

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191450** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.29

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.12.18

(54) ПРИМЕНЕНИЕ МАТ ПРОТИВ CCR7 ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ РЕАКЦИИ "ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА" (РТПХ)

(31) 18213727.3; 19215366.6

(32) 2018.12.18; 2019.12.11

(33) EP

(86) PCT/EP2019/085991

(87) WO 2020/127509 2020.06.25

(71) Заявитель:

**КАТАПУЛЬТ ТЕРАПЬЮТИКС Б.В.
(NL); УНИВЕРСИДАД АВТОНОМА
ДЕ МАДРИД (ES)**

(72) Изобретатель:

**Куэста Матеос Карлос, Муньос
Кальеха Сесилия, Портеро Сайнс
Итхасо, Гомес Гарсия де Сория Мария
дель Валье, Торибно Мария Луиза,
Террон Фернандес Фернандо (ES)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) В соответствии с настоящим изобретением предложено новое применение и способы, включающие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с рецептором CCR7, для применения в качестве нового терапевтического агента для предотвращения и/или лечения реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ), предпочтительно при трансплантации гематopoэтических стволовых клеток (ТГСК), более предпочтительно при аллогенной трансплантации гематopoэтических стволовых клеток. РТПХ согласно настоящему изобретению может представлять собой острую РТПХ (oРТПХ) и/или хроническую РТПХ (xРТПХ), предпочтительно - острую РТПХ. Указанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты способны селективно истощать *ex vivo* или *in vitro* иммунные клетки, экспрессирующие CCR7, и способны селективно убивать *in vivo* иммунные клетки, экспрессирующие рецептор CCR7, и нарушать/блокировать миграцию и активацию указанных иммунных клеток, которые участвуют в возникновении и развитии РТПХ. Предложено применение указанных антител для удаления, киллинга и нарушения/блокирования миграции и активации иммунных клеток, экспрессирующих CCR7, с обеспечением таким образом альтернативной терапии для предотвращения и лечения РТПХ как острого, так и хронического типов.

A1

202191450

202191450

A1

ПРИМЕНЕНИЕ МАТ ПРОТИВ CCR7 ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА» (РТПХ)

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 Настоящее изобретение относится в целом к областям медицины и фармацевтики, в частности, к области биофармацевтических средств для применения при трансплантации и пересадке органов, тканей или клеток. В частности, в настоящем изобретении предложены антитела против рецептора CCR7, которые подходят для предотвращения и лечения реакции «трансплантат против хозяина».

10

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В последние годы трансплантацию гематопоетических стволовых клеток (ТГСК) широко применяли с целью лечения различных гематологических заболеваний, таких как гематопоетическая опухоль органа, лейкоз или гипопластическая анемия. Кроме того, трансплантация клеток является целесообразным способом лечения в области медицины. ТГСК классифицируют в соответствии с различиями в выборе источников или доноров

15 стволовых клеток. Обычные источники стволовых клеток включают костный мозг, собранный из гребней подвздошной кости (Aschan. J. Br Med Bull. 2006;77-78:23-36), стволовые клетки периферической крови, мобилизованные с помощью колониестимулирующего фактора гранулоцитов (Г-КСФ) или плериксафора (Vacigalupo et

20 al., Haematologica. 2002 Aug;87 (8 Suppl):4-8) и пуповинную кровь (Kestendjieva et al., Cell Biol Int. 2008 Jul;32(7):724-32). ТГСК может быть аутологичной, когда стволовые клетки получены от самого пациента, или аллогенной, когда стволовые клетки получены от здорового человека, в том числе индивидуальных генотипически идентичных родственных

25 доноров с общими основными и второстепенными факторами гистосовместимости, доноров-сиблингов с идентичными лейкоцитарными антигенами человека (HLA), HLA-совместимых доноров среди дальних родственников, HLA-идентичных неродственных доноров, несовместимых родственных доноров, несовместимых неродственных доноров, несовместимых доноров пуповинной крови и родственных доноров с несовпадающим гаплотипом.

30

Тем не менее, несмотря на применение высокотехнологичных терапевтических подходов, ТГСК все еще ассоциирована со значимым уровнем смертности, вызванной рядом осложнений, таких как реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), инфекционные заболевания, веноокклюзионная болезнь, отторжение донорского трансплантата и рецидивы

35 основных заболеваний, из которых РТПХ является наиболее частым и серьезным

осложнением после аллогенной ТГСК, с которым необходимо бороться, поскольку оно поражает до 30–70% пациентов и связано со значительной заболеваемостью и смертностью.

РТПХ традиционно подразделяют на острую и хроническую формы. Острая РТПХ (oРТПХ) обычно возникает в период с момента приживления и до 100 дней после трансплантации, а хроническая РТПХ (xРТПХ) возникает спустя более чем 100 дней после
5 трансплантации. Оба типа РТПХ дополнительно подразделяют на степени в зависимости от клинической тяжести заболевания. Тем не менее, такое временное различие размывается при применении новых терапевтических подходов, и был включен перекрывающийся синдром, характеризующийся свойствами обеих форм РТПХ (Ferrara, J.L., et al., Lancet, 2009.
10 373(9674): p. 1550-61; Filipovich, A.H., et al., Biol Blood Marrow Transplant, 2005. 11(12): p. 945-56). Также РТПХ часто считают единым заболеванием, разделяющимся на две фазы: острую фазу РТПХ, возникающую вскоре после ТГСК, и хроническую фазу, когда РТПХ проявляется позже в ходе трансплантации (MacDonald et al. Blood. 2017; 129(1):13-21).

Острая РТПХ главным образом поражает кожу, желудочно-кишечный тракт и печень.
15 Повреждения кожи обычно представляют собой пятнисто-папулезную сыпь, при которой в наиболее критических случаях могут формироваться пузыри и изъязвления, при этом волдыри и токсичный эпидермальный некролиз имитируют синдром Стивенса-Джонсона. Проявления со стороны желудочно-кишечного тракта включают спазмы и боль в животе, диарею, гематохезию, непроходимость кишечника, анорексию, тошноту и рвоту.
20 Заболевание печени обусловлено повреждением желчных канальцев, которое приводит к холестазу и, следовательно, гипербилирубинемии и повышению уровня щелочной фосфатазы.

Хроническая РТПХ обычно напоминает аутоиммунное заболевание, такое как системный склероз, при этом склероз и фиброз обычно поражают кожу, глаза, рот, ЖКТ,
25 печень, легкие, суставы и мочеполовую систему. Обычные кожные проявления представлены склерозом, пойкилодермией и лишаеподобные повреждения. В случае легкого в результате повреждения и обструкции бронхиол возникает облитерирующий бронхиолит, который приводит к высокой смертности.

Гематопоезическая система также обычно поражена как при острой, так и при
30 хронической форме, с повреждением тимуса и цитопениями.

В некоторых способах предотвращения, лечения или подавления РТПХ применяют иммунодепрессивные лекарственные средства, такие как ингибиторы кальциневрина (циклоsporин А и такролимус (FK506)), антипролиферативные агенты (метотрексат и мофетил микофенолата), ингибиторы mTOR (сиролимус или рапамицин) и стероиды, такие
35 как преднизон. Новые подходы направлены на предотвращение или ограничение активации и/или пролиферации аутореактивных Т- или В-лимфоцитов, включая удаление *in vivo* зрелых

Т-клеток из популяции трансплантированных клеток (трансплантата) с помощью циклофосфида или антитимоцитарного глобулина (АТГ), и других способов терапии, таких как экстракорпоральный фотоферез, моноклональные антитела, такие как ритуксимаб, ингибиторы киназ, препятствующие передаче сигналов В-клеток, размножению регуляторных Т-клеток и т.д. Тем не менее, несмотря на то, что данные разработки перспективны, глюкокортикоиды все еще представляют собой стандартную терапию первой линии, несмотря на значимые побочные эффекты при длительном применении, так как эти агенты оказывают неспецифическое и обширное иммуносупрессивное действие, их токсичность значительна, и, следовательно, инфекционные заболевания вследствие ослабленной иммунной системы или рецидивы опухолей становятся проблемой (Zeiser and Blazard. *N Engl J Med* 2017;377:2565-79. DOI: 10.1056/NEJMra1703472). Следовательно, разработка эффективного способа лечения или предотвращения для более селективного позволяющего избежать РТПХ, и лекарственных средств для этого до сих пор в будущем. Следовательно, в данной области техники все еще существует потребность в альтернативных усовершенствованных терапевтических подходах, лишенных серьезных недостатков, свойственных методикам, известным из уровня техники.

Человеческий рецептор 7 с С-С-мотивом (здесь и далее называют «CCR7») представляет собой рецептор, сопряженный с G-белком (GPCR), с трансмембранным доменом, семь раз проходящим через мембрану, который, как изначально было обнаружено, экспрессируется лимфоцит-специфическим образом при инфекции вирусом Эпштейна-Барр (EBV) (Birkenbach et al., 1993, *J.Virol.* 67: 2209-2220). CCR7 селективно связывает два хемокина, называемых CCL19 и CCL21. При гомеостазе и воспалении CCR7 экспрессируется на необученных Т- и В-лимфоцитах, Т-клетках центральной памяти (ТСМ), некоторых подгруппах естественных клеток-киллеров (NK-клеток), полузрелых и зрелых ДК и плазмацитоидных ДК (Forster R, et al., *Cell* 1999; 99: 23–33.; Comerford I, et al. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013 Jun;24(3):269-83). В этих подгруппах лейкоцитов CCR7 контролирует миграцию, организацию и активацию.

В некоторых публикациях сообщается, что донорные Т-клетки, экспрессирующие CCR7, могут быть связаны с патогенезом при РТПХ (Portero et al., 2014, *Blood* 124:3930; Portero-Sainz et al. 2017, *Bone Marrow Transplant.* 52, pg: 745–752; Coghill et al., 2010, *Blood.* 115(23):4914-22). Тем не менее, ни в одном из указанных литературных источников не раскрыто, что нацеливание на CCR7 можно эффективно применять для предотвращения или лечения РТПХ без неблагоприятных побочных эффектов, свойственных методикам, известным из уровня техники.

Следовательно, целью настоящего изобретения является предоставление медикаментов и терапевтических подходов, которые преодолевают недостатки известных из

уровня техники подходов для предотвращения и лечения РТПХ. В частности, целью настоящего изобретения является улучшение уровня выживаемости при аллогенной ТГСК.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложено антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения для предотвращения или
лечения реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) у реципиента трансплантата,
содержащего клетку донора. Предпочтительно IC50 антитела против CCR7 составляет не
10 более 100 нМ для ингибирования по меньшей мере одного из: CCR7-зависимой
внутриклеточной передачи сигналов и интернализации рецептора CCR7, по меньшей мере
одним CCR7-лигандом, выбранным из CCL19 и CCL21. Более предпочтительно антитело
против CCR7 ингибирует CCR7-зависимую внутриклеточную сигнализацию без
существенного агонистического действия. Наиболее предпочтительно антитело против
CCR7 имеет Kd для N-концевого внеклеточного домена CCR7 человека не более чем в 20
15 раз выше, чем Kd референсного антитела против CCR7, при этом референсное антитело
против CCR7 представляет собой антитело мыши против CCR7, в котором
последовательность аминокислот варибельного домена тяжелой цепи (HVR) представляет
собой SEQ ID NO: 1, а последовательность аминокислот варибельного домена легкой цепи
представляет собой SEQ ID NO: 2.

20 В одном варианте реализации антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий
фрагмент для применения в соответствии с настоящим изобретением представляет собой
химерное антитело, гуманизированное антитело или антитело человека. Предпочтительно,
антитело против CCR7 представляет собой антитело, содержащее области HVR антитела
против CCR7 человека, последовательность аминокислот варибельного домена тяжелой
25 цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, а последовательность аминокислот
варибельного домена легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 2.

В одном варианте реализации антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий
фрагмент для применения в соответствии с настоящим изобретением представляет собой
антитело против CCR7, которое осуществляет по меньшей мере одно из: киллинга, индукции
30 апоптоза, блокирования миграции, блокирования активации, блокирования пролиферации и
блокирования распространения экспрессирующих CCR7 клеток в организме реципиента.

В способах или применении согласно настоящему изобретению для предотвращения
или лечения РТПХ у реципиента трансплантата, содержащий клетку донора,
предпочтительно, представляет собой трансплантат, включающий один или более из:
35 органа, ткани, клетки-предшественника, стволовой клетки и гематопоетической клетки.
Более предпочтительно, трансплантат, содержащий клетку донора, представляет собой

трансплантат, содержащий гематопозитическую стволовую клетку или клетку-предшественника. Наиболее предпочтительно, реципиент страдает злокачественным нарушением, и при этом предпочтительно, предотвращение или лечение РТПХ сохраняет или стимулирует действие трансплантата против опухоли или действие трансплантата против лейкоза.

В способах или применении согласно настоящему изобретению для предотвращения или лечения РТПХ у реципиента, предпочтительно, указанное предотвращение или лечение РТПХ включает по меньшей мере одно из: а) введения антитела против CCR7 реципиенту перед тем, как реципиент получил трансплантат, содержащий клетку донора; б) введения антитела против CCR7 реципиенту после того, как реципиент получает трансплантат, содержащий клетку донора, и предпочтительно, перед тем, как у реципиента проявились симптомы РТПХ, или перед тем, как у реципиента была диагностирована РТПХ; в) введения антитела против CCR7 реципиенту после того, как реципиент получил трансплантат, содержащий клетку донора, и предпочтительно, после того, как у реципиента проявились симптомы РТПХ, или после того, как у реципиента была диагностирована РТПХ; д) введения антитела против CCR7 реципиенту трансплантата, содержащего клетку донора, причем указанный трансплантат обрабатывают перед трансплантацией путем инкубации *ex vivo* с антителом против CCR7 или антигенсвязывающим фрагментом согласно определению выше; и е) введения антитела против CCR7 реципиенту после рецидива РТПХ.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен способ *ex vivo* получения препарата органа, ткани или клеток из организма донора для трансплантации реципиенту, причем указанный способ включает следующие этапы: а) инкубацию препарата органа, ткани или клеток с антителом против CCR7 или его антигенсвязывающим фрагментом согласно определению выше, за счет чего антитело против CCR7 осуществляет по меньшей мере одно из следующего: i) уменьшает количество и ii) ингибирует активность экспрессирующих CCR7 донорных клеток в препарате органа, ткани или клеток; и б) необязательно удаление по меньшей мере одного из антитела против CCR7 и экспрессирующих CCR7 донорных клеток из препарата органа, ткани или клеток. Предпочтительно, в указанном способе антитело против CCR7 содержится в консервирующем растворе, используемом для предохранения препарата органа, ткани или клеток перед трансплантацией. Более предпочтительно, в указанном способе орган или ткань перфузируют или промывают консервирующим раствором, содержащим антитело против CCR7. Наиболее предпочтительно, в указанном способе антитело против CCR7 и экспрессирующие CCR7 донорные клетки удаляют из препарата клеток путем аффинного очищения от антитела против CCR7 и экспрессирующих CCR7 донорных клеток, связанных с ним.

Способ *ex vivo* согласно настоящему изобретению предпочтительно, применяют для получения трансплантата для применения на этапе d) способа применения согласно настоящему изобретению, описанного выше.

5

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

В настоящем описании «РТПХ» определяют как заболевание, при котором лимфоциты и подобные клетки в трансплантате, пересаженном хозяину, распознают ткани хозяина как чужеродные и атакуют эти ткани. В этом случае термин «реципиент» или «хозяин» здесь
10 относится к субъекту, получающему трансплантированные или пересаженные клетки, ткань или орган (пациент, получивший трансплантацию). Эти термины могут относиться, например, к субъекту, которому вводят костный мозг донора, очищенные гематопозитические клетки-предшественники донора, периферическую кровь донора, пуповинную кровь донора, Т-клетки донора или трансплантат панкреатических островков. Трансплантированную ткань
15 может происходить от сингенного или аллогенного донора. Термин «донор» в настоящем документе относится к субъекту, из организма которого получена ткань для трансплантации или пересадки реципиенту или хозяину. Например, донор может представлять собой субъекта, из организма которого происходит костный мозг, периферическая кровь, пуповинная кровь, Т-клетки или другая ткань, которую будут вводить реципиенту или
20 хозяину. Настоящее изобретение преимущественно предназначено для человека и целесообразно его применение у пациентов-людей. Тем не менее, настоящее изобретение можно применять для животных, отличных от человека, у которых по меньшей мере наблюдают образование антител при иммунных реакциях. Термин «человек» («люди») означает любого субъекта, такого как взрослые субъекты и популяция детей, причем под
25 термином «популяция детей» подразумевают часть популяции в возрасте с рождения до восемнадцати (18) лет.

Термин «антитело» применяют в наиболее широком смысле и, в частности, в его объем входят, например, отдельные моноклональные антитела против CCR7, включая антагонистические, нейтрализующие антитела, полноразмерные или интактные
30 моноклональные антитела, композиции антител против CCR7 с полиэпитопной специфичностью, поликлональные антитела, поливалентные антитела, одноцепочечные антитела против CCR7 и фрагменты антител против CCR7 (см. ниже), включая фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, диатела, однодоменные антитела (sdAb), при условии, что они проявляют желательную биологическую и/или иммунологическую активность. В настоящем
35 документе термин «иммуноглобулин» (Ig) используют взаимозаменяемо с термином антитело. Антитело может быть человеческим и/или гуманизированным.

Термин «антитело против CCR7» или «антитело, которое связывается с CCR7», относится к антителу, которое способно связывать CCR7 с достаточной аффинностью, так что указанное антитело подходит для применения в качестве диагностического и/или терапевтического агента для нацеливания на CCR7. Предпочтительно, степень связывания антитела против CCR7 с неродственным отличным от CCR7 белком меньше приблизительно 10% связывания указанного антитела с CCR7, при измерениях, например, с помощью радиоиммунного анализа (РИА) или твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В некоторых вариантах реализации константа диссоциации антитела, которое связывается с CCR7 (K_d), составляет ≤ 1 мМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ или $\leq 0,1$ нМ. В некоторых вариантах реализации антитело против CCR7 связывается с эпитопом CCR7, который сохраняется у CCR7 разных видов.

«Выделенное антитело» представляет собой такое антитело, которое было идентифицировано и отделено от и/или извлечено из компонента его природного окружения.

Основная 4-цепочечная единица антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей (антитело IgM состоит из 5 основных гетеротетрамерных единиц и дополнительного полипептида, названного J-цепью, и, следовательно, содержит 10 антигенсвязывающих сайтов, тогда как секретируемые антитела IgA могут полимеризоваться с образованием поливалентных комплексов, содержащих 2–5 основных 4-цепочечных единиц наряду с J-цепью). В случае IgG 4-цепочечная единица, как правило, имеет молекулярную массу приблизительно 150 000 дальтон. Каждая L-цепь соединена с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, а две H-цепи соединены между собой одной или более дисульфидными связями в зависимости от изоформа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также содержит равномерно распределенные межцепочечные дисульфидные мостики. Каждая H-цепь содержит на N-конце вариабельный домен (V_H), за которым следуют три константных домена (C_H) для каждой из α - и γ -цепей и четыре C_H домена для изоформ μ и ϵ . Каждая L-цепь содержит на N-конце вариабельный домен (V_L), за которым следует константный домен (C_L) на другом его конце. V_L расположен по одной линии с V_H и C_L расположен по одной линии с первым константным доменом тяжелой цепи (C_{H1}). Полагают, что определенные остатки аминокислот образуют поверхность контакта между вариабельными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. При спаривании V_H и V_L друг с другом образуется одна антигенсвязывающая область. Описание структуры и свойств различных классов антител, см., например, в пособии «Основная и клиническая иммунология», стр. 71 и глава 6 (Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994).

L-цепь любого вида позвоночного можно отнести к одному из двух явно различных типов, называемых каппа и лямбда, на основании последовательностей аминокислот константных доменов. В зависимости от последовательности аминокислот константного домена тяжелых цепей (C_H) иммуноглобулины можно отнести к различным классам или

5 изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, содержащих тяжелые цепи, обозначенные α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Классы γ и α дополнительно подразделяют на подклассы на основании относительно небольших различий в последовательности и функции C_H , например, у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

10 «Вариабельная область» или «вариабельный домен» антитела относится к аминоконцевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Вариабельный домен тяжелой цепи может обозначаться « V_H ». Вариабельный домен легкой цепи может обозначаться « V_L ». Эти домены, как правило, являются наиболее вариабельными частями антитела и содержат антигенсвязывающие области.

15 Термин «вариабельный» относится к тому факту, что некоторые фрагменты вариабельных доменов у разных антител в значительной степени отличаются последовательностью. V-домен опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела в отношении конкретного антигена. Тем не менее, вариабельность неравномерно распределена по вариабельным доменам протяженностью 110

20 аминокислот. Так, V области состоят из относительно неизменных отрезков, названных каркасными участками (FR), из 15–30 аминокислот, разделенных более короткими участками с очень сильной вариабельностью, называемыми «гипервариабельными участками» (HVR), длина каждого из которых составляет 9–12 аминокислот. Каждый вариабельный домен нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR, по большей

25 части в β -складчатой конфигурации, соединенных тремя гипервариабельными участками, которые образуют петли, соединяющие и, в некоторых случаях, образующие часть β -складчатой структуры. Гипервариабельные участки в каждой цепи удерживаются в непосредственной близости с помощью FR и, вместе с гипервариабельными участками из другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al.,

30 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5oe изд., Public Health Service, Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд. (1991)). Константные домены непосредственно не вовлечены в связывание антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) и

35 антителозависимом клеточном фагоцитозе (АЗКФ).

«Интактное» антитело представляет собой антитело, которое содержит антигенсвязывающий сайт, а также CL и по меньшей мере константные домены тяжелой цепи, C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Указанные константные домены могут представлять собой константные домены нативной последовательности (например, константные домены нативной последовательности человека) или вариант их последовательности аминокислот. Предпочтительно, интактное антитело проявляет одну или более эффекторных функций.

«Голое антитело» в контексте настоящего документа представляет собой антитело, которое не конъюгировано с цитотоксической молекулой или радиоактивной меткой.

Термина «фрагменты антитела» входит часть интактного антитела, предпочтительно, антигенсвязывающая или переменная область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела (см. патент США № 5641870, пример 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); одноцепочечные молекулы антител; и мультиспецифические антитела, образованные фрагментами антител. В одном варианте реализации фрагмент антитела содержит антигенсвязывающий сайт интактного антитела и, следовательно, сохраняет способность связывать антиген.

Fc-фрагмент содержит карбоксиконцевые части обеих H-цепей, удерживаемые вместе дисульфидами. Эффекторные функции антител определяются последовательностями в Fc-области, также представляющей собой часть, распознаваемую Fc-рецепторами (FcR), обнаруживаемыми на некоторых типах клеток.

Термин «моноклональное антитело» в настоящем документе относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е., индивидуальные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны, будучи направлены против одного антигенного сайта, в отличие от составов с поликлональными антителами, которые содержат разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов). Моноклональные антитела обладают тем преимуществом, что они могут быть синтезированы без примесей других антител. Модифицирующее обстоятельство «моноклональное» не должно быть истолковано как подразумевающее получение антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, подходящие для применения согласно настоящему изобретению, можно получить с помощью гибридного метода, впервые описанного в источнике: Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), или можно получить с применением методов рекомбинантной ДНК в клетках бактерий, эукариотических клетках животных или растений (см., например, патент США № 4816567). «Моноклональные антитела» также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с

применением методик, описанных, например, в источниках: Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).

