увеличивается или уменьшается по сравнению с клетками, стимулированными только TSLP.

Ингибирование IL7-индуцированной экспрессии интегринов $\alpha 4$, p7 и $\alpha 4/p7$

[49] В частных вариантах реализации антитела, предложенные в настоящем документе, ингибируют индуцированную IL7 экспрессию интегринов $\alpha 4$, $\beta 7$ и $\alpha 4/\beta 7$ *in vitro*. Индуцированная IL7 экспрессия интегринов $\alpha 4$, $\beta 7$ и $\alpha 4/\beta 7$ в настоящем документе обозначает либо увеличение уровня экспрессии интегринов $\alpha 4$ и $\beta 7$, либо увеличение количества или соотношения Т-лимфоцитов, экспрессирующих $\alpha 4$, $\beta 7$ и/или интегринов $\alpha 4/\beta 7$, либо и то, и другое. Ингибирование может быть частичным, то есть уровень экспрессии интегринов $\alpha 4$, p7 и $\alpha 4/p7$ в присутствии IL7 повышается по сравнению с базовым уровнем (то есть уровнем без антител или IL7) в присутствии антител, но меньше, чем в отсутствие антител; или ингибирование может быть полным, то есть уровень экспрессии интегринов $\alpha 4$, $\beta 7$ и $\alpha 4/\beta 7$ в присутствии IL7 и антитела не выше исходного уровня.

[50] В частных вариантах реализации антитела, предложенные в настоящем документе, ингибируют экспрессию интегринов $\alpha 4$, p7 и/или $\alpha 4/p7$ *in vitro*, т.е. уровень экспрессии интегринов $\alpha 4$, p7 и/или $\alpha 4/p7$ ниже в клетках, обработанных антителами (и с и/или без IL7), чем в необработанных клетках (т.е. без антител или IL7). Степень ингибирования может зависеть от дозы. Ингибирование экспрессии может быть более конкретно определено, исследовано и/или измерено, как изложено в WO 2015/189302 на с. 18, в частности в параграфе [58] и в Примере 16.

Ингибиторы интернализации CD127

[51] В конкретном варианте реализации предложенные в настоящем документе антитела ингибируют индуцированную IL7 интернализацию CD127. Таким образом, при инкубации с указанными антителами присутствие IL7 не вызывает снижения экспрессии CD127 на клеточной поверхности или вызывает менее сильное снижение экспрессии CD127 на клеточной поверхности, чем клетки, инкубированные без антител. В частных вариантах реализации при инкубации с указанными антителами уровень экспрессии на клеточной поверхности CD127, когда клетки инкубируют при 37°C в течение 15 минут с 5 нг/мл IL7, составляет по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90% от уровня экспрессии на клеточной поверхности в клетках, инкубированных без IL7. В условиях *in vitro* экспрессию на клеточной поверхности предпочтительно измеряют по истечении ограниченного периода времени, как указано выше. Кроме того, поскольку при низкой температуре большинство процессов клеточной интернализации ингибированы, этот эффект обычно лучше всего наблюдается при физиологической температуре, в частности при 37°C. Однако также предполагается инкубировать клетки при низкой температуре, в частности при 4°C.

[52] В предпочтительном варианте реализации антитела, предложенные в настоящем документе, не вызывают интернализацию CD127. Таким образом, экспрессия клеточной поверхности CD127 в клетках, инкубированных в присутствии указанных антител, не снижается или существенно не

снижается по сравнению с экспрессией клеточной поверхности в клетках, инкубированных в других идентичных условиях, но в отсутствие антитела. В частных вариантах реализации при инкубации при 37°C в течение от 30 до 45 минут в присутствии 50 нг/мл антитела уровень экспрессии CD127 на клеточной поверхности составляет по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90% от его уровня в инкубированных клетках. в отсутствие антитела. Этот эффект может наблюдаться и в отсутствие IL7 (как в обработанных антителами, так и в необработанных клетках), и в присутствии IL7, и/или в обоих случаях.

[53] Два описанных выше признака, связанных с интернализацией CD127, (т.е. ингибирование интернализации, вызванной IL7 или неиндукция интернализации) могут быть дополнительно определены и/или исследованы, как изложено в WO2015/189302, в частности в параграфах [59]-[63] на страницах 19-20 и на фиг. 16 и в Примере 5.

Нарушение взаимодействия CD127 - γ с-цепи

[54] Согласно частному варианту реализации, антитела, предложенные в этом документе, могут нарушать связывание CD127 с γ с-цепью IL7-R. Это означает, что в условиях (в частности, химических и физических условиях), когда CD127 и γ с-цепь связаны друг с другом в отсутствие антитела и, в частности, в присутствии IL7, присутствие указанных антител значительно снижает указанную связь. В частных вариантах реализации в присутствии антитела и IL7 CD127 не связывается с γ с. В частности, в присутствии антитела и IL-7 количество γ с-цепи, обнаруженной ассоциированной с (или связанной) с CD127, составляет менее 80%, предпочтительно менее 50%, еще более предпочтительно менее 25% или 10% от количества, связанного в отсутствие антитела (или в присутствии другого антитела против CD-127, такого как MD707-13) в других идентичных условиях, в частности в присутствии IL7. Такая особенность антитела может быть оценена, в частности, с помощью методов совместной иммунопреципитации, хорошо известных специалисту по исследованию взаимодействия белков и проиллюстрированных, например, в WO 2015/189302 в примере 21. В частности, клетки можно инкубировать в присутствии или в отсутствие тестируемого антитела, затем солубилизовать в условиях, обеспечивающих сохранение белковых комплексов, и полученный лизат можно подвергнуть иммунопреципитации с использованием анти-CD127, и оценить присутствие γ с в CD127-содержащем иммунопреципитированном комплексе методом вестерн-блоттинга с использованием анти- γ с-антител (и наоборот, иммунопреципитацию можно проводить с использованием анти- γ с-антител, а присутствие CD127 оценить с использованием анти-CD127-антител).

Антагонист в отношении взаимодействия IL7-IL7-R

[55] В соответствии с частным вариантом реализации макромолекула, в частности антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению дополнительно обладает антагонистическими

свойствами в отношении интерлейкина 7 (IL7), тем самым антагонизируя доступ, то есть связывание IL7 с CD127 на CD127-положительных клетках.

[56] Термин "антагонистические свойства в отношении взаимодействия IL7-IL7-R" означает, что антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, которые нацелены на IL7-R-альфа, обладают эффектом предотвращения доступности рецептора IL7, экспрессируемого на клетках CD127, особенно человеческих эффекторных Т-клетках, в частности человеческих Т-клетках памяти, для его связывающего партнера IL7, особенно человеческого IL7. В результате антагонистического связывания IL7 антитела по изобретению или их функциональные фрагменты приводят к лимфопении, предотвращая IL7-зависимую тимусную генерацию Т-клеток.

[57] Антагонистические свойства могут быть, в частности, антагонизмом в отношении передачи сигналов IL7-R, индуцируемой IL7. Антагонист передачи сигналов IL7-R, индуцированный IL7, может быть идентифицирован путем измерения ингибирования фосфорилирования STAT5, как описано в примерах. Индуцированное IL7 фосфорилирование STAT5 является маркером активации IL7-R, и ожидается, что антитело, противодействующее взаимодействию IL7-IL7-R, уменьшит индуцированное IL7 фосфорилирование STAT5.

[58] В частных вариантах реализации макромолекула по изобретению является антагонистом передачи сигналов IL7-R, индуцированных IL7. В конкретном варианте реализации макромолекула по изобретению ингибирует индуцированное IL7 фосфорилирование STAT5. В предпочтительных вариантах реализации ингибирование фосфорилирования STAT5 составляет более 50% при концентрациях антител до 55 нг/мл и/или ингибирование фосфорилирования STAT5 составляет более 80% при концентрациях антител до 100 нг/мл. Ингибирование фосфорилирования STAT5 можно оценивать способами, известными специалисту в данной области, и, в частности, способом, приведенным в разделе примеров, в частности, в примере 5 и/или на страницах 21, параграфы [69] и [70] и Пример 3 из WO2015/189302.

[59] Также желательно, чтобы макромолекула по изобретению (в частности антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или молекула-миметик антитела) ингибировала активацию и/или не активировала или не увеличивала активацию PI3-k и/или сигнальные пути ERK (внеклеточной сигнально-регулируемой киназы) и, в частности, ингибируют фосфорилирование и/или не индуцируют или не увеличивают фосфорилирование PI3-k и/или ERK 1 и/или ERK 2. В частности, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или молекулу-миметик антитела, предложенные в настоящем документе, и, в частности, такое антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или молекулу-миметик антитела, которые являются антагонистом в отношении взаимодействия IL-7-IL-7R, не индуцируют активацию PI3-k и/или пути ERK (предпочтительно пути PI3-k и пути ERK), и, в частности, не индуцируют фосфорилирование PI3-k и/или ERK 1 и/или ERK 2, более конкретно, не индуцируют фосфорилирование PI3-k и ERK 1 и ERK 2. В частности, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или молекула-миметик антитела, предложенные в настоящем

документе, и, в частности, такое антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или молекула-миметик антитела, которые являются антагонистом в отношении взаимодействия IL-7-IL-7R, ингибируют активацию путей PI3-k и/или ERK и, в частности, ингибируют фосфорилирование PI3-k и/или ERK 1 и/или ERK 2, более конкретно ингибируют фосфорилирование PI3-k и ERK 1 и ERK 2. Активация путей и/или фосфорилирования указанных белков может быть исследована способами, известными специалисту, и, в частности, с помощью вестерн-блоттинга, как показано на фиг.7 и в примере 8.

Антагонист для связывания TSLP

[60] Поскольку антитела, предложенные в настоящем документе, связывают CD127 в IL7-R, они могут также связывать CD127 в TSLPR и, в частности, посредством стерического затруднения и/или конкуренции на общих сайтах связывания, они могут ингибировать связывание TSLP с TSLPR. Другими словами, антитела, предложенные в настоящем документе, могут проявлять антагонистическую активность в отношении связывания TSLP.

Ингибитор TSLP-индуцированного продуцирования TARC

[61] В конкретном варианте реализации антитела, предложенные в настоящем документе, ингибируют индуцированное TSLP продуцирование TARC CD127-положительными клетками. Как упомянуто выше, TSLP-стимулированные дендритные клетки продуцируют повышенные уровни TARC. Это может быть результатом их связывания с TSLPR и их потенциального действия в качестве антагонистов связывания TSLP. В конкретном варианте реализации антитела, предложенные в настоящем документе, не увеличивают созревание дендритных клеток (где созревание определяется, например, повышенной экспрессией маркера клеточной поверхности CD40 и/или CD80).

[62] Уровень индуцированной TSLP выработки TARC может быть ниже в клетках, обработанных TSLP вместе с антителами против CD127, предложенными в настоящем документе, чем в клетках, обработанных одним TSLP. Другими словами, антитела, предлагаемые в настоящем документе, могут быть ингибиторами TSLP-индуцированной выработки TARC. В варианте реализации изобретения антитела, предложенные в настоящем документе, снижают уровни выработки TARC. В конкретном варианте реализации уровень выработки TARC в клетках, обработанных TSLP и антителом, предложенным в настоящем документе, снижается более чем на 10%, предпочтительно более чем на 20%, по сравнению с уровнем в клетках, обработанных одним TSLP, даже при низких концентрациях антител 1 мкг/мл. Измерение выработки TARC может быть выполнено на CD127-положительных иммунных клетках, в частности на дендритных клетках, из образца крови с использованием любого стандартного способа, известного специалисту, и проиллюстрировано, например, в WO 2015/189302 в примере 9.

[63] В конкретном варианте реализации антитела, предложенные в настоящем документе, являются цитотоксическими в отношении клеток человека, особенно человеческих Т-клеток, экспрессирующих CD127. Клетками человека, экспрессирующими CD127 в виде цепи рецептора IL7, являющегося мишенью для указанных антител, являются в основном Т-лимфоциты и, более точно, субпопуляции эффекторных Т-лимфоцитов, включая наивные Т-клетки и Т-клетки памяти, но не являются регуляторными Т-клетками (Treg), особенно - не являются покоящимися натуральными Treg. Т-клетки памяти генерируются в результате праймирования антигенов и в основном определяются их функциональными характеристиками, в том числе способностью подвергаться пролиферации при повторной активации и дифференцировке во вторичные эффекторные клетки и клетки памяти. Аналогично, целевой рецептор TSLP (как комплекс, включающий альфа-цепь IL-7-R) регулирует дифференцировку Т-хелперных лимфоцитов, В-клеток и дендритных клеток.

[64] В частности, антитела, предложенные в настоящем документе, обладающие "цитотоксической активностью в отношении Т-клеток" или цитотоксическими свойствами (цитотоксические антитела), вызывают истощение популяции эффекторных Т-клеток, убивая эти клетки, и соответственно уменьшают количество этих клеток при введении. И наоборот, указанные антитела не изменяют субпопуляцию регуляторных Т-клеток или не изменяют ее в значительной степени, позволяя клеткам Treg выполнять свою функцию. В этом контексте в конкретном варианте реализации после введения указанных антител соотношение регуляторных Т (Treg) к эффекторным Т (Teff) клеткам увеличивается. В частности, антитела, предложенные в настоящем документе, позволяют повысить указанное соотношение примерно на 10% или более. В частности, увеличение соотношения Treg по сравнению с Teff составляет около 20%.

[65] В частности, цитотоксические антитела проявляют антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). В качестве альтернативы, антитела, предложенные в настоящем документе, не имеют свойств ADCC. Потенциал ADCC антитела может считаться положительным, когда специфическая цитотоксичность составляет, например, выше 10%. Свойства ADCC можно оценить в анализе ADCC, таком как тест, описанный в Примере 10 WO 2015/189302. Когда антитело представляет собой антитело крысы, эффекторными клетками, используемыми в анализе ADCC, предпочтительно являются клетки LAK (лимфокин-активируемый киллер) крысы. Когда антитела являются гуманизированными, анализ ADCC можно проводить, в частности, на человеческих NK-клетках.

[66] Антитела по изобретению, которые обладают как цитотоксическими, так и антагонистическими свойствами против CD127-положительных клеток, обеспечивают кумулятивный эффект этих свойств в отношении истощения эффекторных Т-клеток, особенно Т-клеток памяти, тем самым обеспечивая более сильное истощение (истощение пула CD127+ клеток)

и соответствующее уменьшение количества Т-клеток-мишеней.

[67] В приведенных выше параграфах, а также в Примерах описано, как исследовать соответствующие желаемые функциональные характеристики антител, предложенных в этом документе. В следующих разделах будут подробно описаны различные структурные характеристики и возможные модификации антител. В свете этих указаний специалист в данной области сможет получить антитела, имеющие нижеприведенные структурные характеристики, а также желательные функциональные характеристики, в частности, взяв за начало антитело N13B2-hVL6, которое имеет желаемые функциональные характеристики.

[68] Специалисту известно, что при введении людям, желательно, чтобы антитела представляли как можно более сильную гомологию с человеческими антителами. Степень идентичности с человеческим антителом измеряется как % человеческих остатков в последовательности антитела, в частности, в каркасе варибельного домена легкой или тяжелой цепи антитела, т.е. % остатков в последовательности антитела, в частности, в каркасе варибельного домена легкой или тяжелой цепи антитела, которые идентичны в том же функциональном положении остатку в наиболее гомологичном из известных человеческих антител, в частности в каркасе наиболее гомологичного известного варибельного домена легкой или тяжелой цепи человеческого антитела. Эта особенность как правило выражена в настоящем документе, как и в литературе, как "антитело А (или каркасная последовательность его варибельного домена) имеет xx % человеческих остатков", что означает, что антитело А (или каркасная последовательность его варибельного домена) имеет xx % остатков, которые идентичны в том же функциональном положении остаткам наиболее гомологичного из известных антител человека (или каркасной последовательности его варибельного домена). Такая степень идентичности может быть измерена с помощью средств, известных специалисту, и, в частности, с помощью инструмента DomainGapAlign Международной информационной системы по иммуногенетике (IMGT), как было выяснено в ходе открытого заседания группы экспертов INN BO3 (апрель 2015 г.). Предпочтительно, антитела, предложенные в настоящем документе, имеют более чем 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 84%, более чем 84% и даже более предпочтительно по меньшей мере 85% идентичности с антителом человека, в частности, на основании определения с использованием инструмента DomainGapAlign. Указанная степень идентичности может быть определена только для варибельного домена легкой цепи или только для легкой цепи (по сравнению с варибельным доменом легкой цепи или легкой цепи человеческого антитела) или для легкой цепи и тяжелой цепи, взятых вместе, путем сравнения каждой цепи с наиболее гомологичной соответствующей цепью человеческого антитела и регистрации кумулятивного процента идентичности. В частности, варибельный домен легкой цепи антитела или легкая цепь антитела по изобретению составляет по меньшей мере 80%, более конкретно, 84%, и еще более конкретно по меньшей мере 85% человеческих остатков. Варибельные домены легкой цепи конкретного антитела, предложенные в данном документе,

имеют соответственно 84,2% (SEQ ID No: 9); 85,3% (SEQ ID No: 10 и SEQ ID No: 11) и 86,3% (SEQ ID No: 12) человеческих остатков. Предпочтительный переменный домен тяжелой цепи антитела, предложенный в настоящем документе (SEQ ID No: 7), имеет 90,8% человеческих остатков.

[69] Переменный домен легкой цепи антитела, предложенного в настоящем документе, может включать до 135 аминокислот, предпочтительно до 120 аминокислот и еще более предпочтительно до 110 или 107 аминокислот. Переменный домен легкой цепи антитела, предложенного в настоящем документе, может включать по меньшей мере 80, предпочтительно по меньшей мере 90 и даже более предпочтительно по меньшей мере 100 или 106 аминокислот. Переменный домен легкой цепи антитела, предложенного в настоящем документе, может содержать от 80 до 135, предпочтительно от 90 до 120 и еще более предпочтительно от 105 до 110 аминокислот.

[70] Предложенная в настоящем документе легкая цепь антитела может содержать до 250 аминокислот, предпочтительно до 230 аминокислот и еще более предпочтительно до 214 или 211 аминокислот. Предложенная в настоящем документе легкая цепь антитела может содержать по меньшей мере 150, предпочтительно по меньшей мере 190 и даже более предпочтительно по меньшей мере 200 или 210 аминокислот. Предложенная в настоящем документе легкая цепь антитела может включать от 150 до 250, предпочтительно от 190 до 230 и еще более предпочтительно от 210 до 220 аминокислот.

[71] В настоящем документе также представлены полипептиды, которые представляют собой (i) антигенсвязывающие фрагменты антител, предложенных в данном документе, в частности антигенсвязывающие фрагменты, состоящие из или содержащие фрагмент легкой цепи антитела или переменных областей легкой цепи антитела, предложенных в настоящем документе, переменный домен тяжелой цепи антитела, предложенный в настоящем документе, и/или (ii) молекулы-миметики антител, предложенные в настоящем документе.

[72] Антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полипептид, который специфически связывается с белком CD127, согласно определению выше в соответствующем разделе (параграфы [44] - [47]), и содержит по меньшей мере три CDR из N13B2-h3 (состоящие из последовательности SEQ ID NO: 4-6), предпочтительно фрагмент переменных доменов легкой цепи, предложенный в настоящем документе (с SEQ ID NO: 9-12), содержащий указанные последовательности CDR. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере 40, предпочтительно по меньшей мере 50 и еще более предпочтительно по меньшей мере 70 или 74 аминокислоты. Антитело-связывающий фрагмент может содержать не более 100, предпочтительно не более 90 и даже более предпочтительно не более 80 или 74 аминокислот. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать от 40 до 100, от 50 до 90 и предпочтительно от 60 до 100 и еще более предпочтительно от 50 до 70 или от 60 до 80 аминокислот. Антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, может, в частности, иметь любые подходящие функциональные признаки, раскрытые в отношении антител, предложенных в этом документе, в

частности признаки, раскрытые в пунктах [47]-[62].

[73] Соответственно, выделенный полипептид, предложенный в настоящем документе, может состоять из последовательности до 250 аминокислот, конкретно до 217, до 214, до 211, более конкретно, до 200, до 175 до 150, до 135, до 120, до 107, еще более конкретно, до 100, до 90, до 80, до 74, до 70, до 60 аминокислот.

[74] Молекула-миметик антитела представляет собой полипептид со свойствами, подобными антителу, в частности, со сходными свойствами связывания с CD127. Миметиками антител могут быть, например, молекулы-аффитела, аффилины, аффимеры, антикаины, монотела и т.д. Молекула-миметик антитела, предложенная в настоящем документе, может, в частности, иметь любые подходящие функциональные признаки, раскрытые в отношении антител, предложенных в настоящем документе, в частности, признаки, раскрытые в пунктах [47]-[62].

[75] В частности, антитело по изобретению представляет собой гуманизированное антитело, которое содержит константные домены, полученные из константных доменов человека. В частности, константный домен легкой цепи антитела происходит от константного домена легкой цепи каппа человека и/или константный домен тяжелой цепи антитела происходит от константной области тяжелой цепи IgG1, IgG2 или IgG4 человека, особенно от константной области тяжелой цепи IgG4 человека. "Полученный из" означает некоторые точечные мутации путем аминокислотных замен, таких как IgG4 (S228P) или IgG1 (E333A). Эти мутации, хорошо известные специалисту в данной области, обычно модифицируют некоторые свойства родительской цепи. Например, они приводят к меньшей иммуногенности по сравнению с родительским антителом или отменяют связывание с Fcγ-рецептором или устраняют димеризацию мономерного антитела или стабилизируют димеризацию, делая антитела лучше для терапевтического использования у человека. Антитело по изобретению, полученное из родительского константного домена тяжелой и легкой цепи, содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID No: 26, SEQ ID No: 27 или в SEQ ID No: 28 или их фрагмента, соответственно. Более конкретно, константный домен легкой цепи антитела состоит из последовательности, указанной в SEQ ID No: 27. В частности, константный домен тяжелой цепи антитела содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID No: 26, или ее фрагмента. Более конкретно, константный домен тяжелой цепи антитела состоит из последовательности, приведенной в SEQ ID No: 26.

[76] В настоящем документе также представлены выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептид по изобретению, или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе. В частности, указанные молекулы нуклеиновой кислоты кодируют переменный домен легкой цепи или легкую цепь антитела, предложенного в настоящем документе, в комбинации с выделенными молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими тяжелую цепь антитела, предложенными в настоящем документе, в соответствии с любым из приведенных в настоящем документе определений. В частности, в настоящем документе

предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, содержащий или состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 9; SEQ ID No: 10; SEQ ID No: 11; SEQ ID No: 12. В частности, выделенная молекула нуклеиновой кислоты по изобретению содержит или состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID No: 18. В частности, указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты представлена в комбинации с выделенной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь, включающую три CDR, состоящие из последовательностей, приведенных в SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2 и SEQ ID No: 3, в частности, кодирующей вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности, указанной в SEQ ID No: 7, более конкретно, выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, состоящую из последовательности, указанной в SEQ ID No: 13. В предпочтительном варианте реализации представлена комбинация выделенных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанная комбинация включает или состоит из первой выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16, SEQ ID No: 17 и SEQ ID No: 18; и второй выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности SEQ ID No: 13. В другом предпочтительном варианте реализации представлена комбинация выделенных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанная комбинация включает или состоит из первой выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности SEQ ID No: 18; и второй выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности SEQ ID No: 13.

[77] В настоящем документе также представлены полинуклеотиды, кодирующие полипептидную последовательность полной легкой цепи, включающую как вариабельный, так и константный домен, то есть, в частности, полинуклеотиды, кодирующие одну из последовательностей SEQ ID No: 9-12 и последовательность SEQ ID No: 27 или 28, в частности полинуклеотиды, содержащие или состоящие из одной из последовательностей SEQ ID No: 15-18, конкатенированных с SEQ ID No: 30 или SEQ ID No: 31. Такие полинуклеотиды представлены, в частности, в комбинации с полинуклеотидом, кодирующим полипептидную последовательность полной тяжелой цепи, содержащей как вариабельный, так и константный домен, то есть, в частности, полинуклеотиды, кодирующие SEQ ID No: 7 и последовательность SEQ ID No: 26, в частности, полинуклеотиды, содержащие или состоящие из SEQ ID No: 13, конкатенированной с SEQ ID No: 29.

[78] В частности, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, предложенные в настоящем документе, могут преимущественно содержать, помимо последовательности, кодирующей легкую цепь и, необязательно, тяжелую цепь антитела, предложенного в настоящем документе, в обратном

направлении от последовательности, кодирующей указанные цепи антитела, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, позволяя секретировать указанные цепи при экспрессии в продуцирующей клетке. Они также могут содержать одну или несколько последовательностей, кодирующих один или несколько маркерных пептидов, для обнаружения и/или облегчения очистки указанных цепей.

[79] В настоящем документе также представлен вектор для клонирования и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, предложенной в настоящем документе. В частности, указанный предложенный вектор представляет собой плазмиду, подходящую для клонирования и/или экспрессии в клетках млекопитающих, которая содержит регуляторные последовательности для транскрипции и экспрессии. Соответственно, в данном документе предложен вектор, содержащий полинуклеотид, описанный выше, в частности полинуклеотид, описанный в параграфах [76]-[78].

[80] Кроме того, в данном документе предложены клетки или клеточные линии, рекомбинированные с молекулой нуклеиновой кислоты, как указано выше, в частности вектор, особенно, клетки или клеточные линии млекопитающих или птиц, в частности, как подробно показано на фиг.2. Например, Клетки яичника китайского хомяка, генетически модифицированные для уменьшения глобального фукозилирования. Действительно, антитела, в которых отсутствует фукозилирование ядра, демонстрируют значительно повышенную антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) (von Horsten et al., 2010). Другим примером является клеточная линия EB66, которая, по природе, обладает свойствами низкого фукозилирования (Olivier et al., 2010). Антитела могут также продуцироваться в клетках, временно трансфицированных молекулой нуклеиновой кислоты, как указано выше, в частности вектором, в частности клетками COS, в частности, как подробно описано в примере 2.

[81] В настоящем документе также представлены способы получения полипептида, предложенного в настоящем документе, в частности, легкой цепи антитела и/или моноклонального антитела, причем указанные способы включают стадию экспрессии указанного полипептида, легкой цепи антитела или моноклонального антитела (или легкой и, необязательно, тяжелой цепи моноклонального антитела) в клетках, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный полипептид, в условиях, обеспечивающих выделение указанного полипептида и стадию выделения указанного полипептида. В частности, антитела или их фрагменты получают в клетках, которые обладают низкими свойствами фукозилирования, таких как клетки птиц EB66.

[82] В настоящем документе также представлена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид (в частности, вариабельный домен легкой цепи антитела или легкую цепь антитела) и/или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или соответствующую молекулу-миметик антитела, и/или выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, согласно определению выше, и фармацевтический носитель. Указанная фармацевтическая композиция может дополнительно содержать другой активный ингредиент. Указанная композиция представлена, в частности, в

составе, подходящем для системного введения или для местного применения. В частности, в настоящем документе предложены композиции, подходящие для местного применения, в частности для внутримышечной или подкожной инъекции, для инъекции с использованием устройства, такого как автоинъектор (или ручка-инъектор), для трансдермального введения, в частности с использованием трансдермального пластыря, для трансмукозального введения, в частности интраназального или ректального введения. В частности, в настоящем документе предложены композиции, подходящие для местного введения в желудочно-кишечный тракт (GI), в частности посредством перорального введения, в частности для лечения кишечного заболевания, такого как болезнь Крона или ЯК, в частности композиции, подходящие для доставки в толстую кишку. В частности, в настоящем документе предложены композиции, подходящие для системного введения, в частности для парентерального или энтерального введения, в частности для внутривенного введения или перорального введения. Как известно специалисту, энтеральное введение может быть либо местным введением в желудочно-кишечный тракт, либо системным введением. В тех случаях, когда такие фармацевтические композиции или их применения представлены в настоящем документе, следует понимать, что также могут быть представлены носитель для введения и их применения, например, когда фармацевтическая композиция для инъекций представлена явно, следует понимать, что композиция представлена сама по себе, а также в устройстве или в комбинации с устройством, позволяющим выполнять введение и/или инъекцию указанной композиции ("устройство для доставки"). Примеры устройств для доставки включают, среди прочего, автоинъекторы, в частности многокамерные шприцы и трансдермальные пластыри. Соответственно, в данном документе предоставляется устройство для доставки, в частности автоинъектор, насос или трансдермальный пластырь, содержащие указанную композицию, и их применения, как представлено ниже в отношении фармацевтических композиций. В настоящем документе также представлен набор, включающий фармацевтическую композицию и устройство для локальной доставки, в частности устройство для подкожной, энтеральной или пероральной доставки, в частности предварительно заполненный шприц или безыгольное устройство, содержащее указанную композицию и/или подходящее для введения указанной композиции, и его применение, как представлено ниже в отношении фармацевтических композиций. Такая фармацевтическая композиция предоставляется в любой подходящей форме для введения, в том числе в виде раствора, в частности стерильного водного раствора, в виде суспензии, в виде твердого вещества, в частности лиофилизированного твердого вещества, в частности для адсорбции на (или в адсорбированном виде на) пластыре. и/или для ресуспендирования и введения в виде раствора, в виде пилули, таблетки или другой твердой формы, подходящей для перорального введения, в частности с отсроченным или пролонгированным высвобождением, в виде наночастиц, например, композиция, содержащая наночастицы с полипептидом, адсорбированным на поверхности или внутри указанных наночастиц и т.д. Форма фармацевтической композиции и, необязательно, характер устройства для доставки могут быть подходящими для доставки активного ингредиента,

предложенного в настоящем документе, системно или локально, т.е. может подходить для активного ингредиента для достижения целевых клеток, тканей, органов в активном состоянии. В частности, форма фармацевтической композиции и, необязательно, характер устройства доставки могут быть подходящими для доставки в желудочно-кишечный тракт, в частности в толстую кишку. Считается, что фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель; однако фармацевтические композиции также предоставляются без носителя для аналогичных применений и целей, когда такой носитель не требуется для фармацевтического применения, например, если продукт вводят в виде чистого лиофилизированного твердого вещества. В частности, введение осуществляют в соответствии с любыми подходящими способами, такими, как описанные в настоящем документе для кишечного высвобождения, особенно для кишечного отсроченного высвобождения.

