

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039303**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.01.11

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

(21) Номер заявки
201692460

(22) Дата подачи заявки
2015.06.10

(54) АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННЫЕ НА CD127

(31) **62/010,117; 15305078.6**

(56) WO-A2-2011094259
WO-A1-2013056984
WO-A1-2011104687

(32) **2014.06.10; 2015.01.23**

(33) **US; EP**

(43) **2017.04.28**

(86) **PCT/EP2015/062993**

(87) **WO 2015/189302 2015.12.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОСЕ ИММУНОТЕРАПЕУТИКС (FR)

(72) Изобретатель:
**Пуарье Николя, Мари Каролин,
Ванхов Бернارد (FR)**

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

(57) Изобретение относится к антителам, которые направлены на CD127, альфа-цепь рецептора (IL-7R) интерлейкина 7 (IL-7) и которые характеризуются антагонистическими свойствами в отношении взаимодействия IL-7-IL-7R, могут проявлять цитотоксическую активность в отношении CD127-положительных клеток, но не повышают созревание дендритных клеток (DC), индуцируемое TSLP, цитокином, также использующим CD127 в составе своего рецептора. В качестве альтернативы или дополнения эти антитела не индуцируют интернализацию CD127 и/или ингибируют индуцируемую IL-7 интернализацию CD127. В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предполагаются антитела, которые распознают эпитоп человеческого CD127, содержащий последовательности из сайта 2b в CD127, в частности эпитоп, содержащий последовательности человеческого CD127 из домена D1 и из сайта 2b в CD127, в частности эпитоп содержит по меньшей мере одну последовательность из D1, содержащую SEQ ID No: 115 (в частности, содержащую SEQ ID No: 110) и/или SEQ ID No: 111, и/или последовательность из сайта 2b, содержащую последовательность SEQ ID No: 116, и необязательно также содержит SEQ ID No: 117 (в частности, содержит SEQ ID No: 111). Соответственно антитела в соответствии с настоящим изобретением являются подходящими для применения с целью излечения состояния, диагностируемого у пациента-человека, которое является результатом патогенеза, связанного с лимфопозом, когда пути передачи сигнала с участием IL-7 вносят вклад в указанный патогенез, в особенности, когда нежелательным является повышение созревания дендритных клеток, более точно повышение экспрессии костимулирующих молекул в них.

B1**039303****039303****B1**

Настоящее изобретение относится к области антител, направленных на альфа-субъединицу рецептора для интерлейкина 7 (IL-7), обозначаемую CD127, или p90 IL-7R, или IL-7R α , или IL-7R α , иногда также называемую IL-7R α , в особенности, на альфа-цепь рецептора для человеческого IL-7, экспрессируемого на человеческих клетках. Эти антитела характеризуются антагонистическими свойствами в отношении взаимодействия IL-7-IL-7R, могут проявлять цитотоксическую активность в отношении CD127-положительных клеток, но не повышают созревание дендритных клеток (DC), индуцируемое TSLP, цитокином, также использующим CD127 в составе своего рецептора. В качестве альтернативы или дополнения, эти антитела не индуцируют интернализацию CD127 и/или ингибируют индуцируемую IL-7 интернализацию CD127. В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предполагаются антитела, которые распознают эпитоп человеческого CD127, содержащий последовательности из сайта 2b в CD127, в частности, эпитоп содержит последовательности человеческого CD127 из домена D1 и из сайта 2b в CD127, в частности, эпитоп содержит по меньшей мере одну последовательность из D1, содержащую SEQ ID No: 115 (в частности, содержащую SEQ ID No: 110), и последовательность из сайта 2b, содержащую, последовательность SEQ ID No: 116, и необязательно также содержит SEQ ID No: 117 (в частности, содержит SEQ ID No: 111).

Соответственно антитела в соответствии с настоящим изобретением являются подходящими для применения с целью излечения состояния, диагностируемого у пациента-человека, которое является результатом патогенеза, связанного с лимфопозом, когда пути передачи сигнала с участием IL-7 вносят вклад в указанный патогенез, в особенности, когда нежелательным является повышение созревания дендритных клеток, более точно, повышение экспрессии костимулирующих молекул в них.

Биохимия

CD127 является общим для рецептора IL-7 (IL-7R) и для рецептора TSLP (TSLPR). IL-7R составлен гетеродимером из CD127 и общей гамма-цепи (γ c) интерлейкиновых рецепторов. Общая гамма-цепь γ c иногда называется в данном документе и в литературе CD132. IL-7R связывается с интерлейкином 7. Рецептор TSLP представляет собой гетеродимер из CD127 и фактора 2, подобного цитокиновому рецептору (CRLF2).

Рецептор TSLP связывается TSLP. В литературе TSLPR иногда используется для обозначения как CRLF2-цепи рецептора, так и комплекса CD127/CRLF2. Во избежание путаницы, в дальнейшем TSLPR обычно обозначает комплекс.

CD127 (номер доступа в базе данных Swiss Prot P16871) может существовать в четырех изоформах. Каноническая изоформа, также называемая H20 (Swiss Prot P16871.1), представляет собой однократно проходящий через мембрану трансмембранный белок, имеет 459 аминокислот и состоит, в направлении от N-конца к C-концу, из 20-аминокислотного сигнального пептида, 219-аминокислотного внеклеточного домена, 25-аминокислотного трансмембранного домена и 195-аминокислотного внутриклеточного домена. У других изоформ одинаковой является последовательность всего (или большей части) внеклеточного домена H20 и проявляются изменяющиеся C-концевые последовательности. Изоформы 2 и 4 являются секретлируемыми (Swiss Prot P16871-4 и P16871-3), тогда как изоформа 3 (Swiss Prot P16871-2) также представляет собой трансмембранный белок. Последовательность CD127 без сигнального пептида представлена в данном документе в виде SEQ ID No: 57. Что касается пронумерованных аминокислот в CD127 в настоящей заявке, указанная последовательность будет служить в качестве эталона для нумерации. Сообщалось, что CD127 имеет последовательность SEQ ID No: 113, и его внеклеточный домен, когда сигнальный пептид удален, имеет последовательность SEQ ID No: 114. Если не указано иное, нумерация, используемая в данном документе для аминокислот в CD127 представляет собой нумерацию из SEQ ID No: 114.

CD127 представляет собой рецептор класса I цитокиновых рецепторов (CRH1). Как широко известно в уровне техники, внеклеточный домен этих рецепторов состоит из двух доменов фибронектина типа 3, называемых D1 и D2. Точная кристаллографическая структура CD127 была опубликована и обсуждалась, например, в McElroy et al., 2009; McElroy et al., 2012, и Walsh, 2012, и, в частности, была раскрыта в виде данных о структуре белка в базе данных Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) под номером доступа 3UP1. В общем, D1 считается вовлеченным в связывание с IL-7, тогда как D2 вовлечен в связывание с γ c-цепью (а также с IL-7). Важно, что сайт 2b в домене D2, состоящий, по сути, из аминокислот 109-127 в SEQ ID No: 114 (см. Walsh, 2012), является критически важным для взаимодействия CD127- γ c, в частности, обеспечивая возможность связывания или повышая связывание CD127 с γ c в присутствии IL-7. В частности, полагают, что мутации в P112 и L115, которые были идентифицированы у пациентов, страдающих от тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID), дестабилизируют гидрофобную сердцевину домена D2, что, вероятно, приводит в результате к их патогенетическим проявлениям. Как указано выше, сайт 2b состоит, по сути, из аминокислот 109-127; специалист в данной области техники поймет, что крайние точки такого домена не обязательно могут определяться однозначно с точностью до одного основания, и что сайт 2b, как можно понять, содержит либо на одном из концов, либо на обоих концах упомянутой последовательности на 1, 2 или 3 аминокислоты больше или меньше. Таким образом, при упоминании в данном документе сайта 2b в CD127, он,

как следует понимать, относится к последовательности в CD127, начиная с положения 106, 107, 108, 109, 110, 111 или 112 и заканчивая положением 124, 125, 126 или 127; в частности, к такой последовательности, которая, как полагают или как показано, составляет необходимый сайт связывания с γ -цепью в IL-7-R, в частности, в присутствии IL-7.