Моноклональные антитела в настоящем документе включают «химерные» антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из конкретных видов или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи(-ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из других видов или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность (см. патент США № 4816567; и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела, представляющие интерес, в настоящем документе включают «приматизированные» антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности переменного домена, происходящие от примата, не являющегося человеком (например, мартышковых, человекообразных обезьян и т.д.), и человеческие последовательности константной области.

«Гуманизированные» формы антител, происходящих не от человека (например, антител грызунов) представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из антитела, происходящего не от человека. В основном, гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены на остатки из гипервариабельной области антител, происходящих из видов, не являющихся человеком (донорное антитело), таких как мышь, крыса, кролик или не являющийся человеком примат, имеющих желательную специфичность, аффинность и функциональные возможности антител. В некоторых случаях несколько остатков в каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменены на соответствующие остатки иммуноглобулина, отличные от человеческих. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаруживаются в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации осуществляют, чтобы дополнительно улучшить функционирование антитела. В общем случае гуманизированное антитело обычно содержит два переменных домена, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют таким петлям из иммуноглобулина, отличного от человеческого, и все или по существу все FR представляют собой FR из последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также содержит по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, константной области иммуноглобулина человека. Более подробную информацию можно найти в источниках: Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*

2:593-596 (1992). См. также следующие обзорные статьи и источники, цитируемые в настоящем документе: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma and Immunol.*, 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions*, 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.*, 5:428-433 (1994).

5 Термин «гипервариабельная область», «HVR» в настоящем документе относится к областям вариабельного домена антитела, имеющим гипервариабельную последовательность и/или образующим петли с определенной структурой, которые отвечают за связывание антигена. Как правило, антитела содержат шесть гипервариабельных участков: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Для гипервариабельных областей используется ряд обозначений, которые предусмотрены настоящим изобретением. Гипервариабельные участки, как правило, содержат остатки аминокислот из «определяющей комплементарности области» или «CDR» (например, приблизительно в районе остатков 24–34 (L1), 50–56 (L2) и 89–97 (L3) в VL и приблизительно в районе остатков 31–35 (H1), 50–65 (H2) и 95–102 (H3) в VH при нумерации в соответствии с системой нумерации по Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)); и/или остатки из «гипервариабельной петли» (например, остатки 24–34 (L1), 50–56 (L2) и 89–97 (L3) в VL, и 26–32 (H1), 52–56 (H2) и 95–101 (H3) в VH при нумерации в соответствии с системой нумерации по Chothia (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)); и/или остатки из «гипервариабельной петли»/CDR (например, остатки 27–38 (L1), 56–65 (L2) и 105–120 (L3) в VL, и 27–38 (H1), 56–65 (H2) и 105–120 (H3) в VH при нумерации в соответствии с системой нумерации IMGT; Lefranc, M. P. et al. *Nucl. Acids Res.* 27:209-212 (1999), Ruiz, M. et al. *Nucl. Acids Res.* 28:219-221 (2000)). Необязательно антитело содержит симметричные инсерции в одной или более из следующих точек 28, 36 (L1), 63, 74–75 (L2) и 123 (L3) в VL, и 28, 36 (H1), 63, 74–75 (H2) и 123 (H3) в VH при нумерации в соответствии с Honneger, A. и Plunkthun, A. J. (*Mol. Biol.* 309:657-670 (2001)). Гипервариабельные участки/CDR антител согласно настоящему изобретению предпочтительно, определяют и нумеруют в соответствии с системой нумерации IMGT.

30 «Каркасные» или «FR» остатки представляют собой остатки вариабельного домена, отличные от остатков гипервариабельной области, определенных в настоящем документе.

 «Блокирующее» антитело или «антагонистическое» антитело представляет собой антитело, которое ингибирует или снижает биологическую активность антигена, который оно связывает. Предпочтительные блокирующие антитела или антагонистические антитела по существу или полностью ингибируют биологическую активность антигена.

«Агонистическое антитело» в настоящем документе представляет собой антитело, которое имитирует по меньшей мере один из видов функциональной активности представляющего интерес полипептида.

«Аффинность связывания» в общем случае относится к силе суммарных нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в настоящем документе «аффинность связывания» относится к истинной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y, как правило, может быть выражена константой диссоциации (K_d). Аффинность можно измерить с помощью обычных способов, известных в данной области техники, включая способы, описанные в настоящем документе. Низкоаффинные антитела, как правило, связывают антиген медленно и имеют тенденцию легко диссоциировать, тогда как высокоаффинные антитела, как правило, связывают антиген быстрее и имеют тенденцию оставаться связанными дольше. В данной области техники известны различные способы измерения аффинности связывания, любой из которых можно применять для целей настоящего изобретения. Конкретные иллюстративные варианты реализации описаны ниже.

« K_d » или «значение K_d » можно измерить с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса в системе BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Пискатауэй, Нью-Джерси), при 25°C на чипах CM5 с иммобилизованным антигеном с уровнем ~10–50 единиц ответа (RU). Вкратце, биосенсорные чипы с карбоксиметилированным декстраном (CM5, BIAcore Inc.) активируют N-этил-N'-[3-диметиламинопропил]карбодиимида гидрохлоридом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Антиген разбавляют 10 мМ ацетатом натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мМ) перед введением при скорости потока 5 мкл/минуту, для получения приблизительно 10 единиц ответа (RU) от сопряженного белка. После введения антигена вводят 1 М этаноламина для блокирования непрореагировавших групп. Для измерений кинетики вводят двукратные серийные разведения антитела или Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ) в ФСБ с 0,05% Твин 20 (ФСБ-Т) при 25°C при скорости потока приблизительно 25 мкл/мин. Скорости связывания (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) рассчитывают, используя простую модель связывания Лэнгмюра 1:1 (программное обеспечение BIAcore Evaluation, версия 3.2), одновременно аппроксимируя сенсограммы связывания и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (K_d) рассчитывают как отношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Если скорость связывания превышает $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса, описанном выше, то скорость связывания можно определить, используя методику

гашения флуоресценции, которая позволяет измерить повышение или снижение интенсивности испускания флуоресценции (возбуждение = 295 нм; испускание = 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°С для 20 нМ антитела против антигена (в форме Fab) в ФСБ, рН 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, которое измеряют на спектрометре, таком как спектрофотометр с возможностью остановки потока (Aviv Instruments) или спектрофотометр серии 8000 SLM-Aminco (ThermoSpectronic) с функцией перемешивания в кювете.

«Скорость связывания», или «скорость ассоциации», или « k_{on} » согласно настоящему изобретению также можно определить с помощью той же методики поверхностного плазмонного резонанса, описанной выше, применяя BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Пискатауэй, Нью-Джерси), как описано выше.

Антитело, «которое связывает» представляющий интерес антиген, например, целевой антиген полипептид CCR7, представляет собой антитело, которое связывает антиген с аффинностью, достаточной для того, чтобы антитело подходило для применения в качестве терапевтического агента для нацеливания на клетку или ткань, экспрессирующую антиген, и не вступает в значимые перекрестные реакции с другими белками. В таких вариантах реализации степень связывания антитела с «нецелевым» белком составляет менее чем приблизительно 10% от связывания указанного антитела с конкретным целевым белком, что определяют с помощью анализа методом сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) или радиоиммунопреципитации (РИА). В отношении связывания антитела с целевой молекулой термин «специфическое связывание», или «специфически связывается с», или «специфичный» в отношении конкретного полипептида или эпитопа на конкретной полипептидной мишени означает связывание, которое измеримо отличается от неспецифического взаимодействия. Специфическое связывание можно измерить, например, путем определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы, которая, как правило, представляет собой молекулу с аналогичной структурой, которая не проявляет связывающей активности. Например, специфическое связывание можно определить по конкуренции с контрольной молекулой, которая сходна с мишенью, например, с избытком немеченой мишени. В этом случае говорят о специфическом связывании, если связывание меченой мишени с зондом конкурентно ингибируется избытком немеченой мишени. Термин «специфическое связывание» или «специфически связывается с» или «специфичен» в отношении конкретного полипептида или эпитопа на конкретной полипептидной мишени в настоящем документе может относиться, например, к молекуле, имеющей K_d в отношении мишени (которую можно определить, как описано выше), равную по меньшей мере приблизительно 10^{-4} М, как вариант, по меньшей мере приблизительно 10^{-5} М, как вариант, по меньшей мере приблизительно 10^{-6} М, как вариант,

по меньшей мере приблизительно 10^{-7} М, как вариант, по меньшей мере приблизительно 10^{-8} М, как вариант, по меньшей мере приблизительно 10^{-9} М, как вариант, по меньшей мере приблизительно 10^{-10} М, как вариант, по меньшей мере приблизительно 10^{-11} М, как вариант, по меньшей мере приблизительно 10^{-12} М или более. В одном варианте реализации термин «специфическое связывание» относится к связыванию, при котором молекула связывается с конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде и по существу не связывается с каким-либо другим полипептидом или эпитопом полипептида.

«Эффекторные функции» антитела относятся к видам биологической активности, которые обусловлены Fc-областью (Fc-областью с нативной последовательностью или вариантом последовательности аминокислот Fc-области) антитела и изменяются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ); связывание с Fc-рецептором; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ); понижающую регуляцию рецепторов на поверхности клеток (например, В-клеточного рецептора) и активацию В-клеток.

Термин «Fc-область» в настоящем документе используют для обозначения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-областей. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определяют как простирающуюся от остатка аминокислоты в положении Cys226, или от Pro230, до ее карбоксильного конца. С-концевой лизин (остаток 447 согласно системе нумерации EU) Fc-области можно удалить, например, в ходе получения или очищения антитела, или путем рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, в состав интактных антител могут входить популяции антител с полностью удаленными остатками K447, популяции антител без какого-либо удаления остатков K447 и популяции антител, содержащие смесь антител с остатками K447 и без них.

«Функциональная Fc-область» обладает «эффекторной функцией» нативной последовательности Fc-области. Примеры «эффекторных функций» включают связывание C1q; КЗЦ; связывание с Fc-рецептором; АЗКЦ; фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов на поверхности клеток (например, В-клеточного рецептора; BCR) и т.д. Для таких эффекторных функций, как правило, требуется, чтобы Fc-область была объединена со связывающим доменом (например, вариabельным доменом антитела), и их можно оценить, применяя различные способы анализа, описанные, например, в определениях в настоящем документе.

«Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «АЗКЦ» относится к форме цитотоксичности, при которой секретированный Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на некоторых цитотоксических клетках (например, естественных клетках-киллерах (NK), нейтрофилах и макрофагах), позволяет этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с несущей антиген целевой клеткой и впоследствии убивать целевую клетку с помощью цитотоксинов. Антитела «вооружают» цитотоксические клетки и абсолютно необходимы для такого киллинга. Первичные клетки, опосредующие АЗКЦ – NK-клетки – экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гематопоэтических клетках в общих чертах описана в таблице 3 на странице 464 источника: Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Чтобы оценить АЗКЦ-активность представляющей интерес молекулы, можно провести анализ АЗКЦ *in vitro*, такой как описанный в патенте США № 5500362 или № 5821337. Подходящие для таких анализов эффекторные клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и естественные клетки-киллеры (NK). Как вариант или дополнительно, активность АЗКЦ интересующей молекулы можно оценить *in vivo*, например, в модели на животном, такой как описанная в источнике: Clynes et al. (USA) 95:652-656 (1998). В WO 2000/42072 (Presta) описаны варианты антител с улучшенным или ослабленным связыванием с FcR. См. также, например, Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

«Эффекторные клетки человека» представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют один или более FcR и осуществляют эффекторные функции. Предпочтительно, указанные клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и осуществляют эффекторную функцию АЗКЦ. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют АЗКЦ, включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; причем МКПК и NK-клетки предпочтительны. Эффекторные клетки можно выделить из природного источника, например, из крови.

«Комплементзависимая цитотоксичность», или «КЗЦ» относится к лизису целевой клетки в присутствии комплемента. Активация классического пути комплемента начинается после связывания первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (подходящего подкласса), которые связаны с распознаваемым антигеном. Чтобы оценить активацию комплемента, можно провести анализ КЗЦ, например, как описано в Gazzano-Santoro et al. (1996, *J. Immunol. Methods* 202:163). Варианты антител с измененными последовательностями аминокислот Fc-области (антитела с вариантами Fc-области) и повышенной или сниженной способностью связывания C1q описаны, например, в патенте США № 6194551 B1 и WO 1999/51642. См. также, например, Idusogie et al. (2000, *J. Immunol.*

164: 4178-4184). Одной такой заменой, которая повышает связывание С1q и таким образом повышает активность КЗЦ, является замена Е333А, которую можно успешно применять в антителах согласно настоящему изобретению.

«Идентичность последовательностей» в настоящем документе определяют как
5 взаимосвязь между двумя или более последовательностями аминокислот (полипептида или белка) или двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот (полинуклеотидов), которую определяют путем сравнения последовательностей. В данной области техники «идентичность» также означает степень родства между последовательностями аминокислот или нуклеиновых кислот, соответственно, которую определяют по совпадению между
10 строками таких последовательностей. «Сходство» между двумя последовательностями аминокислот определяют путем сравнения последовательности аминокислот одного полипептида и ее вариантов с консервативными заменами аминокислот с последовательностью второго полипептида. «Идентичность» и «сходство» можно легко рассчитать с помощью известных способов. Термины «идентичность последовательностей» или «сходство последовательностей» означают, что у двух последовательностей
15 (поли)пептида или двух последовательностей нуклеотидов, после оптимального выравнивания, предпочтительно по всей длине (по меньшей мере самой короткой последовательности в сравнении), максимизации числа совпадений и минимизации количества гэпов, например, с помощью программ ClustalW (1.83), GAP или BESTFIT, используя параметры по умолчанию, наблюдается по меньшей мере некоторый процент идентичности последовательностей, согласно определениям в тексте настоящего документа. В GAP используют алгоритм глобального выравнивания Нидлмана-Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей длине, максимизирующего количество совпадений и минимизирующего количество пропусков. Как правило, в GAP используют
20 параметры по умолчанию, причем штраф за введение пропуска = 50 (для нуклеотидов)/8 (для белков) и штраф за продление пропуска = 3 (для нуклеотидов)/2 (для белков). Для нуклеотидов используемая по умолчанию матрица замен представляет собой nwsgardna, а для белков используемая по умолчанию матрица замен представляет собой Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Предпочтительная программа для
30 множественного выравнивания для выравнивания белковых последовательностей согласно настоящему изобретению представлена ClustalW (1.83) при использовании матрицы blosum и параметров, установленных по умолчанию (штраф за введение пропуска: 10; штраф за продление пропуска: 0,05). Выравнивания последовательностей и оценки за проценты идентичности последовательностей можно получить, применяя компьютерные программы, такие как пакет GCG Wisconsin Package, версии 10.3, доступный от Accelrys Inc., 9685
35 Scranton Road, Сан-Диего, Калифорния, 92121-3752, США, или применяя программное

обеспечение с открытым исходным кодом, такое как программа «needle» (использующая алгоритм глобального выравнивания Нидлмана-Вунша) или «water» (использующая алгоритм локального выравнивания Смита-Уотермана) в EmbossWIN версии 2.10.0, используя те же параметры, что и для GAP выше, или используя установочные параметры по умолчанию (как для «needle», так и для «water», для выравнивания как белков, так и ДНК, штраф за создание гэпа по умолчанию составляет 10,0, и штраф за продление гэпа по умолчанию составляет 0,5; матрицы замен по умолчанию представляют собой Blossum62 для белков и DNAFull для ДНК). Если последовательности существенно отличаются общей длиной, то предпочтительны локальные выравнивания, такие как выравнивания с применением алгоритма Смита-Уотермана. Как вариант, процент сходства или идентичности можно определить путем поиска в общедоступных базах данных с применением таких алгоритмов, как FASTA, BLAST и т.д.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В основе настоящего изобретения лежит открытие, что рецептор CCR7 экспрессируется на высоком уровне в некоторых лимфоидных клетках и антигенпрезентирующих клетках (АПК). В указанных клетках CCR7 играет главную роль в проникновении в лимфоидные ткани, включая лимфатические узлы (ЛУ), процессе, лежащем в основе возникновения и развития РТПХ. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что антитело против CCR7 оказывает значительное терапевтическое действие в моделях РТПХ у мышей. РТПХ можно подавить без заметных побочных эффектов путем введения антитела против CCR7 реципиенту трансплантата. В моделях *in vivo* показано, как нацеливание на CCR7 с помощью антитела предотвращает заболевание и снижает выраженность уже развившейся РТПХ, что делает рецептор CCR7 перспективной мишенью для терапии МАТ как при острой, так и при хронической РТПХ. Моноклональные антитела (mAb, МАТ) против CCR7, т.е., антитела, которые распознают эпитоп в рецепторе CCR7 и которые, предпочтительно, способны ингибировать CCR7-зависимую внутриклеточную сигнализацию, способны *in vivo* убивать и/или блокировать миграцию, активацию и/или пролиферацию, и/или распространение CCR7⁺ иммунных клеток донора и реципиента, при этом они оставляют CCR7⁻ иммунные клетки нетронутыми, таким образом поддерживая, например, реакцию «трансплантат против лейкоза» (РТПЛ) и улучшая симптомы РТПХ и выживаемость *in vivo*.

Согласно первому аспекту, следовательно, настоящее изобретение относится к антителу против CCR7 или его антигенсвязывающему фрагменту для применения по меньшей мере для чего-либо одного из предотвращения и лечения РТПХ у реципиента трансплантата, содержащего клетку донора. Предпочтительно, по меньшей мере одна из

клеток, клетка реципиента или клетка донора, является человеческой. Трансплантат предпочтительно содержит клетки донора, которые включают иммунную клетку, более предпочтительно иммунокомпетентную клетку (например, зрелые Т-клетки), которая будет вызывать иммунный ответ против тканей реципиента, чтобы опосредовать РТПХ. РТПХ может представлять собой острую или хроническую РТПХ. Предпочтительно, РТПХ представляет собой острую РТПХ. «Лечение» РТПХ в настоящем документе означает подавление РТПХ, уменьшение % встречаемости РТПХ, лечение РТПХ, облегчение или ослабление одного или более клинических проявлений РТПХ и улучшение уровня выживаемости получивших лечение субъектов. «Предотвращение» РТПХ в настоящем документе означает «профилактику». Профилактика *in vivo* означает подавление развития РТПХ, отсрочивание начала РТПХ, уменьшение % встречаемости РТПХ, уменьшение одного или более клинических проявлений РТПХ после ее возникновения, и т.д.

Антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой любые антигенсвязывающие белки, которые специфически связываются с CCR7. Антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, который связывается с CCR7, предпочтительно, представляет собой антитело против CCR7 в наиболее широком смысле, согласно определению выше в настоящем документе, включая, например, антитела против CCR7, фрагменты антител, производные антител, мутеины антител и варианты антител. Антитело против CCR7 согласно настоящему изобретению предпочтительно, представляет собой выделенное антитело. Предпочтительно, антитело против CCR7 согласно настоящему изобретению связывается с CCR7 примата, более предпочтительно – с CCR7 человека. Референсные последовательности аминокислот CCR7 человека представляют собой, например, NP_001288643, NP_001288645, NP_001288646, NP_001288647, NP_001829, NP_001288642 и NP_031745. Аминокислоты 1–24 этой последовательности содержат сигнальный пептид для транслокации через мембрану, который отщепляется во время экспрессии. Аминокислоты 25–59 CCR7 человека составляют N-концевой внеклеточный домен, указанный домен содержит сульфатированные остатки тирозина в положениях Y₃₂ и Y₄₁. Известны различные аллельные варианты CCR7 человека с одной или более заменами аминокислот по сравнению с указанными выше референсными последовательностями. «CCR7 человека» в настоящем изобретении включает эти аллельные варианты, по меньшей мере если указанные варианты содержат внеклеточный домен и проявляют функцию CCR7. Антитело против CCR7 для применения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно специфически связывается с N-концевым внеклеточным доменом CCR7, предпочтительно CCR7 человека.

Антитело против CCR7 для применения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой нейтрализующее антитело, которое ингибирует CCR7-зависимую внутриклеточную сигнализацию, CCR7-зависимые функции и/или интернализацию рецептора CCR7 посредством по меньшей мере одного лиганда CCR7, выбранного из CCL19 и CCL21. IC₅₀ антитела против CCR7 предпочтительно не превышает 150, 100, 80, 50, 30, 25, 20, 15, 10, 5 или 3 нМ для ингибирования CCR7-зависимой внутриклеточной передачи сигналов и/или интернализации рецептора CCR7 по меньшей мере одним лигандом CCR7, выбранным из CCL19 и CCL21, что можно, например, определить в анализе, описанном в разделе «Примеры» в настоящем документе. Как вариант, максимальную IC₅₀ антитела определяют исходя из IC₅₀ референсного антитела против CCR7 при тестировании в том же анализе. Таким образом, предпочтительно IC₅₀ антитела против CCR7 согласно настоящему изобретению не более чем в 10, 5, 2, 1,5, 1,2, 1,1 или 1,05 раз выше IC₅₀ референсного антитела против CCR7, при этом референсное антитело против CCR7 представляет собой антитело мыши против CCR7, последовательность аминокислот переменного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, а последовательность аминокислот переменного домена легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 2.

Антитело против CCR7 согласно настоящему изобретению предпочтительно ингибирует CCR7-зависимую внутриклеточную сигнализацию CCR7, как описано выше, без значительного агонистического действия, более предпочтительно без детектируемого агонистического действия, что можно, например, определить в анализе, описанном в разделе «Примеры» в настоящем документе.

Антитело против CCR7 для применения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно проявляет минимальную аффинность в отношении N-концевого внеклеточного домена CCR7, предпочтительно, CCR7 человека. Минимальную аффинность антитела в настоящем документе предпочтительно определяют исходя из K_d референсного антитела против CCR7, определенной в том же анализе. Таким образом, предпочтительно K_d антитела против CCR7 согласно настоящему изобретению для N-концевого внеклеточного домена CCR7 человека не более чем в 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1,5, 1,2, 1,1 или 1,05 раз выше, чем K_d референсного антитела против CCR7 для N-концевого внеклеточного домена CCR7 человека, при этом референсное антитело против CCR7 представляет собой антитело мыши против CCR7, последовательность аминокислот переменного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, а последовательность аминокислот переменного домена легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 2. Согласно настоящему документу подразумевается, что антитело с K_d не более чем в 10 раз превышающей K_d референсного антитела, представляет собой антитело, аффинность

которого не менее чем в 10 раз ниже аффинности референсного антитела. Таким образом, если K_d референсного антитела составляет 1×10^{-9} М, то K_d обсуждаемого антитела составляет 1×10^{-8} М или менее.