[83] В настоящем документе также представлена композиция, содержащая в качестве активного ингредиента полипептид (в частности, вариабельный домен легкой цепи антитела или легкую цепь антитела) и/или антитело (в частности, моноклональное антитело), соответствующий антигенсвязывающий фрагмент или молекулу миметик антитела, согласно определению выше, или фармацевтическая композиция, согласно определению выше, в составе, подходящем для контроля выживания или размножения CD127-положительных клеток человека, в частности CD127-положительных эффекторных клеток человека, особенно выживания или размножения Т-клеток памяти CD127+, особенно Т-клеток памяти, которые одновременно являются CD127+ и CD8+, или которые одновременно являются клетками CD127+ и CD4+, при введении пациенту-человеку. В частности, указанная композиция, содержащая антитело (или другой агент, как указано выше) в качестве активного ингредиента, находится в составе, подходящем для контроля дифференцировки и/или созревания дендритных клеток при введении пациенту.

[84] Авторы изобретения неожиданно показали, что однократная инъекция антитела, предложенного в настоящем документе, обеспечивает устойчивый эффект, и воспалительный ответ все еще значительно снижен у животных, которых лечили однократной инъекцией предложенных антител, вплоть до 14 месяцев и даже до 18 месяцев после указанной однократной инъекции. Введение и предпочтительно однократное введение полипептида, в частности легкой цепи антитела и, более конкретно, антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или молекулы- миметика антитела, предложенного в настоящем документе, предпочтительно оказывает быстрое и/или длительное действие на эффекторные Т-клетки памяти. Быстрый эффект наблюдается предпочтительно в течение недели и более предпочтительно в течение 48 часов и еще более предпочтительно в течение дня после введения указанного полипептида, цепи антитела или антитела. Длительный эффект наблюдается предпочтительно по меньшей мере 12 месяцев и более предпочтительно по меньшей мере 14 месяцев после самого последнего (и, предпочтительно, однократного) введения указанного полипептида, цепи антитела или антитела. Такой эффект

является, в частности, обратимым (в частности, ответ Т-клеток может быть восстановлен новой вакцинацией). Такой эффект предпочтительно является специфическим в отношении антигена и/или ответа и предпочтительно не ассоциирован с измеримой лимфодеплецией (то есть общее количество лимфоцитов у субъекта не уменьшается, согласно измерениям обычными способами). В остальном такой эффект можно определить как клональную делецию Т-клеток памяти или как обратимую антигенспецифическую делецию иммунной Т-памяти. Влияние такого введения на эффекторные Т-клетки памяти может быть оценено путем сравнения уровней секретирующих IFN- γ клеток (измеренных, например, с помощью ELISPOT) в ответ на антиген, например, туберкулин, у вакцинированных субъектов (в частности, у павианов), которых позднее лечили полипептидом, цепью антитела или моноклональным антителом, предложенным в настоящем документе, и у необработанных вакцинированных субъектов: эффект является наблюдаемым, если измеренный уровень антигенспецифических Т-клеток значительно ниже (предпочтительно по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 40% ниже) у получивших лечение субъектов в соответствующий момент времени после лечения. Такой эффект можно также измерить, оценивая другим способом воспалительную реакцию на данный антиген, например, местную, в частности кожную, воспалительную реакцию в ответ на местно вводимый антиген. В качестве альтернативы, может быть использован анализ тетрамера МНС. Способы исследования такого эффекта известны специалисту в данной области и проиллюстрированы в настоящем документе, в частности, в примере 6.

[85] Кроме того, авторы изобретения неожиданно показали, что антитело, предложенное в настоящем документе, может оказывать быстрое действие, в частности на активацию Т-клеток, в частности на высвобождение цитокинов Т-клетками, в частности в воспалительной ткани. Такой эффект, в частности, наблюдается в течение недели, предпочтительно в течение 48 и даже более предпочтительно в течение 24 часов после введения антитела, и, в частности, наблюдается как уменьшение выработки (или высвобождения) IFN γ . Такой эффект, в частности, наблюдается локально, то есть в месте введения антитела или в месте доставки. В частности, антитело, предложенное в настоящем документе, производит быстрый эффект, в частности быстрый локальный эффект, в частности, на высвобождение цитокинов Т-клетками, в частности, производит эффект, наблюдаемый в течение 24 часов после введения. Когда антитело вводят для локальной доставки, но не непосредственно в месте предполагаемой доставки, антитело может оказывать быстрый эффект, как описано выше, в месте доставки, в течение тех же периодов времени после доставки, а не после введения, что может подразумевать или не подразумевать задержку от момента введения, как известно специалисту.

[86] Композиция, предложенная в настоящем документе, может дополнительно содержать дополнительное соединение, обладающее терапевтическим иммуномодуляторным действием, в частности, на клетки, участвующие в аллергит или аутоиммунитете. Для иллюстрации, примерами

представляющих интерес иммуномодуляторов являются другие моноклональные антитела, нацеленные на Т-клетки, такие как анти-CD3, анти-ICOS или анти-CD28-антитела, или рекомбинантные белки или антитела, нацеленные на вспомогательные А-клетки, такие как CTLA4Ig или анти-CD40-антитела.

[87] Полипептид, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или молекула-миметик антитела, выделенная молекула нуклеиновой кислоты, клетка и/или композиция, предложенные в настоящем документе, могут быть представлены в комбинированном продукте, включающем дополнительные продукты, в частности агент с терапевтическим иммуномодуляторным эффектом, как указано выше, в частности, предназначенные для одновременного, раздельного или последовательного введения. В данном документе предложен комбинированный продукт, содержащий полипептид (в частности, переменный домен легкой цепи антитела или легкую цепь антитела) и/или антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или его молекулу-миметик, и/или выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, клетку или клеточную линию и/или фармацевтическую композицию, согласно определению выше, и необязательно дополнительно включающий:

- агент с терапевтическим иммуномодуляторным действием, в частности, предназначенный для введения в сочетании, например, с антителом по настоящему изобретению, в частности, когда указанное введение является либо одновременным, либо раздельным по времени, и/или когда указанное введение осуществляется тем же или другим путем; и/или
- устройство для введения продукта.

[88] Полипептид, в частности легкая цепь антитела и/или антитело, в частности моноклональное антитело и/или антигенсвязывающий фрагмент, или молекула-миметик антитела и/или нуклеиновая кислота, вектор, клетка или клеточная линия и/или фармацевтическая композиция или композиция, согласно определению выше, в частности, представлены для применения у пациента-человека для лечения патологий или патологических состояний, на которые влияют иммунные ответы, особенно ответы Т-клеток памяти. Такие состояния или патологии включают состояния или патологии, вызванные отторжением трансплантата, аутоиммунные заболевания, аллергические заболевания, респираторные заболевания, хронические вирусные инфекции, хронические воспалительные заболевания, в частности хронические кишечные воспалительные заболевания, лимфому, лейкоз или другие раковые заболевания, включая заболевания, которые возникают в результате солидных опухолей, когда эти патологии ассоциированы с CD127-положительными клетками, а также с сигнальным путем IL-7, в частности, когда следует избегать увеличения созревания дендритных клеток. Соответственно, авторы изобретения показывают, что использование указанных агентов может быть рассмотрено для лечения конкретных аллергических кожных заболеваний, воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), в частности болезни Крона (CD) или язвенного колита (ЯК), или первичного синдрома Шегрена, или системной красной волчанки, или системного

склероза, или рассеянного склероза, или диабета типа I или острого лимфобластного лейкоза (например, Т-ОЛЛ) или лимфомы Ходжкина, или рака молочной железы, ассоциированного с клетками CD127+, рака почки, рака мочевого пузыря, рака легкого, рака поджелудочной железы или для лечения Т-клеточной лимфомы кожи, такой как лимфома Сезари, или для лечения острого лимфобластного лейкоза с мутацией усиления функции пути IL-7-R/TSRP или для лечения отторжения трансплантата и/или пациентов, нуждающихся в трансплантации и/или на стадии подготовки к трансплантации и/или перенесших трансплантацию. В предпочтительных вариантах реализации рассматривается лечение воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), в частности болезни Крона (CD) или язвенного колита (ЯК), или первичного синдрома Шегрена, или системной красной волчанки, или системного склероза, или рассеянного склероза, или диабета типа I. В частности, изобретение относится к полипептиду или его антителу или антигенсвязывающему фрагменту или его молекуле-миметику антитела, или к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, или к фармацевтической композиции по изобретению для применения в качестве лекарственного средства, более конкретно для применения в профилактике или лечении отторжения трансплантата органа или ткани или заболевания, выбранного из группы, состоящей из аутоиммунных заболеваний, в частности ревматоидного артрита, системного склероза, рассеянного склероза, диабета I типа, аутоиммунного тиреоидита, системной красной волчанки, первичного синдрома Шегрена и воспалительных заболеваний, в частности воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), более конкретно, болезни Крона и язвенного колита, и энцефаломиелита, а также аллергических заболеваний и раковых заболеваний и заболеваний, связанных с трансплантацией, и респираторных заболеваний, предпочтительно при местном применении.

[89] В настоящем документе предложены применения полипептида, легкой цепи антитела или антитела, соответствующего антигенсвязывающего фрагмента или молекулы-миметика антитела при лечении патологических состояний, включающих изменение иммунного ответа у пациента-человека, приводящее к доминантному толерогенному статусу, или, напротив, отсутствию толерантности в случаях, когда необходим контроль уровня иммунного ответа, а также разрушение злокачественных CD127-положительных клеток.

[90] Под "лечением" или "терапевтическим лечением" подразумевается, что проведенные этапы введения приводят к улучшению клинического состояния животного или человека, нуждающегося в этом, страдающего от расстройства (расстройств), ассоциированных с путем IL-7, то есть включающих активацию или пролиферацию CD127-положительных клеток. Такое лечение направлено на улучшение клинического состояния животного или человека-пациента путем устранения или облегчения симптомов, ассоциированных с расстройством (-ами), связанными с путем IL-7, то есть с активацией или пролиферацией CD127-положительных клеток. Предпочтительно лечение, предлагаемое в настоящем документе, позволяет восстановить здоровье. Предпочтительно, указанное лечение не имеет нежелательных отрицательных эффектов, связанных

с повышенным созреванием иммунных клеток, в частности дендритных клеток.

[91] В частных аспектах лечения пациентов представлены полипептид, антитело, антигенсвязывающий фрагмент, молекула-миметик антитела, полинуклеотид, клетки или клеточная линия или композиция, предназначенные и/или подходящие для применения для истощения CD127-положительных клеток при сохранении CD127-отрицательных клеток.

[92] В частных аспектах лечения пациентов представлено применение полипептида, антитела, антигенсвязывающего фрагмента, молекулы-миметика антитела, полинуклеотида, клеток или клеточной линии или композиции, предназначенных и/или подходящих для применения для предотвращения дифференцировки и/или экспансии и/или созревания CD127-положительных клеток, в частности дифференцировки, экспансии или созревания, индуцируемых IL-7 и/или TSLP, при этом оказывая незначительное влияние или не оказывая прямого влияния на CD127-негативные клетки.

[93] В частных аспектах лечения пациентов представлено применение полипептида, антитела, антигенсвязывающего фрагмента, молекулы-миметика антитела, полинуклеотида, клеток или клеточной линии или композиции, предназначенных и/или подходящих для применения для устранения/нейтрализации наивных Т-клеток и Т-клеток памяти путем вмешательства в передачу сигналов, индуцированную IL-7, при сохранении Treg-клеток.

[94] В частных аспектах лечения пациентов представлено применение полипептида, антитела, антигенсвязывающего фрагмента, молекулы-миметика антитела, полинуклеотида, линии клеток или клеток, предназначенных и/или подходящих для применения для истощения субпопуляций лимфоцитов или других популяций клеток, экспрессирующих CD127 (включая нормальные или патологические Т- и В-лимфоциты, NK-клетки, дендритные клетки и другие типы клеток, включая эпителиальные клетки) в результате цитотоксического действия антител, возможно, но не исключительно, посредством ADCC (антитело-зависимая клеточная цитотоксичность) и, необязательно, посредством CDC (комплемент-зависимая цитотоксичность).

[95] Также в данном документе предложен полипептид, в частности, легкая цепь антитела и/или антитело, антигенсвязывающий фрагмент, молекула-миметик антитела, полинуклеотид, клетки или клеточная линия или композиция, определенные выше, для применения в качестве активного ингредиента в комбинированой или дополнительной терапевтической схеме у пациента, нуждающегося в этом. Также предусмотрено применение полипептида, в частности легкой цепи антитела и/или антитела, антигенсвязывающего фрагмента, молекулы-миметика антитела, полинуклеотида, клеток или клеточной линии или композиции, определенных выше, в качестве терапевтически активного ингредиента в комбинированой или дополнительной терапевтической схеме у пациента, нуждающегося в этом.

[96] В вышеуказанных аспектах предполагаемое использование также применимо к нуклеиновым кислотам, векторам, клеткам, клеточным линиям, композициям и фармацевтическим

композициям, предложенным выше.

[97] Предложенные в настоящем документе средства и продукты, указанные выше, предназначены и/или являются подходящими для применения при патологиях, таких как вызванные отторжением трансплантата, аутоиммунные заболевания, аллергические заболевания, респираторные заболевания, хронические вирусные инфекциями, хронические воспалительные заболевания, в частности хроническое воспаление кишечника, лимфома, лейкоз или другие раковые заболевания, включая заболевания, возникающие в результате солидных опухолей, когда эти патологии ассоциированы с CD127-положительными клетками, а также с сигнальным путем IL-7, в частности, когда следует избегать увеличения созревания дендритных клеток. Соответственно, указанные средства и продукты в частности предназначены и/или являются подходящими для лечения определенных аллергических кожных заболеваний, воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), в частности болезни Крона (CD) или язвенного колита (ЯК), или острого лимфобластного лейкоза (например, Т-ОЛЛ) или лимфомы Ходжкина, или рака молочной железы, ассоциированных с клетками CD127+, рак почки, рак мочевого пузыря, рака легкого, рака поджелудочной железы или для лечения Т-клеточной кожной лимфомы, такой как лимфома Сезари, или для лечения острого лимфобластного лейкоза с мутацией усиления функции пути IL-7-R/TSRP или для лечения отторжения трансплантата и/или пациентов, нуждающихся в трансплантации и/или на стадии подготовки к трансплантации и/или перенесших трансплантацию.

[98] В частности, в настоящем документе предложено применение полипептида, в частности, легкой цепи антитела и/или антитела, антигенсвязывающего фрагмента, молекулы-миметика антитела, нуклеиновой кислоты, клеток, клеточной линии или композиции пациенту-человеку для лечения состояний и/или патологий, вызванных отторжением трансплантата, аутоиммунных заболеваний, аллергических заболеваний, респираторных заболеваний, хронических вирусных инфекций, хронических воспалительных заболеваний, в частности хронических воспалительных заболеваний кишечника, лимфомы, лейкоза или других раковых заболеваний, включая те, которые возникают в результате солидных опухолей, когда эти патологии ассоциированы с CD127-положительными клетками, а также с сигнальным путем IL7, в частности, когда следует избегать увеличения созревания дендритных клеток. Соответственно, указанные продукты предназначены, в частности, для лечения определенных аллергических кожных заболеваний, воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), в частности болезни Крона (БК) или язвенного колита (ЯК), или острого лимфобластного лейкоза (например, Т-ОЛЛ) или лимфомы Ходжкина или рака молочной железы, ассоциированных с клетками CD127+, рака почки, рака мочевого пузыря, рака легкого, рака поджелудочной железы или для лечения Т-клеточной кожной лимфомы, такой как лимфома Сезари, или для лечения острого лимфобластного лейкоза с мутацией усиления функции пути IL7-R/TSRP или для лечения отторжения трансплантата и/или пациентов, нуждающихся в трансплантации и/или на стадии подготовки к трансплантации и/или перенесших трансплантацию

или для лечения аутоиммунного заболевания или аллергического заболевания, или для лечения лейкоза, такой как острый лимфобластный лейкоз, или для лечения лимфомы, или для лечения ракового заболевания, или для лечения хронической вирусной инфекции, или для лечения воспалительных заболеваний, в частности ВЗК, особенно БК или ЯК, или для лечения респираторных заболеваний, или для профилактики и/или лечения симптомов, связанных с трансплантацией.

[99] В частности, в настоящем документе предложено способ лечения, включающий введение полипептида (в частности, варибельного домена легкой цепи антитела или легкой цепи антитела) и/или антитела, антигенсвязывающего фрагмента, молекулы-миметика антитела, или выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, клеток и/или клеточной линии или композиции и/или фармацевтической композиции, согласно определению выше, пациенту-человеку для лечения состояний и/или патологий, вызванных отторжением трансплантата, аутоиммунных заболеваний, аллергических заболеваний, респираторных заболеваний, хронических вирусных инфекций, хронических воспалительных заболеваний, в частности хронических кишечных воспалительных заболеваний, лимфомы, лейкоза или других раковых заболеваний, включая заболевания, возникающие в результате солидных опухолей, когда эти патологии ассоциированы с CD127-положительными клетками, а также с сигнальным путем IL-7, в особенно когда следует избегать увеличения созревания дендритных клеток. Соответственно, указанные способы предназначены, в частности, для лечения определенных аллергических кожных заболеваний, воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), в частности болезни Крона (БК) или язвенного колита (ЯК), или острого лимфобластного лейкоза (например, Т-ОЛЛ) или лимфомы Ходжкина, или рака молочной железы, ассоциированного с CD127+ клетками, рака почки, рака мочевого пузыря, рака легкого, рака поджелудочной железы, или для лечения Т-клеточной кожной лимфомы, такой как лимфома Сезари, или для лечения острого лимфобластного лейкоза с мутацией усиления функции пути IL7-R/TLSPR или для лечения отторжения трансплантата и/или пациентов, нуждающихся в трансплантации и/или на стадии подготовки к трансплантации и/или перенесших трансплантацию или для лечения аутоиммунного заболевания или аллергического заболевания, или для лечения лейкоза, такой как острый лимфобластный лейкоз, или для лечения лимфомы, или для лечения ракового заболевания, или для лечения хронической вирусной инфекции, или для лечения воспалительных заболеваний, в частности ВЗК, особенно БК или ЯК, или для лечения респираторных заболеваний, или для профилактики и/или лечения симптомов, связанных с трансплантацией.

[100] Авторы изобретения также показали, что у пациентов с ЯК уровни IL7, CD127 и/или mPNC TLSPR позволяют прогнозировать ответ на обычное иммуносупрессивное лечение: ответившие (то есть пациенты, у которых наблюдается выраженное снижение симптомов в ответ на лечение) имеют более низкие уровни IL-7 и CD127 и более высокие уровни TLSPR, чем не ответившие.

Соответственно, в настоящем документе предложены способы оценки *in vivo* вероятности ответа на иммуносупрессивное лечение у пациентов, в частности у пациентов с язвенным колитом (ЯК), включающие измерение в образце, полученном от указанного пациента, уровня IL7, CD127 и/или мРНК TLSPR или белка, и позволяющие сделать вывод о том, что вероятность ответа увеличена по сравнению с контрольной группой, когда измеренный уровень IL7 и/или CD127 ниже, чем средний уровень в указанной группе, и/или когда измеренный уровень TLSPR выше, чем средний уровень в указанной группе. Методы для выполнения требуемых измерений известны специалисту в данной области и могут включать использование антитела против CD127, в частности, для измерения уровней экспрессии белка CD127. Полипептид, в частности, легкая цепь антитела и/или моноклональное антитело, предложенные выше, представлены, в частности, для применения в таких способах, и такие способы представлены, в частности, с использованием такого полипептида, легкой цепи антитела и/или моноклонального антитела.

[101] В частности, в данном документе предложен способ выбора соединения из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающего фрагмента и молекулы-миметика антитела, причем этот способ включает по меньшей мере одну из следующих стадий:

- i. исследование связывания данного соединения с CD127, в частности с человеческим CD127, в частности с последовательностью эпитопа из домена D1 и/или из сайта 2b домена D2 из CD127. Эпитопная последовательность из домена D1 и/или из сайта 2b домена D2 может быть любой из эпитопных последовательностей, описанных в данном документе, в частности, как описано в параграфах [16], в частности эпитопной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 31, SEQ ID No: 33, SEQ ID No: 34, SEQ ID No: 35, SEQ ID No: 36 или SEQ ID No: 96 и, в частности, SEQ ID No: 34, SEQ ID No: 35 и SEQ ID No: 96. В конкретном варианте реализации изобретения исследование на связывание может включать исследование на связывание соединения с последовательностью эпитопа, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 34, SEQ ID No: 35 и SEQ ID No: 96, и исследование на связывание соединения с последовательностью эпитопа, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 42 и SEQ ID No: 43. Связывающая способность соединения может быть исследована любым из способов, известных в данной области, в частности методом Blitz, известным специалисту в данной области и проиллюстрированным, в частности, на фиг.3, в примере 3 и примере 4 в настоящем документе и в п. 14, фиг. 3, 4 и 6 и в соответствующих пояснениях, а также в примерах 1, 2, 6, 7 из WO 2015/189302, и/или способом из примера 10, раскрытого в настоящем документе; и/или
- ii. исследование ингибирования передачи сигналов IL7-R, индуцированной IL-7, в частности фосфорилирования STAT5, в присутствии данного соединения. Ингибирование, индуцированное IL7 в присутствии данного соединения, может быть

исследовано способом, раскрытым в примере 8 и/или примере 11 в настоящем документе; и/или

- iii. исследование активации фосфатидилинозитол-3-киназы в присутствии данного соединения. Активация фосфатидилинозитол-3-киназы в присутствии данного соединения может быть исследована в соответствии со способом, раскрытым в примере 8 и/или примере 11 в настоящем документе; и/или
- iv. исследование активации сигнального пути ERK в присутствии данного соединения. Активация сигнального пути ERK в присутствии данного соединения может быть исследована в соответствии со способом, раскрытым в примере 8 и/или примере 11 в настоящем документе;
- v. исследование способности связывания данного соединения по меньшей мере с одним бета-слоем сайта 2b домена D2 из CD127, в частности по меньшей мере с третьим бета-слоем сайта 2b, определяемым как нуклеокислоты SEQ ID No 34 и/или по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы SEQ ID No: 35 и SEQ ID No: 96. Связывающая способность соединения может быть исследована любым из способов, известных в данной области, в частности, методом Blitz, известным специалисту и проиллюстрированным, в частности, на фиг.3, примере 3 и примере 4 в настоящем документе и на с. 14, фиг. 3, 4 и 6 и соответствующих пояснениях, а также примерах 1, 2, 6, 7 из WO 2015/189302 и/или способом из примера 10, раскрытого в настоящем документе.

Способ может дополнительно включать в себя любой из следующих необязательных этапов или по меньшей мере один из следующих необязательных этапов:

- vi. исследование связывания CD127, в частности человеческого CD127, с общей γ с-цепью цитокиновых рецепторов в присутствии соединения. Связывание CD127 с общей γ с-цепью цитокиновых рецепторов цитокинов в присутствии соединения может быть оценено, в частности, с помощью методов совместной иммунопреципитации, хорошо известных специалисту для исследования взаимодействия белков и проиллюстрированных, например, в WO 2015/189302 в примере 21. В частности, клетки можно инкубировать в присутствии или в отсутствие тестируемого соединения, затем солубилизовать в условиях, обеспечивающих сохранение белковых комплексов, и полученный лизат может быть подвергнут иммунопреципитации против CD127, и присутствие γ с в CD127-содержащем иммунопреципитированном комплексе, может быть оценено вестерн-блоттингом с использованием анти- γ с-антител (и наоборот, иммунопреципитацию можно проводить с использованием анти- γ с-антител, а присутствие CD127 оценивать с использованием анти-CD127-антител); и/или

- vii. исследование интернализации CD127, в частности человеческого CD127, и/или IL7-индуцированной интернализации CD127 в присутствии соединения. Интернализация CD127, определенная в настоящем документе в параграфах [51]-[53], может быть дополнительно определена и/или исследована, как изложено в W02015/189302, в частности в параграфах [59]-[63] на страницах 19-20 и на Фигуре 16 в и примере 5; и/или
- viii. исследование созревания дендритных клеток, индуцированных TSLP в присутствии соединения. Созревание дендритных клеток, вызванное TSLP, определено в параграфах [47] и [48] настоящего документа. Средства для измерения такого эффекта известны специалисту и раскрыты, в частности, в публикации WO 2015/189302 на страницах 16-17 и в Примере 9 оттуда. В частности, средства для измерения такого эффекта включают измерение экспрессии CD40 между клетками, стимулированными соединением, и клетками, стимулированными только TSLP (без соединения).

В конкретном варианте реализации способа выбирают соединение, которое специфически связывается с CD127, в частности человеческим CD127, является антагонистом передачи сигналов IL7-R, индуцированной IL7, не индуцирующим активацию фосфатидилинозитол-3-киназы и/или сигнального пути ERK. В более конкретном варианте реализации способа выбирают соединение, которое специфически связывается с CD127, в частности с человеческим CD127, является антагонистом передачи сигналов IL7-R, индуцированной IL7, и не индуцирующим активацию фосфатидилинозитол-3-киназы и не индуцирующим активацию сигнального пути ERK.

[102] В частности, в настоящем документе предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, индуцируемого против CD127, возможно, вызванного иммунизацией животного, не являющегося человеком, такого как крысы штамма LOU/C Igk1a, доступного в Университете г.Лувен, Бельгия). Иммунизация может быть проведена с использованием фрагмента аминокислотной последовательности SEQ ID No: 22 и, в частности, фрагмента SEQ ID No: 22, содержащего эпитопную последовательность, определенную в настоящем документе, и, в частности, SEQ ID No: 35 и/или SEQ ID No: 96, в качестве иммуногена. Гибридома может быть получена путем слияния одноядерных клеток селезенки с иммуноцитомой IR983F крысы LOU. Гибридома может быть подвергнута скринингу в соответствии со способностью секретируемых моноклональных антител связываться с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 22, SEQ ID No: 35 и SEQ ID No: 96, в особенности SEQ ID No: 35 и/или SEQ ID No: 96. Таким образом, изобретение также охватывает иммуногенное соединение, причем указанное иммуногенное соединение представляет собой фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID No. 22, в частности фрагмент, содержащий по меньшей мере одну выбранную аминокислотную последовательность из группы SEQ ID No: 32, SEQ ID No: 33, SEQ ID No: 34, SEQ ID No: 35 и SEQ ID No: 96, в особенности SEQ

№ 34, SEQ ID No: 35 и SEQ ID No: 96, более конкретно SEQ ID No: 96. В конкретном варианте реализации изобретения иммуногенное соединение представляет собой линейный пептид, в частности линейный пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID No: 96, более конкретно, линейный пептид включающий или состоящий из, предпочтительно состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 35.

Краткое описание чертежей

Фигура 1. Аминокислотные последовательности антител, предложенные в настоящем документе

Панель А. Последовательность тяжелой цепи (VH). CDR выделены жирным шрифтом.

Панель В. Последовательность гуманизированных легких цепей (LH), полученных из N13B2. CDR выделены жирным шрифтом. N13B2-VL3 содержит исходные каркасные остатки N13B2-h3 в положениях 48 и 87 (подчеркнуты); N13B2-VL4-V48L и N13B2-VL5-F87Y содержат соответствующий гуманизированный каркасный остаток, а N13B2-VL6-V48L-F87Y содержат оба гуманизированных каркасных остатка.

Фигура 2. Производство антител - стабильная трансфекция

Для каждого из упомянутых антител в клетках CHO-M были выполнены три разные промышленные партии в соответствии с общепринятыми способами, с использованием коммерчески доступных бессывороточных сред, и в настоящем документе приведены титры, полученные в типичных экспериментах, измеренные с помощью анализа ELISA. Горизонтальная ось: время культивирования в днях, вертикальная ось: полученные титры антител в мкг/мл.

Фигура 3. Связывание с CD127

Связывание указанных антител с рекомбинантным CD127 анализировали методом ELISA в соответствии со способом, подробно описанным в примере 3. Горизонтальная ось: концентрация антитела в нг/мл, вертикальная ось: оптическую плотность на 450 нм в произвольных единицах.

Фигура 4. Ингибирование фосфорилирования STAT5

Ингибирование фосфорилирования STAT5 указанными антителами анализировали с помощью цитофлуорометрии в соответствии со способом, подробно описанным в примере 5. Процент клеток CD3+, окрашенных антителами pSTAT5, показан на панели А (горизонтальная ось: концентрация антител в нг/мл), а средняя интенсивность флуоресценции (в произвольных единицах) сигнала pSTAT5 для клеток CD3+ показана на панели В.

Фигура 5. Влияние на Т-клетки памяти

Панель А. Ответ DTH (площадь под кривой кривых эритемы) у павиана после инъекции N13B2.

Гиперчувствительность замедленного типа в ответ на провокацию туберкулином проанализировали у вакцинированных павианов после введения N13B2 (n = 7 павианов) или вспомогательного

вещества ($n = 4$ павиана) путем измерения кожной реакции в соответствии со способом, подробно описанным в примере 6. Вертикальная ось: площадь под кривой эритемы в произвольных единицах. Значения приведены для внутрикожных реакций, проводимых в заданные моменты времени, указанные в днях по горизонтальной оси, до или после введения N13B2 или вспомогательного вещества (вводимого в день 0). "После БЦЖ" соответствует результатам кожной реакции, выполненным после новой вакцинации БЦЖ ($nd =$ не определено).