Передача сигнала с участием IL-7R

Связывание IL-7 с IL-7R запускает активацию нескольких путей передачи сигнала, в том числе Янус-киназа (JAK) 1 и 3, передатчика сигнала и активатора транскрипции 5 (STAT5) и фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3-k). Сообщается, что активируются пути с участием STAT1 и STAT3, хотя они не представляются главными путями. Активация пути STAT5 требуется для индукции антиапоптотического белка Bcl-2 и предотвращения попадания проапоптотического белка Bax в митохондрию и, следовательно, для выживания развивающихся предшественников Т-клеток в тимусе. Активация пути PI3-k приводит в результате к фосфорилированию и удержанию в цитоплазме проапоптотического белка Bad.

Передача сигнала с участием TSLPR

Тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP) представляет собой цитокин эпителиальных клеток, который является активным при лимфопозе и, в частности, вовлечен в регуляцию развития клеток иммунной системы, причем указанная регуляция затрагивает, в частности, созревание указанных клеток. Человеческий TSLP (номер доступа в Genbank AF338732) представляет собой фактор, который вызывает поляризацию дендритных клеток и стимулирует пролиферацию и дифференцировку Т- и В-клеток. TSLP также подавляет образование Treg клеток (Lei et al., 2011).

Было показано, что индуцируемые TSLP пути передачи сигнала отличаются на молекулярном уровне от индуцируемых IL-7 путей. В частности, хотя связывание TSLP с его рецептором также активирует Jak-1, оно не активирует Jak-3, а активирует Jak-2. Эти отличия согласуются с наблюдением, что Jak-1 соединяется с CD127, который является общим для обоих рецепторов, тогда как Jak-2 соединяется с CRLF2, и Jak-3 - с γ с (Rochman et al., 2010). Об активации пути с участием STAT5 также сообщалось для индуцируемой TSLP передачи сигнала (Zhong et al., 2014). Один главный эффект TSLP заключается в том, что он приводит к активации дендритных клеток, в том числе к сверхэкспрессии костимулирующих молекул, таких как CD80, тем самым стимулируя опосредованные TH-2 воспалительные реакции (Reche et al., 2001).

Клеточная биология

Термин "CD127-положительные клетки" обозначает клетки, экспрессирующие CD127 на своей клеточной поверхности. В большинстве случаев, CD127-положительные клетки экспрессируют CD127 в комплексе, образующем IL-7R (IL-7R-положительные клетки) и/или в комплексе, образующем TSLPR (TSLPR-положительные клетки). CD127 экспрессируется различными клетками, в том числе как Т-клетками памяти, так и наивные Т-клетками. CD127 экспрессируется, в частности, эффекторными Т-клетками (Teff), в том числе покоящимися Т-клетками и Т-клетками памяти, и незрелыми В-клетками, но не экспрессируется, в частности, покоящимися натуральными регуляторными Т-клетками (натуральными Treg). IL-7R α является необходимым для стимуляции дифференцировки тимоцитов и клонального размножения лимфоцитов.

Важность пути с участием IL-7-CD127 для гомеостаза наивных Т-клеток подчеркивается несколькими недавними исследованиями, показывающими, что уровни экспрессии мембраносвязанного IL-7R α на обычных CD4⁺ Т-клетках коррелируют с частотами обнаружения CD4⁺ Т-клеток-недавних эмигрантов из тимуса (RTE) у здоровых индивидов и ВИЧ-инфицированных пациентов, а также у пациентов с MS (Albuquerque et al., 2007) (Broux et al., 2010). IL-7R α также является компонентом рецептора TSLP. Было продемонстрировано, что секреция TSLP тельцами Гассала, структурами, состоящими из эпителиальных клеток в медуллярной области тимуса, создает условия для индукции CD11c⁺ миелоидными дендритными клетками (MDC) дифференцировки тимоцитов в Treg (Watanabe et al., 2005a). Соответственно для развития Treg требуются сигналы от рецептора IL-7, как показано у нокаутных по IL-7R α мышей (Mazucchelli et al., 2008). В статье (Haas et al., 2011) авторы показали пониженную экспрессию IL-7R α на обычных Т-клетках и повышенные уровни IL-7 в плазме вместе со снижением частот обнаружения Treg-недавних эмигрантов из тимуса и функцией Treg при MS без явного генетического влияния (Haas et al., 2011).

Анализ того, как IL-7 регулирует перемещение своего когнатного рецептора через мембрану, является ключевым для исчерпывающего понимания роли IL-7/IL-7R в функционировании лимфоцитов. В предыдущих исследованиях предполагалось, что стимуляция Т-клеток IL-7 ведет к понижающей модуляции экспрессии CD127 на поверхности в течение 30 минут, возможно, вследствие интернализации рецептора. В последующие моменты времени (2-6 часов) IL-7, как было показано, индуцирует понижающую регуляцию транскрипции CD127. Тем не менее, фактические динамические характеристики интернализации CD127 и регуляцию IL-7 механизмов его перемещения через мембрану все еще следует выяснить (Henriques et al., 2010). Также предполагалось, что индуцируемая IL-7 передача сигнала зависит от интернализации CD127, и что дальнейшее разрушение рецептора обусловлено активностью JAK3 и опосредовано как протеасомами, так и лизосомами.

Патофизиология

Дендритные клетки после созревания экспрессируют высокие уровни костимулирующих молекул, таких как CD80, который стимулирует опосредованные Т-клетками иммунные реакции. Они также продуцируют цитокин TARC (CCL17), который индуцирует хемотаксис у Т-клеток. Сами по себе зрелые дендритные клетки вносят вклад в патофизиологию нескольких иммуноопосредованных заболеваний, в которых играют роль Т-клеточные реакции, как например, при астме, ревматоидном артрите, колите, рассеянном склерозе и увеите. Зрелые дендритные клетки также играют ключевую роль в процессе отторжения аллотрансплантатов клеток, тканей или органов. Таким образом, целью многих терапевтических стратегий является предотвращение созревания дендритных клеток.

Наличие или отсутствие костимулирующих молекул на антигенпрезентирующих клетках (APC), таких как дендритные клетки, оказывает значительное влияние на качественный и количественный характер иммунной реакции. Сверхэкспрессия CD80 дендритными клетками вызывает созревание DC и повышает активацию Т-клеток памяти (Bour-Jordan et al., 2011). В точки зрения механизма взаимодействия CD28 с CD80 затрагивает центральный кластер иммунологического синапса и локализуется совместно с занятым TCR, тем самым стабилизируя иммунный синапс (Dustin and Shaw, 1999) (Grakoui et al., 1999). Взаимодействие между CD28 и CD80 фактически создает надлежащее размещение в пространстве для эффективного взаимодействия TCR с молекулами HLA (Shaw and Dustin, 1997).

Рассеянный склероз (MS) представляет собой воспалительное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы (CNS). Возникновение демиелинизирующих бляшек в CNS пациентов с MS связано с воспалительным инфильтратом, состоящим, главным образом, из макрофагов и Т-лимфоцитов. На уровне механизма MS считается аутоиммунным заболеванием. Как правило, MS считается заболеванием, опосредованным преимущественно CD4⁺ Т-клетками. Конкретные субпопуляции CD4⁺, Th1 и, как стало известно в последнее время, Th17, вовлечены в патофизиологию заболевания. В настоящее время все еще сложно определить конкретные роли каждой субпопуляции Th1 и Th17. Более того, ингибирование перемещения лейкоцитов за счет антагонизма альфа-4(α4)-интегрина теперь утверждено в качестве терапевтического подхода для лечения воспалительных заболеваний, таких как MS и воспалительное заболевание кишечника (IBD), а также для лечения атеросклероза (Zhi et al., 2014). α4β7 экспрессируется на более ограниченном наборе лейкоцитов, включающем в себя активированные макрофаги, субпопуляции лимфоцитов, NK-клетки, тучные клетки и эозинофилы.