5 Примеры антител против CCR7, обладающих одной или более из указанных выше характеристик и подходящих для применения в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, моноклональные антитела, описанные в US 8865170, WO 2009/139853, WO 2014/151834 и WO 2017/025569, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

10 Предпочтительное антитело против CCR7 для применения в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим последовательность или состоящим из последовательности аминокислот «ZxLFE», где Z представляет собой сульфатированный тирозин, x может представлять собой любую аминокислоту, а F может быть заменена на гидрофобную аминокислоту. Антитело согласно настоящему изобретению, таким образом, 15 предпочтительно специфически связывается с эпитопом, содержащим последовательность или состоящим из последовательности аминокислот «ZTLFE» в положениях 41–45 в N-концевом внеклеточном домене CCR7 человека. Антитело предпочтительно является специфическим в отношении CCR7 человека. Такое предпочтительное антитело против CCR7 предпочтительно, проявляет минимальную аффинность в отношении CCR7 человека 20 или в отношении синтетического антигена, содержащего эпитоп «ZTLFE», предпочтительно, в отношении синтетического антигена SYM1899, как описано в разделе «Примеры» в настоящем документе. Таким образом, предпочтительно K_d антитела против CCR7 составляет 1×10^{-8} М, 5×10^{-9} М, 2×10^{-9} М, $1,8 \times 10^{-9}$ М, 1×10^{-9} М, 1×10^{-10} М или 1×10^{-11} М или менее, предпочтительно в отношении синтетического антигена SYM1899. Как вариант, 25 минимальную аффинность антитела определяют относительно K_d референсного антитела против CCR7 при исследовании в одном и том же анализе. Таким образом, предпочтительно K_d антитела против CCR7 согласно настоящему изобретению для CCR7 человека или для синтетического антигена, содержащего эпитоп «ZTLFE» (предпочтительно, синтетического антигена SYM1899, как описано в разделе «Примеры» в настоящем документе), не более чем 30 в 10, 5, 2, 1,5, 1,2, 1,1 или 1,05 раз выше, чем K_d референсного антитела против CCR7 для указанного антигена, при этом референсное антитело против CCR7 представляет собой антитело мыши против CCR7, последовательность аминокислот варибельного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, а последовательность аминокислот варибельного домена легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 2. Согласно 35 настоящему документу подразумевается, что антитело с K_d не более чем в 10 раз превышающей K_d референсного антитела представляет собой антитело, аффинность

которого не менее чем в 10 раз ниже, чем аффинность референсного антитела. Таким образом, если K_d референсного антитела равна 1×10^{-9} М, то у рассматриваемого антитела K_d равна 1×10^{-8} М или менее.

Антитело против CCR7 для применения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно связывается с CCR7 человека или с синтетическим антигеном, содержащим эпитоп «ZTLFE» (предпочтительно, с синтетическим антигеном SYM1899, как описано в разделе «Примеры» в настоящем документе; SEQ ID NO: 3), с максимальной константой скорости диссоциации k_{off} . Соответственно, предпочтительно константа скорости диссоциации k_{off} антитела против CCR7 согласно настоящему изобретению составляет 1×10^{-3} , 1×10^{-4} или 1×10^{-5} с⁻¹ или менее. Как вариант, максимальную константу скорости диссоциации k_{off} антитела определяют относительно константы скорости диссоциации k_{off} референсного антитела против CCR7, при тестировании в том же анализе. Таким образом, предпочтительно, антитело против CCR7 согласно настоящему изобретению связывается с CCR7 человека или с синтетическим антигеном, содержащим эпитоп «ZTLFE» (предпочтительно, с синтетическим антигеном SYM1899, как описано в разделе «Примеры» в настоящем документе), с k_{off} не более чем в 10, 5, 2, 1,5, 1,2, 1,1 или 1,05 раз выше, чем константа скорости диссоциации k_{off} референсного антитела против CCR7 для указанного антигена, при этом референсное антитело против CCR7 представляет собой антитело мыши против CCR7, последовательность аминокислот варибельного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, а последовательность аминокислот варибельного домена легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 2.

Одно такое предпочтительное антитело для применения в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, содержащее HVR референсного антитела мыши против CCR7 человека, последовательность аминокислот варибельного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, а последовательность аминокислот варибельного домена легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 2, причем указанные HVR описаны в WO 2017/025569, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Антитело против CCR7 для применения в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой химерное антитело, например, антитело мыши/человека. Тем не менее, предпочтительно указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело или антитело человека.

Гуманизированное антитело для применения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно вызывает незначительный иммуногенный ответ или не вызывает иммуногенного ответа против антитела у субъекта, которому вводят указанное антитело. Например, гуманизированное антитело для применения в соответствии с

настоящим изобретением вызывает и/или предположительно будет вызывать ответ против антител мыши у человека (НАМА) на значительно сниженном уровне по сравнению с исходным антителом мыши, например, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 и 2, у субъекта-хозяина. Предпочтительно, гуманизованное антитело вызывает, и/или предположительно будет вызывать минимальный ответ, или не вызывает ответа против антител мыши у человека (НАМА). Наиболее предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению вызывает ответ против антитела мыши, который находится на клинически приемлемом уровне или ниже.

Гуманизация может быть выполнена по существу согласно способу Winter с коллегами (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), путем замены последовательностей гипервариабельной области на соответствующие последовательности антитела человека. На практике гуманизованные антитела обычно представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки гипервариабельной области и необязательно некоторые остатки каркасной области (FR) заменены на остатки из аналогичных сайтов антител грызунов. Выбор вариабельных доменов человека, как из легких, так и из тяжелых цепей, для применения при получении гуманизованных антител, очень важен для снижения иммуногенности при сохранении специфичности и аффинности к антигену. Согласно так называемому способу «наилучшего соответствия» проводили скрининг последовательности вариабельного домена антитела грызуна, сравнивая со всей библиотекой известных последовательностей вариабельных доменов человека. Последовательность человека, наиболее близкую последовательности грызуна, затем используют в качестве каркасной области (FR) человека для гуманизованного антитела (Suns et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). В другом способе используют конкретную каркасную область, которая происходит из консенсусной последовательности всех антител человека из конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Один и тот же каркас можно использовать для нескольких различных гуманизованных антител (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Кроме того, важно, чтобы антитела были гуманизованы с сохранением высокой аффинности к антигену и другие полезные биологические свойства. Для достижения этой цели, в соответствии с предпочтительным способом, гуманизованные антитела получают с помощью процесса анализа исходных последовательностей и различных теоретических гуманизованных продуктов, используя трехмерные модели исходной и гуманизованных последовательностей. Гуманизованное антитело против CCR7 в соответствии с любым из описанных выше вариантов реализации настоящего изобретения предпочтительно, содержит константную область тяжелой цепи, которая представляет собой

область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Гуманизированное антитело против CCR7 в соответствии с любым из описанных выше вариантов реализации настоящего изобретения предпочтительно содержит функциональную Fc-область, обладающую по меньшей мере одной эффекторной функцией, выбранной из группы, состоящей из: связывания C1q, комплементзависимой цитотоксичности; связывания Fc-области, антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности и фагоцитоза.

Предпочтительное гуманизированное антитело для применения в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, последовательность аминокислот переменного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 4, а последовательность аминокислот переменного домена легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 5, как описано, например, в WO 2017/025569.

Как вариант, вместо гуманизации можно получать антитела человека. Под «антителом человека» («человеческим антителом») подразумевают антитело, содержащее полностью человеческие легкие и тяжелые цепи, а также константные области, полученные с помощью любого из известных стандартных способов. Например, доступны трансгенные животные (например, мыши), способные после иммунизации продуцировать весь репертуар антител человека в отсутствие продукции эндогенных иммуноглобулинов. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена РН J-области тяжелой цепи антитела у химерных мышей и мышей с мутацией зародышевой линии приводила к полному ингибированию продукции эндогенных антител. Перенос набора генов зародышевой линии иммуноглобулинов человека таким мышам с мутацией зародышевой линии приведет к продуцированию антител человека после иммунизации. См., например, Jakobovits et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 90:255 1 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993). Как вариант, можно применять технологию фагового дисплея (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)) для получения антител человека и фрагментов антител человека *in vitro* из репертуаров генов переменных (V) доменов иммуноглобулинов от доноров. В соответствии с указанной методикой гены V доменов антител клонируют внутрь рамки считывания в ген либо мажорного, либо минорного белка оболочки филаментного бактериофага, такого как M13 или fd, и они экспонируются как функциональные фрагменты антител на поверхности частицы фага. Так как частица филаментного фага содержит копию одноцепочечной ДНК генома фага, отбор на основе функциональных свойств антитела также приводит к отбору гена, кодирующего антитело, проявляющее такие свойства. Таким образом, фаг имитирует некоторые свойства В-клеток. Фаговый дисплей может проводиться в разнообразных форматах; обзорную информацию можно найти, например, в источнике: Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-57 1 (1993). Антитела человека также можно получить с помощью активированных *in vitro* В-клеток или мышей SCID, клетки иммунной

системы которых заменены клетками человека. После человеческого антитела человека кодирующие его последовательности ДНК можно выделить, клонировать и внедрить в подходящую систему экспрессии, т.е., линию клеток, предпочтительно, от млекопитающего, которая впоследствии экспрессирует и высвобождает его в культуральную среду, из которой
5 можно выделить указанное антитело.

Предпочтительное антитело человека для применения в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, последовательность аминокислот переменного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 6, а
10 последовательность аминокислот переменного домена легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 7 или 8, как описано, например, в WO 2014/151834.

Функциональные фрагменты антител, которые связываются с рецептором CCR7, предусмотренные настоящим изобретением, сохраняют по меньшей мере одну связывающую функцию и/или модулирующую функцию полноразмерного антитела, из
15 которого они происходят. Предпочтительные функциональные фрагменты сохраняют антигенсвязывающую функцию соответствующего полноразмерного антитела (например, способность связывать рецептор CCR7 млекопитающего). В частности, предпочтительные функциональные фрагменты сохраняют способность ингибировать одну или более функций, свойственных рецептору CCR7 млекопитающего, таких как связывающая активность, и/или
20 активность блокирования передачи сигналов, и/или стимуляция клеточного ответа. Например, в одном варианте реализации функциональный фрагмент может ингибировать взаимодействие CCR7 с одним или более его лигандами и/или может ингибировать одну или более опосредованных рецептором функций.

В некоторых вариантах реализации антитело против CCR7 согласно настоящему
25 изобретению содержит константную область легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела. Можно применять любые константные области антитела, известные в данной области. Константная область легкой цепи может представлять собой, например, константную область легкой цепи типа каппа или лямбда, например, константную область легкой цепи человека типа каппа или лямбда. Константная область тяжелой цепи может представлять
30 собой, например, константные области тяжелой цепи типа альфа, дельта, эpsilon, гамма или мю, например, константную область тяжелой цепи человека типа альфа, дельта, эpsilon, гамма или мю. Антитело против CCR7 согласно настоящему изобретению, следовательно, может содержать константные области любого изотипа, т.е., в том числе константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, а также константные области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В
35 одном варианте реализации константная область легкой или тяжелой цепи представляет собой фрагмент, производное, вариант или мутант встречающейся в природе константной

области. Известны методики получения антитела из подкласса или изотипа, отличающегося от подкласса или изотипа интересующего антитела, т.е., переключение подклассов. Таким образом, антитела IgG могут происходить, например, из антитела IgM, и наоборот. Такие методики позволяют получать новые антитела, которые проявляют антигенсвязывающие свойства этого антитела (исходного антитела), но также проявляют биологические свойства, связанные с изотипом или подклассом антитела, отличающимся от подкласса или изотипа исходного антитела. Можно применять технологию рекомбинантной ДНК. В таких процедурах можно использовать клонированную ДНК, кодирующую определенные полипептиды антитела, например, ДНК, кодирующую константный домен антитела нужного изотипа. См. также Lantto et al. (2002, *Methods Mol. Biol.*, 178:303-16). Соответственно, антитела против CCR7 согласно настоящему изобретению включают такие антитела, которые содержат, например, одну или более последовательностей переменного домена, описанных в настоящем документе и имеющих нужный изотип (например, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE и IgD), а также их Fab- или F(ab')₂-фрагменты. Более того, если нужен IgG4, то также может потребоваться введение точечной мутации (CPSCP -> CPPCP) в шарнирную область, как описано у Bloom et al. (1997, *Protein Science* 6:407), чтобы уменьшить склонность к образованию внутри H-цепей дисульфидных связей, которое может приводить к гетерогенности антител IgG4.

Антитело против CCR7 согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит функциональную Fc-область, обладающую по меньшей мере одной эффекторной функцией, выбранной из группы, состоящей из: связывания C1q, комплементзависимой цитотоксичности; связывания с Fc-рецептором, антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности и фагоцитоза.

Антитело против CCR7 согласно настоящему изобретению можно модифицировать для улучшения эффекторной функции, например, чтобы усилить АЗКЦ и/или КЗЦ антитела. Этого можно добиться путем введения одной или более замен аминокислот в Fc-область антитела. Предпочтительная замена в Fc-области антитела согласно настоящему изобретению представляет собой замену, которая повышает связывание C1q и тем самым повышает активность КЗЦ, как, например, описано в источнике: Idusogie et al. (2000, *J. Immunol.* 164: 4178-4184). Предпочтительная замена в Fc-области, которая повышает связывание C1q, представляет собой замену E333A.

Гликозильные группы, добавленные в аминокислотный остов гликопротеинов, например, антител, образованы несколькими моносахаридами или производными моносахаридов, и приводят к тому, что состав одного и того же антитела, полученного в клетке от разных млекопитающих или из разных тканей, может различаться. Кроме того, было показано, что разный состав гликозильных групп может влиять на эффективность

опосредования антигензависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и/или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) антитела. Следовательно, можно улучшить эти свойства, исследуя паттерн гликозилирования антител из различных источников. Пример такого подхода описан в источнике: Niwa et al. (2004, *Cancer Res*, 64(6):2127-33).

5 Как вариант или дополнительно, остаток(-ки) цистеина могут быть введены в Fc-область, обеспечивая образование межцепочечных дисульфидных связей в этой области. Гомодимерное антитело, полученное таким образом, может обладать улучшенной способностью к интернализации и/или к повышенному опосредованному комплементом киллингу клеток и повышенной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). См. Caron et al. (1992, *J. Exp Med.* 176:1191-1195) и Shopes (1992, *Immunol.* 148:2918-2922). Гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой активностью можно также получить, применяя гетеробифункциональные перекрестносвязывающие линкеры, как описано у Wolff et al. (1993, *Cancer Research* 53:2560-2565). Как вариант, можно сконструировать антитело, которое содержит двойные Fc-области и благодаря этому может обладать повышенной способностью вызывать опосредованный комплементом лизис и АЗКЦ. См. Stevenson et al. (1989, *Anti-Cancer Drug Design*, 3:2, 19-230). Чтобы увеличить время полужизни антитела в сыворотке, можно встроить в антитело (в частности, во фрагмент антитела) эпитоп связывания рецептора реутилизации, как описано, например, в US 5739277. В настоящем документе термин «эпитоп связывания рецептора реутилизации» относится к эпитопу Fc-области молекулы IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), который отвечает за увеличение времени полужизни в сыворотке молекулы IgG *in vivo*.

Предпочтительное антитело против CCR7 согласно настоящему изобретению содержит константную область тяжелой цепи аллотипа G1m17,1 человека (см. источник: 25 Jefferis and Lefranc (2009) *MABs Vol. 1 Issue 4*, pp 1-7), причем указанная константная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 9. Более предпочтительно константная область тяжелой цепи аллотипа G1m17,1 человека в антителе согласно настоящему изобретению содержит замену E333A, причем указанная константная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10.

30 Антитела против CCR7 для применения в соответствии с настоящим изобретением можно получить с помощью любой из множества обычных методик. Обычно их получают в рекомбинантных экспрессионных системах, применяя любую методику, известную в данной области техники. См., например, Shukla and Thömmes (2010, "Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins", *Trends in Biotechnol.* 28(5):253–261), 35 Harlow and Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; и Sambrook and Russell (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory

Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Любую экспрессионную систему, известную в данной области, можно применять для получения рекомбинантных полипептидов согласно настоящему изобретению. Обычно клетки-хозяева трансформируют рекомбинантным экспрессионным вектором, который
5 содержит ДНК, кодирующую желательный полипептид.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено применение антитела против CCR7 согласно определению выше в настоящем документе, или его антигенсвязывающего фрагмента для лечения и/или предотвращения РТПХ у реципиента трансплантата, содержащего клетки донора, причем предпочтительно, чтобы действие
10 антитела против CCR7 включало по меньшей мере что-либо одно из: киллинга, индукции апоптоза, блокирования миграции и/или блокирования распространения экспрессирующих CCR7 клеток, блокирования активации экспрессирующих CCR7 клеток, блокирования созревания и дифференцировки экспрессирующих CCR7 клеток, предпочтительно, в реципиенте. Экспрессирующие CCR7 клетки, в отношении которых антитело против CCR7
15 осуществляет одно или более из указанных действий, предпочтительно представляют собой экспрессирующие CCR7 иммунные клетки, которые могут представлять собой трансплантированные иммунные клетки, происходящие из организма донора, или могут представлять собой происходящие из хозяина иммунные клетки, т.е. происходящие из реципиента. Примеры происходящих из организма донора или хозяина экспрессирующих
20 CCR7 иммунных клеток включают, например, Т-клетки, как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клетки, такие как, например, необученные Т-клетки, Т-клетки центральной памяти, регуляторные Т-клетки, хелперные Т-клетки и цитотоксические Т-клетки, В-клетки, такие как, например, необученные В-клетки и фолликулярные В-клетки, антигенпрезентирующие клетки (АПК), такие как, например, дендритные клетки, включая, например, зрелые дендритные клетки
25 (зДК) и плазмацитоидные ДК. Такие клетки, экспрессирующие рецептор CCR7, можно идентифицировать с помощью обычных способов; например, поверхностную экспрессию рецептора CCR7 можно проанализировать с помощью проточной цитометрии, как общеизвестно в данной области техники. Смерть клеток, экспрессирующих рецептор CCR7, можно определить с помощью любого обычного способа, например, путем определения
30 отсутствия или выведения клеток CCR7⁺ из организма реципиента. Предпочтительно, применение антитела против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением предотвращает или уменьшает инфильтрацию CD45⁺ клеток донора по меньшей мере во что-то одно из лимфатического узла, периферической крови, селезенки, тимуса и костного мозга, среди прочих лимфоидных органов реципиента, или в любой из эпителиальных тканей-
35 мишеней РТПХ у реципиента; более предпочтительно антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент предотвращает или уменьшает инфильтрацию CCR7⁺,

CD45⁺ клеток донора по меньшей мере во что-то одно из лимфатического узла, периферической крови, селезенки, тимуса и костного мозга у реципиента, среди прочих лимфоидных органов реципиента, или в любой из эпителиальных тканей-мишеней РТПХ у реципиента.

5 Без связи с какой-либо теорией, терапевтическое применение антитела против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно должно позволять специфически предотвращать или лечить РТПХ *in vivo* за счет, например, киллинга CCR7⁺ Т-клеток и АПК, и/или за счет нарушения миграции и/или блокирования распространения CCR7⁺ Т-клеток и АПК, и/или путем нарушения или блокирования активации, или дифференцировки, или
10 созревания CCR7⁺ Т-клеток и АПК у реципиента. В большинстве случаев комплементзависимый клеточный лизис (КЗЛ), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (АЗКФ) и антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), предположительно, обуславливают клиническую полезность неконъюгированного антитела против CCR7, хотя индукция апоптоза или остановка
15 клеточного цикла также могут играть значительную роль. В случае применения антител против CCR7 нарушение и/или блокирование миграции и/или нарушение или блокирование активации, дифференцировки, пролиферации или созревания иммунных клеток является дополнительным важным механизмом действия.

 Соответственно, в одном варианте реализации настоящего изобретения
20 предпочтительно предложено применение антитела против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением, причем указанное антитело против CCR7 нарушает миграцию клеток донора и/или реципиента, экспрессирующих рецептор CCR7, во вторичную лимфоидную ткань и/или блокирует распространение клеток донора во вторичные лимфоидные ткани, включая лимфатические узлы, селезенку и лимфоидную ткань
25 слизистых оболочек (MALT), такую как пейеровы бляшки.

 Реципиент трансплантата, у которого предотвращают или лечат РТПХ, в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой реципиента трансплантата или пересаженного материала, содержащего орган, клетку-предшественника, стволовую клетку, гематопозитическую клетку, гематопозитическую клетку-предшественника или
30 гематопозитическую стволовую клетку. Трансплантат или пересаженный материал может представлять собой сингенный или аллогенный трансплантат, но предпочтительно представляет собой трансплантат или пересаженный материал, содержащий аллогенные клетки донора. Трансплантат может включать любой тип органа или ткани, включая, например, сердце, легкое, почку, печень, поджелудочную железу, кишечник, лицо (или его
35 части), роговицу, кожу, руку, ногу, половой член, кость, матку, тимус и т.д.

В предпочтительном варианте реализации антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению применяют для предотвращения или лечения РТПХ у реципиента трансплантата гематопозитических клеток. В частности, для предотвращения или лечения РТПХ после аллогенной трансплантации гематопозитических стволовых клеток (ТГСК).

Клетки донора, используемые в способах согласно настоящему изобретению, могут представлять собой клетки цельного или очищенного костного мозга, очищенные гематопозитические предшественники или стволовые клетки костного мозга, очищенные гематопозитические клетки-предшественники или стволовые клетки периферической крови, (очищенные) клетки пуповинной крови или клетки периферической крови из продукта афереза, обогащенного гематопозитическими предшественниками, или стволовые клетки после мобилизации гематопозитических предшественников костного мозга факторами роста, такими как Г-КСФ, или агентами, направленными против CXCR4, такими как плериксафор. В способах согласно настоящему изобретению, если вводятся Т-клетки донора, трансплантат клеток может включать клетки цельного или очищенного костного мозга, клетки пуповинной крови или очищенные стволовые клетки с возвращением Т-клеток. Таким образом, в одном варианте реализации клетки донора для применения в соответствии с настоящим изобретением включают или получены по меньшей мере из одной из следующих клеток: Т-клеток, клеток селезенки, пуповинной крови, амниотической жидкости, клеток пульпы зуба из вартонова студня, происходящих из плаценты клеток, происходящих из корня волоса клеток и/или происходящих из жировой ткани клеток, суспензии клеток, содержащей лимфоциты, моноциты и/или макрофаги, содержащей стволовые клетки ткани, содержащего стволовые клетки органа, содержащей иммунные клетки ткани и содержащего иммунные клетки органа. В одном варианте реализации клетки донора для применения в соответствии с настоящим изобретением представляют собой гематопозитические стволовые клетки (также известные как гематопозитические клетки-предшественники), которые включают или происходят из стволовых клеток костного мозга, стволовых клеток периферической крови, стволовых клеток пуповинной крови, стволовых клеток костного мозга взрослых, таких как неадгезивные происходящие из костного мозга клетки (НА-ККМ), эмбриональные стволовые клетки и/или перепрограммированные стволовые клетки взрослых (т.е., индуцированные плюрипотентные клетки).

У реципиента трансплантата гематопозитических (стволовых) клеток может иметься гематологическое нарушение или негематологическое нарушение. Гематологическое нарушение может представлять собой не являющееся неопластическим гематологическое нарушение или гематологическое злокачественное нарушение. Незлокачественное гематологическое нарушение, в частности, нарушение с недостатком гематопозитических

клеток, может быть выбрано из группы, состоящей из: врожденного или приобретенного иммунодефицита, генетического нарушения, вызывающего гемоглобинопатию, заболевания вследствие недостатка ферментов, аутоиммунного заболевания, тяжелой апластической анемии, талассемии, серповидно-клеточной анемии, иммунологических нарушений, 5 тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID), синдрома Вискотта-Олдрича (WAS), гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH), врожденных ошибок метаболизма, лизосомных болезней накопления, нарушений функции пероксисом, аутоиммунных заболеваний, ревматологических заболеваний и рецидивов любых из перечисленных выше нарушений. Гематологическое злокачественное новообразование может быть выбрано из 10 группы, состоящей из: лейкоза, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), промиелоцитарного лейкоза (ПМЛ), острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), лимфомы из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), миелодиспластического синдрома (МДС), неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы Ходжкина (ХЛ), множественной миеломы (ММ) и нейробластомы. У реципиента 15 трансплантата гематопозитических (стволовых) клеток могут быть негематологические солидные опухоли (например, почечно-клеточный рак, колоректальный рак и т.д.)