Контроль с использованием только вспомогательного вещества не определяли в дни 150 и 180 и "после БЦЖ" (nd).

Панель В.

Ответ DTH (площадь под кривой кривых эритемы) у павиана после инъекции гуманизированного N13B2.

Гиперчувствительность замедленного типа в ответ на заражение туберкулином анализировали у вакцинированных павианов после введения гуманизированного N13B2 (AA892BB, 32257, V915GQ, 33874) или буфера путем измерения кожной реакции в соответствии со способом, подробно описанным в примере 6. Вертикальная ось: площадь под кривой эритемы, в произвольных единицах. Значения приведены для внутрикожных реакций, измеряемых перед введением гуманизированного N13B2 или буфера ("IDR1", первый столбик слева для каждого павиана), через 4 часа после введения гуманизированного N13B2 или буфера ("IDR2", второй столбик слева), через один, два и три месяца ("IDR3-5", с третьего по пятый столбик слева) и через четыре месяца ("IDR6", шестой столбик слева, только для V915GA) после введения гуманизированного N13B2 или буфера и после новой вакцинации БЦЖ ("IDR7", последний столбик слева).

Панель С.

Анализ IFN γ ELISPOT проводили на PBMC в крови у вакцинированного БЦЖ павиана, после провокации туберкулином и введения гуманизированного N13B2.

Частоту AG-специфических Т-клеток после заражения туберкулином анализировали у вакцинированных павианов после введения гуманизированного N13B2 (AA892BB, 32257, V915GQ, 33874) или с помощью анализа IFN γ методом ELISPOT в соответствии со способом, подробно описанным в примере 6. Вертикальная ось: частота пятен на 100 000 клеток. Значения приведены для ELISPOT без антигена ("без Ag", левые столбики) или с туберкулиновым антигеном (правые столбики), выполненного до введения гуманизированного N13B2 или буфера (первый столбик слева для каждой группы столбиков), через 4 дня после введения гуманизированного N13B2 или буфера ("IDR2"), через один, два и три месяца ("IDR3-5") и четыре месяца ("IDR6", только для V915GA) после введения гуманизированного N13B2 или буфера и после новой вакцинации БЦЖ (последний столбик слева, заштрихованный).

Фигура 6. Экспрессия IL-7, CD127 и TSLP у пациентов с ВЗК

Уровни экспрессии мРНК IL-7, CD127 (растворимая форма IL-7R α) и TSLP (полноразмерные) измеряли в соответствии со способом, подробно описанным в Примере 7, в образцах тканей от здоровых контрольных субъектов (контроль без ВЗК), здоровых и больных (воспаленных) образцах биопсии толстой кишки от пациентов с активным язвенным колитом (ЯК), которые не ответили (или перестали отвечать) на противовоспалительное лечение, и в образцах от пациентов с ЯК с неактивным заболеванием - т.е., которые были вылечены или находились в стадии ремиссии во время отбора проб ("ответившие"). Вертикальная ось: относительные единицы флуоресценции. Точки отображают значение для каждого образца в отдельной группе, горизонтальная полоска представляет средние значения для группы, а "усы" ошибок представляют стандартное отклонение. "*" обозначает р-значение <0,05; "***" - р-значение <0,01; "*****" - р-значение <0,0001.

Фигура 7. Ингибирование сигнальных путей CD127

Влияние различных антител против CD127 человека на активацию сигнальных путей оценивали с помощью вестерн-блоттинга, как подробно описано в примере 8. На фигуре представлены репрезентативные результаты от 6 различных доноров. "Без IL-7" соответствует образцу, который не был стимулирован IL-7. "С" соответствует контрольному образцу, стимулированному IL-7 в отсутствие антитела против CD127. Горизонтальные линии слева от блота представляют миграцию указанного маркера молекулярной массы. Стрелки справа от блота указывают миграцию тирозин-фосфорилированного STAT5, тирозина 199-фосфорилированного PI3-k p55, фосфорилированного Akt, фосфорилированного ERK 1/2 и, в качестве эталона загрузки, GAPDH.

Фигура 8. Подавление высвобождения цитокинов Т-клеток из биоптатов ЯК

Панель А. Продуцирование IFN γ образцами биопсии пациентов с ЯК, выращенными ex-vivo.
Панель В. Продуцирование IFN γ образцами биопсии пациентов с CD, выращенными ex-vivo.

На обеих панелях образцы были получены и обработаны, как подробно описано в Примере 9. Каждый символ представляет один образец от пациента, культивируемый с IgG ("Ctrl Ab") или с антителом против CD127 ("aIL-7R α "). Связанные символы представляют собой парные образцы от одного и того же пациента. **p <0,01 с критерием для связанных пар Уилкоксона. Продуцирование IFN γ была значительно ингибирована mAb против IL7R α . Аналогичные результаты наблюдались для образцов биопсии пациентов с CD.

Фигура 9. Антитела против IL-7R α человека и агонистические сигналы

Влияние различных антител против человеческого CD127 на активацию сигнальных путей STAT5, PI3K и ERK оценивали с помощью Вестерн-блоттинга, как подробно описано в Примере 11. На фигуре 9А показана одна из семи различных донорских клеток в отсутствие экзогенного

рекомбинантного человека IL-7. Панель А. "Среда" соответствует образцу, не содержащему никаких антител против человеческого CD127. "Без IL7" означает, что четыре образца не были стимулированы IL-7. Три образца предварительно обрабатывали 10 мкг/мл одного mAb против IL-7R α (N13B2-hVL6 или MD707-13-G4 или 1A11-G1).

Панель В. Количественное определение pI3K и pERK, скорректированное на экспрессию GAPDH и нормализованное к контрольным условиям среды ($n = 7$ различных доноров). Вертикальная ось: экспрессия, нормализованная к контролю. Точки отображают значение для каждого образца в отдельной группе, горизонтальная полоска представляет средние значения для группы, а "усы" ошибок представляют стандартное отклонение.

Фигура 10. Влияние антител против IL7-Ra человека на активацию пути IL7

Количественное определение сигнала фосфо-STAT5 было скорректировано с учетом экспрессии GAPDH и нормализовано к контрольным условиям среды. PBMC предварительно обрабатывали 10 мкг/мл одного mAb против IL7-Ra (N13B2-hVL6 или MD707-13-G4 или 1A11) и затем инкубировали в течение 10 мин при 37°C с 5 нг/мл IL7 человека. Количественные оценки сигнала фосфо-STAT5 были скорректированы на экспрессию GAPDH ($n = 7$ различных доноров). Пунктирная линия изображает состояние среды без обработки. Точки отображают значение для каждого образца в отдельной группе, горизонтальная полоска представляет средние значения для группы, а "усы" ошибок представляют стандартное отклонение. "*" обозначает р-значение $<0,05$ между указанными группами.

Фигура 11. Двойные mAb-агонисты/антагонисты против IL7-Ra индуцируют модификации транскрипции

Анализ последовательностей РНК человеческих PBMC ($n = 7$), инкубированных в течение 3,5 часов (1) с 5 нг/мл IL7 человека, (2) без IL7, (3,4,5) с 5 нг/мл IL7 человека и с различными анти- mAb IL7-Ra человека ((3): 10 мкг/мл N13B2-hVL6; (4): 10 мкг/мл MD707-13-Ig4; (5): 10 мкг/мл 1A11).

Панель А. Тепловая карта экспрессии 93 наиболее дифференцированно экспрессируемых генов (уровень ложноположительных результатов (FDR) 5%, кратность изменения (FD) > 2) между стимуляцией IL7 и контрольными условиями.

Панель В. Количественная оценка медианного профиля трех индуцированных IL7 кластеров в условиях стимуляции IL7, контроля и IL7 и анти-человеческого IL7-Ra.

Панель С. Диаграмма Венна для анализа последовательностей РНК человеческих PBMC ($n = 7$), инкубированных без IL-7 в течение 3,5 часов с различными mAb против IL-7R α человека (10 мкг/мл N13B2-hVL6, 10 мкг/мл. MD707-13-Ig4 №1 или 10 мкг/мл 1A11). Диаграмма Венна для 481 дифференциально экспрессируемых генов (FDR 5%, FC $> 1,5$), при сравнении mAb против IL-7R α человека и контрольных условий среды. Размер круга пропорционален количеству генов для каждой категории.

Примеры

Пример I. Гуманизация легких цепей

Следующую тяжелую цепь использовали во всех описанных в настоящем документе

экспериментах, если не указано иное

N13B2 гуманизованная_VH, нуклеотидная последовательность (SEQ ID No: 13):

CAGGTGCAGCTGGTCAATCAGGGGGGGGACTGGTCAAACCCGGGGGCTCACTGCGTCTGTC
ATGTGCCGTCTCAGGCTTCACACTGAGCGACTACTATATGGCATGGATCCGACAGGCACCAGG
CAAGGGACTGGAGTGGGTGTCTACTATTTCTGCCAGTGGCCTGAGGACCTACTATCCTGACAG
TGTC AAGGGAAGGTTCAACAATCTCACGGGATAACGCTAAAAATTCCCTGTACCTGCAGATGAA
CAGCCTGAGAGCCGAAGACACCGCTGTGTACTATTGCGCTCGCCCACTGTCCGCACACTATGG
CTTCAATTA CTTTGATTATTGGGGGCAGGGTACCCTGGTGACAG

TCTCCAGC

N13B2 гуманизованная_VH, Аминокислотная последовательность (SEQ ID No: 7): см. фиг. 1A

Следующие оптимизированные нуклеотидные последовательности использовали для получения
легких цепей антитела (аминокислотные последовательности которых представлены на фиг. 1B):

N13B2-h3 (SEQ ID No:14):

GAGATCGTCATGACGCAGTCCCCCGCAACGCTCTCCGTCTCCCCGGGGGAACGCGCGACC
CTGTCTGTCAGGACCTCCGAGGACATCTACCAAGGCCTCGCGTGGTATCAGCAGAAGCCC
GGCCAGGCCCCGCGGCTGTTGATCTACTCCGCGAACACCTTGACATCGGCATCCCGGCG
CGCTTCTCGGGGTCAGGGAGCGGCACCGAGTTCACCTGACCATCTCGTCGCTCCAGAGC
GAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACGACTACCCCTGGCGTTTCGGGGGC
GGGACCAAGGTGGAGATCAAG

N13B2hVL3 (SEQ ID No: 15):

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCGAGCCTGAGTGCGAGTGTGGGCGACCGCGTGACG
ATCACCTGCCGGACGTCCGAGGATATCTACCAGGGCCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCG
GGCAAGGCCCCCAAAGTCTGCTGTCTACAGCGCGAACACCTCCACATCGGCGTCCCCAGC
CGGTTACAGCGGCTCCGGCTCGGGAACGGACTACACCTCACGATCTCGTCCCTGCAGCCG
GAAGACTTCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGTATTACGACTACCCGCTGGCGTTTCGGTGCG
GGACCAAGGTTCGAGATCAAG

N13B2hVL4 (SEQ ID No: 16):

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCGAGCCTGAGTGCGAGTGTGGGCGACCGCGTGACG
ATCACCTGCCGGACGTCCGAGGATATCTACCAGGGCCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCG
GGCAAGGCCCCCAAAGTCTGCTGTCTACAGCGCGAACACCTCCACATCGGCGTCCCCAGC
CGGTTACAGCGGCTCCGGCTCGGGAACGGACTACACCTCACGATCTCGTCCCTGCAGCCG

GAAGACTTCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGTATTACGACTACCCGCTGGCGTTTCGGTGGC
GGACCAAGGTCGAGATCAAG

N13B2hVL5 (SEQ ID No: 17):

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCGAGCCTGAGTGCGAGTGTGGGCGACCGCGTGACG
ATCACCTGCCGGACGTCCGAGGATATCTACCAGGGCCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCG
GGCAAGGCCCCCAAACCTGCTGGTCTACAGCGCGAACACCCTCCACATCGGCGTCCCCAGC
CGGTTCAGCGGCTCCGGCTCGGGAACGGACTACACCCTCACGATCTCGTCCCTGCAGCCG
GAAGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTATTACGACTACCCGCTGGCGTTTCGGTGGC
GGACCAAGGTCGAGATCAAG

N13B2hVL6 (SEQ ID No: 18):

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCGAGCCTGAGTGCGAGTGTGGGCGACCGCGTGACG
ATCACCTGCCGGACGTCCGAGGATATCTACCAGGGCCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCG
GGCAAGGCCCCCAAACCTGCTGGTCTACAGCGCGAACACCCTCCACATCGGCGTCCCCAGC
CGGTTCAGCGGCTCCGGCTCGGGAACGGACTACACCCTCACGATCTCGTCCCTGCAGCCG
GAAGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTATTACGACTACCCGCTGGCGTTTCGGTGGC
GGACCAAGGTCGAGATCAAG

Каждую последовательность VL получали путем синтеза генов, вставленных в вектор клонирования (pUC57) с 5'- и 3'-конечными BsiWI и добавлением последовательности Козака (GCCACC) перед ATG. В качестве вектора экспрессии использовали плазмиду экспрессии pFuseCLlg-hk (Invivogen), содержащую константный домен CLкаппа человеческого IgG1.

Каждую клонирующую плазмиду (VL-pUC57-Genscript) расщепляли рестриктазой BsiWI для экстракции вставки VL (400 п.н.). Очищенную вставку лигировали в экспрессионную плазмиду pFuseCLlg-hk, линеаризованную расщеплением BsiWI, и дефосфорилировали. Положительные клоны, имеющие фрагменты VL, вставленные в правильной ориентации перед человеческими константными доменами, амплифицировали и очищали препаратом Midiprep без эндотоксинов (Macherey-Nagel) для стадии трансфекции. Тяжелую цепь клонировали аналогичным образом с константным доменом, состоящим из SEQ ID No: 26.

Пример 2. Получение гуманизированных легких цепей

Для исследованных гуманизированных антител против CD127 трансфекцию и отбор стабильных клонов осуществляли в соответствии с общепринятыми способами. Готовили и исследовали три супернатанта для каждого антитела, соответствующие разному соотношению трансфекции тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC): 2:1, 1:1,3 и 1:2 HC:LC. Полученные титры представлены на фиг.2, полученной после продуцирования в клетках CHO, высеянных в количестве 300000 клеток/мл; без антибиотиков, в соответствии с общепринятыми способами: титр анализировали с помощью ELISA

на иммобилизованном анти-человеческом IgG (Fc) соответствующего антитела и выявление проводили с помощью мышиных анти-человеческих каппа-mAb плюс меченные пероксидазой ослиные антимышиные антитела, с выявлением методом колориметрии на 450 нм с использованием субстрата TMB.

Продуцирование N13B2-h3 и N13B2-hVL6 также исследовали в экспериментах с транзитной трансфекцией. За один день до трансфекции клетки COS высевали в количестве 100 000 клеток/лунку в планшет P12 с полной средой (DMEM SVF10% (Hyclone) + PS 1% + Glu 1%) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂. В день трансфекции клетки COS использовали при слиянии величиной от 50 до 90%. Их промывали PBS и хранили с 500 мкл в полной среде. Смешивали 0,6 мкг варианта VH + 0,4 мкг варианта VL в 200 мкл среды OptiMEM и добавляли 1 мкл реагента Plus (Invitrogen) (инкубация 15 мин при комнатной температуре). В смесь добавляли 3,5 мкл липофектамина LTX (Invitrogen) + 100 мкл и инкубировали 25 мин при комнатной температуре. Всю смесь наносили по каплям на клетки COS и инкубировали в течение 48 часов при 37°C, 5% CO₂. Через 48 часов супернатанты собирали и центрифугировали (1500 об/мин, 10 мин, 4°C). Супернатанты количественно оценивали с помощью ELISA № TH-MO-43. Количественный анализ активности выполняли с помощью ELISA TH-MO-44.

Пример 3. Связывание с CD127 - Elisa

Для сэндвич-ELISA ослиное антитело против человеческого IgG (Fc-специфическое) наносили в концентрации 1,2 мкг/мл на планшет P96 и добавляли очищенные антитела для измерения концентрации как функции от стандартного диапазона. После инкубации и промывания добавляли мышиные антитела против человеческого легкой цепи, каппа-специфичные, (Effimune, клон NaM76-5F3) плюс меченные пероксидазой ослиные антимышиные антитела (Jackson Immunoresearch, номер 715-036-151) и проявляли обычными способами.

Для анализа активности ELISA рекомбинантный hCD127 (Sino Biologicals, Пекин, Китай; номер 10975-H08H) иммобилизовали на пластике при концентрации 1 мкг/мл и добавляли разведения анти-CD127-антитела для измерения связывания. После инкубации и промывки добавляли мышиные антитела против человеческого легкой цепи (каппа-специфичные) плюс меченные пероксидазой ослиные антимышиные антитела и проявляли колориметрией на 450 нм с использованием субстрата TMB обычными способами.

Были получены следующие значения ED50 (концентрация, необходимая для достижения 50% максимального сигнала):

	ED50 (нг/мл)
N13B2-h3	16,8
N13B2-hVL3	15,1
N13B2-hVL4	12,6
N13B2-hVL5	14,8

N13B2-hVL6	9,5
-------------------	-----

Таблица 1. Значение ED50 (в нг/мл) для связывания антител с CD127

Стабильность антител изучали с помощью инкубации антител в течение 7, 14 или 30 дней при 4, 25 и 42°C. Связывание антител с CD127 оставалось превосходным даже после 30-дневной инкубации. Значения ED50, определенные с помощью ИФА после 30 дней инкубации, приведены в таблице 2.

	ED50 (нг/мл)
N13B2-hVL6 d7 при 4°C	55,31
N13B2-hVL6 d7 при 25°C	47,83
N13B2-hVL6 d7 при 42°C	56,16
N13B2-hVL6 d14 при 4°C	62,75
N13B2-hVL6 d14 при 25°C	52,58
N13B2-hVL6 d14 при 42°C	40,62
N13B2-hVL6 d30 при 4°C	46,98
N13B2-hVL6 d30 при 25°C	40,19
N13B2-hVL6 d30 при 42°C	58,69

Таблица 2. Значение ED50 (в нг/мл) для связывания антител с CD127 после 30-дневной инкубации при указанной температуре.

Пример 4. Связывание с CD127 - Blitz

Этот способ выполняли с помощью технологии Blitz (Forté Bio, C22-2 No 61010-1).

Рекомбинантный hCD127 (Sino Biologicals, Пекин, Китай; номер 10975-H08H)/рекомбинантный белок (Sino Biological Cat: 11612-H08H) иммобилизовали при концентрации 50 мкг/мл с помощью фрагмента Fc в биосенсор Fc анти-IgG человека (АНС) (Forté Bio, 18-5063) в течение 30 секунд. Затем добавляли анти-CD127-антитела в концентрации 20 мкг/мл (насыщающая концентрация) в течение периода ассоциации 120 секунд, с последующим периодом диссоциации анти-CD127-антитела в буфере кинетики в течение 120 секунд. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения Blitz Pro 1.2, которое вычисляло константу ассоциации (k_a) и константу диссоциации (k_d) и определяло постоянную аффинности KD (k_a/k_d). Результаты представлены в таблице 3.

	Ассоциация (k_a) (1/мс)	Диссоциация (k_d) (1/с)	Аффинность (KD) (M)
N13B2-h3	1,15x10 ⁶	2,67x10 ⁻³	2,33x10⁻⁹
N13B2-hVL3	1,27 x10 ⁶	4,47x10 ⁻³	3,51x10⁻⁹

N13B2-hVL4	1,04x10 ⁶	2,81x10 ⁻³	2,71x10⁻⁹
N13B2-hVL5	1,01x10 ⁶	2,66x10 ⁻³	2,63x10⁻⁹
N13B2-hVL6	1,05x10 ⁶	2,66x10 ⁻³	2,53x10⁻⁹

Таблица 3. Анализ аффинности для анти-CD127 антител на человеческом рекомбинантном белке CD127 методикой Blitz

Пример 5. Ингибирование фосфорилирования STAT5

Чтобы проверить ингибирование IL7R в функциональном анализе, антитело инкубировали с PBMC человека в течение 30 минут при 37°C, а затем стимулировали IL7 (AbD Serotec, номер PHP046) в концентрации 0,1 нг/мл в течение 15 минут при 37°C. Реакцию останавливали при 4°C и промывали буфером Perm Wash перед фиксацией с помощью набора Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, номер 554722) в течение 15 минут при 4°C. Клетки промывали и окрашивали FITC-меченным анти-CD3 (BD Bioscience, номер 557694) в течение 30 минут при 4°C. Затем клетки пермеабелизовали при инкубации с Perm Buffer III (BD Bioscience, номер 558050) в течение 30 минут при 4°C. После промывания PBS BSA1% азид 0,1%, клетки окрашивали меченным Alexa-647 антителом против pStat5 (BD Bioscience, номер 612599) в течение 30 минут при комнатной температуре. Образцы анализировали на цитофлуорометре BD CantoII. hPBMC-CD3+ с IL7 индуцировали фосфорилирование pStat5, тогда как без IL7 фосфорилирования не наблюдалось. Результаты представлены на фиг. 4 и в таблице ниже, где приедена ED50, то есть концентрация указанного антитела для достижения 50% сигнала в этом анализе.

	IC50-MFI (нг/мл)
N13B2-h3	21,5
N13B2-hVL3	27,2
N13B2-hVL4	16,1
N13B2-hVL5	27,3
N13B2-hVL6	16,8

Таблица 4. Ингибирование фосфорилирования STAT5 антителами против CD127

Этот эксперимент подтвердил, что модификация зародышевой линии и модификация структурных остатков гуманизированной аминокислотой не изменяет биологическую активность антитела против CD127. Все исследованные варианты (N13B2-h3, N13B2-hVL3, N13B2-hVL4, N13B2-hVL5, N13B2-hVL6) могут ингибировать фосфорилирование Stat5 после стимуляции IL7 на hPBMC, подобно ранее полученным эталонным партиям N13B2. Сосредоточившись на N13B2-hVL6 (наиболее гуманизированном и наиболее оптимизированном), мы заметили, что оно способно поддерживать свою биологическую активность в ингибировании фосфорилирования Stat5 в той же степени, что и эталонное N13B2-h3. Более того, этот вариант был очень стабильным после 14 дней инкубации при 42, 25 или 4°C, не вызывал образования агрегатов и сохранял свою связывающую активность.

Пример 6. Влияние на Т-клетки памяти

Туберкулиновая модель гиперчувствительности замедленного типа

Павианов дважды иммунизировали внутрикожно вакциной бациллы Кальмета-Герена (0,1 мл; $2 \cdot 10^5$ КОЕ; Sanofi Pasteur MSD, Лион, Франция) в верхней части голени, за 4 и 2 недели до кожного теста гиперчувствительности замедленного типа (DTH). Внутрикожные реакции (IDR) исследовали с помощью внутрикожных инъекций 2000 или 1000 UI очищенного белкового деривата туберкулина, очищенного от белков среды (PPD; Symbiotics Corporation, Сан-Диего, Калифорния). Солевой раствор (0,1 мл) использовали в качестве отрицательного контроля. Кожные реакции в местах инъекций измеряли с использованием штангенциркуля как минимум двумя наблюдателями и считали положительными при диаметре > 4 мм. Второй IDR выполняли после трехнедельного периода вымывания, и животные получали одну внутривенную инъекцию 10 мг/кг N13B2 ($n = 7$) или 10 мг/кг (V915GA, AA892BB, 32257, 33874) ($n = 4$) гуманизированной N13B2 или эквивалентного объема вспомогательного вещества ($n = 4$). Дополнительные IDR выполняли каждый месяц после инъекции. После периода вымывания некоторых павианов (ранее получивших N13B2) снова иммунизировали дважды внутрикожно вакциной БЦЖ с последующим новым IDR. Среднее значение записывали и наносили на график для каждой временной точки. Чтобы сравнить множественные экспериментальные условия, ответы на эритему определяли количественно как площадь под кривой (AUC) с использованием для расчета программного обеспечения Graph Pad Prism (фиг. 5А и В).

ELISPOT

Ag-специфическую частоту Т-клеток отслеживали с помощью анализа ELISPOT IFN- γ (набор IFIS-g ELISPOT для приматов, не являющихся человеком; R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота) на свежевыделенных PBMC, повторно стимулированных туберкулином, в соответствии с инструкциями производителя.

Вкратце, захватывающее антитело (R&D systems, каталожный номер SEL961) добавляли в каждую лунку фильтровальных пластин ELISPOT MultiScreen® HTS Filter Plates (Merck Millipore) и инкубировали одну ночь при 4°C. После трех промывок добавляли блокирующий буфер и планшет инкубировали 2 часа при температуре окружающей среды. PBMC павианов были недавно извлечены из крови павианов с помощью центрифугирования в градиенте фикола (GE Healthcare Life Science, Париж, Франция). Затем эритроциты лизировали и клетки промывали перед восстановлением в соответствующей концентрации в культуральной среде (среда TexMacs, дополненная пенициллин-стрептомицином (Gibco)) с очищенным белковым дериватом туберкулина или без него. Планшет инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 18-24 часов. После трех промывок буфером для промывки добавляли детектирующее антитело (R&D systems, каталожный номер SEL961) и инкубировали при 4°C в течение 24 часов. Стрептавидин-AP (R&D systems, каталожный номер SEL002) добавляли после трех промываний и инкубировали два часа при температуре окружающей среды в течение 2 часов. Выполняли три промывания. Затем добавляли

BCIP/NBT (R&D systems, каталожный номер SEL002) и выдерживали в темноте 30 минут. Требовалось несколько промывок буфером для промывки и одна - деионизированной водой (фиг. 5С).

Животные

Павианы (*Papio anubis*; 7-14 кг) были получены из Национального научного центра Приматологии (Руссе, Франция). Животных содержали в крупном виварии блока INSERM 1064. Исследования на животных были одобрены Национальным комитетом по этике Франции.

Результаты

В первом эксперименте первый тест IDR с туберкулином выполняли на павианах, вакцинированных БЦЖ, которые не получали лечения в это время (день -30). После периода вымывания длиной один месяц второй тест IDR выполняли через 4 часа и затем раз в месяц после в/в инъекции 10 мг/кг N13B2 (белые столбики). Последний тест на IDR выполняли после новой вакцинации БЦЖ (через 14 месяцев после введения антитела). Контрольные животные (черные столбики) получали аналогичный объем вспомогательного вещества, т.е. получали провокацию по тому же протоколу. Полученные результаты показали, что химерное антитело против IL7 α вызывает очень длительную защиту (до 14 месяцев) после однократного введения. Ответ на тпровокацию восстановился только после новой вакцинации.

В другом эксперименте первый тест IDR с туберкулином выполняли на павианах, вакцинированных БЦЖ (заштрихованные столбики - например, IDR1 для V915GA). После периода вымывания длиной в один месяц тест IDR выполняли через 4 часа и затем раз в месяц после в/в инъекции 10 мг/кг гуманизированного N13B2 (сплошные столбики - например, IDR2-6 для V915GA). Последний тест на IDR выполняли после новой вакцинации БЦЖ и туберкулином (заштрихованные столбики - например, IDR7 для V915GA). Контрольные животные (черные столбики) получали аналогичный объем вспомогательного вещества, т.е. получали провокацию по тому же протоколу. Полученные результаты показали, что гуманизированное N13B2 индуцирует длительную защиту после однократного введения у 3 из 4 оцененных павианов. Животное "33874" первоначально отвечало сразу после введения антитела, но ответ восстановился самопроизвольно через месяц.

PBMC в крови повторно стимулировали ex vivo туберкулином. Первый анализ ELISPOT IFN γ с туберкулином или без него выполняли на павианах, вакцинированных БЦЖ (заштрихованные столбики). Второй анализ ELISPOT IFN γ проводили через 4 дня после инъекции 10 мг/кг гуманизированного N13B2 (сплошные столбики). Затем новый анализ ELISPOT проводили каждый месяц при каждом новом тесте IDR туберкулином in vivo. Последний анализ ELISPOT IFN γ проводили после новой вакцинации БЦЖ (заштрихованные столбики). Полученные результаты показали, что введение гуманизированного N13B2 индуцировало антигенспецифическую делецию Т-клеток памяти у животных с длительным ответом. Павиан "33874" не показал значительного сокращения туберкулин-специфических Т-клеток памяти параллельно с отсутствием долгосрочной

защиты в модели DTH. После новой вакцинации БЦЖ животные с длительным ответом показали повышенную частоту антиген-специфических Т-клеток памяти, которые восстанавливаются до базального уровня (до инъекции mAb), и это ассоциировано с восстановлением ответа DTH *in vivo*. В целом, эти результаты продемонстрировали, что долговременная защита, индуцированная гуманизированным N13B2, ассоциирована с делецией антиген-специфических Т-клеток памяти, что объясняет долгосрочный эффект препарата.

Пример 7. Экспрессия IL-7, CD127 и TSLP у пациентов с ВЗК

Необработанные данные по экспрессии мРНК, полученные, как подробно описано в Planell et al. Gut 2013 анализировали как подробно изложено в описании на Фигуре 6.