Человеческий IL-7 индуцирует сильную экспрессию α4- и β7-интегринов *in vitro* на человеческих Т-лимфоцитах и резко повышает частоту обнаружения человеческих Т-лимфоцитов, экспрессирующих α4-, β7- и α4/β7-интегрины (фиг. 19), которые требуются для хоуминга Т-лимфоцитов и их удержания в тканях, не относящихся к лимфоидным, таких как ткани кишечника, головного мозга и кожи (Denucci et al., 2009; Gorfú et al., 2009).

Наивные Т-клетки отчасти ответственны за острое отторжение трансплантированных органов и тканей. Эти клетки могут подвергаться контролю современными иммунодепрессивными лекарственными средствами (ингибиторы кальциневрина) и моноклональными антителами, которые блокируют костимуляцию (средства, противодействующие адгезии, ингибиторы CD80/86). Т-клетки памяти также являются ответственными за отторжение трансплантата. Т-клетки памяти накапливаются у человека в результате проявившихся за время жизни иммунных реакций, главным образом, предшествующих реакций против вирусов. Было показано, что Т-клетки памяти могут повторно активироваться аллоантигенами в результате "гетерологичного иммунитета", который представляет собой перекрестную реакцию противовирусных защитных механизмов человека с аллоантигенами (Adams et al., 2003). Гетерологичный иммунитет представляет собой сильное препятствие для индукции толерантности, поскольку Т-клетки памяти, в отличие от наивных Т-клеток, запрограммированы на быструю активацию с уменьшенными требованиями в отношении костимулирующих сигналов. Т-клетки памяти также могут быть вовлечены в хроническое отторжение. Наряду с их ролью в трансплантации органов и тканей, наивные Т-клетки и Т-клетки памяти также совместно ответственны за многие аутоиммунные заболевания. Это относится к язвенному колиту (Shinohara et al., 2011), ревматоидному артриту, псориазу или реакции "трансплантат против хозяина".

Более того, было показано, что у некоторых злокачественных клеток проявляется IL-7R. Это относится к кожной лимфоме при синдроме Сезари (60% из них) или детскому острому лимфобластному лейкозу, при котором приблизительно в 15% случаев проявляется мутация с приобретением функции в CD127, делающая эти опухоли частично IL-7-зависимыми (Shochat et al., 2011).

Сокращение количества Т-лимфоцитов являлось очевидным подходом в иммуносупрессии для противодействия отторжению аллотрансплантата или борьбы с аутоиммунными реакциями. Тем не менее, полное истощение Т-клеток может не быть благоприятным для индукции иммунологической толерантности. Целенаправленное воздействие на субпопуляции Т-клеток или избирательно активированные Т-клетки без модификации Treg клеток может составлять про-толерогенный подход (Haudebourg et al., 2009). Таким образом, CD127 можно считать потенциальным привлекательным терапевтическим средством для моноклональных антител (Mab), направленных на модуляцию иммунных реакций, поскольку

такие моноклональные антитела могут иметь потенциал в плане сокращению количества эффекторных, а не регуляторных лимфоцитов. Соответственно, предполагалось, что они могут проявлять эффективность при трансплантации, аутоиммунных реакциях (Michel et al., 2008) и злокачественных опухолях за счет противодействия доступу IL-7 к IL-7-R и, таким образом, ограничения функционирования и роста T- и B-клеток.

Терапия моноклональным антителом в отношении CD127⁺-клеток, которое создает препятствие на пути с участием IL-7, может достигнуть этой цели за счет ликвидации/нейтрализации наивных T-клеток и T-клеток памяти и/или снижения их количества при сохранении Treg клеток или за счет ликвидации или снижения количества CD127-положительных злокачественных клеток. Тем не менее, терапия моноклональным антителом против CD127⁺-клеток может действовать как обоюдоострый меч, если она приводит к активации дендритных клеток. В действительности, CD127 также экспрессируется дендритными клетками в сочетании с CRLF2, образуя рецептор TSLP. В присутствии TSLP дендритные клетки становятся активированными и стимулируют опосредуемые T-клетками иммунные реакции. Некоторые моноклональные антитела к CD127, предположительно за счет модификации характера взаимодействия TSLP с рецептором TSLP, характеризуются свойством, заключающимся в повышении созревания дендритных клеток, индуцируемого TSLP (как показано на фиг. 7 при типичных условиях). Как следствие, терапия моноклональным антителом к CD127, которое не будет повышать созревание дендритных клеток, индуцируемое TSLP, будет предоставлять терапевтическое преимущество. Она будет предоставлять преимущество блокады IL-7R без недостатка, заключающегося в активации дендритных клеток в подвергшейся воспалению среде, содержащей TSLP.

В публикации (Rasaré et al., 2009) авторы анализировали значение альфа-рецептора IL-7 (IL-7R α) в качестве возможной терапевтической мишени при трансплантации. Рассмотрев экспрессию IL-7R α на различных T-клетках и восприимчивых к IL-7 клетках, авторы определяли, может ли целенаправленное воздействие на T-клетки памяти, экспрессирующие IL-7R α , продлить срок выживания аллотрансплантата у мышей, и сделали выводы, что целенаправленное воздействие на IL-7 или IL-7R α преимущественно не будет затрагивать Treg клетки. Из перспектив авторы обратили внимание на то, что целенаправленное воздействие либо на IL-7, либо на IL-7R α при терапевтическом лечении может иметь разные последствия для выживания клеток, экспрессирующих CD127, и может вызывать разные типы лимфопении. Вопрос эффектов антител, которые будут направлены на IL-7R α , в зависимости от того, будут ли они представлять собой блокирующие, или нейтрализующие, или цитотоксичные антитела, также ставился с концептуальной точки зрения. Тем не менее, авторы не показали получение и анализ таких антител, а скорее выразили потребность в дальнейшем изучении для оценки обоснованности данной гипотезы.

С учетом недостатков доступных терапевтических подходов при связанных с иммунными реакциями заболеваниях, а также при других заболеваниях, в которых задействованы IL-7/IL-7R α , таких как разные типы злокачественных опухолей, в том числе некоторые злокачественные опухоли молочной железы, все еще существует потребность в дополнительных кандидатах на роль лекарственного средства, в особенности, в кандидатах, активных в отношении более избирательных мишеней, с целью контроля, например модуляции, активации иммунных реакций у пациентов-людей.

В этом контексте моноклональные антитела к IL-7R α , характеризующиеся антагонистическими свойствами в отношении IL-7R α , были раскрыты в международной заявке WO 2010/017468, а их гуманизированные варианты - в международной заявке WO 2011/094259 с целью лечения аутоиммунных заболеваний, подобных рассеянному склерозу. Указано, что описанные антитела противодействуют связыванию IL-7 с его рецептором и являются активными в отношении размножения и выживания T_H17 и T_H1 клеток, для которых, как было указано, требуется взаимодействие IL-7 с рецептором CD127 на них. Эффект этих антител в отношении созревания иммунных клеток и, в особенности, дендритных клеток, не рассматривался. Кроме того, эти антитела, как указано, не ингибируют индуцируемую TSLP продукцию TARC (с. 107 в международной заявке WO 2011/094259). Аналогично, антитела к CD127, описанные в международной заявке WO 2011/104687 или WO 2013/056984, которые предусматриваются для применения в лечении диабета, волчанки, ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний, не обсуждались в отношении их возможного воздействия на созревание дендритных клеток, и об их взаимодействии с индуцируемой TSLP передачей сигнала не сообщалось. Кроме того, как опубликовано Kern и соавт. (Kern et al., 2013; Kern et al., 2015) и как показано в данном документе, антитела к CD127 из уровня техники индуцируют интернализацию рецептора. Поскольку антагонистические антитела к CD127, которые также индуцируют интернализацию CD127, не способны контролировать кожную гиперчувствительность IV типа (фиг. 10), тогда как антагонистические антитела к CD127, которые не индуцируют интернализацию, способны на это, представляется возможным, что процесс интернализации активирует путь передачи сигнала, ослабляющий антагонистический эффект антител. Наконец, антитела из уровня техники распознают эпитоп, который не содержит какой-либо последовательности из сайта 2b в CD127 (т.е., в частности, из аминокислот 109-127 в SEQ ID No: 114); и не было показано, что они нарушают связывание CD127 с ус-цепью в IL-7-R.