Реципиент трансплантата гематопозитических (стволовых) клеток может получать или не получать лечение с использованием миелоаблативного режима кондиционирования, или немиелоаблативного режима кондиционирования, или кондиционирования пониженной 20 интенсивности, предпочтительно, перед получением трансплантата гематопозитических (стволовых) клеток.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено применение антитела против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением, при котором предотвращение или лечение РТПХ включает введение антитела против CCR7 реципиенту 25 до, (приблизительно) в то же время и/или после того, как реципиент получил трансплантат, содержащий клетку донора. Когда антитело против CCR7 вводят (приблизительно) в то же время, когда реципиент получает трансплантат, содержащий клетку донора, это предпочтительно означает, что антитело против CCR7 вводят в течение 96, 72, 24, 12, 6 или 3 часов. Предпочтительно, предотвращение или лечение РТПХ включает по меньшей мере 30 одно из: а) введения антитела против CCR7 реципиенту перед тем, как реципиент получил трансплантат, содержащий клетку донора; б) введения антитела против CCR7 реципиенту через 48, 72 или 96 часов после того, как реципиент получил трансплантат, содержащий клетку донора, с) введения антитела против CCR7 реципиенту после того, как реципиент получил трансплантат, содержащий клетку донора, и предпочтительно после того, как у 35 реципиента проявились симптомы РТПХ, или после того, как РТПХ была диагностирована у реципиента; и, d) введения антитела против CCR7 реципиенту после рецидива РТПХ.

Предположительно, введение антитела против CCR7 перед тем, как реципиент получил трансплантат, желательно, поскольку оно подготавливает реципиента к получению трансплантата, содержащего клетки донора, и, следовательно, может позволить предотвратить РТПХ или по меньшей мере снизить риск возникновения РТПХ.

5 Соответственно, антитело против CCR7 предпочтительно вводят по меньшей мере до того, как реципиент получит трансплантат, более предпочтительно по меньшей мере за 5, 10, 20 или 40 минут или за 1, 2, 4, 8, 12, 24 или 48 часов до того, как реципиент получит трансплантат.

Предположительно, введение антитела против CCR7 после того, как реципиент 10 получил трансплантат, желательно по той причине, что оно уменьшает иммунную атаку донора на хозяина-реципиента и дополнительно стимулирует приживание у реципиента трансплантата и/или клеток донора. Предпочтительно, антитело против CCR7 вводят после того, как реципиент получил трансплантат, в течение такого времени и так часто, как 15 необходимо для снижения частоты возникновения РТПХ и/или для смягчения или ослабления одного или более симптомов РТПХ. Частота введения и доза также зависят от времени полужизни в сыворотке антитела против CCR7, и могут быть соответствующим образом скорректированы. В предпочтительном варианте реализации настоящего 20 изобретения антитело против CCR7 вводят как до, так и после того как реципиент получил трансплантат.

Тем не менее, как продемонстрировано в разделе «Примеры» в настоящем документе, 25 введение антитела против CCR7 реципиенту после того, как развились аллореактивные ответы у реципиентов, которые получили трансплантат, все еще эффективно для лечения РТПХ, по меньшей мере с точки зрения улучшения уровня выживаемости. В одном варианте реализации настоящего изобретения, следовательно, антитело против CCR7 вводят реципиенту, имеющему трансплантат, который содержит клетки донора, после того, как у 30 реципиента выявили клинические проявления РТПХ и/или обнаружили аллореактивные ответы, и/или предпочтительно после того, как у реципиента была диагностирована РТПХ. В таких случаях реципиент мог не получать предварительного лечения или введения (введений) антитела против CCR7.

Антитело против CCR7, которое вводят реципиенту после того, как реципиент 30 получил трансплантат, можно вводить по меньшей мере через 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21 или 28 дней после по меньшей мере чего-либо одного из: i) получения реципиентом трансплантата или пересаженного материала; ii) возникновения симптомов РТПХ у реципиента; iii) обнаружения аллореактивного ответа у реципиента; и iv) диагностирования у реципиента 35 РТПХ.

В другом варианте реализации настоящего изобретения антитело против CCR7 вводят реципиенту трансплантата, содержащего клетку донора, причем указанный трансплантат обрабатывают перед трансплантацией путем инкубации *ex vivo* с антителом против CCR7, предпочтительно, в соответствии со способом, описанным ниже. Антитело против CCR7, которое вводят реципиенту, может, но не обязательно должно быть тем же антителом против CCR7, которое применяют в способе обработки *ex vivo* трансплантата перед трансплантацией.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят по меньшей мере однократно отдельно от трансплантата, предпочтительно, незадолго до или вскоре после введения трансплантата. «Нездолго» в указанном контексте означает в течение 24 часов, предпочтительно в течение 8 часов, более предпочтительно в течение 6 часов, более предпочтительно в течение 4 часов, более предпочтительно в течение 2 часов, наиболее предпочтительно в течение 1 часа. «Отдельно от» означает, что введение антитела против CCR7 или его антигенсвязывающего фрагмента осуществляют из другого контейнера, например, шприца, а не из контейнера с трансплантатом. Предпочтительно, антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят по меньшей мере за 10 секунд, более предпочтительно по меньшей мере за одну минуту, более предпочтительно по меньшей мере за 10 минут, наиболее предпочтительно по меньшей мере за 1 час до введения трансплантата. В другом предпочтительном варианте реализации трансплантат вводят по меньшей мере за 10 секунд, более предпочтительно по меньшей мере за одну минуту, более предпочтительно по меньшей мере за 10 минут, наиболее предпочтительно по меньшей мере за 1 час до введения антитела против CCR7 или его антигенсвязывающего фрагмента.

Таким образом, лечение предпочтительно включает по меньшей мере одно введение реципиенту антитела против CCR7 или его антигенсвязывающего фрагмента отдельно от трансплантата.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения антитело против CCR7 вводят реципиенту после рецидива РТПХ, при этом реципиент мог не получать предварительного лечения или введения (введений) антитела против CCR7.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против CCR7 (или его антигенсвязывающий фрагмент) согласно определению в настоящем документе для применения в соответствии с настоящим изобретением. Фармацевтическая композиция предпочтительно содержит по меньшей мере антитело против CCR7, или его фармацевтическое производное или пролекарство, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, адъювантом или основой, для введения субъекту. Указанную фармацевтическую композицию можно применять в способах лечения,

описанных в настоящем документе ниже, путем введения эффективного количества композиции нуждающемуся в этом субъекту. Термин «субъект» в настоящем документе используют взаимозаменяемо с термином «реципиент», и он в настоящем документе относится ко всем животным, классифицируемым как млекопитающие, и включает приматов и людей, но не ограничен ими. Субъект предпочтительно представляет собой человека мужского или женского пола любого возраста или расы.

В настоящем документе предполагается, что термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и антимикотические агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и т.п., совместимые с фармацевтическим введением (см., например, «Handbook of Pharmaceutical Excipients», Rowe et al., ред. 7^{ое} издание, 2012 г., www.pharmpress.com). Применение таких сред и агентов с фармацевтически активными веществами хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какая-либо обычная среда или агент несовместимы с активным соединением, предусмотрено их применение в композициях. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензилхлорид аммония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол, 3-пентанол, и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Твин™, плуроники™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Антитела согласно настоящему изобретению могут находиться в одном составе или их можно вводить в различных составах. Введение может быть одновременным или последовательным и может оказывать эффект при любом порядке.

Дополнительные активные соединения также могут быть включены в состав фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Таким образом, в конкретном варианте реализации фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может также содержать более одного активного соединения, которое

необходимо при конкретном подлежащем лечению показании, предпочтительно соединения с взаимодополняющими видами активности, которые не оказывают нежелательного влияния друг на друга. Например, может быть желательным дополнительно предоставить химиотерапевтический агент, цитокин, обезболивающий агент или иммуномодулирующий агент, например, иммуносупрессирующий агент или иммуностимулирующий агент. Эффективное количество таких других активных агентов зависит, помимо прочего, от количества антитела согласно настоящему изобретению, присутствующего в фармацевтической композиции, типа заболевания или нарушения, или лечения, и т.д.

Помимо применения для монотерапевтического лечения или предотвращения РТПХ, антитела и фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно применять с другими лекарственными средствами для осуществления комбинированной терапии. Другие лекарственные средства могут входить в состав той же композиции или могут быть предоставлены в виде отдельной композиции для введения одновременно или в другое время. Комбинированная терапия может оказывать синергетическое терапевтическое действие на пациентов. В конкретном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может быть скомбинировано с другим лечением медицинских состояний, описанных в настоящем документе. Другие терапевтические агенты включают, не ограничиваясь перечисленными: алкилирующие агенты (например, азотистые иприты, (такие как мехлоретамин), циклофосфамид, мелфалан и хлорамбуцил), алкилсульфонаты (например, бусульфан), нитрозомочевины (например, кармустин, ломустин, семустин и стрептозоцин), триазены (например, дакарбазин), антиметаболиты (например, аналоги фолиевой кислоты, такие как метотрексат), аналоги пиримидина (например, фторурацил и цитарабин), аналоги пурина (например, флударабин, идарубицин, цитозина арабинозид, меркаптопурин и тиогуанин), алкалоиды барвинка (например, винбластин, винкристин и виндезин), эпидофиллотоксины (этопозид и тенипозид), антибиотики (дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, блеомицин, пликамицин и митомицин), дибромманнит, дезоксиспергуалин, диметилмилеран и тиотепа, ингибиторы протеасом (бортезомиб), пентостатин, иммуносупрессирующие агенты, такие как стероиды (например, преднизон и метилпреднизолон), ингибиторы кальциневрина (например, циклоспорин А, такролимус или FK506), ингибиторы мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) (сиролимус или рапамицин), мофетил микофенолата, талидомид, леналидомид, азатиоприн, моноклональные антитела (например, даклизумаб (против интерлейкина (IL) 2), инфликсимаб (против фактора некроза опухоли), этанерцепт, MEDI-205 (против CD2), abx-cbl (против CD147)), алектумаб (против CD52), ритуксимаб (против CD20) и поликлональные антитела (например, ATG (антитимоцитарный глобулин), антигистаминные средства, химиотерапию, лучевую терапию, иммунотерапию,

хирургическое вмешательство, алкилирующие агенты, антиметаболиты, антигормоны, терапевтические средства от различных симптомов, например, обезболивающие средства, мочегонные средства, антидиуретические средства, противовирусные средства, антибиотики, цитокины, пищевые добавки, лекарства от анемии, коагулянты, лекарства для 5 костей, психиатрические и психологические лекарства, и тому подобные агенты. Кроме того, антитела и фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно применять в сочетании с другими типами терапии в качестве профилактики РТПХ до или приблизительно одновременно с трансплантацией, включая, но не ограничиваясь перечисленными: иммуносупрессивные агенты, такие как ингибиторы кальциневрина 10 (например, циклоспорин А, такролимус или FK506), ингибиторы мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) (сиролимус или рапамицин), или антипролиферативные агенты (например, мофетил микофенолата, метотрексат), облучение тимуса, фототерапию, мелфалан, деплецию (истощение) по Т-клеткам *in vivo* с помощью циклофосфида или АТГ, или деплецию Т-клеток *ex vivo* с помощью антител (например, против CD3) для 15 предотвращения начала РТПХ. Кроме того, антитела и фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно применять в сочетании с другими типами терапии в качестве лечения РТПХ, включая, но не ограничиваясь перечисленными: стероиды (например, преднизон и метилпреднизолон), экстракорпоральный фотоферез, пентостатин, ингибиторы киназ (например, руксолитиниб, ибрутиниб), ингибиторы протеасомы 20 (бортезомиб), клеточную терапию НК-клетками, или регуляторными Т-клетками, или мезенхимальными стволовыми клетками, иммунотерапию моноклональными антителами (например, ритуксимабом, алемтузумабом, тоцилизумабом и т.д.), или слитыми белками (например, абатацепт, алефацепт), ингибиторы миграции Т-клеток (например, маравирик); и т.д.

25 Также может быть полезно лечение пациентов цитокинами для повышающей регуляции экспрессии CCR7 или другого целевого белка на поверхности клеток-мишеней перед введением антитела согласно настоящему изобретению. Цитокины также могут вводиться одновременно, или до, или после введения истощающего антитела или меченого радиоактивной меткой антитела, чтобы стимулировать иммунные эффекторные функции.

30 Кроме того, применение антител против CCR7 для лечения или предотвращения РТПХ в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно включать применение режимов кондиционирования у реципиента трансплантата, включая миелоаблативное, немиелоаблативное кондиционирование или кондиционирование пониженной интенсивности перед трансплантацией. Указанные способы лечения устраняют основное 35 патологическое состояние и подавляют и устраняют иммунную систему хозяина, что позволяет обеспечить хоминг стволовых клеток донора в костный мозг без риска отторжения

трансплантата. Проведение миелоаблативного кондиционирования, или кондиционирования пониженной интенсивности, или немиелоаблативного кондиционирования может быть использовано для индуцирования смешанного гематопоэтического химеризма или полного гематопоэтического химеризма. Тотальное облучение всего организма (ТВИ) и/или курс химиотерапии бусульфаном и/или циклофосфамидом являются примерами миелоаблативных режимов. В настоящем документе «немиелоаблативный» относится к лечению, которое убивает клетки костного мозга, но не приводит к смерти значительного числа реципиентов от недостаточности костного мозга. Это позволяет стволовым клеткам донора прижиться по меньшей мере со смешанным химеризмом донор/реципиент. Окончательного элиминирования гематопоеза хозяина добиваются благодаря действию «трансплантат против хозяина» иммунных клеток донора, что, в конечном счете, приводит к полному донорскому химеризму. Низкодозное ТВИ, флударабин, АТГ, сниженные дозы бусульфана или комбинации перечисленных применяют в качестве немиелоаблативных режимов. Режим RIC представляет собой промежуточный подход, который предотвращает высокую токсичность миелоаблативных режимов, но обеспечивает достаточный контроль над основным заболеванием и достаточное подавление иммунитета, чтобы предотвратить отторжение трансплантата. Обычный режим RIC включает флударабин и мелфалан, но для проведения терапии RIC вводили и множество других агентов.

Во варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению включают в состав с носителями, которые защищают указанное соединение от быстрой элиминации из организма, такой как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантируемые и микроинкапсулированные системы доставки, например, липосомы. Можно применять биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких составов очевидны для специалистов в данной области техники. Липосомальные суспензии, включая нацеленные липосомы, также можно применять в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно получать в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, описанными в U.S. 4522811, WO2010/095940.

Путь введения антитела (или его фрагмента) согласно настоящему изобретению может быть пероральным, парентеральным, ингаляционным или местным. Термин «парентеральный» в настоящем документе включает внутривенное, внутриартериальное, внутривенное, интралимфатическое, интраперитонеальное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение. Предпочтительны внутривенные формы парентерального введения. Под «системным введением» подразумевают пероральное, внутривенное,

интраперитонеальное и внутримышечное введение. Разумеется, количество антитела, необходимое для терапевтического или профилактического действия, будет изменяться в зависимости от выбранного антитела, природы и тяжести состояния, которое лечат, и конкретного пациента. Кроме того, антитело можно подходящим образом вводить путем импульсной инфузии, например, с уменьшающимися дозами антитела. Предпочтительно, дозирование осуществляют путем инъекций, наиболее предпочтительно, внутривенных или подкожных инъекций, отчасти в зависимости от того, будет введение кратковременным или длительным.

Таким образом, в конкретном варианте реализации фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может находиться в форме, подходящей для парентерального введения, такой как стерильные растворы, суспензии или лиофилизированные продукты в подходящей единичной лекарственной форме. Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (при условии их водорастворимости) или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Подходящие носители для внутривенного введения включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, кремофор EM (BASF, Парсиппани, Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ). Во всех случаях композиция должна быть стерильна и должна быть текучей до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить через шприц. Она должна быть стабильна в условиях приготовления и хранения и предохраняться от загрязнения микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, фармацевтически приемлемый полиол, такой как глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и подходящие их смеси. Необходимую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и применения поверхностно-активных веществ. Предотвращения действия микроорганизмов можно добиться с помощью различных антибактериальных и антимикотических агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобных агентов. Во многих случаях предпочтительно добавление в композицию изотонических агентов, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит, сорбит или хлорид натрия.

Пролонгированное всасывание инъеклируемых композиций может быть достигнуто путем включения в композицию агента, который замедляет всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций можно получить путем включения активного соединения (например, полипептида или антитела) в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией путем фильтрации. Как правило, дисперсии получают путем добавления активного соединения в стерильную основу, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительные способы получения представляют собой вакуумную сушку и лиофилизацию, в результате которых получают порошок активного ингредиента с любым дополнительным нужным ингредиентом из предварительно профильтрованного через стерильный фильтр раствора.

В некотором варианте реализации указанную фармацевтическую композицию вводят внутривенным (в/в) или подкожным (п/к) путем. Можно применять подходящие вспомогательные вещества, такие как объемобразующие агенты, буферные вещества или поверхностно-активные вещества. Упомянутые составы получают с помощью стандартных способов получения композиций для парентерального введения, которые хорошо известны в данной области и более подробно описаны в различных источниках, включая, например, «Remington: The Science and Practice of Pharmacy» (ред. Allen, L. V., 22ое издание, 2012, www.pharmpress.com).

Особенно предпочтительно получение составов с фармацевтическими композициями, а именно, композициями для парентерального введения, в виде дозированных лекарственных форм для простоты введения и равномерности дозировок. Дозированная лекарственная форма в настоящем документе относится к отдельным физическим единицам, подходящим для применения в качестве разовых доз для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения (антитела согласно настоящему изобретению), рассчитанное для получения желательного терапевтического эффекта, вместе с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация стандартных лекарственных форм согласно настоящему изобретению обусловлена и напрямую зависит от уникальных свойств активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, которого необходимо добиться, и ограничений, характерных для области техники составления лекарственных форм с таким активным соединением для лечения индивидуумов.

Как правило, вводимое эффективное количество антитела согласно настоящему изобретению будет зависеть от относительной эффективности выбранного соединения, тяжести нарушения, которое лечат, и массы тела пациента. Тем не менее, активные соединения, как правило, вводят один или более раз в сутки, например, ежедневно 1, 2, 3 или

4 раза в сутки, при этом обычные суммарные суточные дозы находятся в диапазоне от 0,001 до 1,000 мг/кг массы тела/сутки, предпочтительно, от приблизительно 0,01 до приблизительно 100 мг/кг массы тела/сутки, наиболее предпочтительно, от приблизительно 0,05 до 10 мг/кг массы тела/сутки. В частности, для применения в соответствии с настоящим изобретением, антитела против CCR7 предпочтительно, вводят в дозировке 1–1000, 2–500, 5–200, 10–100, 20–50 или 25–35 мг/кг массы тела/сутки, предпочтительно, вводят дозами каждые 1, 2, 4, 7, 14 или 28 дней.

Помимо введения антител пациенту, в настоящей заявке предположено введение антитела путем генной терапии. В WO 96/07321 описано применение генной терапии для получения внутриклеточных антител.

Фармацевтические композиции можно поместить в контейнер, упаковку или диспенсер вместе с инструкциями по введению.

Антитела и фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно применять вместе с другими лекарственными средствами, чтобы обеспечить комбинированную терапию. Указанные другие лекарственные средства могут входить в состав той же композиции или могут быть предоставлены в виде отдельной композиции для введения одновременно или в другое время.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен способ *ex vivo* или *in vitro* получения препарата органа, ткани или клеток из организма донора для трансплантации реципиенту. Указанный способ предпочтительно включает этап: а) инкубации препарата органа, ткани или клеток с антителом против CCR7 или его антигенсвязывающим фрагментом согласно определению в настоящем документе, за счет чего антитело против CCR7 предпочтительно осуществляет по меньшей мере одно из перечисленного: i) снижает количество и ii) ингибирует активность экспрессирующих CCR7 клеток донора в препарате органа, ткани или клеток; и b) необязательно удаления по меньшей мере одного из: антитела против CCR7 и экспрессирующих CCR7 клеток донора из препарата органа, ткани или клеток. Предпочтительно, антитело против CCR7 инкубируют с препаратом органа, ткани или клеток донора в количестве и в течение времени, которые эффективны/достаточны для снижения количества и/или ингибирования активности экспрессирующих CCR7 клеток донора в препарате органа, ткани или клеток до степени, достаточной для снижения риска возникновения РТПХ и/или для снижения тяжести РТПХ у реципиента препарата органа, ткани или клеток. Например, антитело против CCR7 инкубируют с препаратом органа, ткани или клеток донора в количестве и в течение времени, которые эффективны/достаточны для значительного ингибирования активности экспрессирующих CCR7 клеток донора в трансплантате, предпочтительно для снижения активности по меньшей мере на 40%, более предпочтительно для снижения активности по меньшей мере на 80% и наиболее

предпочтительно для снижения активности по меньшей мере на 90%. Или, например, антитело против CCR7 инкубируют с препаратом органа, ткани или клеток донора в количестве и в течение времени, которые эффективны/достаточны для значительного уменьшения количества экспрессирующих CCR7 клеток донора в трансплантате, предпочтительно, для уменьшения количества по меньшей мере на 40%, более предпочтительно, для уменьшения количества по меньшей мере на 80% и наиболее предпочтительно, для уменьшения количества по меньшей мере на 90%. В настоящем документе предполагается, что экспрессирующие CCR7 клетки донора в препарате органа, ткани или клеток донора предпочтительно представляют собой экспрессирующие CCR7 иммунные клетки, более предпочтительно включающие по меньшей мере что-либо одно или более из Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, NK-клеток или АПК.

Согласно настоящему изобретению способ для получения препарата органа, ткани или клеток от донора для трансплантации реципиенту предпочтительно представляет собой способ, который осуществляют в условиях *in vitro* или *ex vivo*, причем способ *ex vivo* не исключает, что препарат органа, ткани или клеток донора обрабатывают антителом против CCR7, пока он еще находится в организме донора после смерти головного мозга или донора, погибшего в результате нарушения кровообращения, путем введения в организм донора антитела против CCR7.

Все приведенные выше описания, касающиеся клинического лечения или предотвращения РТПХ, которое относится к условиям *in vitro* или *ex vivo*, распространяются на это практическое осуществление. Таким образом, антитело против CCR7 может содержаться в консервирующем растворе, который применяют для предохранения препарата органа, ткани или клеток перед трансплантацией. Например, антитело против CCR7 можно добавить в консервирующий раствор для трансплантата органа в количестве, достаточном для связывания и ингибирования активности иммунных клеток в органе. Кроме того, антитело против CCR7 может быть добавлено в консервирующий раствор для трансплантата органа в количестве, достаточном для связывания и уменьшения количества иммунных клеток в органе. Такой консервирующий раствор может подходить для предохранения различного типа органов, таких как сердце, почка и печень, а также тканей из них. Примером коммерчески доступных консервирующих растворов является Plegisol (Abbott), и другие консервирующие растворы, названные в соответствии с местом их происхождения, включают раствор UW (университет Висконсина), раствор Стэнфорда и модифицированный раствор Коллинза (J. Heart Transplant (1988) Vol. 7(6):456-4467). Консервирующий раствор также может содержать обычные консерванты, вспомогательные вещества, стабилизирующие агенты и/или буферные вещества. Консервирующий раствор или буфер, содержащий антитело против CCR7, также можно

применять для промывания или ополаскивания трансплантата органа перед трансплантацией или хранением. Таким образом, орган или ткань для трансплантации можно перфузировать консервирующим раствором, содержащим антитело против CCR7, предпочтительно, перед трансплантацией. Например, консервирующий раствор, содержащий антитело против CCR7, можно применять для промывания перфузией изолированного сердца, которое затем хранят при 4° С в консервирующем растворе.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено применение для подготовки трансплантата органа или ткани перед трансплантацией. Перед трансплантацией антитело против CCR7 или фрагмент может быть добавлено в буфер для промывания, чтобы очистить трансплантат от активных Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, НК-клеток или АПК.