Пример 8. Сигнальный путь человеческих PBMC, стимулированных анти-CD127 антителами плюс IL7

Сигнальные пути IL7 изучали с использованием лизатов PBMC человека, инкубированных 30 мин при 37°C с 10 мкг/мл растворимых антител против CD127 человека и стимулированных IL7 (AbD Serotec, номер PHP046) в концентрации 5 нг/мл в течение 10 мин. при 37°C. Вестерн-блоттинг проводили в восстанавливающих условиях с 20 мкг белка клеточных лизатов в 7,5% полиакриламидных гелях и наносили блоттингом на нитроцеллюлозные мембраны (GeHealthcare). Блоты насыщали 5% BSA-трис-буферным солевым раствором (TBS) и проявляли либо с помощью антитела Phospho-Stat5, Phospho-PI3-киназы p85, фосфо-Akt и фосфо-ERK1/2 (Cell Signalling Technology) при концентрации 1/1000 в 1 % BSA-TBS (в течение ночи при 4°C) с последующим добавлением поликлонального меченного пероксидазой хрена козьего анти- кроличьего антитела, (технология Cell Signaling), при концентрации 1/2000 в течение 1 часа при комнатной температуре либо с антителом GAPDH (Santa Cruz) при концентрации 1/1000 в 1% BSA-TBS (в течение ночи при 4°C) с последующим добавлением поликлонального меченного пероксидазой хрена козьего анти-мышинного антитела (Jackson Immunoresearch) при концентрации 1/2000 в течение 1 часа при комнатной температуре. Мембраны проявляли хемилюминесценцией с использованием системы визуализации LAS-3000 (Fujifilm). Таким образом, были проанализированы следующие анти-человеческие антитела против CD127: N13B2-h3 и N13B2-hVL6 (оба антитела против сайта 1/2b, описанные в настоящем документе); MD707-13-G4 ("антитело против сайта 1", раскрытое в заявке на патент WO2013/056984) и 1A11 (раскрытое в патенте GSK WO2011/094259).

Пример 9. Влияние на высвобождение цитокинов Т-клетками в ткани ВЗК

Биоптаты пациентов с ВЗК можно использовать в качестве модели воспаления *ex-vivo*, и было показано, что они спонтанно высвобождают высокие уровни провоспалительных цитокинов после 24 часов культивирования (ЯК: IFN γ , 130 $\pm$ 19 пг/мл; IL-6 4042 $\pm$ 529 пг/мл; IL-8 25626 $\pm$ 1640 пг/мл - CD: IFN γ 180 $\pm$ 38 пг/мл; IL-6 3653 $\pm$ 734 пг/мл; IL-8 15540 $\pm$ 2452 пг/мл [средние $\pm$ стандартная ошибка среднего для ЯК и БК соответственно].

Применяли анти-CD127 mAb в концентрации 10 мкг/мл в этом анализе культуры органов с использованием хирургических образцов, взятых из воспаленной слизистой оболочки толстой кишки 20 пациентов с ВЗК (10 пациентов с болезнью Крона и 10 пациентов с язвенным колитом), и культивирование проводили при 37°C в течение 24 часов в среде с 10 мкг/мл контрольного mAb IgG или блокирующего mAb против человеческого IL-7R α (подробности отбора проб и условий культивирования см. ниже). Для каждого пациента отбирали парный контрольный образец и культивировали в тех же условиях, с контролем IgG вместо антитела против CD127. Концентрацию цитокинов измеряли с помощью ELISA (как подробно описано ниже) в супернатанте культивируемых ex-vivo образцов.

Выработка IFN γ образцами биопсии ЯК, выращенными ex vivo, была значительно ингибирована mAb против IL7R α . Аналогичные результаты наблюдали для некоторых образцов биопсии БК секретирующих большое количество IFN γ .

Взятие образцов и культивирование органов ex-vivo

В случае использования резекционной ткани слизистой оболочки, небольшие фрагменты размером с биоптат разрезали ножницами. Затем биоптаты или фрагменты размером с биоптат помещали в 300 мкл бессывороточной среды HL-1 (Lonza, Cambridge BioScience, Великобритания) с добавлением L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 50 мкг/мл гентамицина. Экспланты слизистой оболочки инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Соответствующее тестируемое антитело (N13B2) или контроль IgG, используемые в концентрации 10 мкг/мл, добавляли в среду в начале периода инкубации. Наконец, супернатант и материал для биопсии быстро замораживали и хранили при -70°C для последующего анализа.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)

Выработку цитокинов в супернатанте биоптатов измеряли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Человеческий рекомбинантный IFN- γ от производителя ImmunoTools (№ 31673539, Friesoythe, Германия) использовали в соответствии с инструкцией производителя.

Пример 10. Сравнение антител против IL7-R α человека, связанное с их характеризацией эпитопов:

Масс-спектрометрический анализ: профилирование антител с использованием пептидного микрочипа

Пептидные микрочипы PepStarTM компании Pepti Technologies содержат очищенные синтетические пептиды, полученные из антигенов или других источников, которые хемоселективно и ковалентно иммобилизованы на поверхности стекла. Оптимизированный гидрофильный линкерный фрагмент вставляют между поверхностью стекла и пептидной последовательностью, полученной из антигена, чтобы избежать ложноотрицательных результатов, вызванных стерическим затруднением. По техническим причинам все пептиды содержат С-концевой глицин. Эксперименты по профилированию образцов проводили на пептидной библиотеке, состоящей из 52 пептидов.

Полный список пептидов приведен ниже:

SE Q ID	Последовательность	SE Q ID	Последовательность	SE Q ID	Последовательность
44	ESGYAQNGDLEDAEL	62	FIETKKFLLIGKSNI	80	HDVAYRQEKDENKWT
45	AQNGDLEDAELDDYS	63	KKFLLIGKSNICVKV	81	YRQEKDENKWTHVNL
46	DLEDAELDDYSFSCY	64	LIGKSNICVKVGEKS	82	KDENKWTHVNLSTK
47	AELDDYSFSCYSQLE	65	SNICVKVGEKSLTCK	83	KWTHVNLSTKLTLL
48	DYSFSCYSQLEVNGS	66	VKVGEKSLTCKKIDL	84	VNLSTKLTLLQRKL
49	SCYSQLEVNGSQHSL	67	EKSLTCKKIDLTIV	85	STKLTLLQRKLQPAA
50	QLEVNGSQHSLTCAF	68	TCKKIDLTIVKPEA	86	TLLQRKLQPAAMYEI
51	NGSQHSLTCAFEDPD	69	IDLTIVKPEAPFDL	87	RKLQPAAMYEIKVRS
52	HSLTCAFEDPDVNTT	70	TIVKPEAPFDLSVIY	88	PAAMYEIKVRSIPDH
53	CAFEDPDVNTTNLEF	71	PEAPFDLSVIYREGA	89	YEIKVRSIPDHYFKG
54	DPDVNTTNLEFEICG	72	FDLSVIYREGANDFV	90	VRSIPDHYFKGFWSE
55	NTTNLEFEICGALVE	73	VIYREGANDFVVTFN	91	PDHYFKGFWSEWSPS
56	LEFEICGALVEVKCL	74	EGANDFVVTFNTSHL	92	FKGFWSEWSPSYFR
57	ICGALVEVKCLNFRK	75	DFVVTFNTSHLQKKY	93	WSEWSPSYYFRTPEI
58	LVEVKCLNFRKLQEI	76	TFNTSHLQKKYVKVL	94	SPSYYFRTPEINNSS
59	KCLNFRKLQEIFYIE	77	SHLQKKYVKVLMHDV	95	YFRTPEINNSSGEMD
60	FRKLQEIFYIETKKF	78	KKYVKVLMHDDVAYRQ		
61	QEIFYIETKKFLLIG	79	KVLMHDDVAYRQEKDE		

Таблица 5. Список пептидов, используемых в анализах пептидных микрочипов

В общей сложности 4 образца инкубировали на предметных стеклах с микрочипами в формате Multiwell. Для антитела N13B2-h3VL6 и другого образца (MD707-13, HAL и 1A11) применяли 6 различных концентраций (10 мкг/мл; 2 мкг/мл; 1 мкг/мл; 0,1 мкг/мл; 0,01 мкг/мл; 0,001 мкг/мл). Серийные разведения образцов инкубировали в течение 1 часа при 30°C на многолуночном

микропланшете, содержащем 21 отдельный миничип (1 миничип на каждое разведение образца). После инкубации образца добавляли вторичное антитело против IgG человека в концентрации 1 мкг/мл и оставляли реагировать в течение 1 часа. Параллельно проводили дополнительную контрольную инкубацию с применением только вторичного антитела на том же предметном стекле микрочипа для оценки ложноположительного связывания с пептидами. После промывки и сушки предметное стекло сканировали с помощью лазерного сканера высокого разрешения на 635 нм для получения профилей интенсивности флуоресценции. Полученные изображения количественно оценивали для получения среднего значения пикселей для каждого пептида. Изображения количественно оценивали для получения среднего значения пикселей для каждого пептида. Вторичное антитело против IgG человеческого, меченное Cy5 в концентрации 1 мкг/мл.

Буферы и растворы. Использовали TBS-буфер, включающий 0,05% Tween20 (JPT) и буфер для анализа T20 (Pierce, SuperBlock TBS T20, №37536). Сбор и анализ проводили с использованием пептидных микрочипов (JPT Peptide Technologies GmbH, Берлин, Германия; партия № 2668, многолучная инкубационная камера, сканер Axon GenePix Scanner 4200AL). Микрочипы сканировали с использованием флуоресцентного сканера высокого разрешения. Параметры лазера и применяемое разрешение были идентичными для всех выполненных измерений. Полученные изображения анализировали и количественно оценивали с использованием программного обеспечения для распознавания пятен GenePix (Molecular Devices). Для каждого пятна была извлечена средняя интенсивность сигнала (от 0 до 65535 произвольных единиц).

Для дальнейшей оценки данных определяли так называемые значения MMC2. MMC2 равняется среднему значению всех трех экземпляров на микрочипе, кроме случаев, когда коэффициент вариации (CV) - стандартное отклонение, деленное на среднее значение - больше 0,5. В этом случае MMC2 присваивается среднее из двух ближайших значений (MC2).

Анализ с помощью дейтерия

Используя систему HDX-2 (Waters SA/NV; Зеллик, Бельгия) рекомбинантный человеческий CD127 и 0- или 1-молярный эквивалент mAb смешивали и разбавляли в 99,9% D₂O, 10 mM фосфата натрия, 100 mM NaCl, pH 6,8 до конечного содержания D₂O 90% и концентрация комплекса CD127 или CD127/mAb 27,5 мкМ. Водородно-дейтериевый обмен проводили при 20,0°C в течение 30 минут. Обмен гасили путем разбавления 1:1 (об./об.) образцов 100 mM фосфатом натрия, 4 M гуанидин-HCl, 0,4 M TCEP, pH 2,3, при 1,0°C, с получением конечного pH 2,5. Через 2 минуты погашенные образцы загружали в устройство HDX для оперативного расщепления пепсином при 20,0°C (Энзимат ВЕН пепсин, 2,1 × 30 мм; 5 мкМ) с последующим обессоливанием (Acquity ВЕН C18 Vanguard 2,1 мм × 5 мм; 1,7 м) и разделением обращенных фаз (Acquity ВЕН C18 1,0 мм × 100 мм; 1,7 мкМ) с использованием градиента от 5% до 40% 0,2% муравьиной кислоты в ацетонитриле (pH 2,5) в течение 10 минут при расходе 40 мкл/мин при 0,0°C. Масс-спектрометрический анализ выполняли на масс-спектрометре Waters Xevo G2-XS ESI-Q-TOF в режиме положительных ионов с

коррекцией методом LockSpray. Использовали мягкие условия источника (температура: 90°C, капиллярное напряжение: 2,5 кВ, конус для отбора проб: 30 В, расход десольватационного газа: 800 л/ч, температура десольватации: 250°C) для минимизации обратного обмена при обеспечении надлежащей десольватации (73). Идентификации пептидов способствовала вызванная столкновением диссоциация, регистрируемая в режиме MSE с использованием PLGS 3.0.2 и UNIFI 1.8. Включение дейтерия определяли в DynamX 3.0. Изображения структуры готовили с использованием PyMOL 1.8.2.3 (Schrodinger LLC, Кембридж, Массачусетс, США) из PDB ID 3DI3 (19). Одноосновный и двухосновный фосфат натрия, хлорид натрия, гидрохлорид гуанидина, трис (2-карбоксиэтил) фосфин гидрохлорид (TCPEP), 50% гидроксид натрия и муравьиную кислоту приобретали у Sigma Aldrich (Schnelldorf, Германия) с наивысшей доступной чистотой. Растворители класса LC-MS получали от Biosolve Chimie (Дьёз, Франция), оксид дейтерия (99,9% D) и 20% хлорид дейтерия в оксиде дейтерия (99,96% D) получали из Cambridge Isotope Laboratories (Андовер, Массачусетс, США), 37% соляную кислоту - от VWR International (Фонтене-су-Буа, Франция) и бычий цитохром C - от Thermo Fisher Scientific (Гермеринг, Германия). Ультрацентрифужные фильтры Amicon (0,5 мл; отсечка 10 кДа) получали от Merck Millipore (Мольсем, Франция).

Результаты

Характеризация эпитопов с помощью линейного пептидного массива различных mAb против IL7R α позволила идентифицировать два типа mAb-антагонистов: (1) mAb, связывающиеся с областью (сайт-1) взаимодействия с IL-7, как ранее описано двумя другими группами исследователей (клон 1A11, описанный в WO/2011/094259, и клон HAL, описанный в WO/2011/104687) и включающие MD707-13, и (2) mAb, т.е. N13B2-h3VL6 по настоящему изобретению, связывающие как сайт-1, так и эпитоп, перекрывающий предсказанный домен (сайт-2b) гетеродимеризации между IL-7R α и субъединицами γ -цепи (Walsh 2012).

N13B2-h3VL6 и MD707-13 с высокой и сходной аффинностью (связывание с сайтом-1/2b с KD 2×10^{-10} М и связывание с сайтом-1 с аналогичным KD 5×10^{-10} М) рекомбинантно экспрессировали с изотипом Fc человеческого IgG4 (содержащим шарнирную мутацию S228P для предотвращения обмена Fab-плечо) и сравнивали с ранее описанным mAb с другим сайтом-1 с аналогичной аффинностью, клон 1A11, описанным в WO/2011/094259 (KD 6×10^{-10} М) и рекомбинантно экспрессировали с изотипом Fc человеческого IgG1, которое в настоящее время разрабатывается в клинических испытаниях (клинические испытания NCT02293161). Анализ конформационного эпитопа с использованием водородно-дейтериевого обмена с масс-спектрометрией (HDX-MS) подтвердил предыдущие наблюдения и продемонстрировал, что антитело по изобретению, то есть N13B2-h3VL6 (сайт-1/2b mAb), защищено от включения дейтерия в несколько пептидов сайта-1, но также в пептид, перекрывающий сайт-2b, в то время как два других mAb (MD707-13 и 1A11) значительно предотвращают включение дейтерия только в пептиды из сайта-1 (данные не

показаны).

Антитело по изобретению было единственным, которое распознало конформационный эпитоп, локализованный на сайте 1 из домена 1, и конформационный эпитоп, локализованный на сайте 2b человеческого CD127.

Пример 11. Сравнение антител против IL-7 α человека по их способности быть агонистом и/или антагонистом пути IL-7.

Вестерн-блоттинг

Свежевыделенные PBMC человека инкубировали в течение 30 минут при 37°C с 10 мкг/мл mAb против IL-7 α человека, а затем культивировали отдельно или с 5 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-7 (AbDSerotec) в течение 10 минут при 37°C. После остановки реакций на льду готовили лизаты клеток с использованием буфера RIPA (с коктейлем ингибитора протеазы). Белки (15 мкг) растворяли в восстанавливающих условиях на 7,5%-полиакриламидных гелях и иммобилизовали на нитроцеллюлозных мембранах (GeHealthcare) с использованием стандартных способов. Блоты промывали 5% BSA-трис-буферным солевым раствором и инкубировали с Phospho-STAT 5, Phospho-PI3K p55 или Phospho-ERK-специфическими антителами в 1% BSA-TBS (в течение ночи при 4°C), а затем поликлональными анти-козьими антителами кролика, мечеными пероксидазой хрена (технология Cell Signaling), в течение 1 часа при комнатной температуре. В качестве альтернативы, блоты окрашивали с использованием антитела GAPDH (Santa Cruz) в 1% BSA-TBS (в течение ночи при 4°C), а затем поликлонального козьего анти-мышинного антитела, меченного пероксидазой хрена (Jackson Immunoresearch), в течение 1 часа при комнатной температуре. Мембраны детектировали хемилюминесценцией с использованием системы визуализации LAS-3000 (Fujifilm).

РНК-секвенирование

Свежевыделенные человеческие PBMC инкубировали с 10 мкг/мл моноклональных антител против человеческого IL-7 α (30 мин при 37°C), а затем культивировали отдельно или с 5 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-7 (AbDSerotec) в течение 3 часов при 37°C. Реакции останавливали на льду и осадок клеток ресуспендировали в буфере RLT (Qiagen), содержащем 1% Р-меркаптоэтанол, в очищенной от РНКазы/ДНКазы воде и хранили при -80°C. РНК экстрагировали с использованием набора для мини-экстракции РНК в соответствии с инструкциями производителя (Qiagen). Качество и количество РНК оценивали с помощью инфракрасной спектromетрии (Nanodrop) и биоанализатора Agilent (Agilent RNA 6000 Pico Kit). Библиотеки Smart-Seq2 готовили в Broad Technology Labs и секвенировали с помощью Broad Genomics Platform в соответствии с протоколом SmartSeq2 с некоторыми изменениями. Вкратце, полную РНК очищали с использованием микросфер РНК-SPRI, мРНК polyA + подвергали обратной транскрипции в кДНК, и амплифицированную кДНК подвергали фрагментации на основе транспозона, используя

двойное индексирование для штрих-кодирования каждого фрагмента каждого преобразованного транскрипта комбинацией специфических штрих-кодов для каждого образца. Секвенирование проводили в формате спаренных концов 2x25 п.н. с дополнительными 8 циклами для каждого индекса. Данные разделяли по штрих-коду и выровнены с использованием Tophat версии 2.0.10 с настройками по умолчанию. Транскрипты количественно оценивали с помощью вычислительного конвейера Broad Technology Labs с использованием Cuffquant версии 2.2.1. Вкратце, данные обрабатывали с помощью CuffNorm, если 50% считываний были выровнены, и если по крайней мере 100 000 пар были выровнены на каждый образец. При нормализации использовали настройки по умолчанию, включая "геометрическую" нормализацию, и информацию об уровне экспрессии, в виде преобразованные в log2 значений FPKM (число фрагментов на т.п.н. транскрипта на миллион картированных фрагментов), использовали для последующего анализа. Для выявления дифференциальных генов выполняли линейное моделирование с оценкой отношения среднее-дисперсия (подход limma-trend) с помощью эмпирической байесовской статистической процедуры с использованием пакета LIMMA в R. Гены с р-значением, откорректированным по Бенджамини и Хохбергу, <5% и кратностью изменения (FC) > 1,5 считались дифференциально экспрессированными. Для представления экспрессии генов выполняли анализ основных компонентов (PCA) и кластеризацию в R v3.3.2 с использованием пакетов ade4/adegraphics и rheatmap соответственно. Биологическую значимость отобранных генов оценивали с использованием пакета R clusterProfiler. Отбирали категории генной онтологии (GO), обогащенные показателем ложного обнаружения (FDR) <5% и по меньшей мере с пятью представленными генами. Доступ к данным RNA-seq можно получить используя номер доступа GEO GSE

Результаты

Сигнальные пути STAT5, PI3K и ERK

Затем mAb против IL-7Rα человека (N13B2-h3VL6, MD707-13, 1A11 и HAL) сравнивали по их способности активировать или блокировать сигнальные пути STAT5, PI3K и ERK, ранее ассоциированные с передачей сигналов IL-7R (фиг.9 и 10). Как показано ранее (см., например, фиг.7), IL-7 индуцирует сильное фосфорилирование STAT5 на человеческих PBMC, и все исследованные mAb являются мощными ингибиторами этого фосфорилирования STAT5 (см. Фиг.7). В отличие от этого, как показано на фиг. 9 и 10, авторы изобретения обнаружили, что хотя IL-7 индуцирует переменное фосфорилирование PI3K и не вызывает фосфорилирования ERK, антитела предшествующего уровня техники (а именно MD707-13, 1A11 и HAL) значительно индуцируют фосфорилирование ERK и в меньшей степени сигнал PI3K даже в отсутствие экзогенного IL-7, в отличие от антитела по изобретению. Эти результаты показывают, что антитела против IL-7Rα человека предшествующего уровня техники обладают частичными свойствами агониста и поэтому рассматриваются как двойные агонистические/антагонистические mAb в отношении человеческого IL-7R. Напротив, антитело по изобретению, и в частности N13B2-h3VL6,

обладает свойством только антагониста человеческого IL-7R.

Авторы изобретения оценили, могут ли антитела со свойствами агониста/антагониста доставлять эффективный агонистический сигнал, способный модифицировать Т-клетки человека. Транскриптомы человеческих PBMC, инкубированные в течение 3,5 часов без экзогенного человеческого IL-7, с человеческим IL-7 и с IL-7 и антителом (MD707-13, 1A11 сайт-1 (IgG4 № 1 или IgG1 № 2 соответственно) или N13B2-hVL6 сайт-1/2b (IgG4)), проанализировали с помощью РНК-секвенирования следующего поколения (RNA-SEQ). В общей сложности 481 ген был дифференциально экспрессирован в человеческих PBMC, инкубированных с mAb против IL-7R α человека, по сравнению с контрольными условиями, в то время как в общей сложности 334 гена были дифференциально экспрессированы только стимуляцией IL-7 человека по сравнению с контрольными условиями.

Ген	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 №1		1A11 IgG1 №2	
	logFC / нестимул.	Скоррек тиров. Р- значение	logFC / нестимул.	Скорректи ров. Р- значение	logFC / нестимул.	Скорректи ров. Р- значение
ACADVL	0,85	0,040	1,15	0,001	0,87	0,011
AHR	0,86	0,029	1,16	0,000	1,21	0,000
AKIRIN1	0,75	0,028	0,88	0,002	0,78	0,006
ALDH16A1	1,23	0,021	1,45	0,001	1,32	0,003
ALDH5A1	0,72	0,044	0,93	0,002	1,05	0,001
APPBP2	0,81	0,001	0,90	0,000	0,81	0,000
ARHGEF1	0,85	0,001	1,05	0,000	0,88	0,000
B3GNT2	1,03	0,034	1,23	0,003	1,15	0,005
C17orf59	1,07	0,039	1,49	0,001	1,27	0,004
CCDC117	0,77	0,024	0,88	0,002	0,80	0,005
CCNI	0,73	0,004	0,98	0,000	0,78	0,001
CDK17	0,98	0,003	1,09	0,000	0,94	0,001
COTL1	1,67	0,000	1,80	0,000	1,35	0,000
CYP1B1	-0,66	0,029	-0,75	0,003	-0,69	0,006
DDI2	1,17	0,011	1,45	0,000	1,24	0,002
DEF6	1,03	0,030	1,39	0,001	1,09	0,006
DNLZ	1,17	0,029	1,19	0,008	1,22	0,006
DUSP2	1,73	0,002	2,18	0,000	2,30	0,000
ENG	-0,73	0,004	-0,61	0,005	-0,67	0,002
EXOC8	0,69	0,043	0,62	0,033	0,63	0,026
FAM160B1	0,83	0,030	1,26	0,000	0,72	0,024
FEM1B	0,99	0,005	1,09	0,000	0,87	0,005
GCFC2	1,00	0,011	0,87	0,011	0,83	0,013
GNA15	0,99	0,011	1,14	0,001	1,25	0,000
GOPC	0,83	0,015	0,64	0,029	0,69	0,015
GRSF1	0,65	0,015	0,81	0,000	0,69	0,002
HIPK3	0,67	0,025	0,79	0,002	0,69	0,006
HMHA1	0,88	0,004	1,05	0,000	0,89	0,001
HSBP1L1	1,04	0,029	0,97	0,017	0,86	0,030
JUNB	0,91	0,025	1,25	0,000	1,42	0,000
KLC2	1,08	0,036	1,18	0,007	1,34	0,002
LYSMD2	0,78	0,016	0,72	0,010	0,70	0,009
LYZ	-0,60	0,031	-0,86	0,000	-0,76	0,001
MS4A7	-0,80	0,001	-0,98	0,000	-0,59	0,006
MTA2	0,84	0,038	1,18	0,001	1,10	0,002
NCOA5	0,65	0,018	0,84	0,000	0,89	0,000
NSUN2	0,63	0,029	0,74	0,002	0,75	0,002
PITHD1	0,81	0,040	1,03	0,002	0,81	0,013
PLEKHF2	0,72	0,004	0,83	0,000	0,77	0,001
POLRMT	1,09	0,001	1,30	0,000	1,06	0,000
PPP2CA	0,75	0,025	0,87	0,002	0,75	0,007
PREB	0,88	0,018	0,78	0,014	0,92	0,004
PRKCH	0,70	0,011	0,88	0,000	0,78	0,001

	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 №1		1A11 IgG1 №2	
PSMD3	1,01	0,035	1,58	0,000	1,37	0,001
PYGO2	1,08	0,003	1,07	0,001	0,74	0,016
RASSF5	0,63	0,004	0,67	0,000	0,60	0,002
RBL2	0,71	0,011	0,85	0,000	0,59	0,012
RRP1	0,69	0,019	0,62	0,013	0,80	0,002
SMCHD1	0,71	0,001	1,00	0,000	0,85	0,000
SREBF2	0,83	0,009	1,13	0,000	0,98	0,000
TAF10	1,87	0,001	1,57	0,001	1,28	0,006
TAF4B	0,75	0,030	1,12	0,000	1,29	0,000
TMX4	1,04	0,009	1,13	0,001	0,89	0,009
TPGS1	2,55	0,008	2,95	0,000	2,06	0,011
TRAM1	0,71	0,001	0,73	0,000	0,59	0,002
TRPC4AP	0,98	0,005	1,21	0,000	1,06	0,001
TTC13	0,76	0,034	0,90	0,003	0,68	0,022
UNC119	1,02	0,036	1,43	0,001	1,26	0,002
USP9X	0,90	0,000	0,92	0,000	0,85	0,000
VPS4A	0,74	0,042	0,95	0,002	0,75	0,012
ZNF800	0,74	0,013	1,01	0,000	0,84	0,001
ACTN4	0,55	0,005	0,60	0,000	0,65	0,000
C15orf48	-0,63	0,029	-0,87	0,000	-0,51	0,035
C3AR1	-0,56	0,011	-0,75	0,000	-0,64	0,001
CD247	0,80	0,004	0,87	0,000	0,50	0,038
FAM50A	0,66	0,028	0,93	0,000	0,54	0,031
HCK	-0,65	0,009	-0,83	0,000	-0,46	0,030
IL6ST	0,43	0,034	0,60	0,000	0,77	0,000
JAK1	0,71	0,001	0,80	0,000	0,58	0,002
KYNU	-0,60	0,018	-0,94	0,000	-0,56	0,007
NCF2	-0,57	0,029	-0,71	0,001	-0,70	0,001
PARP10	0,58	0,037	0,75	0,002	0,73	0,002
RAD54L2	0,61	0,037	0,66	0,008	0,53	0,033
SMG5	0,54	0,033	0,80	0,000	0,75	0,001
TOR3A	0,73	0,028	0,62	0,028	0,57	0,040
ADM	-0,88	0,005	-1,01	0,000	-0,02	0,967
CES1	-0,77	0,028	-0,78	0,008	-0,45	0,145
SLC31A2	-0,79	0,004	-0,60	0,012	-0,17	0,577
SMPDL3A	-1,11	0,009	-1,12	0,002	-0,56	0,149
TREM1	-0,72	0,009	-0,67	0,005	-0,28	0,287
VNN1	-0,97	0,030	-1,17	0,002	-0,35	0,423
FLT1	-1,01	0,028	-0,66	0,101	-0,80	0,039
ABCG1	0,39	0,339	0,70	0,028	0,62	0,047
ANKRD30BL	0,88	0,342	1,42	0,049	1,73	0,012
C16orf58	0,42	0,219	0,63	0,019	0,59	0,026
C6orf120	0,31	0,536	1,03	0,003	0,84	0,013
CA2	-0,33	0,450	-0,70	0,033	-0,73	0,022

	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 №1		1A11 IgG1 №2	
CCNL2	0,51	0,178	0,75	0,012	0,59	0,049
CD14	-0,64	0,070	-0,98	0,001	-0,89	0,002
CDK16	0,64	0,118	0,96	0,004	0,80	0,014
CHTF18	0,67	0,174	0,87	0,030	1,13	0,004
CLPTM1	0,74	0,111	1,06	0,005	1,01	0,007
CREBZF	0,50	0,116	0,72	0,006	0,67	0,008
CREG1	0,70	0,095	0,86	0,013	0,99	0,004
CSF1R	-0,39	0,263	-0,71	0,010	-0,92	0,001
DAPK3	0,56	0,240	0,80	0,038	0,97	0,008
DDRGK1	0,91	0,126	1,39	0,004	1,53	0,002
DOHH	1,40	0,061	1,45	0,020	1,69	0,006
EMC8	0,61	0,229	1,15	0,004	1,04	0,008
FAM115C	0,37	0,264	0,61	0,022	0,64	0,013
FUCA1	-0,35	0,234	-0,59	0,011	-0,66	0,004
GAPT	-0,48	0,188	-0,67	0,023	-0,85	0,003
GMIP	0,55	0,076	0,78	0,002	0,70	0,005
GMPPB	0,82	0,073	0,92	0,016	0,95	0,010
HCG11	0,70	0,087	1,05	0,002	0,80	0,014
HEATR3	0,43	0,280	0,74	0,019	0,74	0,017
HEIH	0,97	0,056	1,05	0,014	0,84	0,047
HELZ2	0,42	0,287	0,77	0,013	0,77	0,010
HMG20B	0,54	0,088	0,61	0,019	0,59	0,022
HNRNPA0	0,58	0,165	0,74	0,028	0,90	0,006
HPCAL1	0,38	0,344	0,86	0,005	0,67	0,028
KIAA1919	0,63	0,116	0,81	0,013	0,66	0,042
KLHDC2	0,54	0,149	0,71	0,019	0,62	0,040
LTB	0,45	0,248	0,92	0,003	0,82	0,007
MAF1	0,86	0,161	1,54	0,002	1,38	0,005
MAFF	0,54	0,249	0,81	0,029	1,19	0,001
MAP3K11	0,49	0,263	0,77	0,030	0,70	0,044
MGST1	-1,05	0,089	-1,24	0,015	-1,06	0,036
MIER2	0,89	0,112	0,93	0,047	1,25	0,006
MOB2	0,69	0,150	1,05	0,007	0,90	0,017
PET100	-0,32	0,298	-0,61	0,013	-0,61	0,010
PLK3	0,20	0,700	0,79	0,021	0,83	0,012
POLG	0,52	0,086	0,97	0,000	0,79	0,002
PSMD2	0,41	0,212	0,62	0,018	0,61	0,017
RAB13	-0,50	0,089	-0,73	0,002	-0,62	0,009
RASAL3	0,74	0,067	0,92	0,006	0,72	0,028
RELB	0,22	0,633	0,63	0,046	0,69	0,022
RGMB	0,58	0,173	0,80	0,020	0,74	0,028
RNF10	0,56	0,095	0,67	0,016	0,66	0,014
RNF149	0,60	0,077	0,69	0,016	0,69	0,012
RPL39L	-1,02	0,125	-1,09	0,049	-1,41	0,008
RPUSD1	0,76	0,105	0,84	0,031	1,00	0,008