Несмотря на современный интерес к разработке антител к CD127, усилия, следовательно, концен-

трировались на ингибировании индуцируемой IL-7 передачи сигнала с участием IL-7R. При этом TSLP и TSLPR были вовлечены в ряд патологий. Было показано, что TSLP играет роль в заболеваниях кожи и легких (He and Geha, 2010) и связан с различными патологиями, в том числе с воспалительным заболеванием дыхательных путей и атопическим дерматитом у человека и мышей (Ying et al., 2008) (Jariwala et al., 2011). Кроме того, было показано, что TSLP связан с регуляцией иммунных реакций и воспаления в кишечнике (Taylor et al., 2009). Другие патологии, в которые вовлечен TSLP и TSLPR, включают в себя детский В-клеточный лейкоз (van Bodegom et al., 2012), аллергические расстройства, специфичные в отношении легких и кожи, заболевания, связанные с аутоиммунными реакциями (Roan et al., 2012), и злокачественную опухоль, в том числе злокачественную опухоль молочной железы (Olkhanud et al., 2011).

Таким образом, хотя в уровне техники в большом количестве источников подтверждается, что антитела к CD127 являются перспективными кандидатами для лечения заболеваний, связанных с аутоиммунными реакциями, посредством противодействия индуцируемым IL-7 и/или опосредуемым IL-7-R механизмам, и что такие антитела также будут связываться с CD127 в контексте рецептора TSLP и препятствовать индуцируемым TSLP и/или опосредуемым рецептором TSLP механизмам, их возможное участие в созревании дендритных клеток не исследовалось, и в уровне техники не сообщалось об улучшении, заключающемся в получении антител, которые не проявляют эффект, заключающийся в повышении созревания дендритных клеток, и/или которые не индуцируют интернализацию CD127, и/или которые ингибируют индуцируемую IL-7 интернализацию.

После неожиданного открытия индуцируемого существующими антителами к CD127 нежелательного повышения созревания дендритных клеток, индуцируемого TSLP (хотя антитела ингибируют индуцируемую TSLP продукцию TARC), авторами настоящего изобретения были разработаны антитела, которые не проявляют такого повышения и, следовательно, являются более подходящими для лечения заболеваний, в частности аутоиммунных заболеваний. Более того, авторами настоящего изобретения было обнаружено, что антитела, которые не индуцируют интернализацию и/или ингибируют индуцируемую IL-7 интернализацию CD127 характеризуются высокой эффективностью, в особенности *in vivo*, по сравнению с антителами из уровня техники, такими как MD707-13.

Настоящим изобретением предполагаются средства, подходящие в данных условиях, относящиеся к моноклональным антителам к IL-7R α , которые оказывают отрицательное воздействие только на путь с участием TSLP. Соответственно моноклональные антитела (Mab) в соответствии с настоящим изобретением не повышают индуцируемое TSLP созревание дендритных клеток, в противоположность тому, что наблюдалось авторами настоящего изобретения с традиционными антителами к CD127. В качестве дополнения или альтернативы, антитела в соответствии с настоящим изобретением не индуцируют интернализацию CD127 и/или ингибируют индуцируемую IL-7 интернализацию CD127. В соответствии с конкретным вариантом осуществления в антителах, обеспечиваемых в соответствии с настоящим изобретением, объединены эти свойства, относящиеся к созреванию DC и/или интернализации, с антагонистической активностью в отношении передачи сигнала с участием IL-7/IL-7-R. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела согласно настоящему изобретению ингибируют индуцируемую IL-7 экспрессию α 4-, β 7- и α 4/ β 7-интегринов в Т-клетках, в частности, *in vivo*. Эти Mab с новыми механизмами действия, таким образом, являются составной частью новых продуктов для оценки терапевтических благоприятных эффектов целенаправленного воздействия на CD127.

Более того, авторами настоящего изобретения раскрыт эпитоп, распознаваемый предпочтительным антителом в соответствии с настоящим изобретением, тем самым обеспечивая возможность непосредственной разработки альтернативных антител и/или их фрагментов, или антигенсвязывающих доменов, или структурно связанных антигенсвязывающих доменов из других типов полипептидов, которые связываются с соответствующим эпитопом и сохраняют желаемые характеристики.

Эпитопы в CD127, распознаваемые N13B2, идентифицировали с помощью сканирования на матрице с пришитыми олигопептидами (иногда называемого сканированием перекрывающимися пептидами или *pepscan*-анализом), и они содержат аминокислотные последовательности человеческого CD127, состоящие из последовательностей *ep1* (SEQ ID No: 110), *ep2* (SEQ ID No: 111) и *ep3* (SEQ ID No: 86). В этой методике используется библиотека олигопептидных последовательностей из перекрывающихся и неперекрывающихся сегментов белка-мишени, и ее исследуют в отношении способности данных последовательностей к связыванию с антителом, представляющим интерес. Комбинируя несмежные пептидные последовательности из разных частей белка-мишени и обеспечивая конформационную жесткость этого комбинированного пептида (как например, за счет использования остовов CLIPS) (Timmerman et al., 2007), прерывающиеся эпитопы можно картировать с очень высокой вероятностью и точностью (Cragg, 2011) (Gaseitsiwe et al., 2010). Дополнительное определение эпитопа с использованием процедур защиты от протеолиза позволяет определить, что конформационный эпитоп содержит аминокислотные последовательности человеческого CD127, имеющие последовательности SEQ ID No: 115, SEQ ID No: 116 и SEQ ID No: 117. Таким образом, эпитоп содержит последовательности из сайта 2b в CD127. Более того, эпитоп содержит последовательности в обоих доменах D1 и D2 в CD127 и, более конкретно, последовательности из домена D1 вместе с последовательностями из сайта 2b. Эпитопы в соответствии с на-

стоящим изобретением более подробно описаны ниже. В частности, указанные эпитопы состоят из SEQ ID No: 115 (или SEQ ID No: 110), SEQ ID No: 116 (или SEQ ID No:86) и SEQ ID No: 117 (или SEQ ID No:111) в их конформационном расположении в нативном CD127.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления моноклональные антитела также проявляют цитотоксическое действие в отношении CD127⁺-клеток-мишеней, что также физически уменьшает их количество (сокращение субпопуляции).

Таким образом, настоящее изобретение относится к макромолекуле, такой как антитело, антиген-связывающий фрагмент антитела или химерная молекула, содержащая антитело или его фрагмент, которая (i) специфично связывается с альфа-цепью рецептора к IL-7 (обозначаемого CD127) посредством взаимодействия антитело-антиген, в особенности, с альфа-цепью рецептора IL-7, экспрессируемого человеческими CD127-положительными клетками, и которая (ii) не повышает созревание дендритных клеток, индуцируемое TSLP (характеризующееся, например, повышенной экспрессией антигенов CD80 и/или CD40 на клеточной поверхности), и/или (iii) не индуцирует интернализацию CD127, и/или ингибирует индуцируемую IL-7 интернализацию CD127.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения указанная макромолекула содержит V_H-цепь, содержащую по меньшей мере одну из следующих аминокислотных последовательностей:

VHCDR1 SEQ ID No:10;
 VHCDR2 SEQ ID No: 12;
 VHCDR3 SEQ ID No: 14 или SEQ ID No: 48;
 VH SEQ ID No: 22;

и/или V_L-цепь, содержащую по меньшей мере одну из следующих аминокислотных последовательностей:

VLCDR1 SEQ ID No: 16 или SEQ ID No: 50;
 VLCDR2 SEQ ID No: 18 или SEQ ID No: 52;
 VLCDR3 SEQ ID No: 20;
 VL SEQ ID No: 24.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления макромолекула проявляет цитотоксическую активность в отношении человеческих T-клеток, экспрессирующих CD127 (CD127⁺-клетки). В соответствии с другими вариантами осуществления макромолекула не проявляет цитотоксическую активность в отношении человеческих T-клеток, экспрессирующих CD127 (CD127⁺-клетки).

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим указанную макромолекулу, способам получения указанных макромолекул и применениям указанных макромолекул и композиций.