Концентрация антитела против CCR7 или его фрагмента в консервирующем растворе или буфере для промывания может изменяться в зависимости от типа трансплантата. В соответствии с настоящим изобретением указанная инкубация может осуществляться, например, в течение периода от 1 минуты до 7 дней. Что касается удаления по меньшей мере чего-либо одного из антитела против CCR7 (например, не связанного антитела против CCR7) и экспрессирующих CCR7 клеток донора из препарата органа, ткани или клеток в соответствии со способами и применениями согласно настоящему изобретению, специалисту в данной области техники известны различные способы осуществления указанного этапа. Одним примером способа удаления антитела из трансплантата является промывание трансплантата. Промывание может, например, осуществляться с использованием центрифугирования, если трансплантат содержит или представляет собой суспензию клеток. Как вариант, антитело против CCR7 и экспрессирующие CCR7 клетки донора можно удалить из препарата клеток, подлежащего трансплантации (например, клеток костного мозга, клеток периферической крови или клеток пуповинной крови), путем аффинного очищения от антитела против CCR7 и предпочтительно, экспрессирующих CCR7 клеток донора, связанных с ним. Следовательно, предпочтительно аффинный лиганд, применяемый для очищения, не влияет на антигенсвязывающую способность антитела против CCR7, так что препарат клеток можно очистить от экспрессирующих CCR7 клеток донора вместе с антителом против CCR7. Способы аффинного очищения хорошо известны в данной области и включают, например, способы, в которых аффинный лиганд иммобилизован на материале твердофазного носителя, такого как магнитная гранула, или материале твердофазного носителя, применяемого в аффинной (колоночной) хроматографии.

Количество антитела, используемого на описанном выше этапе инкубации, не ограничено конкретным образом. Специалист в данной области техники может легко определить подходящие количества, которые могут, например, зависеть от типа

используемого трансплантата. Предпочтительно, в соответствии с настоящим изобретением указанную инкубацию осуществляют с количеством антитела от 0,1 мкг до 100 мг. Выбор подходящих количеств антитела находится в рамках компетенции специалиста в данной области. Как правило, более высокие количества или концентрации антитела, соответственно, предпочтительны, когда трансплантат содержит или представляет собой 5 ткань или орган. Кроме того, выбор точного количества или концентрации, соответственно, используемого антитела также зависит от размера такой ткани или органа.

В настоящем документе и в формуле изобретения глагол «включать» и его спряжения используют в неограничивающем смысле для обозначения того, что объекты, следующие за 10 этим термином, включены, но при этом объекты, конкретно не упомянутые, не исключены. Кроме того, упоминание элемента в единственном числе не исключает возможность присутствия более чем одного элемента, если контекст явным образом не требует наличия одного и только одного из элементов. Термины в единственном числе, следовательно, обычно означают «по меньшей мере один».

15 Термин «около» или «приблизительно», когда его используют вместе с численным значением (например, приблизительно 10), предпочтительно означает, что это значение может представлять собой указанное значение (равное 10), увеличенное или уменьшенное на 0,1% относительно указанного значения.

20 Все цитируемые в настоящем документе патенты и литературные источники полностью включены в него посредством ссылки.

Настоящее изобретение описано ниже на приведенных примерах, которые не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

25 Фигура 1. Антитело против CCR7 эффективно предотвращает развитие РТПХ.

А) Относительная потеря массы тела в трех экспериментальных группах. Контрольная группа, мышам в которой вводили ФСБ (n = 4), группа изотипического контроля (ИК), мышам в которой вводили неродственное антитело (n = 5), и группа антитела против CCR7, мышам в которой вводили антитело, нацеленное на CCR7 (n = 5). Массу тела на 0 день 30 принимали за 100%. Р-значения относятся к сравнительному анализу группы антитела против CCR7 и других групп.

В) Кривые выживаемости Каплана-Мейера для всех экспериментальных групп.

С) Процент CD45+ клеток человека, обнаруженных в последовательных образцах периферической крови (ПК), полученных из каждой экспериментальной группы.

35 D) Процент CD45+ клеток человека, обнаруженных в лимфоидных тканях (костном мозге и селезенке), собранных после умерщвления животных.

Фигура 2. Антитело против CCR7 эффективно для лечения РТПХ на ранних стадиях.

А) Относительная потеря массы тела в экспериментальных группах. Группа изотипического контроля (ИК), мышам в которой вводили неродственное антитело (n = 5), и группа антитела против CCR7, мышам в которой вводили антитело, нацеленное на CCR7 (n = 5). Массу тела на 0 день принимали за 100%. Р-значения относятся к сравнительному анализу группы антитела против CCR7 и другой группы.

В) Кривые выживаемости Каплана-Мейера для каждой экспериментальной группы.

С) Процент CD45+ клеток человека, обнаруженных в последовательных образцах периферической крови (ПК), полученных из каждой экспериментальной группы.

Д) Процент CD45+ клеток человека, обнаруженных в лимфоидных тканях (костном мозге и селезенке), собранных после умерщвления животных.

Фигура 3. Антитело против CCR7 эффективно для лечения РТПХ на ранних и поздних стадиях.

А) Относительная потеря массы тела в экспериментальных группах. В группе изотипического контроля (ИК) мышей сначала лечили неродственным антителом на +3 день (n = 2), на +7 день (n = 2) или на +10 день (n = 1). В группах антитела против CCR7 мышей сначала лечили антителом, нацеленным на CCR7 (n = 5), на +7 день (n = 5) или на +10 день (n = 5). Массу тела на 0 день принимали за 100%. Р-значения относятся к сравнительному анализу группы антитела против CCR7 и другой группы.

В) Кривые выживаемости Каплана-Мейера для каждой экспериментальной группы. Всех животных из каждой группы ИК объединяли в одну отдельную группу.

Фигура 4. Отбор МАТ против CCR7. Несколько коммерчески доступных клонов антител, нацеленных на CCR7, характеризовали на основании их способности блокировать опосредованную CCR7 миграцию к CCL19 и CCL21 (А) и на основании эффективности индукции киллинга целевых клеток, опосредованного комплементом (КЗЦ) (В). Как миграцию (% от введения, n = 2 для базального уровня, СК, 150503 и 2Н4; n = 1 для 6В3, 3D12, Н60), так и КЗЦ (% специфического лизиса, n = 2) тестировали на экспрессирующих CCR7 клетках хронического лимфоцитарного лейкоза после процедур, описанных в разделе «Материалы и методы». Столбцами представлено среднее значение ± СО. На основании данных результатов был выбран клон 150503 для исследования с целью подтверждения концепции *in vitro* и *in vivo* при РТПХ.

35

Фигура 5. Механизмы действия нейтрализующего антитела против CCR7.

А) Блокирование CCR7 нейтрализует опосредованную мишенью миграцию клеток T_N и T_{CM} , полученных путем афереза. Специфический антагонизм взаимодействий CCR7-лиганд, выраженный в виде снижения % мигрирующих введенных клеток, показан для субпопуляций $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток. В обоих случаях выдержанные на бессывороточной среде МКПК, выделенные путем афереза (n = 3), предварительно инкубировали с 10 мкг/мл антитела против CCR7 или соответствующего изотипического контроля (ИК) в течение 30 минут. Затем хемотаксис, вызванный 1 мкг/мл CCL19 или CCL21, анализировали в прозрачных камерах Трансвелл (4 часа). Базальная миграция представляет собой самопроизвольную миграцию без хемотаксического стимула. Клетки, мигрировавшие в нижнюю камеру, окрашивали и подсчитывали с помощью проточной цитометрии. Процент мигрировавших клеток (% от введения) рассчитывали, как описано в разделе «Материалы и методы».

В) МАТ против CCR7 специфически истощает клетки по T_N и T_{CM} . Специфическое истощение CCR7-положительных клеток, выраженное как % специфического лизиса, опосредованного активацией комплемента (КЗЦ), показано для подгрупп $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток. В обоих случаях клетки-мишени, полученные путем афереза (n = 3), инкубировали с 10 мкг/мл антитела против CCR7 или соответствующим изотипическим контролем (ИК) в течение 30 минут, а затем приводили в контакт с комплементом кролика на 1,5 ч. Лизис клеток определяли путем количественного анализа внедрения 7-AAD в каждой подгруппе с помощью проточной цитометрии. Процент специфического лизиса рассчитывали по формуле, представленной в разделе «Материалы и методы». Столбцами представлено среднее значение \pm СО. н/з - не значимо; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

Фигура 6. Относительное содержание введенных путем инфузии субпопуляций CCR7+ Т-клеток при аферезе не коррелирует с ЦМВ или частотой рецидивов.

А-В) Относительное содержание инфузировавшихся субпопуляций CCR7+ Т-клеток при аферезе при сравнении статуса инфицирования реципиентов ЦМВ в течение первых шести месяцев после трансплантации. Образцы афереза анализировали с помощью проточной цитометрии и разделяли на образцы, инфузировавшиеся пациентам, у которых выявили ДНК ЦМВ (n = 60), и у которых не выявили ДНК ЦМВ после трансплантации (n = 43). Показан процент $CD4^+CCR7^+$ (А) и $CD8^+CCR7^+$ (В) субпопуляций, которые вводили путем инфузии пациентам с ЦМВ или без него. Для определения реактивации ЦМВ использовали пороговое значение вирусной нагрузки >57 копий/мл.

С-Д) Относительное содержание инфузировавшихся субпопуляций CCR7+ Т-клеток при аферезе при сравнении пациентов с рецидивом или без рецидива заболевания. Образцы афереза анализировали с помощью проточной цитометрии и разделяли на образцы, которые

вводили путем инфузии пациентам, у которых был рецидив ($n = 25$), и пациентам, у которых не было рецидива после трансплантации ($n = 78$). Показан процент $CD4^+CCR7^+$ (C) и $CD8^+CCR7^+$ (D) субпопуляций, которые инфузировали пациентам с рецидивом или без рецидива заболевания.

5

Фигура 7. Относительное содержание введенных путем инфузии субпопуляций $CCR7^+$ T-клеток при аферезе не коррелирует с рецидивирующим заболеванием. Образцы афереза анализировали с помощью проточной цитометрии и разделяли на образцы, инфузированные пациентам с рецидивом (ДА) и пациентам без рецидива (НЕТ) после трансплантации.

10 Относительное содержание субпопуляций $CCR7^+$ T-клеток ($CD4^+$ или $CD8^+$) в аферезе при сравнении пациентов с рецидивом или без рецидива заболевания показана для различных заболеваний крови, включая:

А) миелодиспластический синдром (МДС); «ДА» н/з $CD4^+$ $p = 0,4199$; $CD8^+$ $p = 0,2117$;

В) острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); «ДА» н/з $CD4^+$ $p = 0,5758$; $CD8^+$ $p = 0,1908$;

15 С) острый миелоидный лейкоз (ОМЛ); «ДА» н/з $CD4^+$ $p = 0,1638$; $CD8^+$ $p = 0,4126$;

Д) лимфому Ходжкина (ХЛ); «ДА» н/з $CD4^+$ $p = 0,5106$; $CD8^+$ $p = 0,8873$;

Е) неходжкинскую лимфому (НХЛ); «ДА» н/з $CD4^+$ $p = 0,9926$; $CD8^+$ $p = 0,7369$;

Ф) множественную миелому (ММ).

20 **Примеры**

Пример 1. Антитела против $CCR7$ как средство для лечения РТПХ

Материалы и методы

Образцы, реагенты и проточная цитометрия (ПЦ)

Образцы периферической крови брали у здоровых волонтеров после получения информированного согласия. Затем проводили анализ экспрессии $CCR7$ на нормальных T- и В-лимфоцитах. Конъюгированное с фикоэритрином (PE) антитело мыши против $CCR7$ человека приобретали в R&D Systems (Мак-Кинли, Миннеаполис). Во всех случаях в анализ были включены подходящие изотипические контроли (ИК). Иммунофлуоресцентное окрашивание анализировали на проточном цитометре FACS CANTO II, применяя программное обеспечение DIVA (BD Biosciences). Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли путем центрифугирования в градиенте фиколла (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, Мадрид, Испания).

Ксеногенная модель РТПХ у мышей

35 Были разработаны модели РТПХ *in vivo* у мышей NOD/SCID-IL2R γ^{null} . Для этого во всех моделях животных облучали сублетальными дозами радиации на уровне 2 Гр и через 4

часа каждой облученной мыши вводили внутривенно по 8×10^6 моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека от здоровых волонтеров (в 200 мкл ФСБ). Для подтверждения концепции *in vivo* использовали как самцов, так и самок мышей в возрасте 6–10 недель. Эксперименты проводили в вивариях Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) в соответствии с испанским законодательства и рекомендациями этического комитета CBMSO.

Клинические показатели, которые оценивали у мышей, включали потерю массы тела, сутулую осанку (кифоз), изменения кожи, паралич задних конечностей (или пониженную подвижность) и учащенное дыхание. Для исследования инфильтрации в периферической крови (ПК) собирали образцы крови в различные моменты времени на протяжении экспериментов. Для анализа инфильтрации в различные ткани мышей умерщвляли и органы/ткани, включая селезенку и костный мозг (КМ), собирали и разъединяли. В обоих случаях клетки метили конъюгированным с FITC МАТ против CD45 человека, (клон H130, BD Biosciences, www.bdbiosciences.com), а затем анализировали с помощью проточной цитометрии.

Профилактическое применение антитела против CCR7 у мышей

Для оценки эффективности блокирования CCR7 в клетках донора использовали мышей в условиях профилактики. Для этого мышей сначала лечили либо очищенным МАТ мыши против CCR7 человека ($n = 5$ мышей; клон 150503, изотип IgG2a, R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота, США), либо посторонним антителом изотипического контроля (ИК) ($n = 5$ мышей; IgG2a, Biolegend, Сан-Диего, Калифорния, США) или ФСБ ($n = 4$ мыши). Оба МАТ против CCR7 и ИК вводили путем интраперитонеальной инъекции в концентрации ~ 10 мг/кг (~ 200 мкг/мышь). Через 2 часа каждому животному инокулировали МКПК от одного здорового донора. Животные получали еще 4 дозы антитела против CCR7, ИК или ФСБ каждые 4 дня. Образцы ПК анализировали на 10, +13, +18 и +21 дни после трансплантации. КМ и селезенку анализировали после умерщвления животных.

Терапевтическое применение антитела против CCR7 во время пиков РТПХ

Для исследования терапевтической эффективности МАТ против CCR7 была разработана модель для оценки того, оказывало ли МАТ против CCR7 влияние на аллореактивные популяции, обнаруженные в периферической крови (ПК), и смягчались ли симптомы РТПХ при применении указанного подхода. В указанной модели мышья-носителей МКПК сначала лечили на +5 день после приживления трансплантата антителом против CCR7 ($n = 5$) или соответствующим ИК ($n = 5$) в концентрации ~ 10 мг/кг (~ 200 мкг/мышь). Лечение повторяли каждые 3 дня. Отбор образцов ПК осуществляли на +10, +13,

+18 и +25 дни после трансплантации. Отбор образцов селезенки и КМ осуществляли после умерщвления животных. Эксперимент завершали через 33 дня после приживления трансплантата МКПК.

С помощью другой модели авторы настоящего изобретения оценивали эффективность применения антитела против CCR7 в различные моменты времени во время или после пика аллореактивности. Для этого двадцать мышей-носителей МКПК человека лечили антителом против CCR7 (n = 15) или ИК (n = 5). В группе, которую лечили антителом против CCR7, 5 мышей получили первую дозу на +3 день; 5 мышей получили первую дозу на +7 день и 5 мышей получили первую дозу на +10 день. В группе, которой вводили ИК, 2 мышам осуществляли первое введение на +3 день; 2 мышам - на +7 день, и одной мыши - на +10 день после приживления трансплантата. Эксперимент завершали на +26 день.

Анализ для определения ингибирования CCR7-зависимой внутриклеточной сигнализации

Способность антитела против CCR7 ингибировать опосредованную CCL19 и/или CCL21 внутриклеточную сигнализацию в клетках яичника китайского хомячка (CHO) со сверхэкспрессией CCR7 человека определяли с помощью общепринятого стандартного анализа рекрутинга β -аррестина (PathHunter™, DiscoverX, Фримонт, Калифорния, США; Southern et al., 2013, J Biomol Screen. 18(5):599-609).

Анализ для определения ингибирования миграции клеток

Способность антитела против CCR7 ингибировать миграцию (хемотаксис) клеток Т-клеточной лимфомы человека, эндогенно экспрессирующих рецептор CCR7 человека, индуцированную лигандами CCL19 и CCL21, определяли в анализе миграции клеток.

Анализ миграции клеток проводили, применяя двойные камеры системы Трансвелл с вкладышами с размером пор 8 мкм (Costar, Кембридж, Массачусетс, США). Нижняя камера содержала лиганд (CCL19 или CCL21), разведенный средой HamF12 с добавлением 0,5% БСА. Клетки с эндогенной экспрессией CCR7 (Т-клеточная лимфома (HuT-78)), предварительно инкубированные с моноклональными антителами против CCR7, помещали во вкладыш, и камеру в сборе инкубировали при 37°C. Количество клеток в нижней камере, мигрировавших через мембрану, определяли после лизиса клеток путем окрашивания ДНК (раствор красителя CyQuant GR, Life Technologies Ltd, Великобритания).

Анализ комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ)

Анализ КЗЦ проводили, как описано в источнике: Cuesta-Mateos et al., Cancer Immunol Immunother. 2015, 64: 665-76. Вкратце, 2×10^5 клеток-мишеней МКПК высевали в 96-луночный круглодонный планшет вместе с указанными концентрациями очищенного

антитела против CCR7, алемтузумаба (против CD52) или антитела ИК. Через 30 мин при 37 °С клетки промывали и добавляли полную среду RPMI 1640, содержащую 25 % комплемента кролика (Serotec, Оксфорд, Великобритания), с предварительной термоинактивацией (56 °С, 30 мин) или без нее. Через 1,5 ч клетки окрашивали МАТ против CD19-FITC, против CD3-PE и против CD5-APC, чтобы отличить популяции клеток ХЛЛ и Т-клеток. 7-AAD применяли в качестве красителя для исключения при определении жизнеспособности. Процент специфического лизиса (% СЛ) рассчитывали по формуле: $100 \times (\% \text{ мертвых клеток с активированным комплементом} - \% \text{ мертвых клеток с инактивированным комплементом}) / (100 - \% \text{ мертвых клеток с инактивированным комплементом})$.

10

Анализ для определения отсутствия агонистического действия

Протестированные при высоких концентрациях (267 нМ) моноклональные антитела против CCR7 человека тестировали для выявления (отсутствия) индуцированного детектируемого внутриклеточного агонистического действия в клетках яичника китайского хомячка (СНО) со сверхэкспрессией CCR7 человека, используя общепринятый стандартный анализ рекрутинга β-аррестина (PathHunter™, DiscoverX, Фримонт, Калифорния, США; Southern et al., 2013, J Biomol Screen. 18(5):599-609) (результаты не показаны). Неродственный IgG2a использовали в качестве отрицательного контроля, а CCL21, природный лиганд CCR7, использовали в качестве положительного контроля. Считается, что у связывающего антитела против CCR7 человека отсутствует детектируемое внутриклеточное агонистическое действие, если указанное антитело оказывает не большее внутриклеточное агонистическое действие, чем отрицательный контроль.

20

Измерение аффинности Viacore

Аффинности моноклональных антител определяли путем измерений в системе Viacore при стандартных условиях. Моноклональное антитело иммобилизовали на подходящей сенсорной поверхности и раствор сульфатированного антигена SYM1899 ((пиро-Glu)DEVTTDDZIGDNTTVVDZTLFESLCSKKDVRNK; SEQ ID NO: 3); где Z обозначает сульфатированный тирозин), содержащего остатки 19–49, происходящие из N-конца CCR7 человека, пропускали по поверхности сенсора.

30

РЕЗУЛЬТАТЫ

Профилактическое введение антитела против CCR7 блокирует развитие РТПХ

У мышей, получавших первую профилактическую дозу антитела против CCR7 до приживления трансплантата МКПК человека и четыре последующие дозы после приживления трансплантата, не развивались какие-либо клинические признаки РТПХ.

35

Напротив, у мышей, получавших ИК или ФСБ, наблюдались клинические признаки РТПХ, включая потерю массы тела (фигура 1А). Различия в массе тела наблюдали между +9 днями и +12 днями после трансплантации (сравнение ИК с антителом против CCR7, $p = 0,045$; и сравнение ФСБ с антителом против CCR7, $p = 0,0134$). Примечательно, что все животные, получившие антитело против CCR7, даже набрали массу тела в ходе эксперимента. Соответственно, антитело против CCR7 увеличивало продолжительность общей выживаемости (фигура 1В). У животных, которых лечили МАТ против CCR7, не развивались какие-либо клинические признаки, и они выживали на протяжении периода до 32 дней, момента времени, когда животных умерщвляли, и который считали истинным периодом без признаков заболевания. Напротив, контрольных мышей, у которых проявлялись тяжелые клинические признаки, умерщвляли на +11, +13, +14 и +18 дни. На +13, +14 и +18 дни по одному животному из группы, которую лечили антителом против CCR7, умерщвляли, чтобы провести сравнительные анализы инфильтрации органов. Ни у одного из животных, получивших антитело против CCR7, не наблюдалось клинических признаков, и их умерщвляли исключительно для целей эксперимента. Таким образом, в течение этих дней у мышей, которых лечили антителом против CCR7, не развивались какие-либо клинические признаки, они набирали массу тела и, соответственно, присутствие реактивных клеток донора в ПК от мышей, которых лечили антителом против CCR7 не было детектировано (фигура 1С). Напротив, присутствие про-РТПХ клеток в ПК контрольных животных возрастало с течением времени. В момент умерщвления анализировали инфильтрацию в КМ и селезенке (фигура 1D). Про-РТПХ клетки не были обнаружены и в лимфоидных тканях животных, которых лечили МАТ против CCR7, что согласуется с данными, полученными для ПК. Напротив, в контрольной группе наблюдалась постоянная инфильтрация указанных тканей (сравнение КМ контрольной группы с КМ группы антитела против CCR7: 34,6% против 0,57%, $p = 0,002$; сравнение КМ группы ИК с КМ группы антитела против CCR7: 41,7% против 0,57%, $p = 0,003$ / сравнение селезенок из контрольной группы с селезенками из группы антитела против CCR7: 70,1% против 0,17%, $p = <0,001$; сравнение селезенок из группы ИК с селезенками из группы антитела против CCR7: 71,3% против 0,17%, $p = <0,001$). Не наблюдали различий между контрольными группами (сравнение ФСБ с ИК:КМ, $p = 0,57$ /селезенка, $p = 0,86$).

Терапевтическое введение антитела против CCR7 смягчает РТПХ

Чтобы продемонстрировать терапевтическую эффективность антител против CCR7 *in vivo*, авторы настоящего изобретения использовали модели, в которых животных лечили после развития аллореактивных ответов. Указанные ответы, которые обычно возникали с +3 по +5 дни, являются основной причиной патогенеза РТПХ. С учетом вышесказанного, в

одной модели МКПК человека трансплантировали мышам с иммунодефицитом. Животных лечили либо ИК ($n = 5$), либо антителом против CCR7 ($n = 5$). Первую дозу антител вводили на +5 день, а введение последующих доз осуществляли каждые два дня. В этой модели антитело против CCR7 оказывало положительное влияние на массу тела животных (фигура 2А). Напротив, контрольные животные теряли массу тела. Различия впервые наблюдали к +12 дню. Кроме того, терапия антителом против CCR7 увеличивала продолжительность общей выживаемости (фигура 2В).