	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 №1		1A11 IgG1 №2	
SCARF1	0,39	0,408	0,77	0,032	1,13	0,002
SENP6	0,44	0,204	0,69	0,012	0,72	0,007
SIPA1L3	-0,01	0,992	0,71	0,021	0,74	0,013
SLC25A22	0,51	0,283	0,75	0,047	0,83	0,024
SLC38A10	0,24	0,595	0,76	0,014	0,66	0,030
SLC43A2	0,66	0,068	0,63	0,040	0,99	0,001
SPATC1L	0,96	0,180	1,17	0,044	1,22	0,031
SPP1	-0,53	0,102	-0,85	0,001	-0,62	0,017
SRP68	0,68	0,096	0,77	0,024	0,98	0,003
TAZ	0,95	0,092	1,23	0,008	1,22	0,007
TCIRG1	0,79	0,069	1,15	0,001	1,15	0,002
TNFRSF1B	0,51	0,208	0,72	0,026	0,82	0,009
TNFRSF4	0,23	0,751	0,97	0,034	1,15	0,009
TNKS	0,66	0,052	0,78	0,006	0,67	0,016
TSC22D2	0,47	0,137	0,65	0,011	0,61	0,014
UBA5	0,91	0,076	1,22	0,004	1,17	0,005
USP48	0,64	0,145	0,90	0,012	0,72	0,044
VPS51	0,50	0,145	0,82	0,003	0,76	0,005
ZFAND5	0,56	0,054	0,71	0,003	0,64	0,007
ZNF259	0,47	0,242	0,85	0,007	0,65	0,038
ZNF496	0,51	0,220	0,86	0,008	0,83	0,009
ZNF696	0,80	0,061	1,09	0,002	0,75	0,033
ANXA1	-0,43	0,034	-0,49	0,005	-0,63	0,000
C12orf75	-0,45	0,041	-0,43	0,022	-0,61	0,001
C18orf32	-0,56	0,040	-0,61	0,008	-0,48	0,036
CHMP7	0,50	0,028	0,64	0,001	0,55	0,004
DNAJC3	-0,49	0,004	-0,62	0,000	-0,36	0,013
EVI2B	-0,36	0,046	-0,38	0,013	-0,75	0,000
HCST	-0,54	0,034	-0,45	0,042	-0,65	0,003
HSBP1	-0,44	0,009	-0,64	0,000	-0,46	0,002
PAPOLA	0,57	0,018	0,72	0,000	0,55	0,006
PPBP	-0,55	0,018	-0,65	0,001	-0,50	0,010
TIMP1	-0,52	0,019	-0,65	0,001	-0,57	0,002
TLR2	-0,42	0,044	-0,60	0,001	-0,35	0,048
UBE2D2	0,49	0,040	0,74	0,000	0,49	0,013
AGTRAP	-0,52	0,040	-0,66	0,002	-0,42	0,051
CXCL16	-0,55	0,034	-0,60	0,006	-0,38	0,091
P2RX4	-0,48	0,034	-0,60	0,002	-0,06	0,846
P2RX7	-0,72	0,018	-0,54	0,039	0,32	0,258
SLAMF7	-0,44	0,011	-0,64	0,000	-0,19	0,251
SLC2A6	-0,59	0,028	-0,56	0,013	-0,13	0,648
SUGP2	0,64	0,005	0,50	0,012	0,33	0,114
TNFAIP6	-0,55	0,029	-0,90	0,000	-0,13	0,637
TNIP3	-0,55	0,028	-0,61	0,004	-0,21	0,385

	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 №1		1A11 IgG1 №2	
CYBA	-0,53	0,030	-0,39	0,065	-0,63	0,002
EPG5	0,59	0,034	0,39	0,112	0,57	0,013
RNF135	-0,57	0,043	-0,33	0,209	-0,64	0,006
ALDH1B1	-0,79	0,036	-0,38	0,294	-0,36	0,311
CKS2	-0,85	0,048	-0,61	0,109	-0,59	0,116
ETFDH	-0,71	0,003	-0,36	0,090	-0,40	0,054
FPR1	-0,87	0,029	-0,62	0,076	-0,29	0,467
GSTT1	-0,94	0,030	-0,52	0,195	-0,46	0,254
NFYB	-0,61	0,025	-0,42	0,075	-0,14	0,633
PREP	0,72	0,030	0,48	0,102	0,48	0,092
TGFB1	-0,99	0,007	-0,27	0,477	-0,36	0,310
TMEM160	-0,75	0,030	-0,30	0,373	-0,55	0,062
TYMP	-0,75	0,040	-0,38	0,278	-0,17	0,687
UBE3D	-0,96	0,046	-0,35	0,477	-0,33	0,497
ZNF619	0,79	0,043	0,49	0,170	0,52	0,128
ABCA1	-0,43	0,068	-0,60	0,002	-0,39	0,044
ACTR6	-0,31	0,332	-0,65	0,007	-0,56	0,020
ANXA5	-0,40	0,089	-0,66	0,001	-0,39	0,046
C16orf70	-0,21	0,548	-0,56	0,021	-0,68	0,005
CAND1	0,54	0,102	0,56	0,046	0,88	0,001
CAPG	-0,50	0,076	-0,74	0,001	-0,48	0,036
CCDC66	-0,41	0,204	-0,55	0,037	-0,70	0,006
COMMD8	-0,33	0,165	-0,59	0,002	-0,40	0,034
CPD	0,52	0,055	0,46	0,043	0,64	0,004
CYB5R1	-0,25	0,327	-0,51	0,011	-0,72	0,000
DUSP6	-0,45	0,129	-0,61	0,013	-0,48	0,049
ENY2	-0,45	0,067	-0,46	0,026	-0,59	0,004
FCER1G	-0,45	0,165	-0,75	0,004	-0,51	0,049
FRMD8	0,52	0,053	0,72	0,001	0,49	0,028
GSR	0,43	0,086	0,71	0,001	0,50	0,014
KIF1B	0,45	0,092	0,59	0,007	0,57	0,008
MEF2D	0,53	0,103	0,60	0,028	0,57	0,035
MPZL1	0,38	0,220	0,58	0,020	0,75	0,002
MRPS6	-0,43	0,075	-0,55	0,006	-0,88	0,000
NDUFA5	-0,25	0,247	-0,60	0,000	-0,36	0,037
NDUFB7	-0,37	0,213	-0,49	0,043	-0,62	0,007
NUP153	0,34	0,228	0,57	0,009	0,62	0,005
S100A4	-0,41	0,120	-0,54	0,014	-0,82	0,000
S100A8	-0,38	0,266	-0,56	0,043	-0,77	0,004
SERPINA1	-0,46	0,067	-0,69	0,001	-0,47	0,021
SLC17A5	-0,33	0,173	-0,51	0,010	-0,72	0,000
SLC7A7	-0,47	0,076	-0,68	0,002	-0,52	0,016
SNRK-AS1	0,59	0,079	0,57	0,042	0,59	0,031
STAT5A	0,34	0,166	0,66	0,001	0,49	0,012
TBXAS1	-0,27	0,390	-0,49	0,043	-0,64	0,007

	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 №1		1A11 IgG1 №2	
TFPI2	-0,52	0,079	-0,65	0,008	-0,49	0,042
TMEM184B	0,22	0,545	0,63	0,013	0,55	0,027
TYROBP	-0,35	0,212	-0,56	0,012	-0,84	0,000
USMG5	-0,39	0,120	-0,49	0,018	-0,68	0,001
USP19	0,48	0,145	0,76	0,005	0,54	0,044
USP38	0,44	0,105	0,49	0,029	0,61	0,006
XYLT2	0,27	0,329	0,60	0,005	0,57	0,006
ACTR5	0,56	0,137	0,74	0,018	0,53	0,093
ADAMDEC1	-0,88	0,095	-1,24	0,004	-0,63	0,176
ARHGAP18	-0,55	0,094	-0,63	0,021	-0,51	0,060
AUH	1,01	0,101	1,14	0,026	0,67	0,223
BAG2	0,29	0,548	0,70	0,042	0,42	0,254
BAIAP2	-0,44	0,367	-0,82	0,031	-0,32	0,474
BLOC1S3	-0,54	0,180	-0,71	0,029	-0,37	0,290
C16orf54	0,44	0,128	0,62	0,008	0,20	0,477
C1orf216	0,25	0,669	0,82	0,042	0,55	0,193
C2orf49	-0,47	0,455	-0,97	0,040	-0,44	0,407
C3orf58	0,46	0,182	0,60	0,032	0,43	0,144
CAMK1D	0,47	0,228	0,64	0,040	0,48	0,136
CCL2	-0,33	0,522	-0,86	0,019	0,52	0,186
CCL7	-0,48	0,282	-0,90	0,010	0,36	0,355
CCRL2	-0,42	0,263	-0,76	0,011	0,09	0,848
CD33	-1,08	0,261	-1,61	0,039	-1,28	0,103
CD6	0,12	0,833	0,67	0,042	0,51	0,134
CD68	-0,35	0,184	-0,66	0,002	-0,36	0,093
CDC42EP2	-0,30	0,490	-0,66	0,037	0,08	0,864
CLEC4E	-0,61	0,086	-0,94	0,001	-0,53	0,069
CLEC7A	-0,35	0,521	-0,83	0,034	-0,51	0,223
CPNE8	-0,52	0,422	-1,02	0,036	-0,32	0,601
CSF3	0,03	0,959	-0,63	0,030	0,30	0,353
CTSF	0,32	0,628	1,25	0,006	0,88	0,051
DAB2	-0,62	0,089	-0,67	0,029	-0,49	0,119
DFNA5	-0,63	0,080	-0,89	0,002	-0,33	0,311
ECI1	0,62	0,167	0,78	0,031	0,45	0,249
ELAVL1	0,56	0,120	0,74	0,013	0,51	0,091
ERO1L	-0,52	0,086	-0,85	0,001	-0,31	0,252
EXOSC4	-0,51	0,130	-0,69	0,013	-0,23	0,491
FAM105A	0,50	0,080	0,76	0,001	0,44	0,064
FAM83G	0,39	0,431	0,82	0,029	0,71	0,055
FCAR	-0,32	0,280	-0,71	0,002	-0,31	0,211
FGR	-0,41	0,067	-0,67	0,000	-0,27	0,169
FHL3	0,57	0,180	0,72	0,035	0,24	0,572
FKBP8	0,39	0,166	0,68	0,002	0,28	0,250
FLI1	0,63	0,053	1,03	0,000	0,51	0,065
FPR2	-0,36	0,529	-0,88	0,032	0,11	0,867

	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 №1		1A11 IgG1 №2	
G0S2	-0,40	0,231	-0,65	0,015	0,02	0,973
GEMIN2	-0,13	0,855	-0,85	0,041	-0,38	0,420
GGH	-0,45	0,302	-0,73	0,034	-0,59	0,091
GIMAP1	0,39	0,256	0,69	0,012	0,47	0,097
GIMAP1-						
GIMAP5	1,89	0,075	1,77	0,047	0,95	0,331
GNG10	-0,30	0,280	-0,61	0,005	-0,10	0,752
GPR137B	-0,51	0,376	-0,90	0,044	-0,31	0,566
GPR35	-0,41	0,322	-0,70	0,031	-0,12	0,791
GPR84	-0,38	0,154	-0,68	0,002	0,05	0,891
GTF2I	0,85	0,101	1,11	0,009	0,75	0,082
GZMM	0,55	0,215	0,77	0,029	0,31	0,448
HBEGF	-0,57	0,080	-0,76	0,004	0,02	0,970
HECTD3	0,61	0,107	0,66	0,038	0,38	0,267
HLCS	0,46	0,310	0,80	0,024	0,59	0,105
IFFO1	0,50	0,145	0,61	0,032	0,23	0,487
IGSF6	-0,65	0,058	-0,85	0,003	-0,23	0,502
IL19	-0,62	0,543	-1,55	0,033	-0,56	0,516
IL1R2	-0,38	0,627	-1,20	0,025	-0,63	0,285
IL24	-0,86	0,053	-0,92	0,013	-0,51	0,201
IL6	-0,43	0,196	-0,68	0,012	0,14	0,701
ILF3-AS1	-0,50	0,263	-0,76	0,035	-0,26	0,542
ISY1-RAB43	0,18	0,841	-1,07	0,033	0,24	0,717
JTB	0,24	0,621	0,73	0,030	0,33	0,372
KCNA3	0,08	0,879	0,85	0,005	0,37	0,264
KMO	-0,50	0,122	-0,72	0,006	-0,38	0,183
LACC1	-0,40	0,071	-0,65	0,000	-0,27	0,171
LILRB3	-0,31	0,410	-0,67	0,017	0,12	0,763
MET	-0,36	0,419	-0,67	0,049	-0,06	0,916
MMP1	-0,29	0,342	-0,74	0,001	-0,29	0,245
MMP19	-0,34	0,254	-0,59	0,013	-0,32	0,204
MTERFD1	-0,02	0,982	-0,61	0,048	-0,38	0,249
NCF1	-0,48	0,214	-0,85	0,006	-0,39	0,241
NCF1C	-0,56	0,254	-1,07	0,005	-0,53	0,198
NENF	0,90	0,068	0,97	0,018	0,51	0,247
OCEL1	0,70	0,198	1,04	0,018	0,57	0,232
PEX26	0,54	0,179	0,83	0,010	0,47	0,166
PGAM5	0,47	0,256	0,82	0,013	0,63	0,055
PHF1	0,08	0,883	0,65	0,043	0,38	0,270
PIGP	-0,03	0,970	-0,68	0,046	-0,24	0,557
PILRA	-0,49	0,095	-0,75	0,002	-0,45	0,063
PKIA	0,57	0,256	0,86	0,034	0,54	0,211
PLA2G7	-0,53	0,058	-0,73	0,002	-0,33	0,187
PLAUR	-0,32	0,229	-0,68	0,001	-0,21	0,363
PMP22	-0,72	0,132	-1,08	0,005	-0,45	0,290

	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 №1		1A11 IgG1 №2	
PTAFR	-0,58	0,099	-0,73	0,012	0,08	0,867
QPCT	-0,57	0,108	-0,81	0,005	-0,53	0,072
RAB2A	0,45	0,198	0,60	0,033	0,53	0,059
RAC1	0,90	0,065	1,13	0,005	0,76	0,063
RALY	0,39	0,234	0,60	0,023	0,44	0,107
RANBP10	0,14	0,738	0,59	0,026	0,31	0,293
RASA3	0,38	0,120	0,66	0,001	0,34	0,102
RAVER1	0,43	0,182	0,62	0,017	0,50	0,053
RCN2	0,48	0,231	0,76	0,017	0,41	0,234
RETSAT	0,48	0,231	0,65	0,047	0,59	0,065
RSPH3	-0,13	0,841	-0,95	0,008	-0,29	0,497
SEMA4A	-0,53	0,057	-0,69	0,003	-0,04	0,911
SEPHS2	0,43	0,503	1,00	0,030	0,87	0,055
SLAMF8	-0,27	0,544	-0,64	0,040	0,53	0,087
SNAPC1	-0,34	0,325	-0,64	0,016	-0,30	0,300
SUSD3	0,53	0,101	0,59	0,027	0,41	0,136
TAF1A	-0,23	0,588	-0,60	0,043	-0,03	0,954
TBC1D17	0,37	0,330	0,65	0,029	0,38	0,227
TBC1D22A	0,38	0,254	0,62	0,020	0,23	0,469
TBC1D25	0,37	0,298	0,71	0,010	0,44	0,120
TBL2	0,31	0,450	0,68	0,026	0,23	0,542
TFE3	0,23	0,552	0,61	0,027	0,41	0,159
THBS1	-0,37	0,256	-0,64	0,012	-0,49	0,053
TLR8	-0,74	0,089	-0,88	0,015	-0,03	0,963
TMEM176B	-0,94	0,068	-1,03	0,016	-0,82	0,055
TPRKB	-0,46	0,212	-0,88	0,003	-0,48	0,120
UBE3A	0,06	0,924	0,65	0,042	0,54	0,096
USP21	0,37	0,272	0,75	0,004	0,27	0,363
VAMP4	-0,31	0,375	-0,61	0,024	-0,40	0,163
VNN2	-0,47	0,086	-0,60	0,008	-0,41	0,074
WBP5	-0,97	0,205	-1,42	0,020	-0,70	0,298
XPOT	0,78	0,061	0,78	0,026	0,57	0,108
ZDHHC3	0,56	0,095	0,73	0,008	0,30	0,328
ZER1	0,58	0,161	0,78	0,019	0,36	0,333
ZNF589	0,27	0,504	0,73	0,012	0,25	0,474
ZNF71	0,55	0,101	0,65	0,020	0,23	0,487
ZNF792	0,70	0,108	0,95	0,008	0,67	0,063
ABHD14A	-0,24	0,527	0,00	1,000	-0,62	0,018
ACSL1	0,07	0,872	-0,08	0,823	0,62	0,014
AGO2	0,21	0,547	0,31	0,259	0,71	0,003
APOBEC3D	0,20	0,673	0,12	0,801	0,68	0,034
ARHGAP31	0,22	0,582	0,28	0,364	0,60	0,026
ATF3	0,18	0,771	0,04	0,949	0,89	0,017
B3GNT5	0,11	0,855	-0,01	0,985	0,81	0,013
BACH2	0,26	0,352	0,25	0,296	0,71	0,001

	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 №1		1A11 IgG1 №2	
C19orf43	-0,57	0,055	-0,30	0,285	-0,59	0,014
C9orf69	0,34	0,319	0,40	0,153	0,64	0,012
CCL4	-0,15	0,757	-0,39	0,248	0,94	0,002
CCL8	-0,28	0,813	-0,94	0,214	2,02	0,003
CCR2	-0,56	0,174	-0,32	0,412	-1,00	0,002
CD160	-0,64	0,288	-0,74	0,143	2,02	0,000
CD274	-0,28	0,494	-0,36	0,285	0,78	0,008
CD36	-0,77	0,172	-0,72	0,129	-1,26	0,005
CD52	-0,08	0,769	-0,25	0,155	-0,61	0,000
CD69	0,02	0,974	-0,08	0,770	0,82	0,000
CD72	-0,30	0,499	-0,29	0,431	0,65	0,038
CHKA	-0,41	0,410	-0,56	0,156	-0,76	0,039
CLIC3	0,05	0,939	-0,05	0,913	-0,67	0,041
COMMD3-BMI1	0,34	0,655	0,21	0,771	-1,41	0,005
COX17	-0,21	0,616	-0,45	0,133	-0,67	0,015
CRTAM	-0,39	0,388	-0,39	0,310	1,05	0,002
CSF2	0,11	0,939	0,79	0,337	1,61	0,024
CSF2RB	0,04	0,930	0,01	0,989	0,73	0,004
CX3CR1	-0,19	0,662	-0,24	0,493	-0,64	0,023
CXCL10	-0,55	0,511	-0,36	0,648	1,58	0,007
CXCL9	-0,32	0,687	-0,05	0,956	1,61	0,002
DUSP1	0,85	0,133	0,82	0,088	0,93	0,043
DVL2	0,54	0,143	0,58	0,058	0,61	0,040
EGR2	-0,67	0,094	-0,45	0,210	0,85	0,008
EIF4EBP1	-0,46	0,260	-0,15	0,737	-0,81	0,010
EPSTI1	0,09	0,874	0,16	0,728	0,75	0,021
FAM91A1	0,35	0,338	0,50	0,083	0,59	0,034
FASLG	0,05	0,933	0,06	0,881	0,76	0,007
FBXO30	0,27	0,586	0,63	0,077	0,76	0,024
FGFBP2	-0,16	0,647	-0,23	0,384	-0,77	0,001
FUS	0,30	0,429	0,37	0,238	0,61	0,029
GBP1	-0,22	0,716	-0,34	0,475	1,07	0,005
GBP1P1	-0,19	0,820	-0,02	0,979	1,11	0,019
GBP2	0,04	0,924	0,02	0,956	0,61	0,004
GBP4	0,00	0,997	0,08	0,823	0,74	0,002
GBP5	0,00	1,000	0,06	0,921	1,14	0,002
GCHFR	-0,03	0,952	-0,16	0,574	-0,64	0,004
GIMAP8	0,37	0,298	0,49	0,092	0,59	0,035
GZMA	-0,28	0,298	-0,29	0,194	-0,61	0,003
GZMB	0,05	0,916	-0,08	0,829	0,71	0,002
GZMH	-0,23	0,512	-0,36	0,181	-0,68	0,005
HAVCR2	0,07	0,858	-0,19	0,435	0,66	0,001
HIST1H2BK	-0,29	0,391	-0,47	0,076	-0,71	0,005
HIVEP1	0,36	0,213	0,09	0,783	0,65	0,005

	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 №1		1A11 IgG1 №2	
HSPBP1	0,53	0,153	0,49	0,120	0,78	0,007
HSPH1	0,40	0,414	0,71	0,056	0,72	0,046
IFNG	0,32	0,706	-0,32	0,654	1,21	0,024
IGF2R	0,15	0,664	0,37	0,119	0,66	0,003
IKZF2	0,20	0,664	0,42	0,212	0,61	0,049
IL21R-AS1	0,16	0,635	0,34	0,172	0,61	0,007
INADL	0,56	0,070	0,45	0,088	0,59	0,018
INHBA	-0,08	0,885	-0,24	0,549	0,89	0,005
INIP	-0,50	0,067	-0,38	0,111	-0,59	0,008
INTS3	0,55	0,092	0,49	0,079	0,67	0,010
IRF1	0,01	0,996	0,13	0,727	0,68	0,013
IRF4	0,36	0,256	0,41	0,113	1,03	0,000
IRF8	-0,09	0,790	0,01	0,982	0,71	0,000
IRG1	-0,36	0,567	-0,45	0,380	1,41	0,002
ISOC2	0,30	0,564	0,07	0,898	0,74	0,036
JAK2	0,63	0,087	0,53	0,091	0,98	0,001
JUN	0,06	0,880	0,23	0,400	0,76	0,002
KCNK6	0,37	0,503	0,60	0,144	0,80	0,040
KDM6B	-0,05	0,911	0,19	0,527	0,66	0,006
KHK	-0,81	0,070	-0,17	0,733	-0,73	0,047
KIR2DL4	-0,26	0,656	-0,39	0,402	1,02	0,008
KLRB1	-0,13	0,622	-0,26	0,178	-0,82	0,000
LGALS1	-0,42	0,178	-0,49	0,052	-0,69	0,005
LIMK2	-0,08	0,879	-0,01	0,976	0,79	0,006
LMNB1	0,13	0,793	0,30	0,418	0,72	0,018
LOC729013	-0,42	0,503	-0,39	0,469	-0,93	0,035
LRCH4	0,72	0,170	0,74	0,087	0,89	0,033
LST1	-0,45	0,432	-0,83	0,055	-1,03	0,013
MAP3K13	-0,09	0,837	-0,38	0,125	-0,64	0,006
MB21D1	0,00	1,000	0,15	0,701	0,76	0,009
MFGE8	0,08	0,941	0,21	0,792	-1,17	0,034
MPPE1	-0,31	0,477	-0,43	0,220	-0,77	0,013
NAB2	0,25	0,731	0,55	0,278	1,23	0,006
NDUFAF6	-0,27	0,557	-0,54	0,115	-0,65	0,044
NFKBIB	0,08	0,881	0,21	0,576	0,60	0,043
NOP14	0,14	0,821	0,55	0,164	0,80	0,028
NR4A1	0,12	0,777	0,06	0,871	0,95	0,000
NR4A2	-0,09	0,841	-0,25	0,373	0,75	0,002
OSBPL5	-0,55	0,152	-0,21	0,581	-0,62	0,046
PAGR1	0,48	0,159	0,54	0,051	0,64	0,016
PIM3	0,05	0,930	0,42	0,181	0,59	0,040
PLEK	-0,08	0,853	-0,17	0,579	0,82	0,001
PML	0,51	0,168	0,56	0,067	0,62	0,036
PPP1R15B	0,27	0,302	0,32	0,143	0,60	0,003
PTGES2	-0,39	0,545	-0,64	0,189	-1,00	0,026

	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 №1		1A11 IgG1 №2	
PTGS2	0,12	0,854	-0,02	0,971	0,79	0,022
PYCARD	-0,16	0,703	-0,21	0,550	-0,60	0,032
RAB20	-0,28	0,509	-0,34	0,324	0,61	0,045
RGS16	-0,16	0,809	-0,07	0,901	1,09	0,004
RNF19A	0,22	0,457	0,26	0,282	0,67	0,002
RPL21	-0,54	0,132	-0,10	0,809	-0,84	0,004
RPL34	-0,07	0,837	-0,10	0,709	-0,59	0,003
RPS29	-0,02	0,975	-0,06	0,878	-0,60	0,024
SBNO2	0,14	0,758	0,23	0,515	0,59	0,044
SERPINE2	-0,19	0,655	0,02	0,957	0,63	0,026
SH2D1B	-0,11	0,749	-0,09	0,742	0,94	0,000
SH3BGRL3	-0,28	0,207	-0,26	0,180	-0,66	0,000
SLC25A20	-0,14	0,731	-0,33	0,257	-0,59	0,024
SLC7A5	0,33	0,355	0,21	0,530	0,60	0,024
SLMO2-ATP5E	-0,30	0,893	-0,82	0,594	-2,45	0,042
SMG6	0,30	0,410	0,45	0,121	0,62	0,021
SMIM11	-0,40	0,417	-0,43	0,299	-0,74	0,045
SMIM14	-0,32	0,165	-0,36	0,057	-0,68	0,000
SNHG8	-0,25	0,666	-0,37	0,400	-0,80	0,034
SPRY2	-0,16	0,880	-0,46	0,531	1,37	0,018
SRC	0,25	0,549	0,32	0,341	0,59	0,042
SREBF1	0,41	0,509	0,58	0,233	0,93	0,034
STARD4	0,21	0,583	0,33	0,268	0,83	0,002
STAT1	0,20	0,582	0,23	0,428	0,64	0,008
SUMF1	-0,17	0,683	-0,37	0,222	-0,64	0,017
TAGAP	0,03	0,937	0,08	0,793	1,06	0,000
TESK1	-0,06	0,921	0,18	0,645	0,63	0,038
TMEM165	0,42	0,303	0,57	0,083	0,65	0,038
TNF	-0,33	0,261	-0,32	0,206	0,61	0,007
TNFRSF10A	0,34	0,619	0,63	0,215	0,93	0,044
TNFRSF9	0,02	0,976	-0,09	0,807	1,08	0,000
TP53I13	0,53	0,210	0,62	0,073	0,84	0,010
TYSND1	-0,24	0,590	-0,10	0,818	-0,70	0,018
UBE2D1	0,63	0,111	0,62	0,066	0,91	0,005
XCL1	-0,07	0,941	0,02	0,979	2,19	0,000
XCL2	-0,25	0,805	0,77	0,257	2,83	0,000
ZNF326	-0,37	0,344	-0,53	0,088	-0,60	0,044

Таблица 6. Список генов, достоверно (FDR 5%) и дифференциально (кратность изменения > 1,5), экспрессируемых после инкубации человеческих РВМС (n = 7) с mAb против IL7Rα по сравнению с нестимулированными клетками.

Анализ диаграммы Венна (фиг. 11С) выявил 61 общий дифференциально экспрессируемый ген с тремя mAb без какого-либо особого обогащения генной онтологии по данным GoMiner. Несмотря на 61 общий ген, антитело по изобретению индуцирует только 31 значительную модификацию гена без обогащения генной онтологии. Напротив, два антитела предшествующего уровня техники индуцируют важную транскрипционную модификацию транскриптома PBMC человека с 245 дифференциально экспрессированными генами, индуцированными mAb IgG4 № 1 сайта-1, и 237 дифференциально экспрессированными генами, индуцированными mAb IgG1 № 2 сайта-1. 78 дифференциально экспрессируемых генов были общими для этих двух mAb сайта-1, но эти гены не экспрессируются дифференциально, когда PBMC стимулированы антителом N13B2-hVL6.

Анализ основных компонентов (PCA) сигнатуры IL-7 показывает, что дифференциально экспрессируемые гены, индуцированные антителами предшествующего уровня техники, сильно отличаются от дифференциально экспрессируемых генов, индуцированных IL-7. Обогащение генной онтологии GoMiner показывает, что оба антитела предшествующего уровня техники модифицируют биологические функции PBMC, такие как активация, пролиферация, миграция, хемотаксис лейкоцитов, секреция цитокинов и воспалительные реакции, ассоциированные с путем MAPK/ERK.