Как используется в данном документе, макромолекула обозначает любую молекулу, в особенности, молекулу биологического происхождения или молекулу, содержащую фрагменты биологического происхождения, с молекулярным весом более 500 Да. Макромолекулы включают в себя полипептиды и модифицированные полипептиды, такие как гликозилированные полипептиды и их конъюгаты, но не ограничиваются ими. Как используется в данном документе, макромолекула, которая "специфично связывается с CD127 посредством взаимодействий антитело-антиген", означает, что взаимодействия между указанной макромолекулой и CD127 состоят, по сути, из тех же взаимодействий, что и взаимодействия между антителом, специфичным к CD127, и CD127. В частности, указанная макромолекула может содержать остатки в антителе, которые вовлечены в указанное взаимодействие, в пространственной конфигурации, обеспечивающей возможность образования тех же химических связей с белком CD127. В соответствии с конкретным вариантом осуществления макромолекула содержит по меньшей мере одну последовательность CDR V_H-цепи и/или V_L-цепи антитела. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления макромолекула содержит все из последовательностей CDR V_H-цепи и/или V_L-цепи антитела. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления макромолекула содержит полную V_H-цепь и/или полную V_L-цепь антитела.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления макромолекулу получают, конструируют или подвергают отбору таким образом, чтобы она распознавала эпитоп, определяемый следующими признаками (определяемый по меньшей мере одним из следующих признаков):

(а) эпитоп содержит последовательности, в частности, по меньшей мере 3, 4, 5, 6 или 7 последовательных аминокислот, взятых из сайта 2b в CD127, в частности, из аминокислот 109-127 в SEQ ID No: 114, более конкретно, из аминокислот 110-125, 110-120, 112-120 в SEQ ID No: 114, более конкретно из аминокислот 114-119 в SEQ ID No: 114 (соответствующих SEQ ID No: 116); в частности, эпитоп содержит SEQ ID No: 116, в частности, содержит SEQ ID No:86; в частности, эпитоп содержит P112 или L115 в CD127;

(b) в дополнение к признакам из пункта (а) выше эпитоп содержит последовательности, в частности, по меньшей мере 3, 4, 5, 6 или 7 последовательных аминокислот, взятых из домена D1 в CD127, в частности, из аминокислот 1-98 в SEQ ID No: 114; в частности, эпитоп содержит аминокислотные последовательности SEQ ID No: 115 (в частности, содержит аминокислотную последовательность ep1 (SEQ ID No: 110));

(с) в дополнение к признакам из пункта (а) и необязательно из пункта (b) выше эпитоп содержит последовательности, в частности, 3, 4, 5, 6 или 7 последовательных аминокислот, взятых из аминокислот 180-220 в SEQ ID No: 114, в частности, из аминокислот 190-200; в частности, эпитоп содержит аминокислотную последовательность SEQ ID No: 117; в частности, содержит аминокислотную последовательность ep2 (SEQ ID No: 111);

(d) эпитоп содержит последовательности SEQ ID No: 115 и последовательности SEQ ID No: 116, или эпитоп содержит последовательность SEQ ID No: 117 и последовательности SEQ ID No: 116; в частности, эпитоп содержит последовательности SEQ ID No: 115, SEQ ID No: 116 и SEQ ID No: 117;

(е) эпитоп содержит последовательности в CD127, которые определены в пунктах (а), (b) (с) и/или (d) выше, и не содержит аминокислотные последовательности (из более чем 3, 4 или 5 последовательных аминокислот) в CD127, отличающиеся от напрямую упомянутых, т.е., в частности, эпитоп содержит только следующие последовательности в CD127:

одну последовательность, взятую из сайта 2b, в частности, состоящую из аминокислот 109-127 в SEQ ID No: 114, или аминокислот 110-125, 110-120 или 112-120 в SEQ ID No: 114, или аминокислот 114-119 в SEQ ID No: 114 (соответствующих SEQ ID No: 116), или последовательность, соответствующую SEQ ID No: 86 и/или состоящую из последовательности из 3 аминокислот или более чем 3, 4, 5, 6, 7 аминокислот и из 19 аминокислот или менее чем 19, 18, 15, 11 аминокислот, взятых из сайта 2b, в частности, такую последовательность, содержащую P112 или L115 в CD127;

необязательно, в дополнение к последовательности сайта 2b, одну последовательность, взятую из домена D1 в CD127, в частности, из 98 аминокислот в SEQ ID No: 114, в частности, одну последовательность, состоящую из SEQ ID No: 110 или из SEQ ID No: 115, и/или состоящую из последовательности из 3 аминокислот или более чем 3, 4, 5, 6, 7 аминокислот и из 20 аминокислот или менее чем 20, 18, 16, 11 аминокислот, содержащих SEQ ID No: 115 или содержащихся в последовательности SEQ ID No: 115;

необязательно, в дополнение к последовательности сайта 2b и к необязательной последовательности из домена D1, если они присутствуют, одну последовательность, взятую из аминокислот 180-220 в SEQ ID No: 114; в частности, одну последовательность, состоящую из SEQ ID No: 111 или из SEQ ID No: 117 и/или состоящую из последовательности из 3 аминокислот или более чем 3, 4, 5, 6, 7 аминокислот и из 20 аминокислот или менее чем 20, 18, 16, 11 аминокислот, содержащих SEQ ID No: 117 или содержащихся в последовательности SEQ ID No: 117;

причем указанный эпитоп, возможно, содержит дополнительные аминокислоты при условии, что эти дополнительные аминокислоты не взяты из последовательности CD127 (т.е. при условии, что эпитоп не содержит более чем 3, 4 или 5 последовательных аминокислот из последовательности CD127, за исключением последовательности из сайта 2b, и, возможно, необязательных последовательностей из домена D1 и из аминокислот 180-220 в SEQ ID No: 114, описанной выше);

(f) эпитоп, в дополнение к признаку, описанному в пункте (а), (b), (с) или (d) выше, не содержит более чем 3, 4 или 5 последовательных аминокислот, взятых из участка 99-108 в SEQ ID No: 114, не содержит более чем 3, 4 или 5 последовательных аминокислот, взятых из участка 128-179 в SEQ ID No: 114, и/или не содержит более чем 3, 4 или 5 последовательных аминокислот из участка 220-239 в SEQ ID No: 114, в частности, не содержит более чем 3, 4 или 5 последовательных аминокислот из любого из участков 99-108, 128-179 и 220-239 в SEQ ID No: 114;

(g) эпитоп содержит комбинацию последовательностей из CD127, которые определены в пунктах (а), (b), (с), (d), (е) и/или (f) выше, причем некоторые аминокислоты подверглись мутации, в частности делеции и/или замене, в частности, замене на аминокислоты с подобными свойствами (консервативные замены); в частности эпитоп состоит из последовательностей или содержит последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% идентичные последовательностям в CD127, которые определены в пунктах (а), (b), (с), (d), (е) и/или (f) выше, в комбинации, как определено в пунктах (b), (с) или (d), в случае, когда это является уместным;

(h) эпитоп представляет собой конформационный эпитоп, имеющий признаки, определенные в пунктах (а), (b), (с), (d), (е), (f) и/или (g) выше, т.е. содержит последовательности или состоит из последовательностей, которые определены в пунктах (а), (b), (с), (d), (е), (f) и/или (g) выше, в конформации, которая имитирует конформацию указанных последовательностей в нативном CD127 (либо в виде мономера, либо в виде димера с γ с и/или связанного с IL-7);

(i) эпитоп содержит фрагмент CD127 (т.е. отрезок из последовательных аминокислот) с признаками из пунктов (а), (b), (с), (d), (g) и/или (h) выше;

(j) эпитоп имеет признаки, определенные в пункте (g) выше, и его получают с помощью технологии, такой как технология CLIPS, которая обеспечивает возможность синтеза сборных пептидных ансамблей с предсказуемой структурой.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления эпитопов с признаками из пунктов (b) и (с) эпитоп включает в себя аминокислотную последовательность в CD127, которая лежит между двумя последовательностями ep1 и ep2 и необязательно не продолжалась с включением в себя какой-либо аминокислоты или не продолжалась с включением в себя более чем одной аминокислоты в последовательности человеческого CD127, лежащей выше (т.е. в направлении N-конца относительно последовательно-

сти ер1) и/или ниже (т.е. в направлении С-конца относительно последовательности ер2) этих последовательностей. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления эпитоп является таким, чтобы ни одна из последовательностей ер1 или ер2 не продолжалась с включением в себя любой из аминокислот, смежных с ними в последовательности человеческого CD127, или с включением в себя более чем 7, 5 или 1 последовательной аминокислоты из аминокислот, смежных с ними в последовательности человеческого CD127, которая лежит между ер1 и ер2; продолжение последовательностей ер1 и ер2 в этом случае также может ограничиваться выше (относительно ер1) или ниже (относительно ер2), как указано выше. В соответствии с конкретными вариантами осуществления последовательности CD127, которые содержат последовательности эпитопов, указанные выше, не продолжают так, чтобы они содержали смежные с ними аминокислоты из последовательности человеческого CD127, которые являются смежными с ер1 более чем на 1 аминокислоту с N-конца или более чем на 7 аминокислот с С-конца, или являются смежными с ер2 более чем на 30 аминокислот с N-конца или на 30 аминокислот с С-конца.