У животных, которых лечили МАТ против CCR7, не развивались какие-либо клинические признаки, и они выживали на протяжении периода до 33 дней, момента времени, когда животных умерщвляли, и который считали истинным периодом без признаков заболевания. Напротив, контрольных мышей, у которых проявлялись тяжелые клинические признаки, умерщвляли на +12, +20 и +28 дни. На +12 и +28 дни одно животное из группы, которую лечили антителом против CCR7, умерщвляли, чтобы провести сравнительные анализы инфильтрации органов. Ни у одного из животных, получивших антитело против CCR7, не наблюдалось клинических признаков, и их умерщвляли исключительно для целей эксперимента. Соответственно, в течение указанных дней у мышей, которых лечили антителом против CCR7, не развивались какие-либо клинические признаки, они набрали массу тела, и, соответственно, не было обнаружено присутствие реактивных клеток донора в ПК из мышей, которых лечили антителом против CCR7 (фигура 2С). Напротив, присутствие про-РТПХ клеток в ПК контрольных животных возрастало с течением времени. Примечательно, что значимые различия в инфильтрации ПК наблюдали со дня +10 (контрольная группа по сравнению с группой антитела против CCR7: 12,6% по сравнению с 2,6%; $p = 0,02$). Эти различия возрастали на +12 день и продолжали возрастать до окончания эксперимента (47,3% по сравнению с 6,5%; $p < 0,001$) (фигура 2С). В момент умерщвления анализировали инфильтрацию в КМ и селезенке (фигура 2D). В лимфоидных тканях (КМ и селезенке) от животных, которых лечили МАТ против CCR7, наблюдали невысокое относительное содержание про-РТПХ клеток, что согласуется с данными, полученными для ПК (фигура 2D). Напротив, в контрольной группе наблюдалась постоянная инфильтрация указанных тканей (сравнение КМ контрольной группы с КМ группы антитела против CCR7: 27,3% против 3,5%; $p = 0,005$ / сравнение селезенок контрольной группы с селезенкой группы антитела против CCR7: 59,2% против 8,4%; $p = 0,006$).

В другой модели авторы настоящего изобретения ставили цель оценить эффективность антител против CCR7 в лечении РТПХ в различные моменты времени после начала заболевания. Для этого антитела против CCR7 вводили в различные моменты времени после приживления трансплантата. Животные получали лечение на +3, +7 и +10 дни

после приживления трансплантата МКПК донора. Пятнадцать мышей получали лечение антителом против CCR7 (5 на +3 день; 5 на +7 день; 5 на +10 день), и пять мышей получали ИК (2 на +3 день; 2 на +7 день и 1 на +10 день). Все мыши получали последовательные дозы каждые два дня до завершения эксперимента. У мышей, получавших первую дозу антитела против CCR7 на +3 день, наблюдалось увеличение массы тела и бóльшая продолжительность 5 общей выживаемости (фигуры 3А и 3В). У животных, которых лечили МАТ против CCR7, не развивались какие-либо клинические признаки, и они выживали на протяжении периода до 26 дней, момента времени, когда их умерщвляли, который считали истинным периодом без признаков заболевания. Напротив, у контрольных мышей выявили медиану общей 10 выживаемости, составляющую 14 дней. Примечательно, что у животных, которые получали лечение антителом против CCR7 не ранее +7 или +10 дня, наблюдался худший исход, чем у мышей, лечение которых начали на +3 день. Тем не менее, у животных, лечение которых начали только на +7 или +10 день, все же наблюдался лучший исход, чем у соответствующих контрольных животных. Некоторые животные, получившие первую дозу на +7 или +10 день, 15 доживали до +19 дня, при этом ни одно животное из соответствующих контрольных групп не выживало дольше, чем до +12 дня.

Антитело против CCR7 нарушает хемотаксис T_N - и T_{CM} -клеток человека к CCL19 и CCL21 *in vitro*

20 Полученные результаты побудили авторов настоящего изобретения оценить полезность CCR7 не в качестве биомаркера для выбора правильного трансплантата, а в качестве рецептора, нацеливание на который возможно при терапии на основе антител. Для этого авторы выбрали и использовали антитело, характеризующееся способностью блокировать взаимодействия CCR7 с лигандами и убивать клетки-мишени посредством КЗЦ или 25 антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (фигура 4).

Соответственно, сначала авторы настоящего изобретения оценивали способность выбранных МАТ ингибировать управляемый лигандами хемотаксис МКПК человека, полученных путем афереза. Как и ожидалось, если МКПК предварительно инкубировали с ИК, добавление CCL19 или CCL21 в среду запускало миграцию подгрупп CCR7⁺ T_N и T_{CM} 30 (фигура 5А), оказывая более выраженное действие в компартменте T_N . Тем не менее, связывание 10 мкг/мл МАТ против CCR7 уменьшало миграцию до базальных уровней для этих клеток. Напротив, T_{EM} и T_{EMRA} не мигрировали в ответ на лиганды CCR7 и, соответственно, антитело против CCR7 не оказывало влияния на их поведение.

35 **Антитело против CCR7 специфически истощает CCR7⁺ T_N - и T_{CM} -клетки человека посредством КЗЦ**

Как было установлено ранее (Cuesta-Mateos C. Targeting CCR7 in T-cell Prolymphocytic Leukemia. CONTROL-T: International Conference April 2016 Mature T-cell lymphomas - molecular pathology, modeling of cellular dynamics, and therapeutic approaches. 2016), выбранное антитело достаточно эффективным для киллинга Т-клеток опухоли посредством КЗЦ, но его действие на здоровые подгруппы CCR7⁺ Т-клеток не изучалось ранее. Поэтому авторы провели анализы КЗЦ *in vitro* со свежими МКПК человека, полученными путем афереза. При связывании с CD4⁺ T_N- или T_{CM}-клетками антитело против CCR7 в концентрации 10 мкг/мл опосредовало высокую КЗЦ-активность (фигура 5B). Аналогичные результаты наблюдали для CD8⁺ T_N-клеток. И напротив, на CCR7-отрицательные клетки T_{EM} и T_{EMRA} MAT против CCR7 не действовало, свидетельствуя о том, что при терапии антителом против CCR7 будут сохраняться эффекторные клетки и, следовательно, защита от патогенов и эффект РТПЛ. Для дальнейшего изучения этой идеи авторы настоящего изобретения исследовали, коррелировали ли количества CCR7⁺ клеток в трансплантате с реактивацией ЦМВ в течение первых 6 месяцев после трансплантации, но не наблюдали явных различий относительного содержания (фигура 6A и 6B) или абсолютных количеств (результаты не показаны) CD4⁺CCR7⁺ или CD8⁺CCR7⁺ клеток между пациентами с реактивацией ЦМВ или без нее. Кроме того, многофакторный логистический регрессионный анализ (таблица 1) подтвердил, что относительное содержание CCR7⁺ клеток в трансплантате не являлось фактором риска реактивации ЦМВ.

20

Таблица 1. Многофакторный анализ

Реактивация ЦМВ (да/нет)	0,95	0,144	0,889–1,0173
CD4 ⁺ CCR7 ⁺ (%)			
Реактивация ЦМВ (да/нет)	0,88	0,092	0,772–1,019
CD8 ⁺ CCR7 ⁺ (%)			
Рецидив заболевания (да/нет)	1,01	0,702	0,942–1,092
CD4 ⁺ CCR7 ⁺ (%)			
Рецидив заболевания (да/нет)	0,92	0,362	0,779–1,095
CD8 ⁺ CCR7 ⁺ (%)			

Сокращения: ЦМВ – цитомегаловирус; CI – доверительный интервал; OR – отношение шансов; ^aСкорректировано с учетом значимых искажающих факторов.

[CD4⁺ (p=0,144); CD8⁺ (p=0,092)]. Аналогично, относительное содержание или абсолютные количества CCR7⁺ клеток в трансплантате не коррелировали с частотой рецидива заболевания после трансплантации, как не наблюдалось и явных различий между пациентами, у которых произошел рецидив, и пациентами, у которых он не произошел (фигура 6С и 6D и не показанные данные). Соответственно, многофакторный логистический регрессионный анализ (таблица 1) подтвердил, что относительное содержание CCR7⁺ клеток в трансплантате не являлось фактором риска рецидива заболевания [CD4⁺ (p=0,702); CD8⁺ (p=0,362)]. Наконец, отсутствие связи между относительным содержанием CCR7⁺ клеток в трансплантате и частотой рецидивов дополнительно подтверждалось при разделении пациентов на группы в соответствии с диагнозом основного заболевания (фигура 7). В совокупности эти результаты исключают применение CCR7 (при аферезе) в качестве биомаркера для предсказания инфекции ЦМВ или рецидива заболевания, но в качестве дополнительного регистрируемого показателя позволяют предположить, что любой подход, направленный на снижение относительного содержания процента CCR7⁺ клеток в трансплантате, не будет связан с повышенным риском инфекции или повышенной частотой рецидивов.

МАТ против CCR7 блокирует сигнализацию CCR7 без агонистического действия

Протестированное при высоких концентрациях (267 нМ) моноклональное антитело с HVR из SEQ ID NO: 1 и 2 не демонстрировало какого-либо детектируемого агонистического действия в клетках яичника китайского хомячка (CHO), сверхэкспрессирующих CCR7 человека, что определяли с помощью общепринятого стандартного анализа рекрутинга β -аррестина (PathHunter™, DiscoverX, Фримонт, Калифорния, США; Southern et al., 2013, J Biomol Screen. 18(5):599-609) (результаты не представлены).

25

ОБСУЖДЕНИЕ

РТПХ представляет собой частое осложнение, возникающее после аллогенной трансплантации, которое может приводить к летальному исходу. Недавно было продемонстрировано, что более высокая экспрессия CCR7 в клетках донора коррелирует с более высокой степенью инфильтрации вторичных лимфоидных органов (SLO) реципиента, а следовательно, с большей вероятностью обнаружения аллоантигенов, которые могут приводить к аллогенным иммунным ответам. Более ранние данные, полученные авторами настоящего изобретения, продемонстрировали, что миграция в SLO обуславливается CCR7, и была установлена связь между миграцией в направлении лигандов CCR7 и развитием и степенью РТПХ (Portero-Sainz, I et al., Bone Marrow Transplantation (2017), 1–8). Аналогично, данные других публикаций предполагают, что необученные Т-клетки и ТСМ играют

35

основные роли в развитии как oРТПХ, так и xРТПХ (Yakoub-Agha, I., et al., *Leukemia*, 2006. 20(9): p. 1557-65; Distler, E., et al., *Haematologica*, 2011. 96(7): p. 1024-32; Cherel, M., et al., *Eur J Haematol*, 2014. 92(6): p.491-6.), хотя необученные Т-клетки обладают большей способностью отвечать на антигены реципиента, чем ТСМ. Полученные результаты позволяют предположить возможность применения CCR7 в качестве терапевтической мишени для иммунотерапии не только вследствие их высокой плотности в необученных Т-клетках, ТСМ и некоторых АПК, но также благодаря их решающей роли в прогрессировании и патогенезе заболевания. В этой связи авторы продемонстрировали *in vivo*, что введение антител против CCR7 NHP приводило к селективному уменьшению уровня необученных Т-клеток, а также клеток ТСМ (данные не показаны). Кроме того, наблюдалось, что антитела против CCR7 эффективно блокируют миграцию экспрессирующих CCR7 Т-клеток к лигандам CCR7 (данные не показаны). Наконец, антитела против CCR7 эффективны для предотвращения и лечения РТПХ, что продемонстрировано в моделях на мышах *in vivo*. Примечательно, что наиболее эффективный терапевтический подход включал введение антител против CCR7 с +3 по +5 дни, что совпадает с терапевтическим окном применения циклофосфида для предотвращения аллореактивности при ТГСК (Luznik, L., et al., *Biol Blood Marrow Transplant*, 2002. 8(3): p. 131-8). В совокупности результаты доклинического применения антител против CCR7 подтверждают, что истощение и/или нейтрализация миграции экспрессирующих CCR7 клеток (включая необученные Т-клетки и ТСМ) в SLO являются рациональными подходами к предотвращению и/или лечению РТПХ. Следовательно, за счет истощения по экспрессирующим CCR7 клеткам и/или блокирования миграции в SLO аллореактивные экспрессирующие CCR7 клетки не будут активироваться, мешая таким образом развитию РТПХ.

Соответственно, Sasaki et al. (2003, *J Immunol*, 170(1): стр. 588-96.) показали, что раннее применение антагонистов CCL21 предотвращало проникновение Т-клеток донора в лимфатический узел и, таким образом, развитие РТПХ. Dutt с соавторами показали, что удаление необученных CD62L клеток отсрочивало начало РТПХ и продлевало ОБ в доклинических моделях *in vivo* (Dutt, S., et al., *Blood*, 2005,106(12): p. 4009-15). Аналогично, в клинических условиях истощение по экспрессирующим CD45RA необученным Т-клеткам в аферезе оказывало влияние на частоту и развитие РТПХ (Touzot, F., et al., *J Allergy Clin Immunol*, 2015.135(5): p. 1303-9 e1-3.; Shook, D.R., et al., *Pediatr Blood Cancer*, 2015. 62(4): p.666-73; Triplett, V.M., et al., *Bone Marrow Transplant*,2015. 50(7): p. 1012.). Тем не менее, во всех указанных исследованиях, и в отличие от терапии антителом против CCR7 клетки ТСМ не являются мишенью. В заключение стоит упомянуть, что новейшие данные предполагают, что иммунитет против инфекций не зависит от CCR7+ клеток (Choufi, V., et al., *Bone Marrow Transplant*, 2014. 49(5): p. 611-5), следовательно, истощение и/или блокирование

экспрессирующих CCR7 клеток, вероятно, является безопасным для пациентов-реципиентов подходом.

Пример 2. Идентификация пациентов с низким риском РТПХ

5 **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Авторы настоящего изобретения проанализировали когорту, включающую 103 пар донор – реципиент (см. таблицу 2), которые прошли аллогенную ТГСК в больнице университета La Princesa, Мадрид, Испания (Portero-Sainz et al., 2017). Протоколы исследования были одобрены Этическим комитетом (ссылка PI-624), и исследования проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Таблица 2. Характеристики трансплантата.

Возраст реципиентов (лет)

0–20	2 (2%)
21–30	13 (13%)
31–40	21 (20%)
41–50	26 (25%)
51–60	25 (25%)
>60	16 (15%)

Диагноз основного заболевания

[частота рецидивов]

Миелодиспластический синдром (МДС)	28 (27%) [5/28 (17%)]
Острый лимфоидный лейкоз (ОЛЛ)	9 (9%) [3/9 (33%)]
Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ)	45 (44%) [10/45 (22%)]
Лимфома Ходжкина (ХЛ)	9 (9%) [3/9 (33%)]
Неходжкинская лимфома (НХЛ)	8 (8%) [2/8 (25%)]
Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ)	2 (2%) [0/2 (0%)]
Множественная миелома (ММ)	2 (2%) [1/2 (50%)]

Возраст доноров, годы

17-30	33 (32%)
31-40	32 (31%)
41-50	19 (19%)
51-60	13(12%)
>60	6 (6%)

Соответствие пола

Д мужчина – Р мужчина	36 (35%)
Д мужчина – Р женщина	26 (25%)
Д женщина – Р женщина	18 (18%)
Д женщина – Р мужчина	23 (22%)

Тип донора

HLA-идентичный сибс	31 (30%)
HLA-идентичный (10/10) неродственный	47 (46%)
Несовпадающий по HLA-Cw (9/10) неродственный	25 (24%)

Серология ЦМВ (I)

Д положительный – Р отрицательный	12 (12%)
Д положительный – Р положительный / Д отрицательный – Р положительный	77 (75%)
Д отрицательный – Р отрицательный	14 (13%)

Серология ЦМВ (II)

Реактивация	59 (57%)
-------------	----------

Источник трансплантата

СККМ	5 (5%)
СКПК	98 (95%)
Введенные путем инфузии $CD34^+_{10^6/kg}$ массы тела реципиента	5,23 (1,4 - 8,2)
Введенные путем инфузии $CD3^+_{10^6/kg}$ массы тела реципиента	22,07 (25,3 - 468,1)

Режим кондиционирования

Миелоаблативный	70 (68%)
Немиелоаблативный стандартный	33 (32%)

Профилактика РТПХ

CsA и MTX	90 (87%)
CsA и MMF	11 (11%)
CsA	2 (2%)

Сокращения: Д - донор; Р - реципиент; ЦМВ - цитомегаловирус; СККМ - стволовые клетки костного мозга; СКПК - стволовые клетки периферической крови; CsA - циклофосфамид; MTX - метотрексат; MMF -мофетил микофенолата.

Фенотипирование

Образцы афереза окрашивали панелью антител семи цветов (таблица 3), как описано ранее (Portero-Sainz et al., 2017). Относительные и абсолютные количества субпопуляций Т-клеток относятся к общему количеству белых кровяных клеток. Субпопуляции T_N, T_{CM}, T_{EM} и T_{EMRA} идентифицировали с помощью следующих антител: CD45RA-FITC, CD62L-PE, CD3-APC, CD4-PB (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния).

Таблица 3. Клоны антитела, используемые в исследовании.

CD8	SK1	FITC	BD
CD4	RPA-T4	PB	BD
CD62L	SK11	PE	BD
CD3	SK7	PerCP	BD
CD3	SK7	APC	BD
CD19	SJ25C1	PECy7	BD
CD45	2D1	PO	BD
CD45RA	HI100	FITC	BD
CCR7	150503	APC	R&D
CCR7	150503	Нет (очищенное)	R&D
IgG2a	MOPC-173	Нет (очищенное)	BIOLEGEND

Терапевтические антитела

10 Очищенное МАТ мыши против CCR7 человека (изотип IgG2a) приобретали у R&D Systems (Миннесота, США), а совпадающий изотипический контроль (ИК) – у Biologend (Калифорния, США).

Статистический анализ

15 Качественные переменные представлены в виде относительных (процент, %) и абсолютных (количество, n) частот. Количественные переменные выражены в виде показателей основной тенденции (среднего) и дисперсии (СО или стандартная ошибка среднего). Качественные результаты между группами сравнивали с помощью критерия Пирсона χ^2 или точного критерия Фишера, в зависимости от обстоятельств. Количественные переменные с равными дисперсиями (критерий Левена) анализировали, используя t-критерий или однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). U-критерий Манна-Уитни или критерий Крускала-Уоллиса использовали для гетероскедастичных данных.

Бинарный логистический регрессионный анализ проводили надлежащим образом в когорте пациентов согласно описанию у Portero-Sainz et al. (2017), чтобы идентифицировать прогностические факторы РТПХ и реактивации ЦМВ (или рецидива заболевания), с

коррекцией с учетом искажающих факторов: возраста, HLA и статуса ЦМВ, пола, режима кондиционирования, количества инфузировавшихся CD3⁺ и CD34⁺, аллогенной сенсибилизации, рецидива после ТГСК, основного заболевания, источника трансплантата и профилактики.

5 Проводили однофакторный поисковый анализ для поиска переменных, связанных с зависимыми переменными оРТПХ, хРТПХ и инфекцией ЦМВ или рецидивом заболевания (P<0,05). Искажающие факторы, достигшие порога вероятности в однофакторном анализе (P<0,10), включали в модель многофакторного логистического регрессионного анализа. Чувствительность ± 95% CI для степени риска оРТПХ из нашей предыдущей модели
10 (Portero-Sainz et al., 2017) оценивали с помощью ROC-кривых. Чувствительность для степени риска инфекции ЦМВ рассчитывали тем же путем. Значимость устанавливали на уровне P<0,05. Для определения реактивации ЦМВ использовали пороговое значение вирусной нагрузки >57 копий/мл. Статистический анализ проводили с использованием Stata версии 13.0 (College Station, Техас, США).

15

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выбор афереза на основании относительного содержания CCR7⁺ клеток не предотвращает и не задерживает РТПХ

Чтобы установить потенциальную точку отсечения для выбора афереза, обеспечивающего
20 низкий риск развития РТПХ, авторы настоящего изобретения провели анализ чувствительности (ROC-кривые) в нашей когорте и произвольно выбрали 25^{ый} перцентиль (<3,6%) для идентификации пациентов, получивших трансплантат с низким относительным содержанием CCR7⁺ Т-клеток. Как видно в таблице 4, у 87,88% (75,23% –100%) пациентов, получивших трансплантаты с относительным содержанием CD4⁺CCR7⁺ клеток в рамках
25 25^{ого} перцентиле (<3,6%), не развивалась оРТПХ. В случае CD8⁺CCR7⁺ выбор <2,2% клеток в аферезе (25^{ый} перцентиль) был ассоциирован с чувствительностью к хРТПХ 88,57% (76,60% – 100%).

Таблица 4: ROC-анализ %CD4+CCR7+ (или %CD8+CCR7+) клеток в аферезе и оРТПХ (или хРТПХ) (с отсечением по 25-ому перцентиле)

% CD4+CCR7+	нет	да	Всего
<3,6	21	4	25
≥ 3,6	49	29	78
Всего	70	33	103
% CD4+CCR7+	значение		CI (95%)
Чувствительность (%)	87,88		72,23–100

Специфичность (%)	30,00	18,55 –41,45
TPR	37,18	25,81–48,55
TNR	84,00	67,63–100
Распространенность	32,04	22,54–41,54

хРТПХ (кол-во пациентов)

% CD8+CCR7+	нет	да	Всего
<2,2	18	4	22
>= 2,2	35	31	66
Всего	53	35	88

% CD8+CCR7+	значение	CI (95%)
Чувствительность (%)	88,57	76,60–100
Специфичность (%)	33,96	20,27–47,66
TPR	46,97	34,17–59,77
TNR	81,82	63,43–100
Распространенность	39,77	28,98–50,57

TPR – частота истинно положительных значений

TNR – частота истинно отрицательных значений

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения для предотвращения или лечения реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) у реципиента трансплантата, содержащего клетку донора.
5
2. Антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п. 1, отличающиеся тем, что IC_{50} указанного антитела против CCR7 составляет не более 100 нМ для ингибирования по меньшей мере одного из: CCR7-зависимой внутриклеточной сигнализации и интернализации рецептора CCR7, по меньшей мере одним CCR7-лигандом, выбранным из CCL19 и CCL21.
10
3. Антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п. 2, отличающиеся тем, что указанное антитело против CCR7 ингибирует CCR7-зависимую внутриклеточную сигнализацию без значительного агонистического действия.
15
4. Антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп. 1–3, отличающиеся тем, что K_d указанного антитела против CCR7 для N-концевого внеклеточного домена CCR7 человека не более чем в 20 раз выше, чем K_d референсного антитела против CCR7, где референсное антитело против CCR7 представляет собой антитело мыши против CCR7, последовательность аминокислот переменного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, а последовательность аминокислот переменного домена легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 2.
20
25
5. Антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело против CCR7 представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или антитело человека.
30
6. Антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п. 5, отличающиеся тем, что указанное антитело против CCR7 представляет собой антитело, содержащее области HVR антитела против CCR7 человека, последовательность аминокислот переменного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, и последовательность аминокислот переменного домена легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 2.
35

7. Антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по
любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело
5 против CCR7 влияет по меньшей мере на одно из следующего: киллинг, индукция
апоптоза, блокирование миграции, блокирование активации, блокирование
пролиферации и блокирование распространения экспрессирующих CCR7 клеток в
организме реципиента.
8. Антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по
10 любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что трансплантат,
содержащий клетку донора, представляет собой трансплантат, включающий одно или
более из: органа, ткани, клетки-предшественника, стволовой клетки и
гематопоэтической клетки.
- 15 9. Антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п.
8, отличающиеся тем, что трансплантат, содержащий клетку донора, представляет
собой трансплантат, содержащий гематопоэтическую стволовую клетку или клетку-
предшественника.
- 20 10. Антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п.
9, отличающиеся тем, что реципиент страдает злокачественным нарушением, и при
этом, предпочтительно, предотвращение или лечение РТПХ сохраняет или
стимулирует действие трансплантата против опухоли или действие трансплантата
25 против лейкоза.
11. Антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по
любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что предотвращение или
лечение РТПХ включает по меньшей мере одно из:
- 30 а) введения указанного антитела против CCR7 реципиенту перед тем, как
реципиент получил трансплантат, содержащий клетку донора;
- б) введения указанного антитела против CCR7 реципиенту после того, как
реципиент получил трансплантат, содержащий клетку донора, и предпочтительно
перед тем, как у реципиента проявились симптомы РТПХ, или перед тем, как у
реципиента была диагностирована РТПХ;
- 35 в) введения указанного антитела против CCR7 реципиенту после того, как
реципиент получил трансплантат, содержащий клетку донора, и предпочтительно

после того, как у реципиента проявились симптомы РТПХ, или после того, как у реципиента была диагностирована РТПХ;

5 d) введения указанного антитела против CCR7 реципиенту трансплантата, содержащего клетку донора, причем указанный трансплантат обрабатывают перед трансплантацией путем инкубации *ex vivo* с антителом против CCR7 или его антигенсвязывающим фрагментом; и

e) введения указанного антитела против CCR7 реципиенту после рецидива РТПХ.