Среди 334 генов, дифференциально экспрессируемых с IL7 по сравнению с контрольным условием, 93 гена были дифференциально экспрессированы с высоким кратным изменением (> 2) и были разделены на 3 отдельных кластера с помощью анализа с использованием тепловой карты (фиг. 11А). Первый кластер генов с пониженной регуляцией, оцениваемый по обогащению онтологии генов, в основном был вовлечен в дифференцировку и апоптоз лейкоцитов, второй кластер генов с высоким уровнем регуляции ассоциирован с адгезией, дифференцировкой и активацией лейкоцитов, а третий кластер генов с повышенным уровнем регуляции имел смешанную онтологию генов. Интересно, что все исследованные mAb (как сайт-1, так и сайт-1/2b) демонстрировали сходные эффекты, предотвращая модификацию кластера-1 и кластера-2, но без воздействия на кластер-3 (Фигура 11В).

В целом, транскрипционный анализ подтвердил, что несмотря на то, что mAb против человеческого IL-7R α сайта-1/2-b обладали сходными антагонистическими свойствами, два mAb сайта-1, ранее описанные в данной области техники, индуцируют значительные транскрипционные модификации человеческих PBMC, совместимые с активацией Т-клеток и воспалительными реакциями, индуцированными путем MAPK/ERK.

mAb сайта-1/2b против IL-7R α человека по изобретению, то есть N13B2-hVL6, индуцировало меньшую транскрипционную модификацию человеческих PBMC по сравнению с двумя mAb сайта-1, ранее описанными в уровне техники.

Отсутствие специфических и "только антагонистических" mAb против IL-7R α для более крупных

биологических видов не позволило проверить этот эффект у приматов или людей. Авторы изобретения обнаружили, что антагонистические/антагонистические свойства mAb против IL-7R α зависят от специфического целевого эпитопа, поскольку антитела существующего уровня техники, связывающие домен взаимодействия IL-7 сайта-1, по-видимому, обладают как антагонистическими, так и антагонистическими свойствами, тогда как антитело по изобретению, связывающее домен димеризации IL-7R α / γ c (сайт 2b), проявляет строгую антагонистическую активность. Авторы изобретения предполагают, что антитело по изобретению может нарушать димеризацию IL-7R α / γ c, необходимую для интернализации и передачи сигнала рецептора. "Только антагонистические" антитела против IL-7R предотвращали длительное воспаление кожи у приматов, опосредованное Т-клетками памяти, даже после хронической антигенной стимуляции, не индуцируя лимфопению или поликлональных Т-клеточных функциональных или метаболических нарушений.

Было показано, что IL-7 индуцирует пролиферативные и антиапоптотические сигналы посредством передачи сигналов IL-7R, главным образом, путем активации пути JAK/STAT. Также считается, что передача сигналов IL-7R включает путь PI3K/AKT, но это наблюдалось в трансформированных immortalized клеточных линиях или первичных тимоцитах, и эти сигналы не были обнаружены в периферических наивных или человеческих Т-лимфоцитах памяти (Watanabe, J. Exp. Med., 1998). В нескольких сообщениях также было высказано предположение, что передача сигналов IL-7R может усиливать фосфорилирование ERK либо в Т-лимфоцитах, либо в субпопуляциях про-В-клеток (Deshpande P. I. Immunol, 2013; Fleming HE и Paige CJ, Immunity, 2001). Роль этих путей в передаче сигналов IL-7R в зрелых и человеческих Т-клетках менее ясна. Используя первичные свежевыделенные человеческие PBMC (в основном состоящие из Т и В-лимфоцитов, моноцитов и NK-клеток) от здоровых добровольцев, стимулированные высокой концентрацией рекомбинантного человеческого IL-7 (5000 пг/мл, в то время как концентрация в сыворотке составляет ~5 пг/мл в лимфопенических условиях, Wong HL, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008), авторы изобретения подтвердили, что IL-7 индуцировал воспроизводимое фосфорилирование STAT5. Активация сигнала PI3K была более вариабельной, и авторы изобретения не наблюдали фосфорилирования ERK. Хотя все mAb против IL7R α , использованные в этом исследовании, были сильными ингибиторами IL-7-индуцированного pSTAT5 и проявляли сходные свойства транскрипционных антагонистов, мы обнаружили, что два mAb сайта-1 уровня техники индуцировали агонистические сигналы PI3K/ERK и важные транскрипционные модификации, ассоциированные с активацией Т-клеток и воспалительными реакциями, индуцированными путем MAPK/ERK. Эти противоположные свойства двойного агониста/антагониста некоторых mAb не являются уникальными, поскольку другие мишени, такие как IL-4, IL-6R, IL-15, CD28, CD38, CD40 или HER2, продемонстрировали сходные виды активности после эндоцитоза/интернализации рецепторов.

Также исследователи недавно подтвердили гетеродимеризацию этого сайта 2b с TSLPR и продемонстрировали ее готовность к передаче сигналов рецептора, как уже предсказывалось для IL-7R α и γ -цепи (Verstraete K., Nature Communications, 2017). Интересно, что предсказанный сайт гетеродимеризации между IL-7R α / γ -цепью и IL-7R α /TSLPR перекрывается, что указывает на общий механизм передачи сигналов, опосредованный гетеродимеризацией, между обоими рецепторами.

Мы обнаружили, что анализ ингибирования pSTAT5 *in vitro* не позволяет предсказать эффективность анти-IL-7R-антител *in vivo*. В предыдущем сообщении другое анти-IL7R α -mAb предотвращало *in vitro* и *ex vivo* IL-7-индуцированный pSTAT5 у приматов, но не защищало от воспаления головного мозга на экспериментальной модели мартышек с аутоиммунным энцефалитом (EAE) (Dunham J., J. Neuroimmune.Pharmacol, 2016).

IL-7 уже хорошо описан в плане поддержания пула периферических наивных Т-лимфоцитов и Т-лимфоцитов памяти у мышей. Однако у приматов важность IL-7 в поддержании периферического Т-клеточного гомеостаза может быть менее очевидной, и/или дублирующие механизмы могут объяснить эту разницу между биологическими видами.

Эти данные показали, что антагонистические свойства mAb против IL-7R α и эффективность *in vivo* связаны не только с предотвращением связывания IL-7 и ингибирования pSTAT5. Эти данные показали, что антитело по изобретению, также нацеленное на сайт гетеродимеризации рецептора (сайт 2b), является "только антагонистическим" и обеспечивает более высокую эффективность ингибирующих Т-клеточных ответов *in vivo*.

Нацеливание на IL7R антител с "только антагонистическими свойствами" потенциально способно регулировать выживание и накопление антиген-специфических Т-клеток памяти и, следовательно, может способствовать предотвращению долгосрочного рецидива при аутоиммунных и воспалительных заболеваниях.

Ссылки

- Abraham, C. & Cho, J. H. Inflammatory Bowel Disease. *New England Journal of Medicine* 361, 2066-2078 (2009).
- Adams, D. H. & Eksteen, B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 244-251 (2006).
- Agace, W. W. Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 682-692 (2006).
- Albuquerque AS, Cortesão CS, Foxall RB, Soares RS, Victorino RM, Sousa AE. Rate of increase in circulating IL-7 and loss of IL-7R α expression differ in HIV-1 and HIV-2 infections: two lymphopenic diseases with similar hyperimmune activation but distinct outcomes. *J Immunol.* 2007 Mar 1;178(5):3252-9. PubMed PMID: 17312174.
- Baumgart, D. C. & Sandborn, W. J. Crohn's disease. *Lancet* 380, 1590-1605 (2012).
- Broux, B., Hellings, N., Venken, K., Rummens, J.-L., Hensen, K., Van Wijmeersch, B., and Stinissen, P. (2010). Haplotype 4 of the multiple sclerosis-associated interleukin-7 receptor alpha gene influences the frequency of recent thymic emigrants. *Genes Immun.* 11, 326-333.
- Chothia, C., and Lesk, A.M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196, 901-917.
- Chothia C, Lesk AM, Gherardi E, Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB, Winter G. Structural repertoire of the human VH segments. *J Mol Biol.* 1992 Oct 5;227(3):799-817.
- Clark LA, Demarest SJ, Eldredge J, Jarpe MB, Li Y, Simon K, van Vlijmen HW. Influence of canonical structure determining residues on antibody affinity and stability. *J Struct Biol.* 2014 Feb;185(2):223-7. doi: 10.1016/j.jsb.2013.08.009. PubMed PMID: 23994046
- Danese, S. & Fiocchi, C. Ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* 365, 1713-1725 (2011).
- Denucci, C.C., Mitchell, J.S., and Shimizu, Y. (2009). Integrin function in T-cell homing to lymphoid and nonlymphoid sites: getting there and staying there. *Crit. Rev. Immunol.* 29, 87-109.
- Feagan, B. G. et al. Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *New England Journal of Medicine* 369, 699-710 (2013).
- Deshpande, P., Cavanagh, M.M., Le Saux, S., Singh, K., Weyand, C.M., and Goronzy, J.J. (2013). IL-7- and IL-15-mediated TCR sensitization enables T cell responses to self-antigens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 1416-1423.
- Dunham, J., Lee, L.-F., Driel, N. van, Laman, J.D., Ni, I., Zhai, W., Tu, G.-H., Lin, J.C., Bauer, J., Hart, B.A. 't, et al. (2016). Blockade of CD127 Exerts a Dichotomous Clinical Effect in Marmoset Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 11, 73-83.
- Fleming, H.E., and Paige, C.J. (2001). Pre-B Cell Receptor Signaling Mediates Selective Response to IL-7 at the Pro-B to Pre- B Cell Transition via an ERK/MAP Kinase-Dependent Pathway. *Immunity* 15, 521-531.
- Gorfu, G., Rivera-Nieves, J., and Ley, K. (2009). Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr. Mol. Med.* 9, 836-850.
- Haas, J., Korpö, M., Schwarz, A., Balint, B., and Wildemann, B. (2011). The interleukin-7 receptor α chain contributes to altered homeostasis of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 41, 845-853.
- Haudebourg, T., Poirier, N., and Vanhove, B. (2009). Depleting T-cell subpopulations in organ transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 22, 509-518.

- He, R., and Geha, R.S. (2010). Thymic stromal lymphopoietin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183, 13-24.
- Henriques, C.M., Rino, J., Nibbs, R.J., Graham, G.J., and Barata, J.T. (2010). IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7R α in T cells. *Blood* 115, 3269-3277.
- Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.M. and Gottesman, K.S. (1992) Sequences of Proteins of Immunological Interest (DIANE publishing, 1992).
- Kern, B., Kraynov, E., Lee, L.-F., Ray, R. (2013). Receptor occupancy and internalization of an anti-IL-7 receptor antibody. *Cytokine* 63, 276-277.
- Kern B, Li W, Bono C, Lee LF, Kraynov E. Receptor occupancy and blocking of STAT5 signaling by an anti-IL-7 receptor antibody in cynomolgus monkeys. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016 Mar;90(2):191-8.
- Khor, B., Gardet, A. & Xavier, R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 307-317 (2011).
- Lei, L., Zhang, Y., Yao, W., Kaplan, M.H., and Zhou, B. (2011). Thymic Stromal Lymphopoietin Interferes with Airway Tolerance by Suppressing the Generation of Antigen-Specific Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 186, 2254-2261.
- Mazzucchelli, R., Hixon, J.A., Spolski, R., Chen, X., Li, W.Q., Hall, V.L., Willette-Brown, J., Hurwitz, A.A., Leonard, W.J., and Durum, S.K. (2008). Development of regulatory T cells requires IL-7R α stimulation by IL-7 or TSLP. *Blood* 112, 3283-3292.
- McElroy CA, Dohm JA, Walsh ST. Structural and biophysical studies of the human IL-7/IL-7R α complex. *Structure.* 2009 Jan 14;17(1):54-65. doi: 10.1016/j.str.2008.10.019.
- McElroy CA, Holland PJ, Zhao P, Lim JM, Wells L, Eisenstein E, Walsh ST. Structural reorganization of the interleukin-7 signaling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Feb 14;109(7):2503-8. doi: 10.1073/pnas.1116582109
- Michel, L., Berthelot, L., Pettré, S., Wiertlewski, S., Lefrère, F., Braudeau, C., Brouard, S., Soullillou, J.-P., and Laplaud, D.- A. (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis. *J. Clin. Invest.* 118, 3411-3419.
- Planell N, Lozano JJ, Mora-Buch R, Masamunt MC, Jimeno M, Ordas I, Esteller M, Ricart E, Piqué JM, Panés J, Salas A. Transcriptional analysis of the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis in remission reveals lasting epithelial cell alterations. *Gut.* 2013 Jul;62(7):967-76. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303333
- Racapé, M., Vanhove, B., Soullillou, J.-P., and Brouard, S. (2009). Interleukin 7 receptor alpha as a potential therapeutic target in transplantation. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 57, 253-261.
- Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, Clifford T, Liu Mr, Travis M, Zurawski SM, Johnston J, Liu YJ, Spits H, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Bazan JF. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol.* 2001 Jul 1;167(1):336-43
- Roan, F., Bell, B.D., Stoklasek, T.A., Kitajima, M., Han, H., and Ziegler, S.F. (2012). The multiple facets of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) during allergic inflammation and beyond. *J. Leukoc. Biol.* 91, 877-886.
- Rochman, Y., Kashyap, M., Robinson, G.W., Sakamoto, K., Gomez-Rodriguez, J., Wagner, K.-U., and Leonard, W.J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19455-19460.
- Sandborn, W. J. et al. Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *New England Journal of Medicine* 369, 711-721 (2013).

Shochat C, Tal N, Bandapalli OR, Palmi C, Ganmore I, te Kronnie G, Cario G, Cazzaniga G, Kulozik AE, Stanulla M, Schrappe M, Biondi A, Basso G, Bercovich D, Muckenthaler MU, Izraeli S. Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *J Exp Med*. 2011 May 9;208(5):901-8. doi: 10.1084/jem.20110580. Erratum in: *J Exp Med*. 2011 May 9;208(5):preceding 901. *J Exp Med*. 2011 Jun 6;208(6):1333

Taylor, B.C., Zaph, C., Troy, A.E., Du, Y., Guild, K.J., Comeau, M.R., and Artis, D. (2009). TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J. Exp. Med*. 206, 655-667.

Van Bodegom, D., Zhong, J., Kopp, N., Dutta, C., Kim, M.-S., Bird, L., Weigert, O., Tyner, J., Pandey, A., Yoda, A., et al. (2012). Differences in signaling through the B-cell leukemia oncoprotein CRLF2 in response to TSLP and through mutant JAK2. *Blood* 120, 2853-2863.

Verstraete, K., Peelman, F., Braun, H., Lopez, J., Van Rompaey, D., Dansercoer, A., Vandenberghe, I., Pauwels, K., Tavernier, J., Lambrecht, B.N., et al. (2017). Structure and antagonism of the receptor complex mediated by human TSLP in allergy and asthma. *Nat. Commun.* 8.

Walsh ST. Structural insights into the common γ -chain family of cytokines and receptors from the interleukin-7 pathway. *Immunol Rev*. 2012 Nov;250(1):303-16

Watanabe, M., Ueno, Y., Yajima, T., Okamoto, S., Hayashi, T., Yamazaki, M., Iwao, Y., Ishii, H., Habu, S., Uehira, M., et al. (1998). Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J. Exp. Med*. 187, 389-402.

Watanabe, N., Wang, Y.-H., Lee, H.K., Ito, T., Wang, Y.-H., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2005a). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436, 1181-1185.

Wong, H.-L., Pfeiffer, R.M., Fears, T.R., Vermeulen, R., Ji, S., and Rabkin, C.S. (2008). Reproducibility

Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Fang, C., Cousins, D., Zhang, G., Gu, S., Gao, Z., Shamji, B., et al. (2008). Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 2790-2798.

Zhi, K., Li, M., Zhang, X., Gao, Z., Bai, J., Wu, Y., Zhou, S., Li, M., and Qu, L. (2014). $\alpha 4\beta 7$ Integrin (LPAM-1) is upregulated at atherosclerotic lesions and is involved in atherosclerosis progression. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 33, 1876-1887

Zhong, J., Sharma, J., Raju, R., Palapetta, S.M., Prasad, T.S.K., Huang, T.-C., Yoda, A., Tyner, J.W., van Bodegom, D., Weinstock, D.M., et al. (2014). TSLP signaling pathway map: a platform for analysis of TSLP-mediated signaling. *Database J. Biol. Databases Curation* 2014, bau007.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> OSE IMMUNOTHERAPEUTICS

<120> Антитела и полипептиды, направленные против CD127

<130> B12201A

<150> EP 16306655.8

<151> 2016-12-09

<160> 96

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 1

Phe Thr Leu Ser Asp Tyr Tyr Met Ala

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 2

Thr Ile Ser Ala Ser Gly Leu Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 3

Pro Leu Ser Ala His Tyr Gly Phe Asn Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 4

Arg Thr Ser Glu Asp Ile Tyr Gln Gly Leu Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 5

Ser Ala Asn Thr Leu His Ile
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 6

Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu Ala
1 5

<210> 7

<211> 122

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 7

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

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

Tyr Met Ala Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Pro Leu Ser Ala His Tyr Gly Phe Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 8
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asp Ile Tyr Gln Gly
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Asn Thr Leu His Ile Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
85 90 95

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 9
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 9

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Ser Ala Asn Thr Leu His Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
85 90 95

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 10

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 10

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
35 40 45

Tyr Ser Ala Asn Thr Leu His Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
85 90 95

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 11
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 11

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
 35 40 45

Tyr Ser Ala Asn Thr Leu His Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
 85 90 95

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 12
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 12

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
 35 40 45

Tyr Ser Ala Asn Thr Leu His Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
85 90 95

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 13
<211> 366
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 13
caggtgcagc tggtcgaatc agggggggga ctgggtcaaac ccggggggctc actgcgtctg 60
tcatgtgccg tctcaggctt cacactgagc gactactata tggcatggat ccgacaggca 120
ccaggcaagg gactggagtg ggtgtctact atttctgcc a gtggcctgag gacctactat 180
cctgacagtg tcaagggaag gttcacaatc tcacgggata acgctaaaaa ttccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaagac accgctgtgt actattgcgc tcgcccactg 300
tccgcacact atggcttcaa ttactttgat tattgggggc aggggtaccct ggtgacagtc 360
tccagc 366

<210> 14
<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 14
gagatcgtca tgacgcagtc ccccgcaacg ctctccgtct ccccggggga acgcgcgacc 60
ctgtcgtgca ggacctccga ggacatctac caaggcctcg cgtgggtatca gcagaagccc 120
ggccaggccc cgcggctggt gatctactcc gcgaacacct tgcacatcgg catcccggcg 180
cgcttctcgg ggtcagggag cggcaccgag ttcacctga ccatctcgtc gctccagagc 240
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag tactacgact accccctggc gttcgggggc 300
gggaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 15
<211> 321
<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 15

gacattcaga tgaccagtc cccctcgagc ctgagtgcga gtgtgggcga ccgcgtgacg	60
atcacctgcc ggacgtccga ggatatctac cagggcctcg cctggtacca gcagaagccg	120
ggcaaggccc ccaaactgct ggtctacagc gcgaacaccc tccacatcgg cgtccccagc	180
cggttcagcg gctccggctc gggaacggac tacaccctca cgatctcgtc cctgcagccg	240
gaagacttcg ccacctactt ctgccagcag tattacgact acccgctggc gttcgggtggc	300
ggcaccaagg tcgagatcaa g	321

<210> 16

<211> 321

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 16

gacattcaga tgaccagtc cccctcgagc ctgagtgcga gtgtgggcga ccgcgtgacg	60
atcacctgcc ggacgtccga ggatatctac cagggcctcg cctggtacca gcagaagccg	120
ggcaaggccc ccaaactgct gctctacagc gcgaacaccc tccacatcgg cgtccccagc	180
cggttcagcg gctccggctc gggaacggac tacaccctca cgatctcgtc cctgcagccg	240
gaagacttcg ccacctactt ctgccagcag tattacgact acccgctggc gttcgggtggc	300
ggcaccaagg tcgagatcaa g	321

<210> 17

<211> 321

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 17

gacattcaga tgaccagtc cccctcgagc ctgagtgcga gtgtgggcga ccgcgtgacg	60
atcacctgcc ggacgtccga ggatatctac cagggcctcg cctggtacca gcagaagccg	120
ggcaaggccc ccaaactgct ggtctacagc gcgaacaccc tccacatcgg cgtccccagc	180
cggttcagcg gctccggctc gggaacggac tacaccctca cgatctcgtc cctgcagccg	240
gaagacttcg ccacctacta ctgccagcag tattacgact acccgctggc gttcgggtggc	300
ggcaccaagg tcgagatcaa g	321

<210> 18

<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 18
gacattcaga tgaccagtc cccctcgagc ctgagtgcga gtgtgggcga ccgcgtgacg 60
atcacctgcc ggacgtccga ggatatctac cagggcctcg cctggtagca gcagaagccg 120
ggcaaggccc ccaaactgct gctctacagc gcgaacaccc tccacatcgg cgtccccagc 180
cggttcagcg gctccggctc gggaacggac tacaccctca cgatctcgtc cctgcagccg 240
gaagacttcg ccacctacta ctgccagcag tattacgact acccgctggc gttcgggtggc 300
ggcaccaagg tcgagatcaa g 321

<210> 19
<211> 31
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 19

Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr
1 5 10 15

Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val
20 25 30

<210> 20
<211> 31
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 20

Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe
1 5 10 15

Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile
20 25 30

<210> 21
<211> 459
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 21

Met	Thr	Ile	Leu	Gly	Thr	Thr	Phe	Gly	Met	Val	Phe	Ser	Leu	Leu	Gln	1	5	10	15
Val	Val	Ser	Gly	Glu	Ser	Gly	Tyr	Ala	Gln	Asn	Gly	Asp	Leu	Glu	Asp	20	25	30	
Ala	Glu	Leu	Asp	Asp	Tyr	Ser	Phe	Ser	Cys	Tyr	Ser	Gln	Leu	Glu	Val	35	40	45	
Asn	Gly	Ser	Gln	His	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Phe	Glu	Asp	Pro	Asp	Val	50	55	60	
Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe	Glu	Ile	Cys	Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Val	65	70	75	80
Lys	Cys	Leu	Asn	Phe	Arg	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Phe	Ile	Glu	Thr	85	90	95	
Lys	Lys	Phe	Leu	Leu	Ile	Gly	Lys	Ser	Asn	Ile	Cys	Val	Lys	Val	Gly	100	105	110	
Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Ile	Val	Lys	115	120	125	
Pro	Glu	Ala	Pro	Phe	Asp	Leu	Ser	Val	Ile	Tyr	Arg	Glu	Gly	Ala	Asn	130	135	140	
Asp	Phe	Val	Val	Thr	Phe	Asn	Thr	Ser	His	Leu	Gln	Lys	Lys	Tyr	Val	145	150	155	160
Lys	Val	Leu	Met	His	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	Gln	Glu	Lys	Asp	Glu	Asn	165	170	175	
Lys	Trp	Thr	His	Val	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln	180	185	190	
Arg	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Met	Tyr	Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	195	200	205	
Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Pro	Ser	Tyr	210	215	220	
Tyr	Phe	Arg	Thr	Pro	Glu	Ile	Asn	Asn	Ser	Ser	Gly	Glu	Met	Asp	Pro	225	230	235	240
Ile	Leu	Leu	Thr	Ile	Ser	Ile	Leu	Ser	Phe	Phe	Ser	Val	Ala	Leu	Leu	245	250	255	

Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val
260 265 270

Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys
275 280 285

Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu
290 295 300

Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val
305 310 315 320

Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu
325 330 335

Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu
340 345 350

Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser
370 375 380

Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val
385 390 395 400

Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro
405 410 415

Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala
420 425 430

Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala
435 440 445

Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln
450 455

<210> 22
<211> 219
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 22

Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp
1 5 10 15

Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val Asn Gly Ser Gln
20 25 30

His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu Asp Pro Asp Val Asn Thr Thr Asn
35 40 45

Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val Lys Cys Leu Asn
50 55 60

Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe Leu
65 70 75 80

Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly Glu Lys Ser Leu
85 90 95

Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys Pro Glu Ala Pro
100 105 110

Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala Asn Asp Phe Val Val
115 120 125

Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val Lys Val Leu Met
130 135 140

His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn Lys Trp Thr His
145 150 155 160

Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln Arg Lys Leu Gln
165 170 175

Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile Pro Asp His Tyr
180 185 190

Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr Tyr Phe Arg Thr
195 200 205

Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp
210 215

<210> 23

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 23

Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe
1 5

<210> 24
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 24

Asp Leu Ser Val Ile Tyr
1 5

<210> 25
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 25

Phe Lys Gly Phe
1

<210> 26
<211> 327
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 26

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 27
<211> 107

<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 27

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 28
<211> 106
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 28

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

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

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 29
<211> 984
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 29
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
aaatatggtc ccccatgccc accatgcccga gcacctgagt tcctggggggg accatcagtc 360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgagggtcacg 420
tgcggtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 840
gacggctcct tcttctctta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
ctctccctgt ctccgggtaa atga 984

<210> 30
<211> 325
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 30
cgcacgggtg ccgcgccgtc ggtgttcata ttcccgcga gcgacgagca gttgaagtcc 60

<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 34

Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln Arg
1 5

<210> 35
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 35

Thr Leu Leu Gln Arg Lys Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile
1 5 10 15

<210> 36
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 36

Leu Val Glu Val Lys Cys Leu Asn Phe Arg
1 5 10

<210> 37
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 37

Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val Lys Cys Leu Asn Phe Arg
1 5 10

<210> 38
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 38

Leu Val Glu Val Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys
1 5 10

<210> 39
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 39

Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly
1 5

<210> 40
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 40

Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile
1 5 10

<210> 41
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 41

Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly
1 5 10

<210> 42
<211> 5
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 42

Cys Leu Asn Phe Arg
1 5

<210> 43
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 43

Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe
1 5

<210> 44
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 44

Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu
1 5 10 15

<210> 45
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 45

Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser
1 5 10 15

<210> 46
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 46

Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr
1 5 10 15

<210> 47
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 47

Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu
1 5 10 15

<210> 48
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 48

Asp	Tyr	Ser	Phe	Ser	Cys	Tyr	Ser	Gln	Leu	Glu	Val	Asn	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 49
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 49

Ser	Cys	Tyr	Ser	Gln	Leu	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Gln	His	Ser	Leu
1				5					10					15

<210> 50
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 50

Gln	Leu	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Gln	His	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Phe
1				5					10					15

<210> 51
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 51

Asn	Gly	Ser	Gln	His	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Phe	Glu	Asp	Pro	Asp
1				5					10					15

<210> 52
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 52

His	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Phe	Glu	Asp	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Thr
1				5					10					15

<210> 53

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 53

Cys	Ala	Phe	Glu	Asp	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe
1				5					10					15

<210> 54

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 54

Asp	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe	Glu	Ile	Cys	Gly
1				5					10					15

<210> 55

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 55

Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe	Glu	Ile	Cys	Gly	Ala	Leu	Val	Glu
1				5					10					15

<210> 56

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 56

Leu	Glu	Phe	Glu	Ile	Cys	Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Val	Lys	Cys	Leu
1				5					10					15

<210> 57
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 57

Ile	Cys	Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Val	Lys	Cys	Leu	Asn	Phe	Arg	Lys
1				5				10						15

<210> 58
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 58

Leu	Val	Glu	Val	Lys	Cys	Leu	Asn	Phe	Arg	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile
1				5					10					15

<210> 59
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 59

Lys	Cys	Leu	Asn	Phe	Arg	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Phe	Ile	Glu
1				5					10					15

<210> 60
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 60

Phe	Arg	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Phe	Ile	Glu	Thr	Lys	Lys	Phe
1				5					10					15

<210> 61
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 61

Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly
1 5 10 15

<210> 62

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 62

Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile
1 5 10 15

<210> 63

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 63

Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val
1 5 10 15

<210> 64

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 64

Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly Glu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 65

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 65

Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly Glu Lys Ser Leu Thr Cys Lys
1 5 10 15

<210> 66

<211> 15

<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 66

Val	Lys	Val	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu
1				5					10					15

<210> 67
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 67

Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Ile	Val
1				5					10					15

<210> 68
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 68

Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Glu	Ala
1				5					10					15

<210> 69
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 69

Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Glu	Ala	Pro	Phe	Asp	Leu
1					5				10					15

<210> 70
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 70

Thr Ile Val Lys Pro Glu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 71

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 71

Pro Glu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala
1 5 10 15

<210> 72

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 72

Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala Asn Asp Phe Val
1 5 10 15

<210> 73

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 73

Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala Asn Asp Phe Val Val Thr Phe Asn
1 5 10 15

<210> 74

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 74

Glu Gly Ala Asn Asp Phe Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu
1 5 10 15

<210> 75

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 75

Asp	Phe	Val	Val	Thr	Phe	Asn	Thr	Ser	His	Leu	Gln	Lys	Lys	Tyr
1				5					10					15

<210> 76
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 76

Thr	Phe	Asn	Thr	Ser	His	Leu	Gln	Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Val	Leu
1				5					10					15

<210> 77
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 77

Ser	His	Leu	Gln	Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Val	Leu	Met	His	Asp	Val
1				5					10					15

<210> 78
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 78

Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Val	Leu	Met	His	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	Gln
1				5					10					15

<210> 79
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 79

Lys	Val	Leu	Met	His	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	Gln	Glu	Lys	Asp	Glu
1				5					10					15

<210> 80
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 80

His	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	Gln	Glu	Lys	Asp	Glu	Asn	Lys	Trp	Thr
1				5					10					15