В соответствии с вариантами осуществления, при которых макромолекулу получают, конструируют или подвергают отбору таким образом, чтобы она распознавала эпитоп, содержащий несколько несмежных аминокислотных последовательностей в CD127 (т.е. последовательностей, которые не являются смежными в первичной последовательности CD127), возможно получить или отобрать антитела, которые распознают эпитоп, содержащий одну из указанных последовательностей в CD127, а затем отобрать из числа этих антител те, которые распознают другую последовательность(последовательности) в CD127 (указанный последующий отбор можно осуществлять посредством последовательных процедур отбора, если распознаваться должны более чем две несмежные последовательности в CD127).

Настоящее изобретение также включает в себя конформационный эпитоп, распознаваемый антагонистическими антителами в соответствии с настоящим изобретением. Настоящее изобретение также включает в себя антитела, которые связываются с этим конформационным эпитопом. Варианты осуществления включают в себя конформационный эпитоп в CD127, содержащий (i) домен с последовательностью, по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичной SEQ ID NO: 115, и/или домен с последовательностью, по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичной SEQ ID NO: 117, и (ii) домен с последовательностью, по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% идентичной SEQ ID NO: 116. Более конкретно, конформационный эпитоп в CD127 содержит аминокислотные остатки 73-79 и/или 114-119 и аминокислотные остатки 193-196 в SEQ ID No: 114. Настоящее изобретение включает в себя антитела, которые связываются с этим конформационным эпитопом. В соответствии с конкретными вариантами осуществления макромолекулу получают, конструируют или подвергают отбору таким образом, чтобы она распознавала конформационный эпитоп, содержащий аминокислотные последовательности в человеческом CD127, имеющие последовательности SEQ ID No: 115, SEQ ID No: 116 и SEQ ID No: 117.

В частности, в соответствии с описанными выше вариантами осуществления образование антитела индуцируется в ответ на иммуноген, который состоит из описанного эпитопа или содержит описанный эпитоп, т.е. первоначально получают посредством иммунизации животного, которое не является человеком, в частности, млекопитающего, антигеном, содержащим указанный эпитоп или состоящим из него. Соответственно, настоящее изобретение также относится к антигену, который содержит эпитоп, описанный выше, в частности, к его применению в качестве иммуногена при получении антител и/или к его применению в способах отбора и/или исследования для получения антитела, или антигенсвязывающего фрагмента, или другой макромолекулы. Настоящее изобретение также относится к указанным способам применения указанного антигена. Поскольку антигены могут содержать непептидные составляющие в дополнение к пептидным составляющим и/или могут содержать пептидные составляющие, которые не образуют часть эпитопа, в данном документе следует понимать, что, если не указано иное, или это очевидно из контекста, в случае, когда это относится к последовательности антигена и/или к признакам указанной последовательности, указанные последовательность или признаки, как следует понимать, обозначают последовательность (или ее признаки) части антигена, представляющей собой эпитоп. Если антиген содержит аминокислоты, которые не образуют часть эпитопа, указанные аминокислоты предпочтительно не содержат более чем 3, 4 или 5 последовательных аминокислот в CD127.

Если они являются соответствующими, и если они не являются неприменимыми с технической точки зрения, определения и признаки, раскрытые в данном документе в отношении антител или их фрагментов, подобным образом применяются к любой макромолекуле в соответствии с настоящим изобретением.

Связывание CD127

В соответствии с настоящим изобретением "связывание" с белком IL-7R α относится к взаимодействию типа антиген-антитело и охватывает свойства "специфического связывания" антител или их антигенсвязывающих фрагментов, причем специфическое связывание означает, что антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с белком IL-7R α , в то время как они не связываются или связываются со значительно более слабой аффинностью с другими белками (например, общей у-цепью цитокинового рецептора). Специфическое связывание предпочтительно характеризуют и/или определяют в физиологических условиях, в особенности, с учетом pH исследуемого раствора и содержания в нем соли. Связывание

и специфичность связывания можно исследовать в соответствии с анализами, раскрытыми в разделе Примеры, и их, в частности, можно исследовать с помощью анализа методом Вiasore, ELISA или вестерн-блоттинг.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты целенаправленно воздействуют на альфа-цепь IL-7-R и связываются с альфа-цепью IL-7-R, когда она находится в комплексе с рецептором TSLP (с CCRF2; номер доступа в Genbank AF338733; Reche et al., 2001).

В соответствии с конкретным вариантом осуществления антитела или их фрагменты или химерные молекулы согласно настоящему изобретению связываются с CD127 в виде выделенного белка с константой диссоциации (Kd), которая ниже чем 5E-10 M. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления константа диссоциации (Kd) ниже чем 1E-10 M, или ниже чем 9E-11 M, или ниже чем 5E-11 M.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела или их фрагменты, или химерная молекула, или другая макромолекула согласно настоящему изобретению связываются с антигеном человеческого CD127, содержащим последовательности ep1 (SEQ ID No: 110) и/или ep2 (SEQ ID No: 111). В соответствии с конкретными вариантами осуществления антиген содержит фрагмент человеческого CD127, содержащий как ep1, так и ep2 (т.е. антиген содержит последовательности ep1 и ep2 и лежащие между ними последовательности человеческого CD127). В соответствии с другими вариантами осуществления антиген содержит только последовательности ep1 и ep2 из человеческого CD127, возможно, дополнительно к другим последовательностям из другого источника, которые отличаются от последовательностей человеческого CD127. В соответствии с другими вариантами осуществления последовательности ep1 и/или ep2 продолжаются с включением в себя нескольких дополнительных аминокислот из человеческого CD127, в частности до одной аминокислоты с N-конца относительно ep1, до 7 аминокислот с C-конца относительно ep1, до 1, 10, 20 или 30 аминокислот с N-конца относительно ep2, до 7, 10, 20 или 30 аминокислот с C-конца относительно ep2. Конкретные антигены включают в себя антиген, который описан выше, предпочтительно содержащий как ep1, так и ep2, причем последовательность CD127, содержащая ep1, не продолжается так, чтобы она содержала аминокислоты, смежные с указанной последовательностью в последовательности человеческого CD127, или не продолжается так, чтобы она содержала более чем 1 аминокислоту с N-конца или более чем 7 аминокислот с C-конца относительно ep1 в последовательности человеческого CD127; и антиген, который описан выше, причем последовательность CD127, содержащая ep2, не продолжается так, чтобы она содержала аминокислоты, смежные с указанной последовательностью в последовательности человеческого CD127, или не продолжается так, чтобы она содержала более чем 30 аминокислот с N-конца или более чем 30 аминокислот с C-конца относительно ep2 в последовательности человеческого CD127; и антигены, имеющие оба эти признака. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела или их фрагменты, или химерная молекула, или другая макромолекула в соответствии с настоящим изобретением связываются с антигеном человеческого CD127, содержащим последовательности SEQ ID No: 115, SEQ ID No: 116 и SEQ ID No: 117.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антиген не перекрывается с эпитопом или не содержит эпитоп в IL-7R, который распознается моноклональным антителом, выбранным из группы, состоящей из C1GM, C2M3, P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a и HAL403b (описаны в международной заявке WO 2011104687 A1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления образование антитела индуцируется в ответ на антиген, или антитело связывается с эпитопом, которое не содержит какой-либо остаток или не содержит некоторые из остатков I82, K84, K100, T105 и Y192 альфа-рецептора интерлейкина 7, в частности, не содержит K100 и/или не содержит T105. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антиген или эпитоп не содержит K194 или не содержит какой-либо из остатков или не содержит все из остатков, выбранных из группы, состоящей из остатков D190, H191 и K194 в человеческом IL-7R. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антиген или эпитоп не содержит ни I82, ни K84, или не содержит ни K100, ни T105, или не содержит Y192, или содержит ни D190, H191, Y192, ни K194.