10 12. Способ получения *ex vivo* препарата органа, ткани или клеток из организма донора для трансплантации реципиенту, включающий следующие этапы:

15 a) инкубацию препарата органа, ткани или клеток с антителом против CCR7 или его антигенсвязывающим фрагментом по пп. 2–7, за счет чего указанное антитело против CCR7 осуществляет по меньшей мере одно из следующего: i) уменьшает количество и ii) ингибирует активность экспрессирующих CCR7 клеток донора в препарате органа, ткани или клеток; и,

b) необязательно, удаление по меньшей мере одного из антитела против CCR7 и экспрессирующих CCR7 клеток донора из препарата органа, ткани или клеток.

20 13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанное антитело против CCR7 находится в консервирующем растворе, используемом для предохранения препарата органа, ткани или клеток перед трансплантацией.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что орган или ткань перфузируют или промывают консервирующим раствором, содержащим антитело против CCR7.

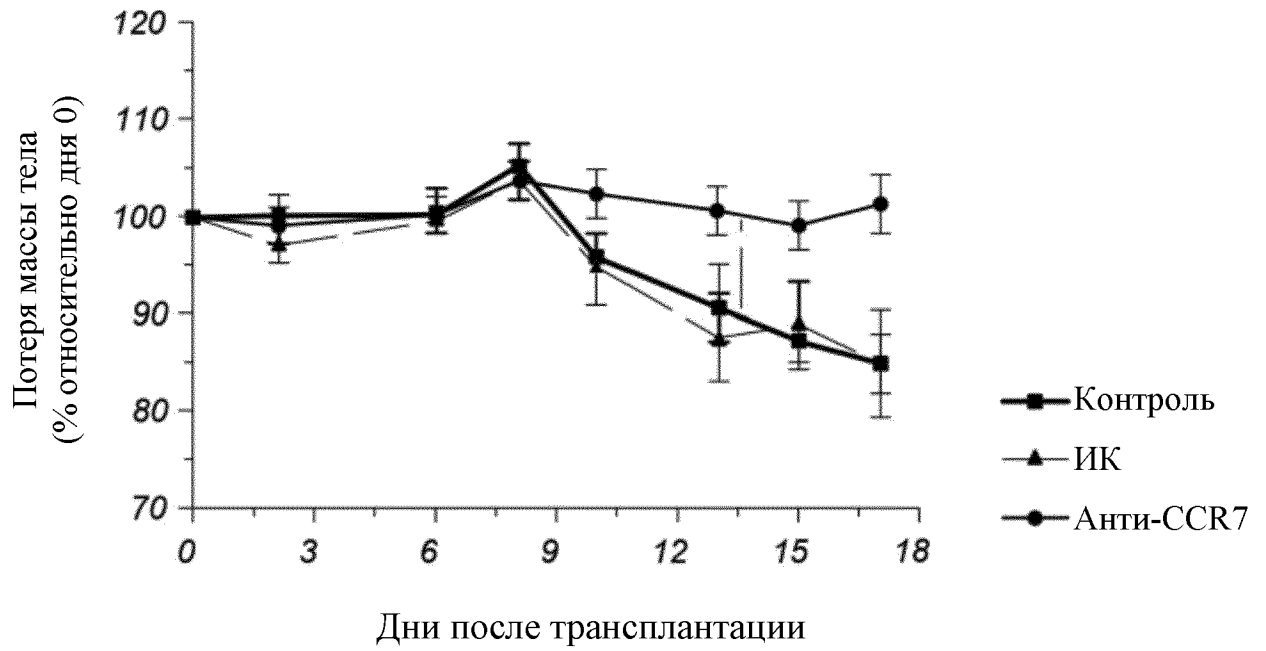
25

15. Способ по п. 12 или 13, отличающийся тем, что антитело против CCR7 и экспрессирующие CCR7 клетки донора удаляют из препарата клеток путем аффинного очищения от антитела против CCR7 и экспрессирующих CCR7 клеток донора, связанных с ним.

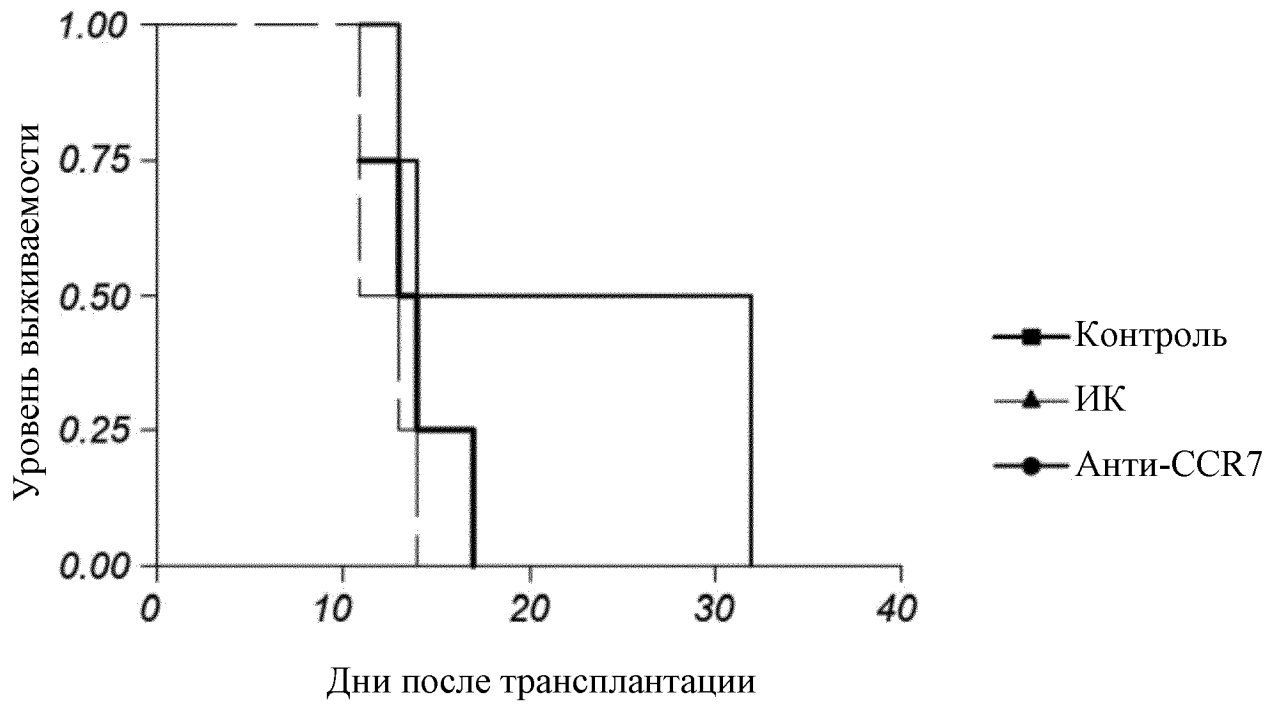
30

Фигура 1

А

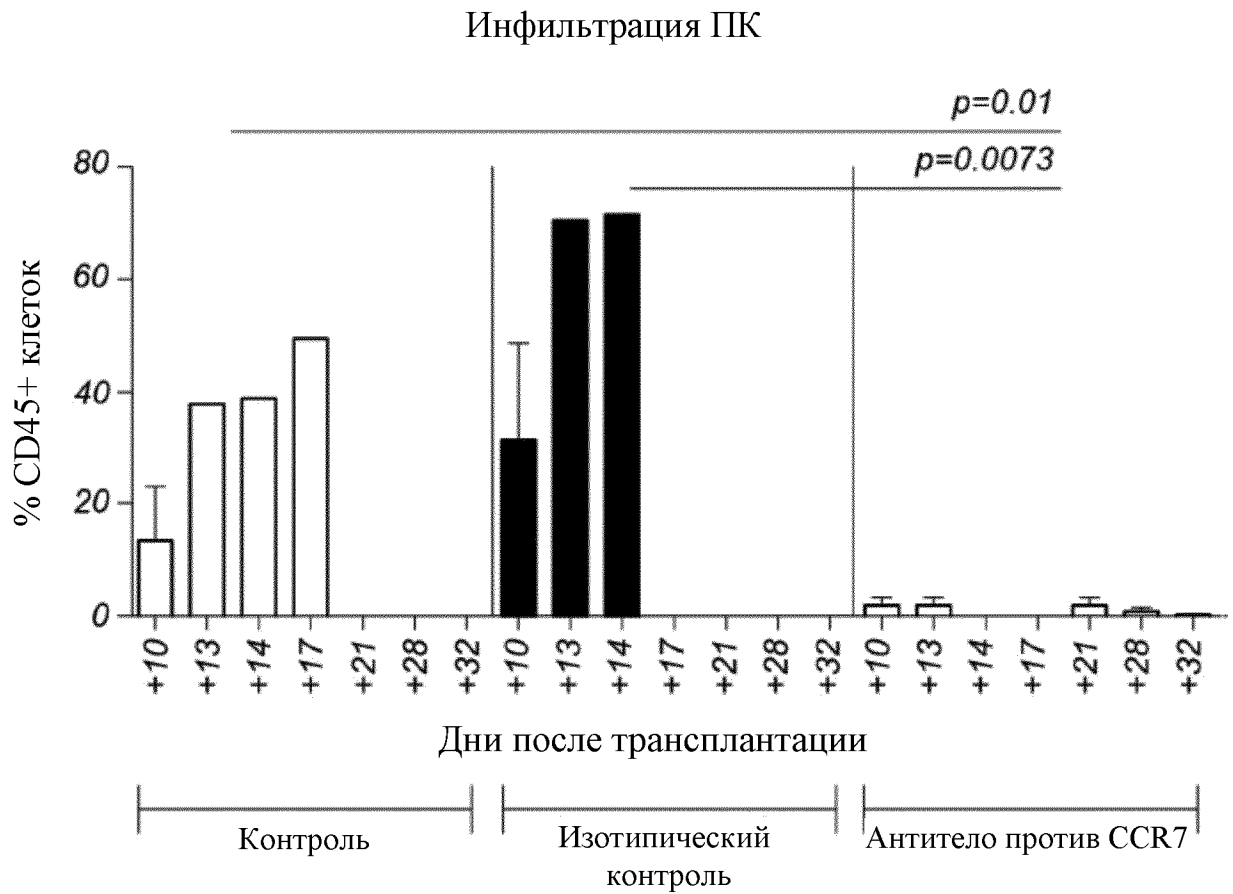


В

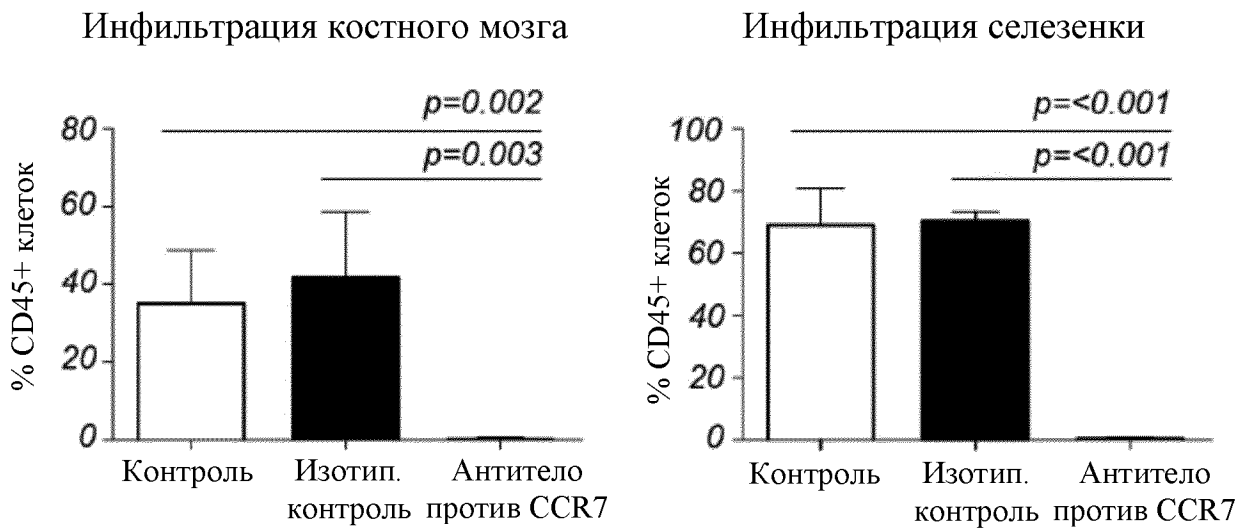


Фигура 1 (продолжение)

С

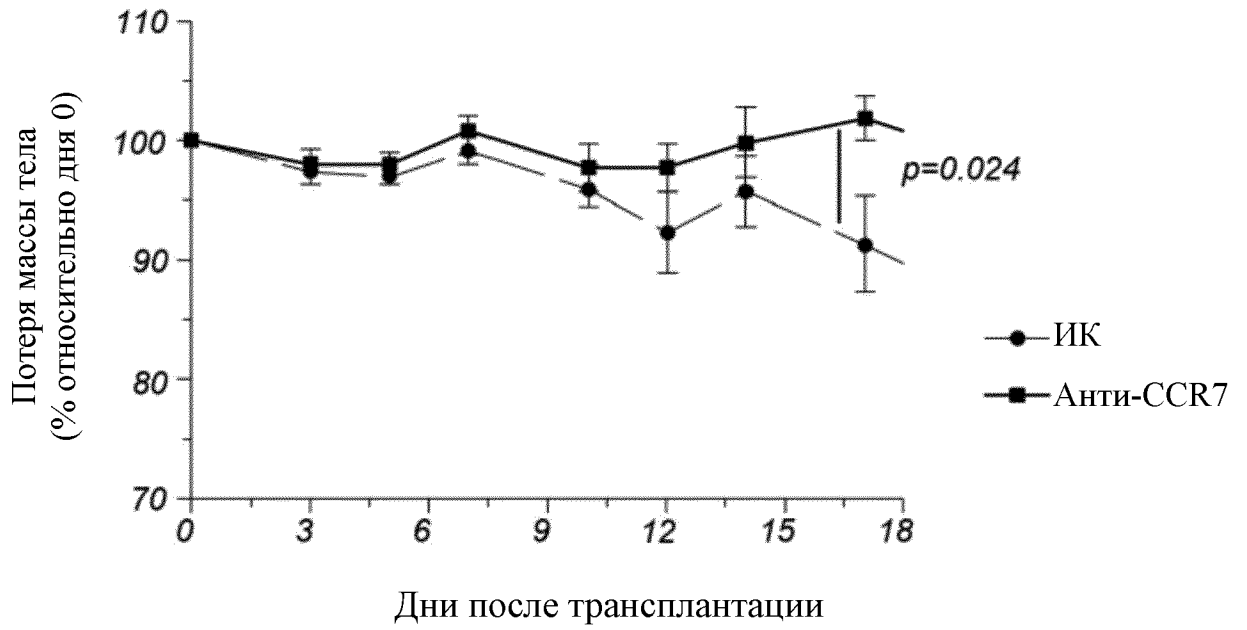


D

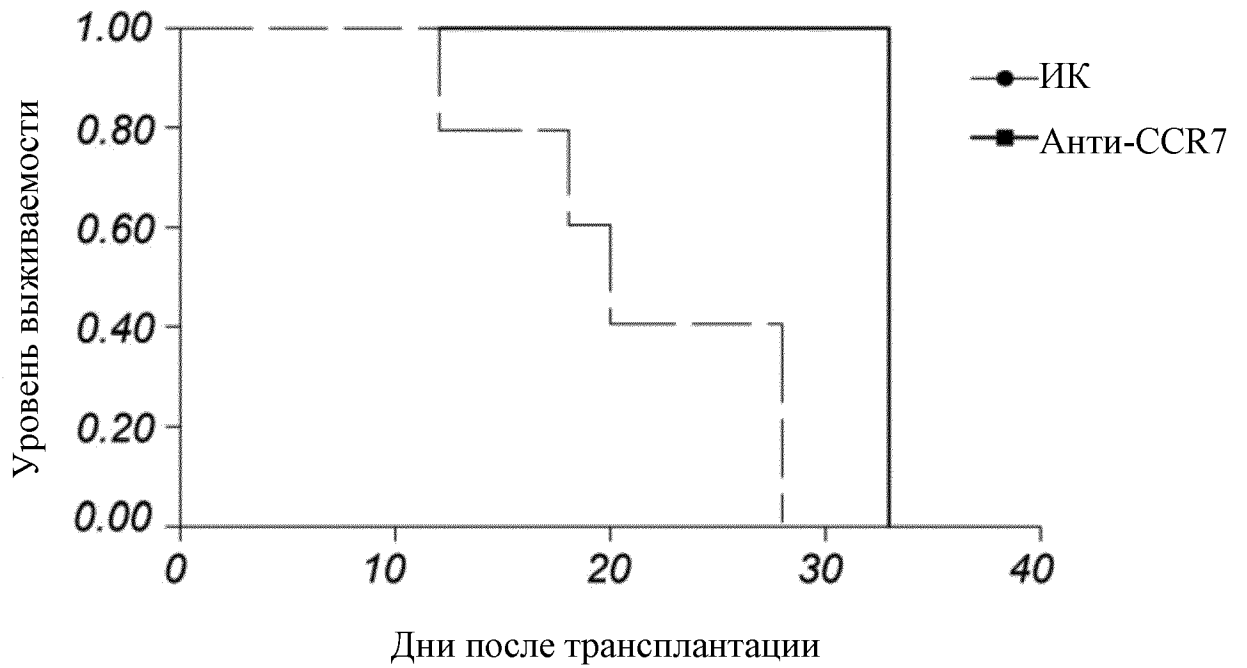


Фигура 2

А

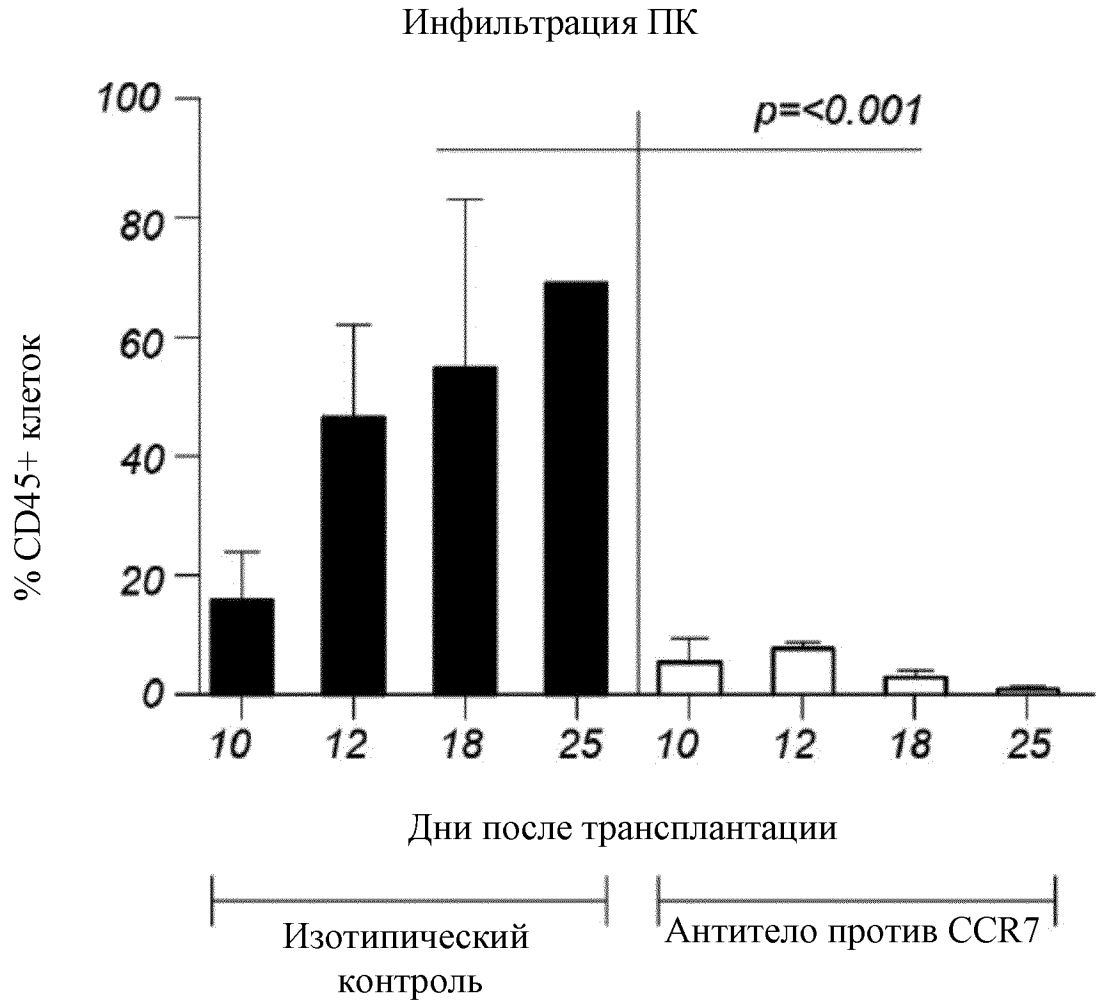


В

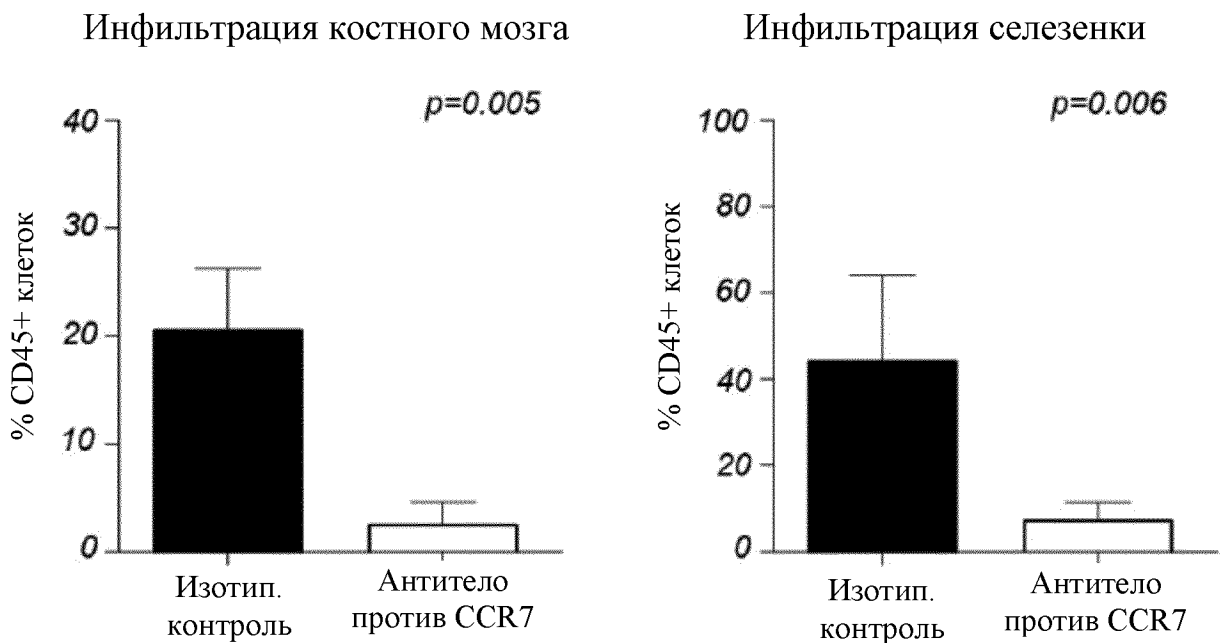


Фигура 2 (продолжение)