<210> 81
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 81

Tyr	Arg	Gln	Glu	Lys	Asp	Glu	Asn	Lys	Trp	Thr	His	Val	Asn	Leu
1				5					10					15

<210> 82
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 82

Lys	Asp	Glu	Asn	Lys	Trp	Thr	His	Val	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Lys
1				5					10					15

<210> 83
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 83

Lys	Trp	Thr	His	Val	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Leu
1				5					10					15

<210> 84
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 84

Val	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln	Arg	Lys	Leu
1				5					10					15

<210> 85

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 85

Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln	Arg	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala
1				5					10					15

<210> 86

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 86

Thr	Leu	Leu	Gln	Arg	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Met	Tyr	Glu	Ile
1				5					10					15

<210> 87

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 87

Arg	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Met	Tyr	Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser
1				5					10					15

<210> 88

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 88

Pro	Ala	Ala	Met	Tyr	Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His
1				5					10					15

<210> 89
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 89

Tyr	Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly
1				5					10					15

<210> 90
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 90

Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe	Trp	Ser	Glu
1				5					10					15

<210> 91
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 91

Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Pro	Ser
1				5					10					15

<210> 92
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 92

Phe	Lys	Gly	Phe	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Pro	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Arg
1				5					10					15

<210> 93
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 93

Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Pro	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Arg	Thr	Pro	Glu	Ile
1				5					10					15

<210> 94

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 94

Ser	Pro	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Arg	Thr	Pro	Glu	Ile	Asn	Asn	Ser	Ser
1				5					10					15

<210> 95

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 95

Tyr	Phe	Arg	Thr	Pro	Glu	Ile	Asn	Asn	Ser	Ser	Gly	Glu	Met	Asp
1				5					10					15

<210> 96

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 96

Arg	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Met
1				5			

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CD127, в частности с человеческим CD127, содержащие:
 - легкую цепь антитела, содержащую, или вариабельный домен легкой цепи антитела, состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 9; SEQ ID No: 10; SEQ ID No: 11; SEQ ID No: 12; в частности SEQ ID No: 12; и
 - вариабельный домен тяжелой цепи антитела, содержащий три CDR, состоящие из последовательностей, приведенных в SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2 и SEQ ID No: 3, в частности вариабельный домен тяжелой цепи антитела, состоящий из последовательности, приведенной в SEQ ID No: 7.
2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где указанное антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, в частности, где константный домен легкой цепи антитела происходит от константного домена легкой цепи каппа человека, в частности, где константный домен легкой цепи состоит из последовательности SEQ ID NO: 27 или 28 и где константный домен тяжелой цепи антитела происходит от константного домена тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, в частности от константного домена тяжелой цепи IgG4 человека, в частности, где константный домен тяжелой цепи антитела состоит из последовательности с SEQ ID No: 26.
3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где легкая цепь антитела включает, или вариабельный домен легкой цепи антитела состоит из SEQ ID No: 12, и где вариабельный домен тяжелой цепи антитела состоит из SEQ ID No. : 7.
4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, которое является антагонистом передачи сигналов IL-7R, индуцированной IL-7, и которое не индуцирует активацию фосфатидилинозитол-3-киназы и/или сигнального пути ERK.
5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, которое распознает эпитоп, содержащий последовательность, взятую из сайта 2b из CD127, и/или нарушает связывание CD127 с общей цепью γ с цитокиновых рецепторов, в частности, которое распознает по меньшей мере третий бета-слой сайта 2b CD127.
6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, которое не индуцирует интернализацию CD127 и/или ингибирует индуцированную IL7 интернализацию CD127.
7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, которое не увеличивает созревание дендритных клеток, индуцированное TSLP.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, которое оказывает длительный эффект и/или быстрый эффект, в частности, которое оказывает быстрый локальный эффект.
9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, которое специфически связывается с CD127 человека с константой аффинности KD ниже 5×10^{-9} M, что может быть определено биосенсорным анализом.
10. Комбинация выделенных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из пп.1-9, в частности первой выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16, SEQ ID No: 17 и SEQ ID No: 18; и второй выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности SEQ ID No: 13.
11. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9 и/или комбинацию выделенных молекул нуклеиновой кислоты по п.10 и фармацевтический носитель.
12. Фармацевтическая композиция по п.11, которая подходит для местного применения, в частности для местного подкожного, энтерального или перорального применения, более конкретно - для доставки в толстую кишку.
13. Набор, содержащий фармацевтическую композицию по п.11 или 12 и устройство для доставки, подходящее для местного введения, в частности устройство для подкожной, энтеральной или пероральной доставки, более конкретно - указанное устройство содержит предварительно заполненный шприц, или безыгольное устройство.
14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, или комбинация выделенных молекул нуклеиновой кислоты по п.10, или фармацевтическая композиция по п.11 или 12, или набор по п.13, для применения в качестве лекарственного средства.
15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, или комбинация выделенных молекул нуклеиновой кислоты по п.10, или фармацевтическая композиция по п.11 или 12, или набор по п.13 для применения по п.14 для профилактики или лечения отторжения трансплантата органа или ткани или заболевания, выбранного из группы, состоящей из аутоиммунных заболеваний, в частности ревматоидного артрита, системного склероза, рассеянного склероза, диабета I типа, аутоиммунного тиреоидита, системной красной волчанки, первичного синдрома Шегрена и воспалительных заболеваний, в частности воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), более конкретно, болезни Крона и язвенного колита, и энцефаломиелита, а также аллергических заболеваний и раковых заболеваний, и заболеваний, связанных с трансплантацией, и респираторных заболеваний.

16. Способ отбора соединения из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или молекулы-миметика антитела и включающий или состоящий по меньшей мере из одной из следующих стадий:

- i. исследование способности соединения связываться с CD127, в частности с человеческим CD127, в частности с последовательностью эпитопа из домена D1 и/или из сайта 2b домена D2 человеческого CD127;
- ii. исследование ингибирования передачи сигналов IL7-R, индуцированной IL7, в частности фосфорилирования STAT-5, в присутствии указанного соединения;
- iii. исследование активации фосфатидилинозитол-3-киназы в присутствии указанного соединения;
- iv. исследование активации сигнального пути ERK в присутствии указанного соединения;
- v. исследование способности соединения связываться по меньшей мере с третьим бета-слоем сайта 2b CD127, в частности с человеческим CD127;

и необязательно дополнительно включающий по меньшей мере одну из следующих стадий:

- vi. исследование связывания CD127 с общей цепью цитокиновых рецепторов γ_c в присутствии указанного соединения;
- vii. исследование интернализации CD127 и/или IL7-индуцированной интернализации CD127 в присутствии указанного соединения;
- viii. исследование созревания дендритных клеток, индуцированного TSLP, в присутствии указанного соединения;

в частности, при этом отбирают соединение, которое специфически связывается с CD127, является антагонистом передачи сигналов IL-7R, индуцированной IL-7, и не индуцирует активацию фосфатидилинозитол-3-киназы и/или пути передачи сигналов ERK.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

(по ст. 34 РСТ, для рассмотрения на нац. фазе)

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CD127, в частности с человеческим CD127, содержащие:
 - легкую цепь антитела, содержащую, или вариабельный домен легкой цепи антитела, состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 9; SEQ ID No: 10; SEQ ID No: 11; SEQ ID No: 12; в частности SEQ ID No: 12; и
 - вариабельный домен тяжелой цепи антитела, состоящий из последовательности, приведенной в SEQ ID No: 7.
2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где указанное антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, в частности, где константный домен легкой цепи антитела происходит от константного домена легкой цепи каппа человека, в частности, где константный домен легкой цепи состоит из последовательности SEQ ID NO: 27 или 28 и где константный домен тяжелой цепи антитела происходит от константного домена тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, в частности от константного домена тяжелой цепи IgG4 человека, в частности, где константный домен тяжелой цепи антитела состоит из последовательности с SEQ ID No: 26.
3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где легкая цепь антитела включает, или вариабельный домен легкой цепи антитела состоит из SEQ ID No: 12.
4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, которое является антагонистом передачи сигналов IL-7R, индуцированной IL-7, и которое не индуцирует активацию фосфатидилинозитол-3-киназы и/или сигнального пути ERK.
5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, которое распознает эпитоп, содержащий последовательность, взятую из сайта 2b из CD127, и/или нарушает связывание CD127 с общей цепью γ с цитокиновых рецепторов, в частности, которое распознает по меньшей мере третий бета-слой сайта 2b CD127.
6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, которое не индуцирует интернализацию CD127 и/или ингибирует индуцированную IL7 интернализацию CD127.
7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, которое не увеличивает созревание дендритных клеток, индуцированное TSLP.
8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, которое оказывает длительный эффект и/или быстрый эффект, в частности, которое оказывает быстрый локальный эффект.
9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, которое специфически

связывается с CD127 человека с константой аффинности KD ниже 5×10^{-9} M, что может быть определено биосенсорным анализом.

10. Комбинация выделенных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из пп.1-9, в частности первой выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16, SEQ ID No: 17 и SEQ ID No: 18; и второй выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности SEQ ID No: 13.
11. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9 и/или комбинацию выделенных молекул нуклеиновой кислоты по п.10 и фармацевтический носитель.
12. Фармацевтическая композиция по п.11, которая подходит для местного применения, в частности для местного подкожного, энтерального или перорального применения, более конкретно - для доставки в толстую кишку.
13. Набор, содержащий фармацевтическую композицию по п.11 или 12 и устройство для доставки, подходящее для местного введения, в частности устройство для подкожной, энтеральной или пероральной доставки, более конкретно - указанное устройство содержит предварительно заполненный шприц, или безыгльное устройство.
14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, или комбинация выделенных молекул нуклеиновой кислоты по п.10, или фармацевтическая композиция по п.11 или 12, или набор по п.13, для применения в качестве лекарственного средства.
15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, или комбинация выделенных молекул нуклеиновой кислоты по п.10, или фармацевтическая композиция по п.11 или 12, или набор по п.13 для применения по п.14 для профилактики или лечения отторжения трансплантата органа или ткани или заболевания, выбранного из группы, состоящей из аутоиммунных заболеваний, в частности ревматоидного артрита, системного склероза, рассеянного склероза, диабета I типа, аутоиммунного тиреоидита, системной красной волчанки, первичного синдрома Шегрена и воспалительных заболеваний, в частности воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), более конкретно, болезни Крона и язвенного колита, и энцефаломиелита, а также аллергических заболеваний и раковых заболеваний, и заболеваний, связанных с трансплантацией, и респираторных заболеваний.

A**N13B2-VH (SEQ ID No: 7)**

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAVSGFTLSDYYMAWIRQAPGKGL
EWVSTISASGLRTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARPLSAHYGFNYFDYWGQGTLVTVSS

B**N13B2-hVL3 (SEQ ID No: 9)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYQGLAWYQQKPGKAPKL
LYSANTLHIGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQYYDY
PLAFGGGGTKVEIK

N13B2-hVL4-V48L (SEQ ID No: 10)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYQGLAWYQQKPGKAPKL
LYSANTLHIGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQYYDYP
LAFGGGGTKVEIK

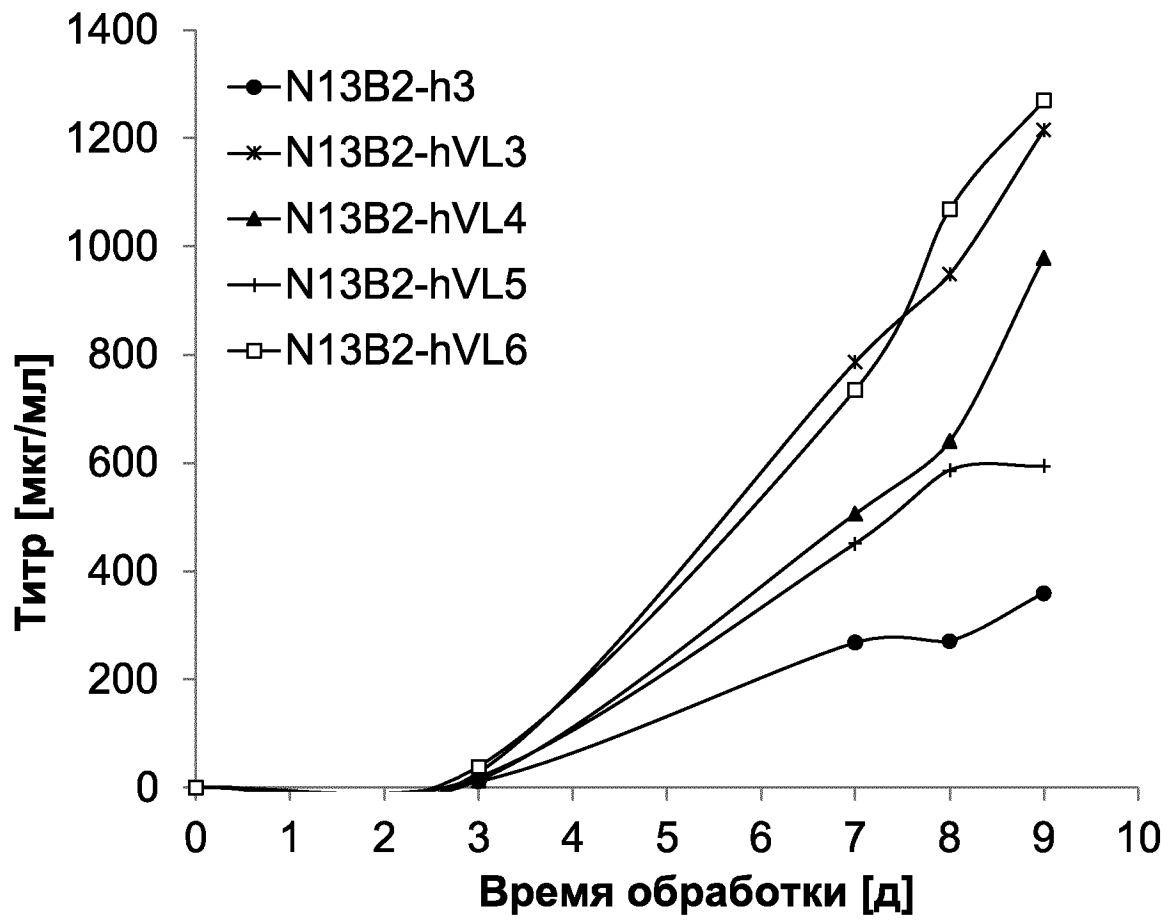
N13B2-hVL5-F87Y (SEQ ID No: 11)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYQGLAWYQQKPGKAPKL
LYSANTLHIGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYYDY
PLAFGGGGTKVEIK

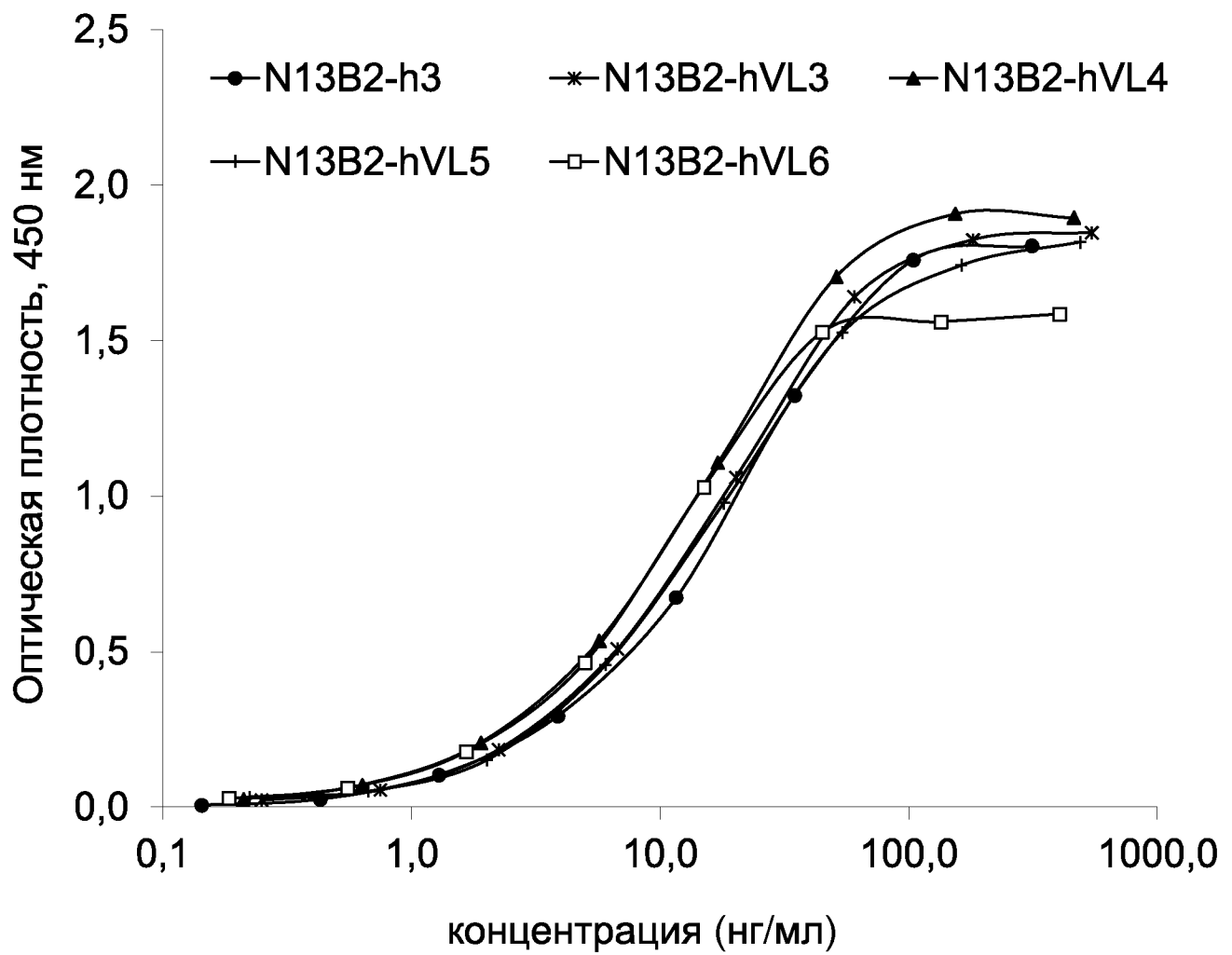
N13B2-hVL6-V48L-F87Y (SEQ ID No: 12)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYQGLAWYQQKPGKAPKL
LYSANTLHIGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYYDYP
LAFGGGGTKVEIK

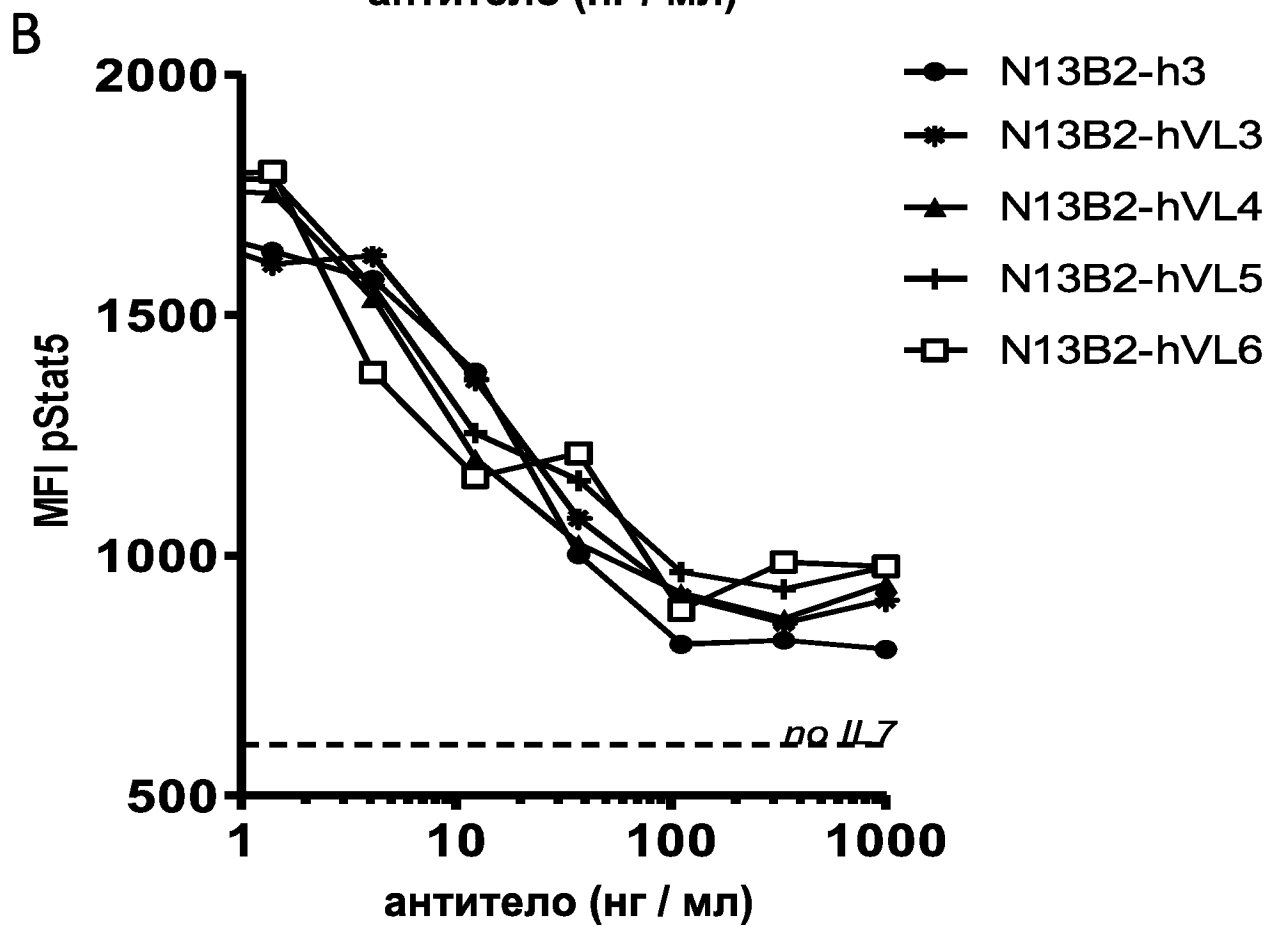
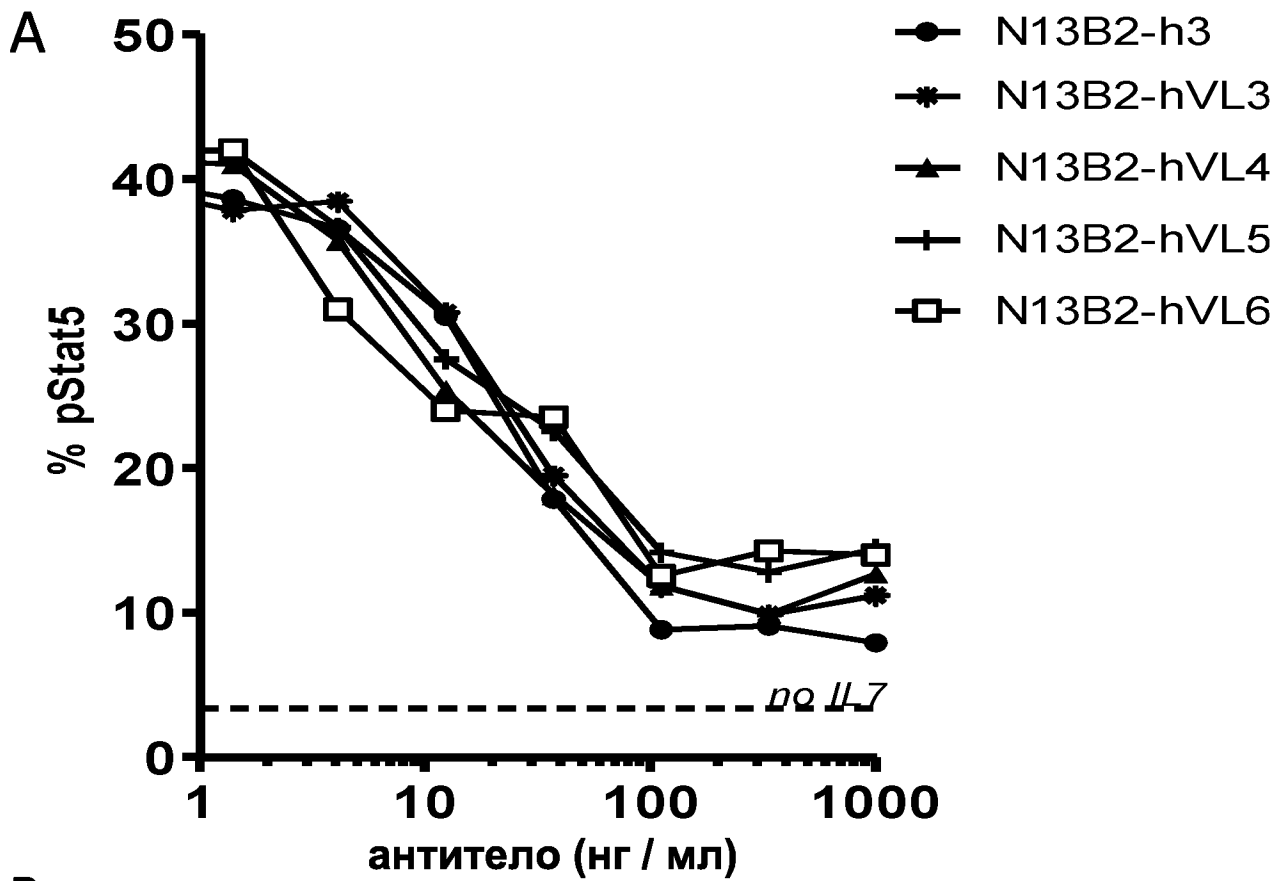
Фиг. 1