Хотя CD127 является общим как для IL-7R, так и TSLPR, следует отметить, что антитело к CD127 не обязательно будет распознавать (т.е. связываться в подходящих условиях) CD127 в обоих контекстах. Более того, даже если антитело связывается с CD127 как в контексте IL-7R, так и TSLPR, оно не обязательно будет оказывать одинаковый эффект в отношении взаимодействия IL-7-IL-7R и взаимодействия TSLP-TSLPR. Оно, например, может предотвращать связывание IL-7 с IL-7R, но не связывание TSLP с TSLPR. Более того, связывание антитела с любым из рецепторов может оказывать разные эффекты помимо разных эффектов в отношении взаимодействия лиганд-рецептор. В действительности, связывание антитела может модифицировать конформацию рецептора независимо от лиганда или в сочетании с лигандом и тем самым активировать или инактивировать рецептор. Эффект может отличаться для любого из рецепторов, и фактически он может быть обратным: антитело, которое инактивирует IL-7R, может активировать TSLPR и наоборот.

Как используется в данном документе, активация рецептора означает запуск по меньшей мере некоторых из биохимических изменений, которые происходят после связывания лиганда с его рецептором.

Эти изменения могут включать в себя модификацию структуры рецептора (например, димеризацию); фосфорилирование рецептора и привлечение и/или фосфорилирование связывающихся с рецептором белков (таких как Янус-киназы, транскрипционные факторы STAT и т.д.) и/или изменения в клеточной локализации рецептора (например, интернализации рецептора). Как используется в данном документе, деактивация рецептора означает предотвращение или обращение по меньшей мере одной из биохимических модификаций, связанных со связыванием его лиганда с рецептором. Например, рецептор может активироваться конститутивно (т.е. активироваться даже в отсутствие лиганда) и деактивироваться в присутствии средства, такого как антитело в соответствии с настоящим изобретением. В качестве альтернативы или дополнения, индуцируемая лигандом активация может полностью или частично ингибироваться при деактивации рецептора. Таким образом, деактивация может происходить, среди прочих механизмов, посредством предотвращения связывания лиганда (и последующих событий "активации"), и/или предотвращения структурных изменений, связанных со связыванием лиганда (например, димеризации), и/или модификации положения рецептора в клетке (например, деактивирующее средство может запускать интернализацию и/или разрушение рецептора и, следовательно, предотвращает активацию лигандом).

Отсутствие повышенного созревания дендритных клеток, индуцируемого TSLP

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут связываться с CD127 в рецепторе TSLP (т.е. могут связываться с CD127, когда он находится в комплексе с CRLF2, образуя рецептор TSLP). Таким образом, антитела в соответствии с настоящим изобретением может препятствовать индуцируемой TSLP и/или опосредованной рецептором TSLP передачи сигнала.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что существующие антитела, которые направлены на CD127 (или которые распознают CD127) в рецепторе TSLP, и которые проявляют некоторый антагонизм в отношении взаимодействия TSLP-TSLPR, все-таки повышают созревание дендритных клеток, индуцируемое TSLP: указанное созревание выше в клетках, обработанных TSLP и антителами, чем в клетках, обработанных только TSLP. Эти традиционные антитела повышают зависимое от TSLP созревание дендритных клеток. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления антитела или фрагменты в соответствии с настоящим изобретением не проявляют синергию с TSLP в отношении созревания иммунных клеток, в частности, дендритных клеток. Иными словами, антитела в соответствии с настоящим изобретением не повышают созревание иммунных клеток, индуцируемое TSLP. Этот эффект является особенно желаемым в отношении созревания дендритных клеток.

Следует отметить, что способность антител к CD127 к ингибированию индуцируемой TSLP продукцией TARC нельзя считать обоснованным прогностическим фактором для отрицательного (или по меньшей мере не относящегося к положительному) эффекта антител в отношении индуцируемой TSLP передачи сигнала и ее дальнейших последствий (в частности, созревания дендритных клеток). В действительности, как обнаружили авторы настоящего изобретения, даже антитела, эффективно ингибирующие индуцируемую TSLP выработку TARC, могут повышать зависимое от TSLP созревание дендритных клеток, которое измеряют по экспрессии CD40 или CD80 с TSLPR

Индуцируемое TSLP созревание дендритных клеток можно измерить по экспрессии клеточного маркера CD40 и/или CD80 (Inaba et al., 1995; Watanabe et al., 2005b) в качестве маркера, который является определяющим фактором созревания некоторых иммунных клеток, в особенности, так называемой дифференцировки TH-2, наблюдаемой при некоторых аутоиммунных заболеваниях, астме и трансплантации. В соответствии с конкретными вариантами осуществления повышение созревания дендритных клеток, индуцируемое TSLP, оценивают посредством определения повышенной экспрессии маркера(маркеров) клеточной поверхности CD40 и/или CD80 в TSLPR-положительных клетках, обработанных TSLP и макромолекулой в соответствии с настоящим изобретением по сравнению с TSLPR-положительными клетками, обработанными только TSLP.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления макромолекулы, в частности, антитела или их фрагмент, которые не повышают индуцируемое TSLP созревание дендритных клеток, не повышают экспрессию CD80 более чем на 25% по сравнению со стимуляцией только TSLP (без макромолекулы). Предпочтительно экспрессия CD80 не повышается более чем на 20%, предпочтительно не более чем на 10% и еще более предпочтительно не более чем на 5%. В соответствии с конкретным предпочтительным вариантом осуществления экспрессия CD80 не повышается или снижается в клетках, стимулируемых TSLP и макромолекулой, по сравнению с клетками, стимулируемыми только TSLP.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления макромолекулы, которые не повышают индуцируемое TSLP созревание дендритных клеток, не повышают экспрессию CD40 более чем на 50% по сравнению со стимуляцией только TSLP (без макромолекулы). Предпочтительно экспрессия CD40 не повышается более чем на 25 %, предпочтительно не более чем на 10% и еще более предпочтительно не более чем на 5%. В соответствии с конкретным предпочтительным вариантом осуществления экспрессия CD40 не повышается или снижается в клетках, стимулируемых TSLP и макромолекулой, по сравнению с клетками, стимулируемыми только TSLP.

Процедуры по измерению созревания дендритных клеток также иллюстрируется в разделе Примеры (см. в частности, пример 9), и их можно проводить в соответствии с любым стандартным способом,

известным любому специалисту в данной области техники, в частности, любым способом, подходящим для определения экспрессии CD80 и/или CD40 на дендритных клетках, в качестве маркера созревания дендритных клеток.

Для анализа свойств антител к CD127 в отношении отсутствия нежелательного усиления передачи сигнала с участием TSLP можно использовать клетки, экспрессирующие TSLPR, такие как про-B-клетки млекопитающего (такие как BA/F3 клетки, проиллюстрированные в данном документе).