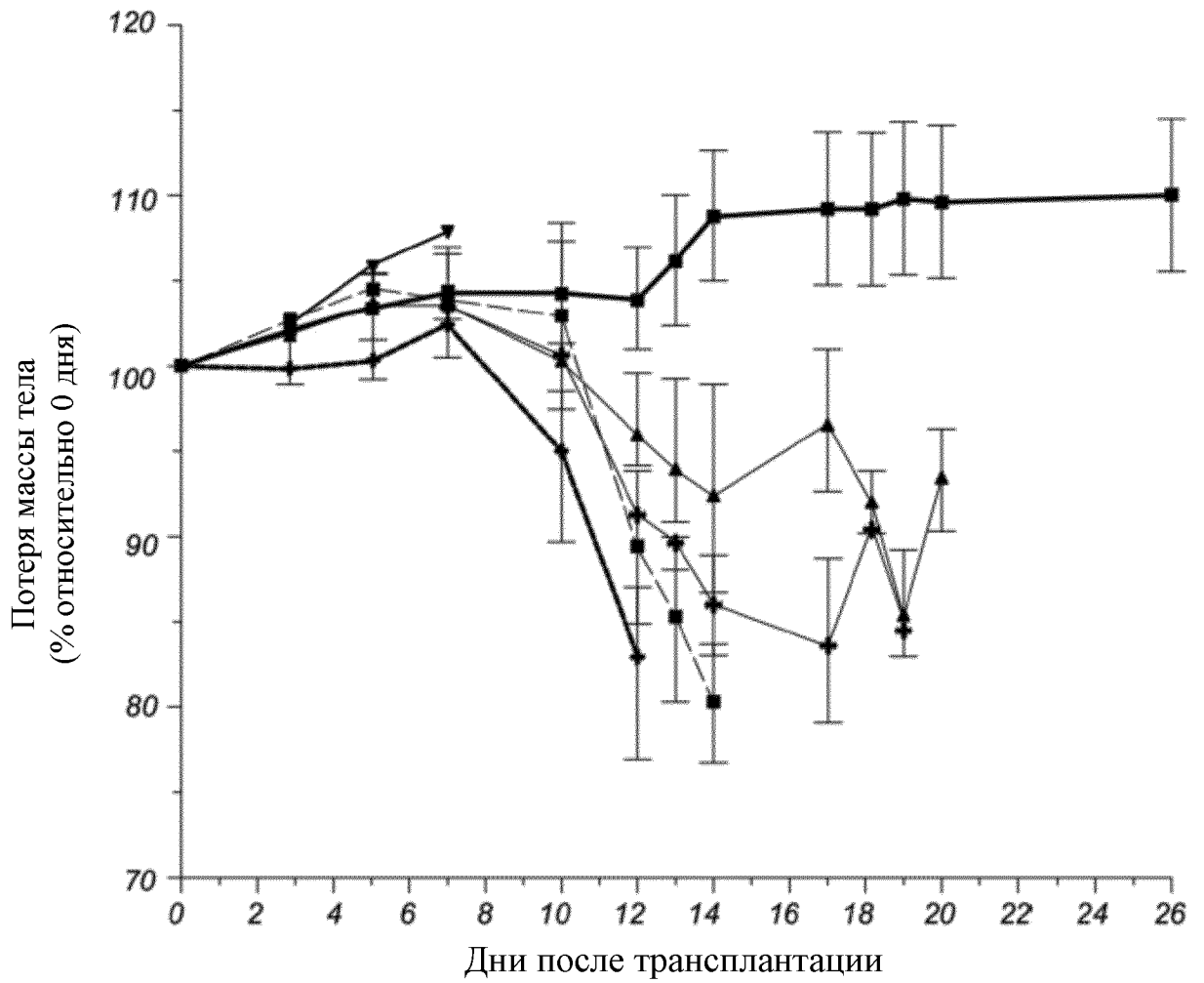
С



D



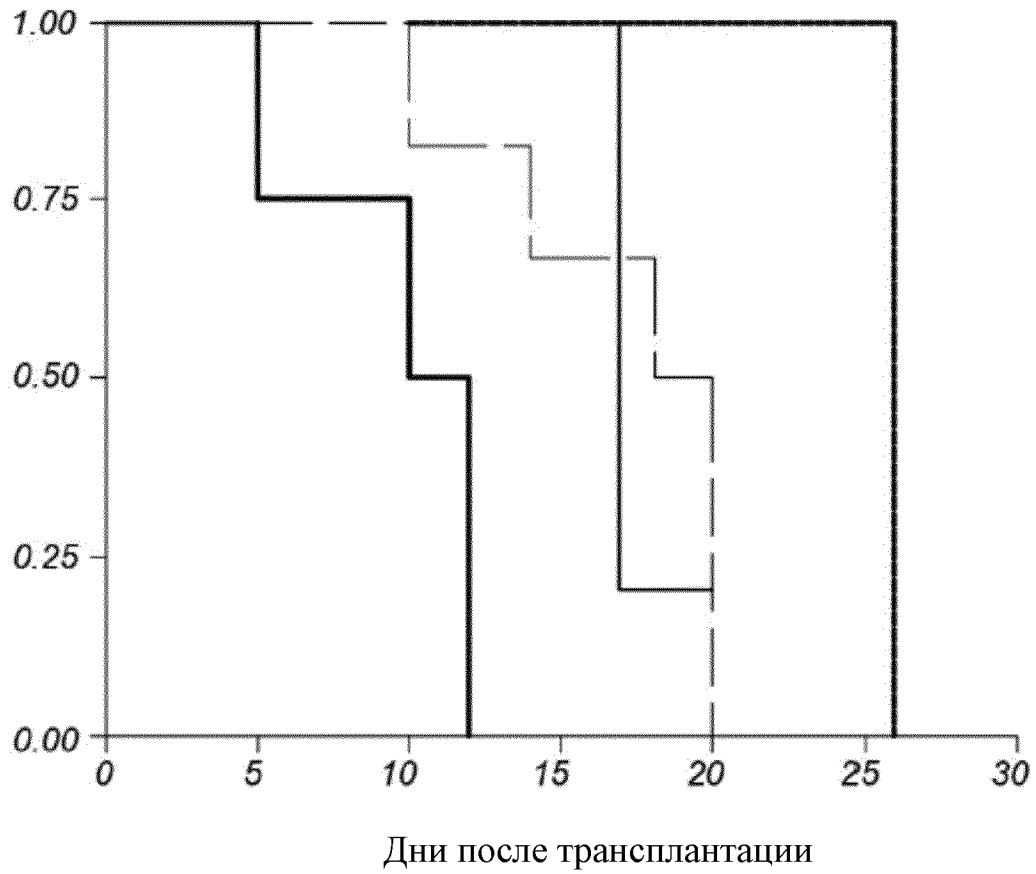
Фигура 3А



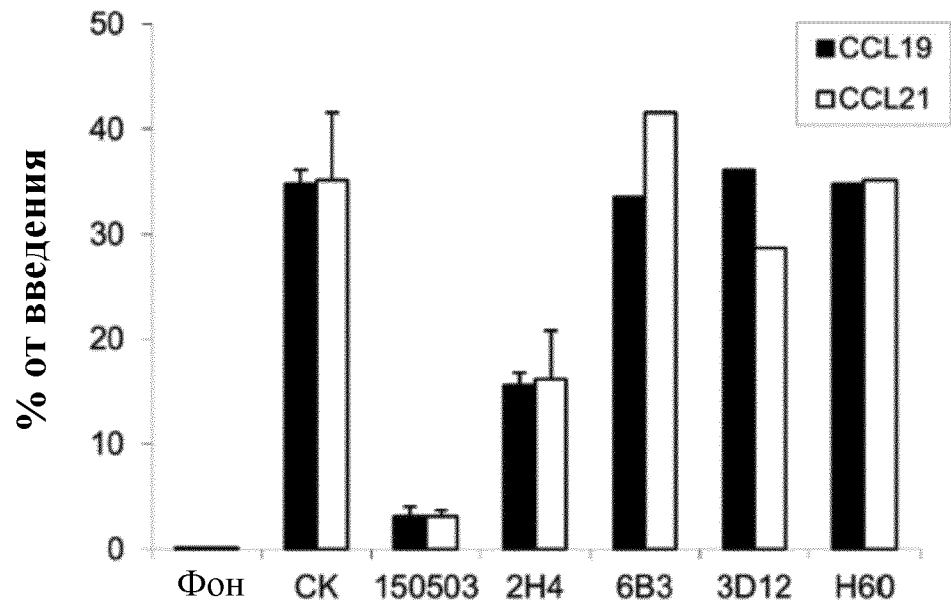
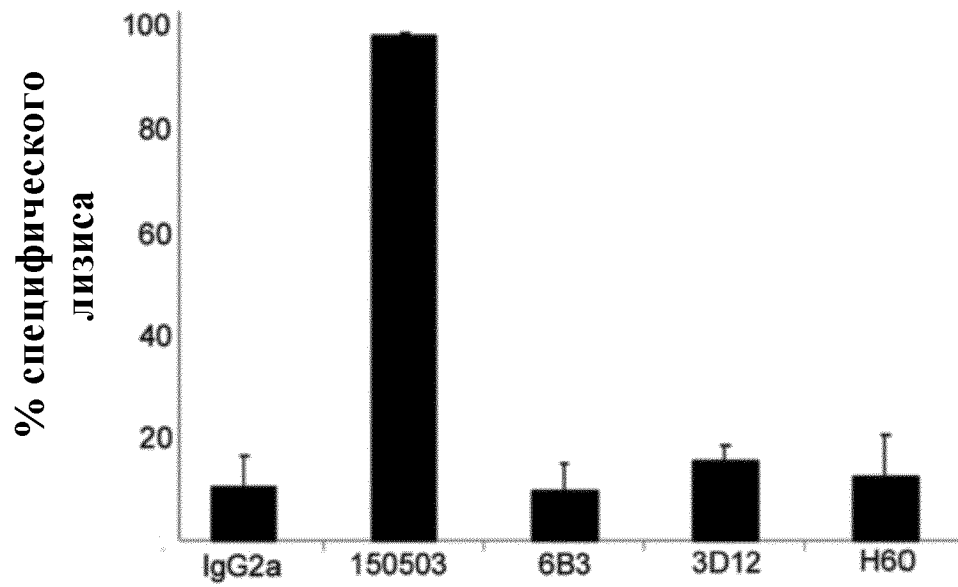
- Антитело против CCR7, +3 день
- ИК, +3 день
- ▲ Антитело против CCR7, +7 день
- ▼ ИК, +7 день
- ◆ Антитело против CCR7, +10 день
- ◆ ИК, +10 день

Фигура 3В

— Анти-CCR7, +3 день
— Анти-CCR7, +7 день
— Анти-CCR7, +10 день
— ИК

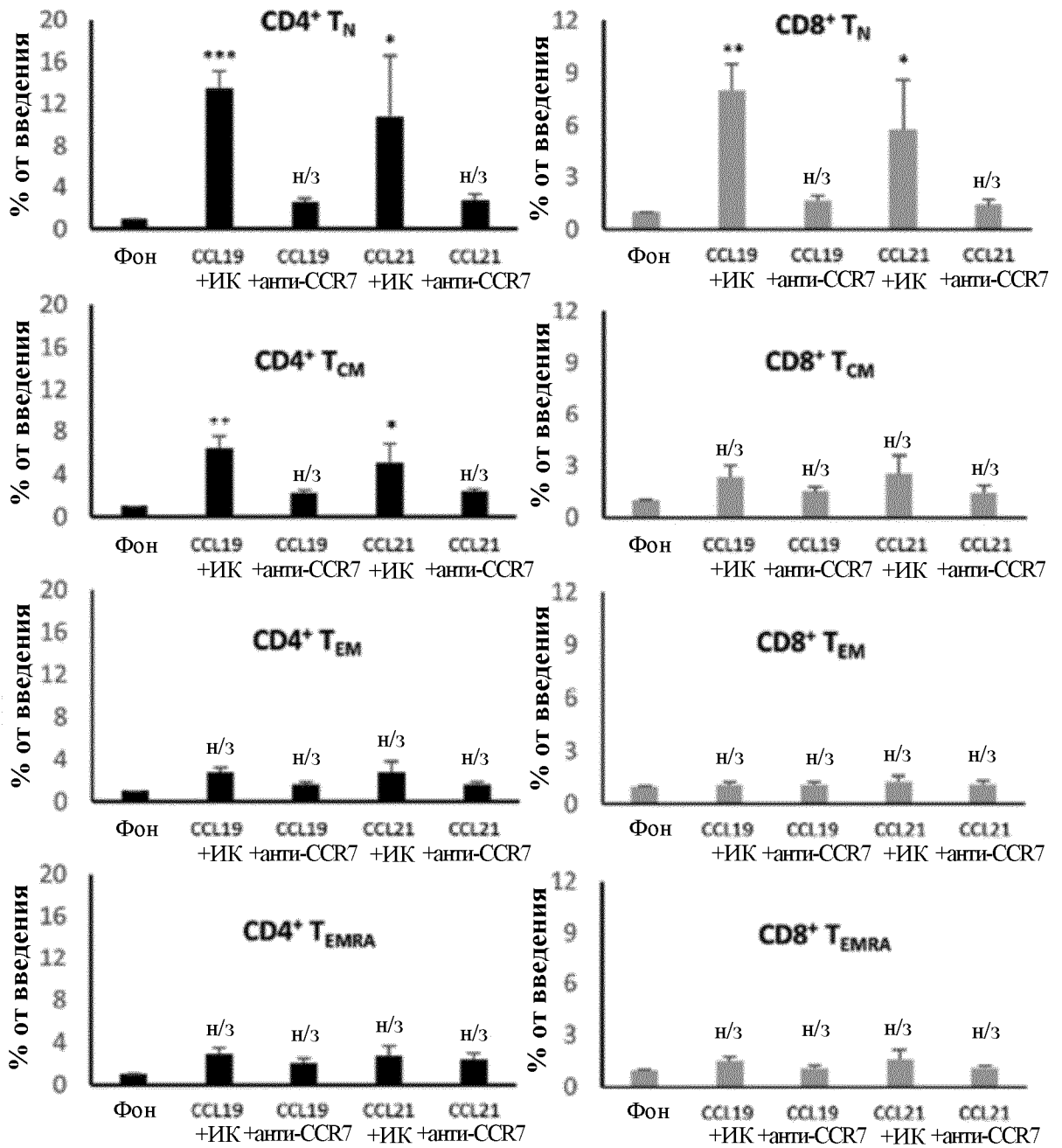


Фигура 4

A**B**

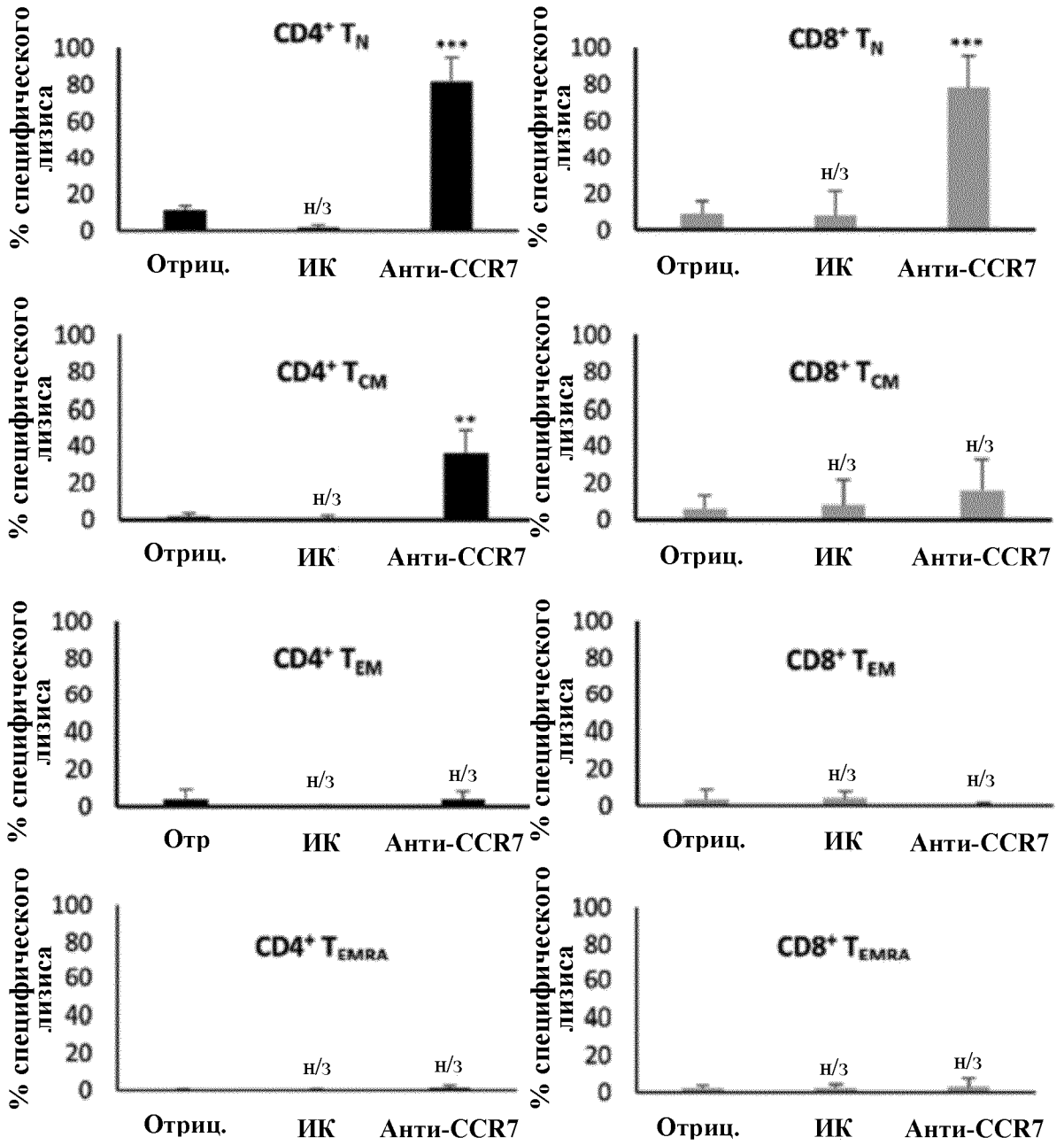
Фигура 5А

А

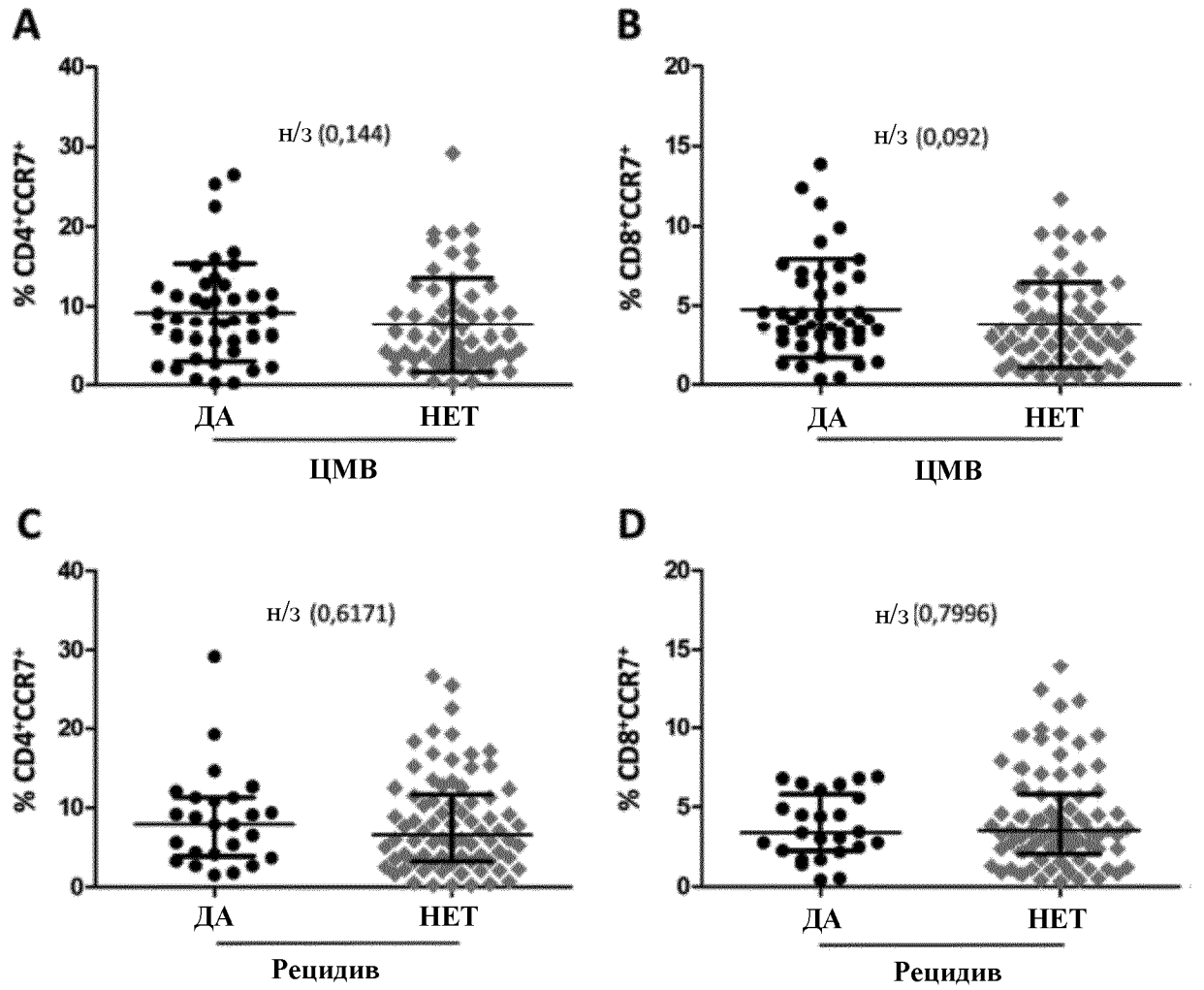


Фигура 5В

В



Фигура 6



Фигура 7