Фиг. 2

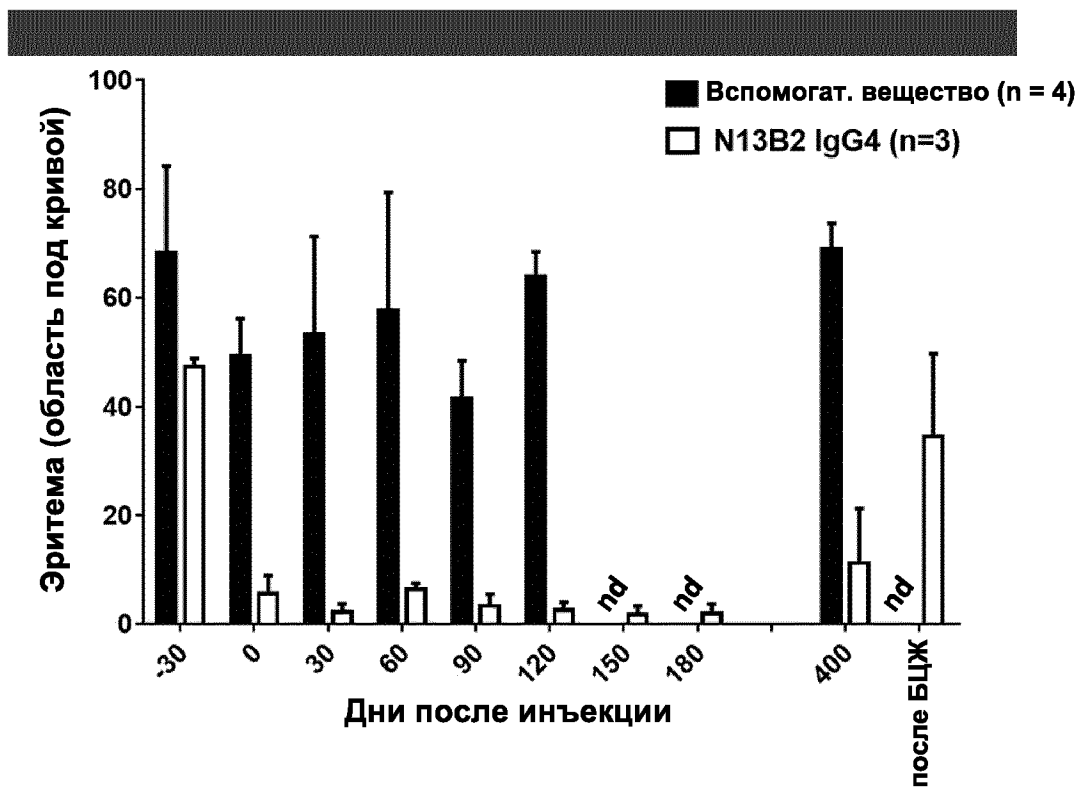


Фиг. 3

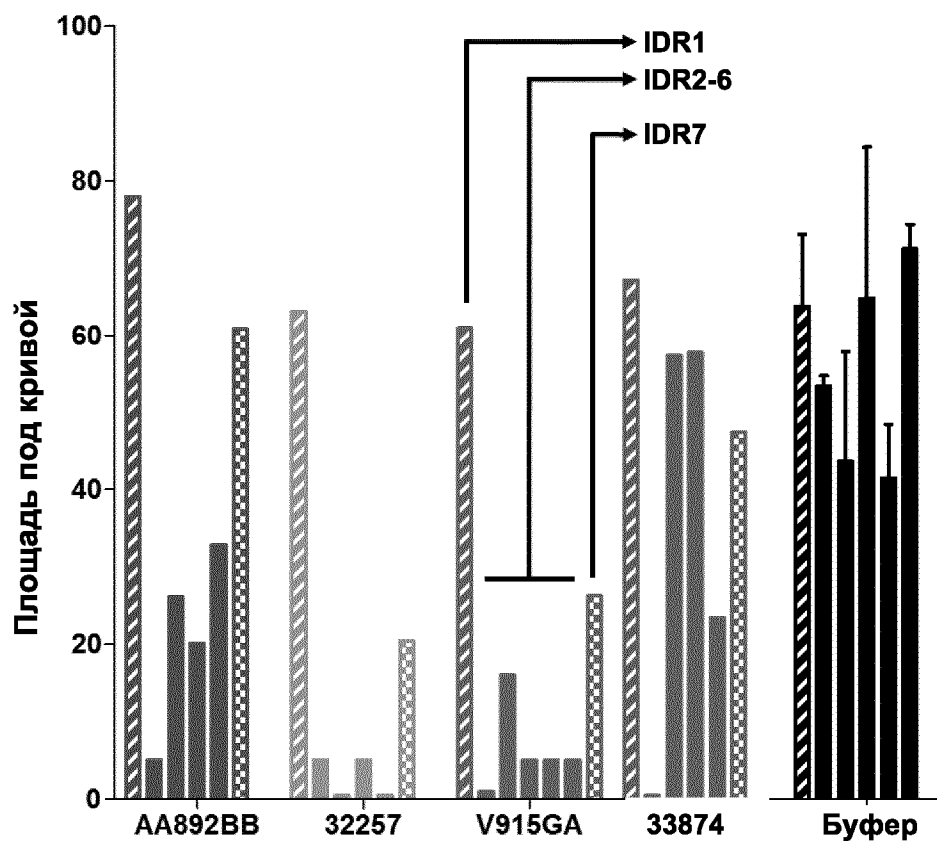


ФИГ. 4

А

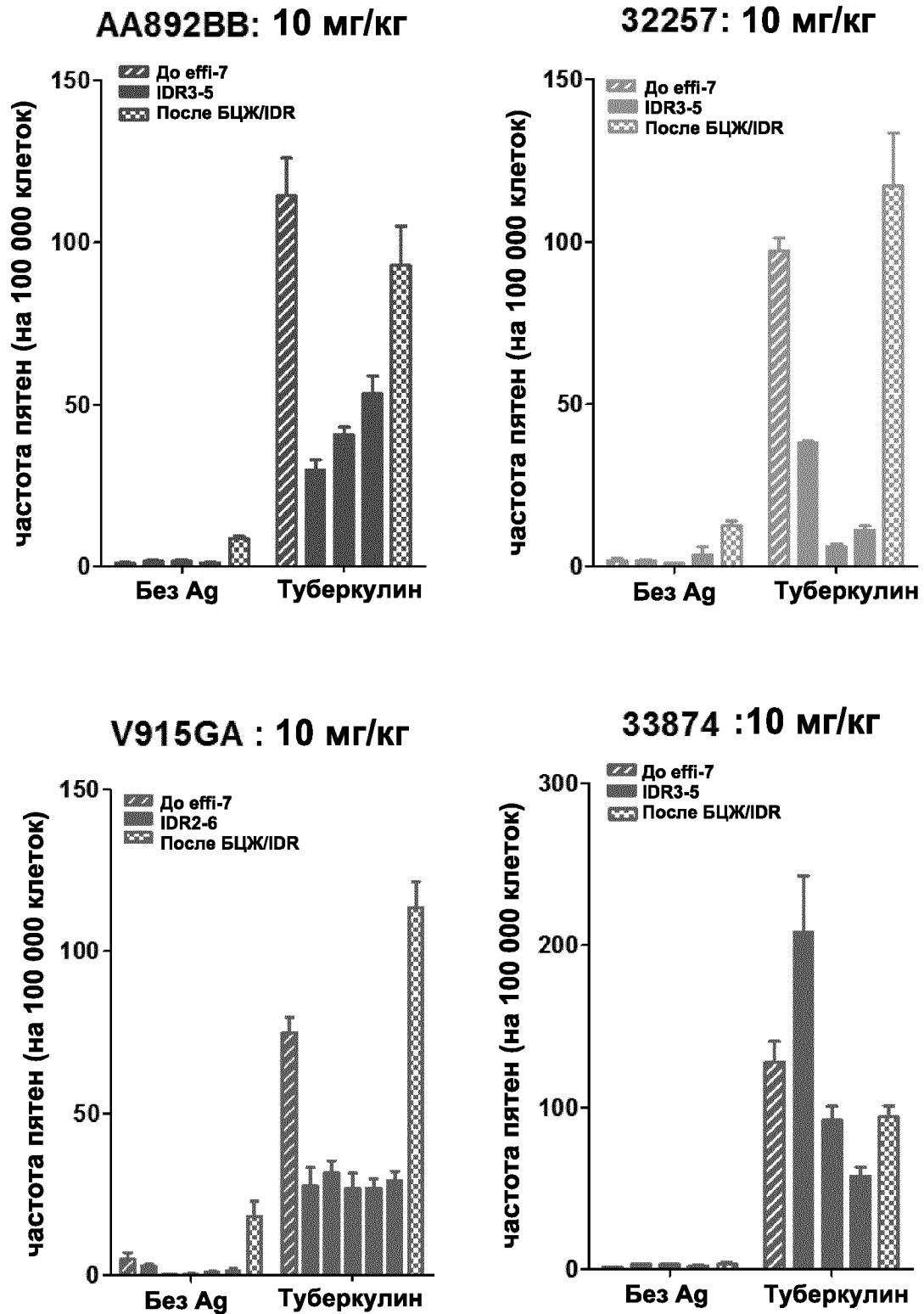


В

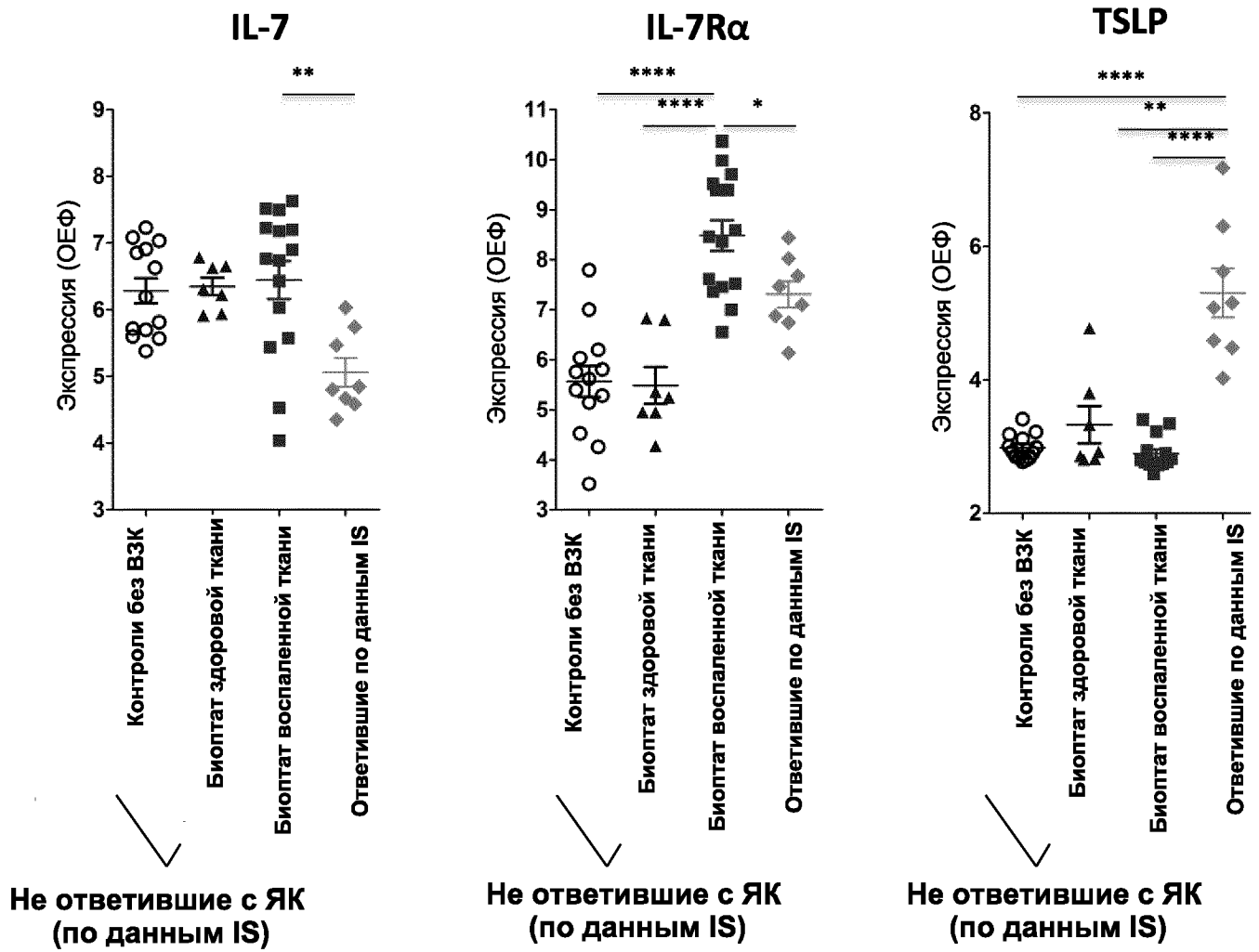


Фиг. 5

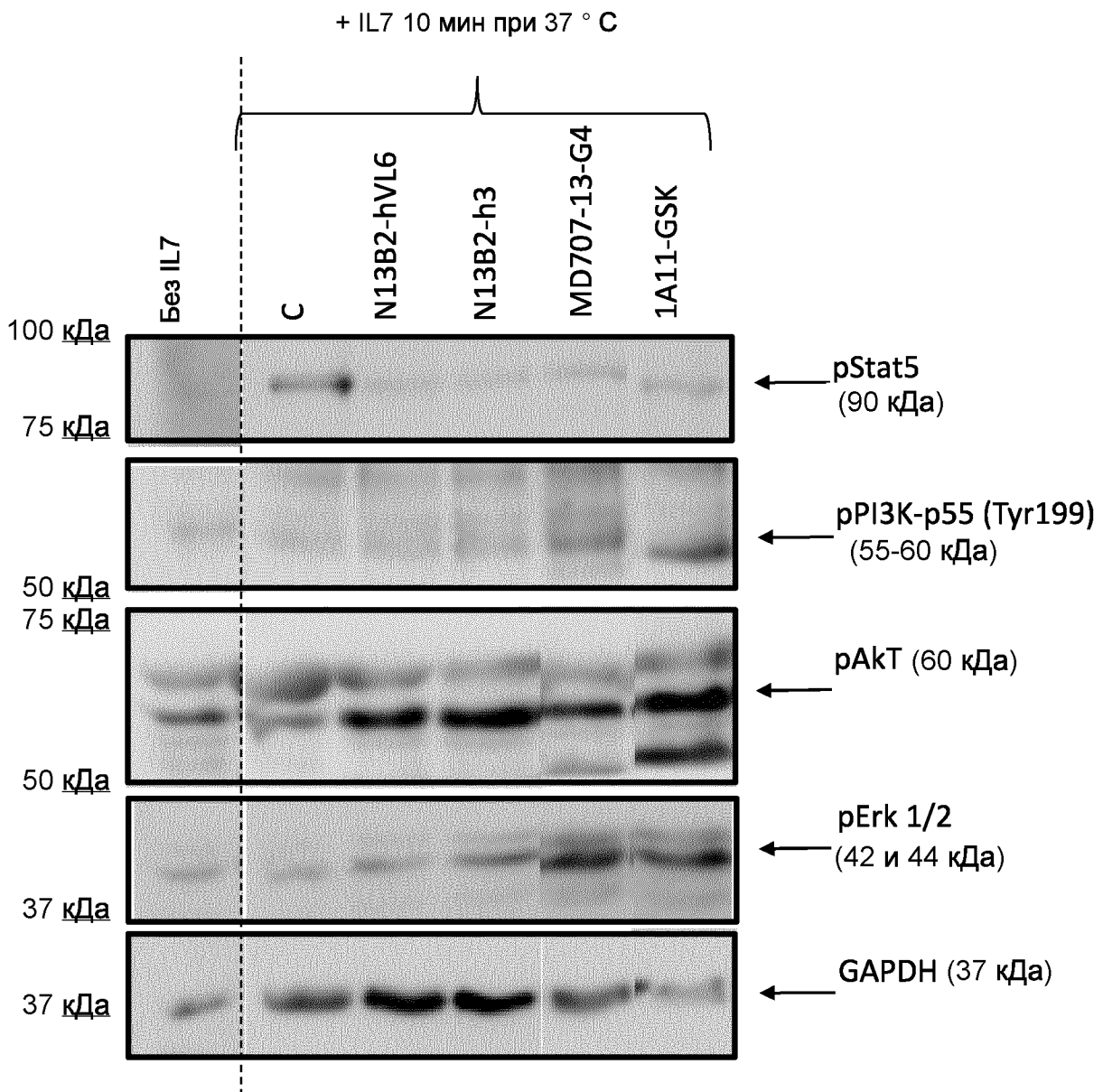
С



Фиг. 5 (продолж.)

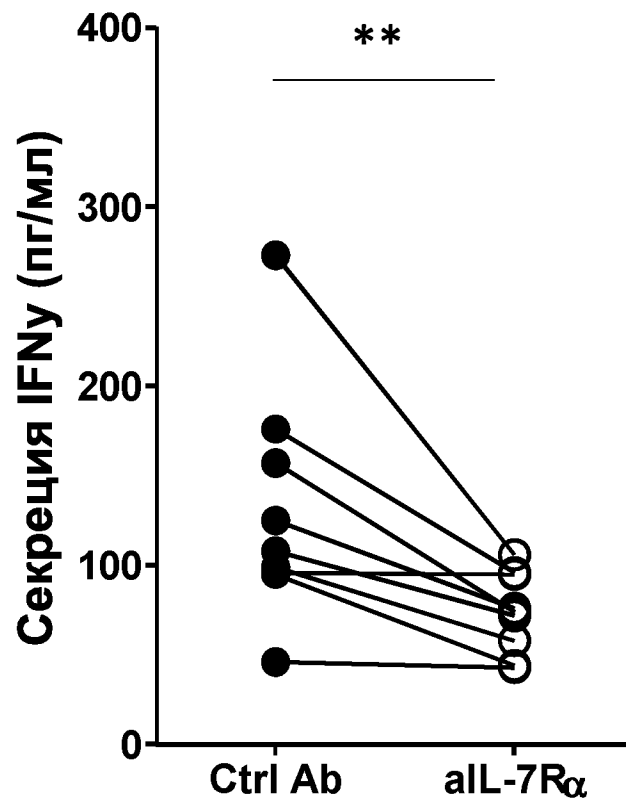


ФИГ. 6

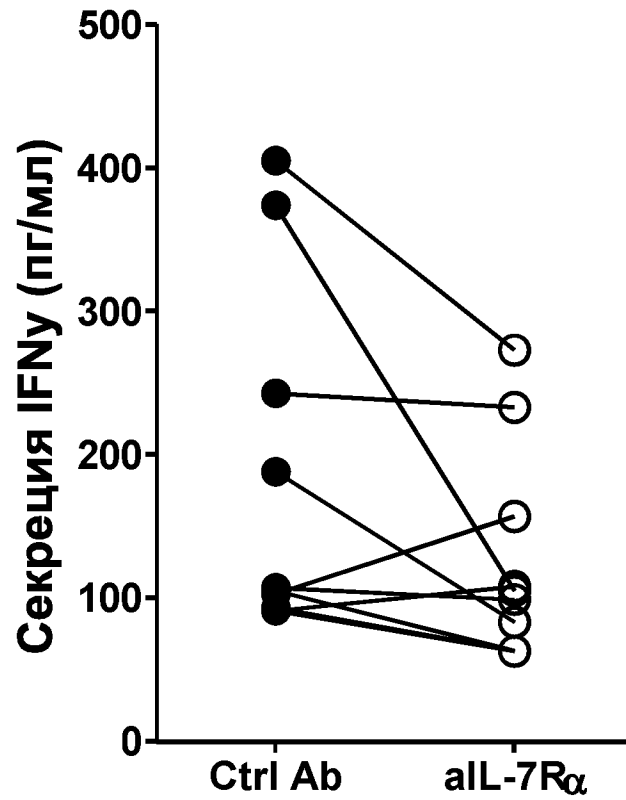


Фиг. 7

А

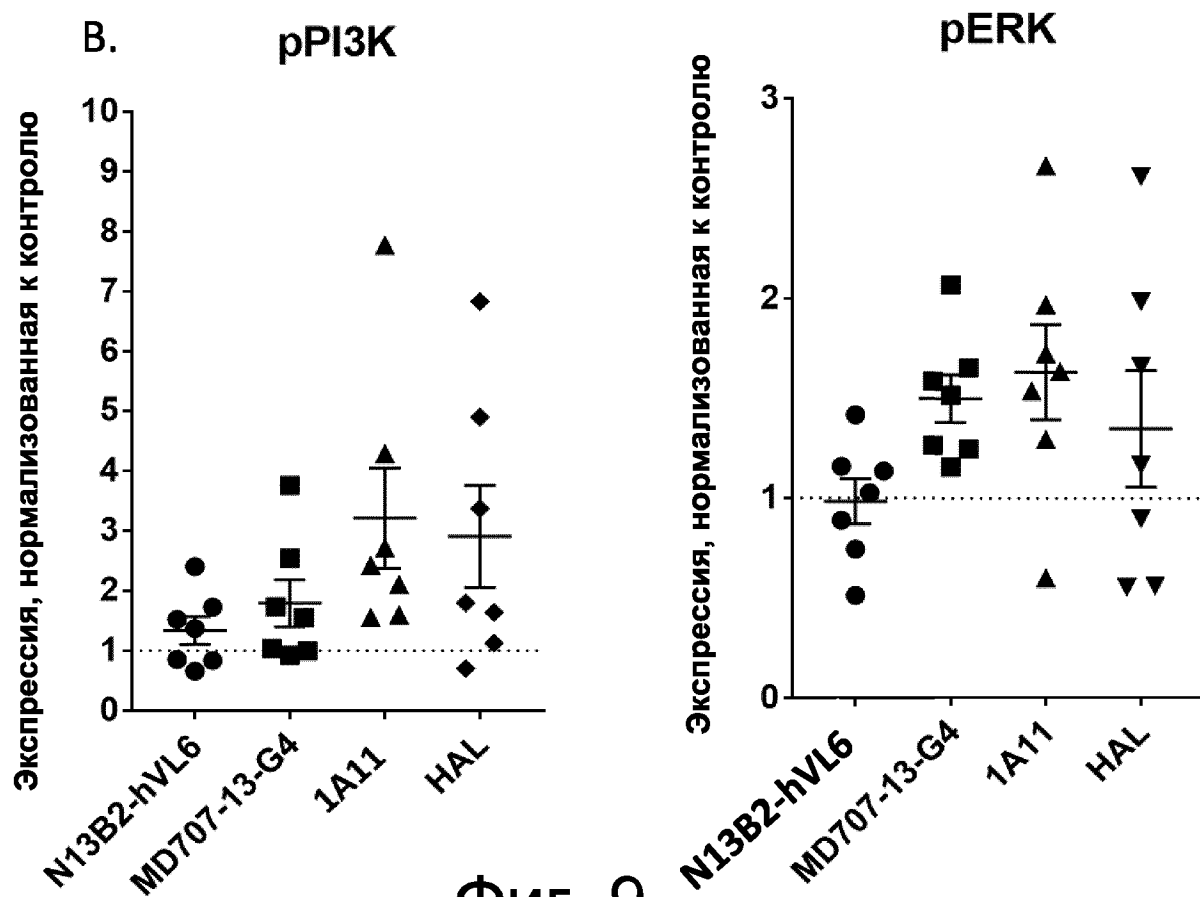
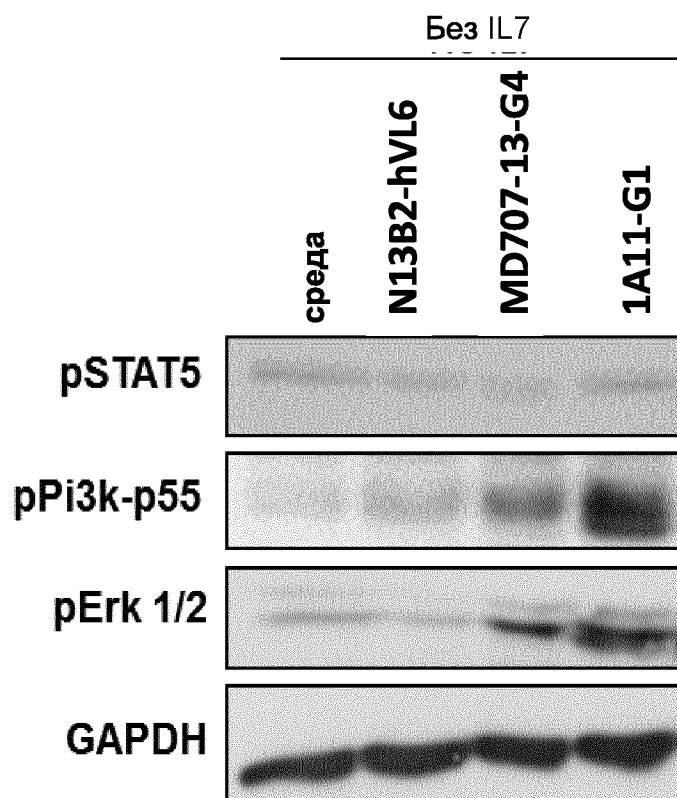


В

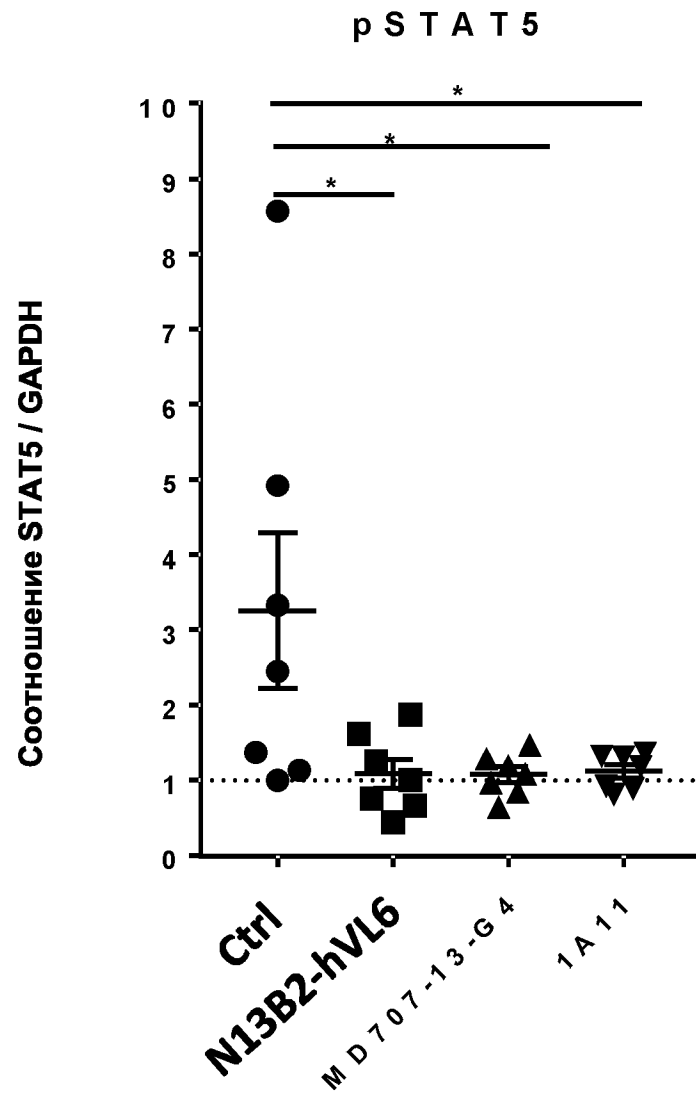


ФИГ. 8

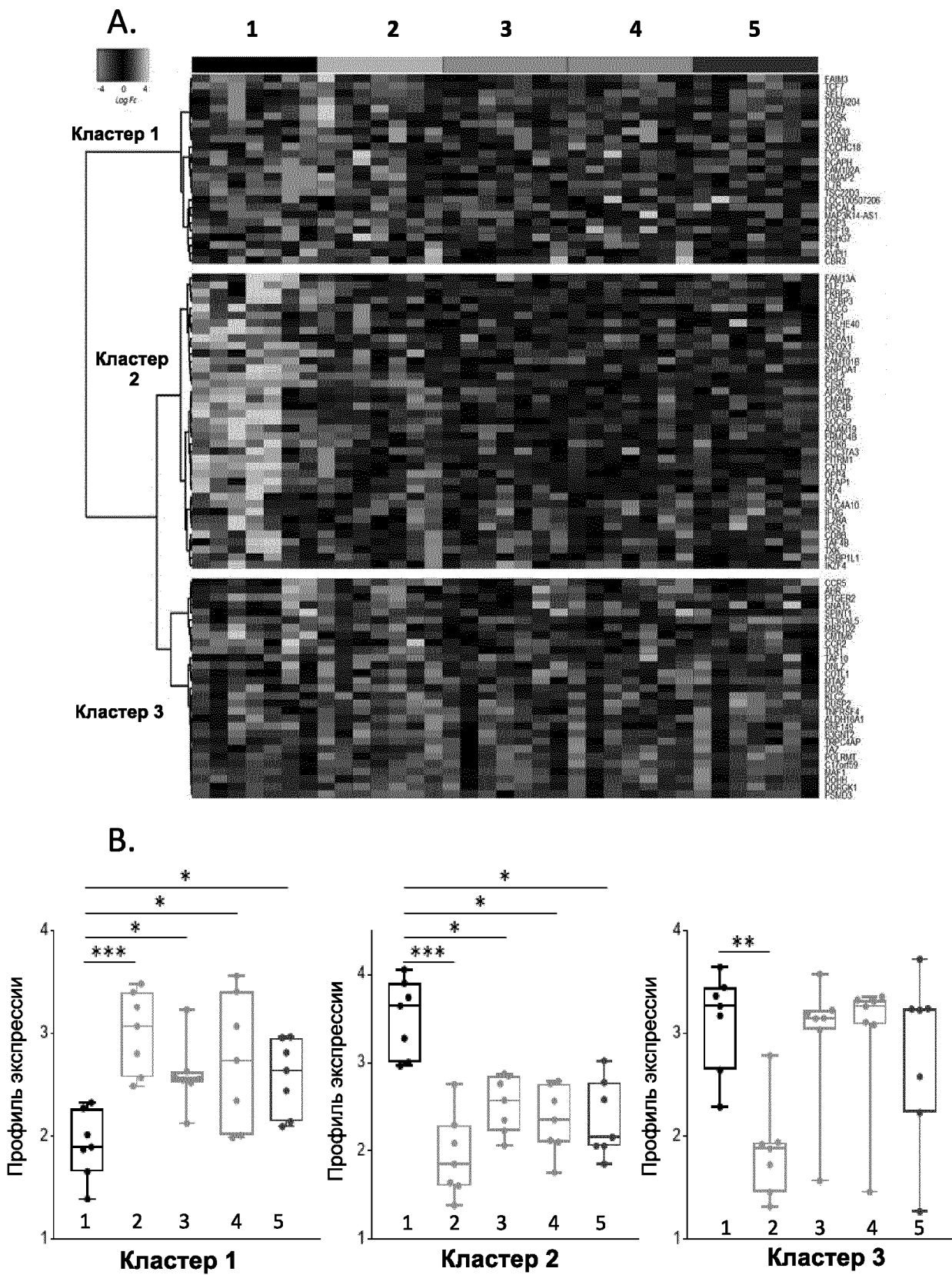
A.



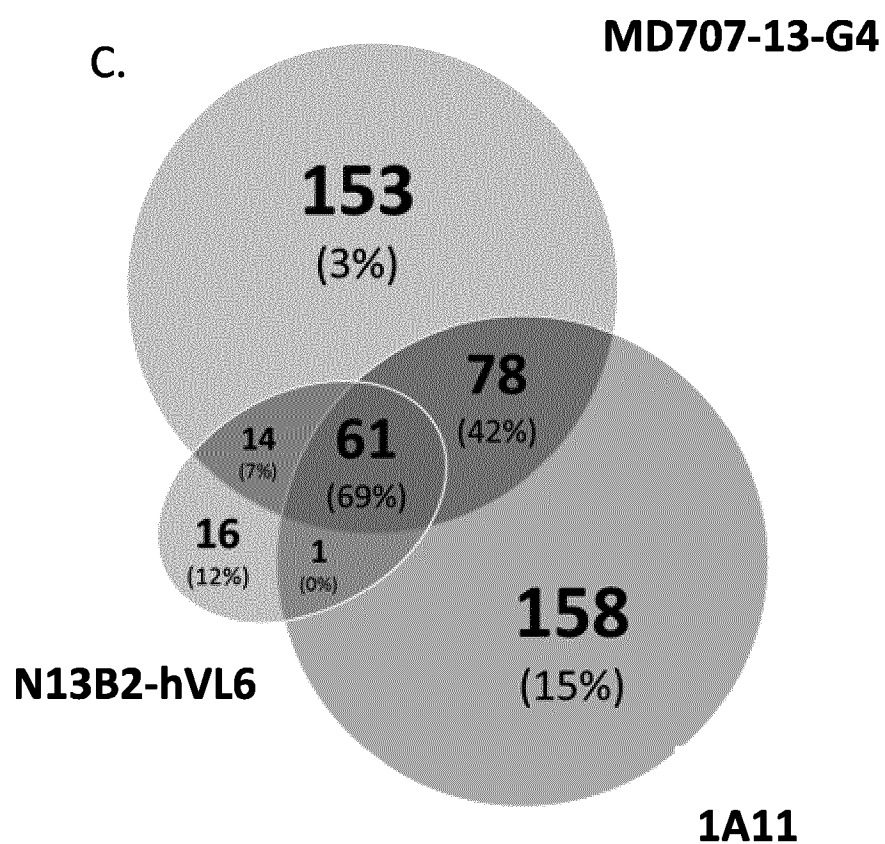
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 11 (продолж.)