Ингибирование индуцируемой IL-7 экспрессии $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов

В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела (или макромолекулы) согласно настоящему изобретению ингибируют индуцируемую IL-7 экспрессию $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов *in vitro*. Индуцируемая IL-7 экспрессия $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов, как используется в данном документе, обозначает любое из или оба из повышения уровня экспрессии $\alpha 4$ - и $\beta 7$ -интегринов и повышения количества или доли Т-лимфоцитов, экспрессирующих $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и/или $\alpha 4/\beta 7$ -интегрины. Ингибирование может быть частичным, т.е. уровень экспрессии $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов в присутствии IL-7 повышен по сравнению с фоновым уровнем (т.е. уровнем и без антитела, и без IL-7) в присутствии антител, но повышен меньше, чем в отсутствие антител; или ингибирование может быть полным, т.е. уровень экспрессии $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов в присутствии IL-7 и антитела не превышает фонового уровня.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением ингибируют экспрессию $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и/или $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов *in vitro*, т.е. уровень экспрессии $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и/или $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов ниже в клетках, обработанных антителами (и с IL-7 и/или без IL-7), чем в необработанных клетках (т.е. без антитела или IL-7). Степень ингибирования может быть дозозависимой. Ингибирование экспрессии можно измерить, как изложено в разделе Примеры, причем специалист в данной области техники может адаптировать измерение, например, к специфичным антителам, фрагментам антител, или антигенсвязывающим доменам, или другим макромолекулам, раскрытым в данном документе, и/или к конкретным моделям заболеваний, если это необходимо.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления антитела (или макромолекулы) согласно настоящему изобретению ингибируют экспрессию $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и/или $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов *in vivo*. Как используется в данном документе, эта экспрессия означает, что (i) экспрессия $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и/или $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов, (ii) количество и/или доля $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и/или $\alpha 4/\beta 7$ -положительных Т-лимфоцитов и/или (iii) приживление $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и/или $\alpha 4/\beta 7$ -положительных Т-лимфоцитов снижены в образцах, полученных из животных, обработанных антителами, в сравнении с необработанными животными. Как используется в данном документе, приживление обозначает включение пересаженной ткани или клеток в организм хозяина, процесс, который, как правило, происходит за период времени, составляющий от нескольких часов до нескольких суток. В соответствии с конкретными вариантами осуществления животное представляет собой млекопитающее, в частности млекопитающее, не являющееся человеком, в особенности, мышь. В соответствии с конкретными вариантами осуществления животное представляет собой человек. В соответствии с конкретными вариантами осуществления эффект наблюдается на человеческих лимфоцитах, вводимых инъекцией животному-реципиенту, предпочтительно иммунодефицитной мыши. В соответствии с конкретными вариантами осуществления через две недели после инъекции человеческих РВМС иммунодефицитным мышам средний процент $\beta 7$ -интегрин-положительных Т-клеток снижается по меньшей мере на 25%, предпочтительно по меньшей мере на 50% у обработанных антителом мышей в сравнении с необработанными мышами. В соответствии с конкретными вариантами осуществления через две недели после инъекции человеческих РВМС иммунодефицитным мышам средний процент $\beta 7$ -интегрин-положительных прижившихся Т-клеток снижается по меньшей мере на 25%, предпочтительно по меньшей мере на 50% и еще более предпочтительно по меньшей мере на 70% у обработанных антителом мышей в сравнении с необработанными мышами. Эффект антитела или макромолекулы в соответствии с настоящим изобретением можно определить с помощью методов, приведенных в разделе Примеры, в частности, в примере 16 для экспрессии $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов и приживления, причем специалист в данной области техники может адаптировать данные методы, если это необходимо, например, к конкретному антителу, его фрагменту или антигенсвязывающему домену или другой макромолекуле и/или к конкретной модели заболевания.

Ингибиторы интернализации CD127

Интернализация является процессом в клетке, посредством которого рецептор клеточной поверхности, такой как CD127, транспортируется внутрь цитоплазматического пространства клетки (возможно, на/у поверхности внутриклеточных компартментов или мембран) и, следовательно, больше не доступен из внеклеточного пространства, т.е. интернализированный рецептор не может напрямую контактировать с лигандом во внеклеточном пространстве. Лиганд, либо природный лиганд рецептора, либо любой искусственный лиганд или другая молекула, связанная с рецептором, может интернализироваться вместе с рецептором. Большинство рецепторов подвергаются постоянной интернализации, и их экспрессия на клеточной поверхности сохраняется постоянной либо вследствие замены интернализированных и разрушившихся рецепторов заново синтезированными/созревшими рецепторами, либо вследствие непосредственного возвращения, т.е. транспорта интернализированного рецептора обратно на клеточную поверхность.

Некоторые стимулы могут приводить к повышенной частоте интернализации и/или пониженной частоте замены/возвращения, таким образом приводя к чистому уменьшению экспрессии рецептора на клеточной поверхности. Как используется в данном документе, индуцируемая IL-7 интернализация CD127 обозначает снижение экспрессии CD127 на клеточной поверхности, индуцируемое присутствием IL-7 (или наблюдаемое в присутствии IL-7) во внеклеточной среде, которое наблюдается *in vitro* после ограниченного периода инкубирования с целью исключения долговременных эффектов, таких как понижающая регуляция транскрипции. Указанный ограниченный период, как правило, составляет порядка десятков минут, предпочтительно менее 2 ч, более предпочтительно менее 1 ч и еще более предпочтительно 45 мин или менее, 30 мин или менее или 15 мин или менее.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением ингибирует индуцируемую IL-7 интернализацию CD127. Таким образом, при инкубировании с антителом в соответствии с настоящим изобретением присутствие IL-7 не индуцирует снижения экспрессии CD127 на клеточной поверхности или индуцирует менее сильное снижение экспрессии CD127 на клеточной поверхности, чем у клеток, инкубируемых без антител. В соответствии с конкретными вариантами осуществления при инкубировании с антителами в соответствии с настоящим изобретением уровень экспрессии CD127 на клеточной поверхности, когда клетки инкубируют при 37°C в течение 15 мин с 5 нг/мл IL-7, составляет по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90% от уровня экспрессии на клеточной поверхности в клетках, инкубируемых без IL-7. Экспрессию на клеточной поверхности предпочтительно измеряли *in vitro* после ограниченного периода, как указано выше. Кроме того, большинство процессов интернализации в клетку ингибируются при низкой температуре, эффект обычно лучше всего наблюдается при физиологической температуре, в частности, 37°C. Тем не менее, также предполагается инкубирование клеток при низкой температуре, в частности 4°C.

Известно, что антитела к рецептору могут индуцировать интернализацию рецептора, это означает, что экспрессия рецептора на клеточной поверхности понижается в присутствии антитела. Это, в частности, может являться результатом индукции изменения конформации рецептора, которое имитирует изменение, индуцируемое природным лигандом, индуцирующим интернализацию, и этот эффект может зависеть от эпитопа, распознаваемого антителами. Как используется в данном документе, "антитело индуцирует интернализацию CD127" означает, что клетки, инкубируемые в присутствии антитела, проявляют пониженную экспрессию CD127 на клеточной поверхности по сравнению с клетками, инкубируемыми в отсутствие антитела. Экспрессию на клеточной поверхности предпочтительно измеряют *in vitro* после ограниченного периода инкубирования и в температурных условиях, как упомянуто выше. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления антитело согласно настоящему изобретению не индуцирует интернализацию CD127. Таким образом, экспрессия CD127 на клеточной поверхности у клеток, инкубируемых в присутствии антитела, не снижается или не снижается значительно в сравнении с экспрессией на клеточной поверхности у клеток, инкубируемых в идентичных в других отношениях условиях, но в отсутствие антитела. В соответствии с конкретными вариантами осуществления при инкубировании при 37°C в течение 30-45 мин в присутствии 50 нг/мл антитела уровень экспрессии CD127 на клеточной поверхности составляет по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90% от уровня у клеток, инкубируемых в отсутствие антитела. Этот эффект можно наблюдать в отсутствие IL-7 (как у обработанных антителом, так и необработанных антителом клеток), в присутствии IL-7 и/или в обоих случаях.

Любой из двух относящихся к интернализации CD127 признаков, описанных выше (т.е. ингибирование индуцируемой IL-7 интернализацией или отсутствие индукции интернализации), может вносить вклад в повышенную эффективность антител, в то время как комбинация обоих признаков, возможно, будет еще более эффективной. В данном документе раскрыто антитело, представляющее собой предпочтительный вариант осуществления, причем в присутствии как IL-7, так и указанного антитела экспрессия CD127 на клеточной поверхности не снижается значительно. В соответствии с такими предпочтительными вариантами осуществления после 45-минутного инкубирования в присутствии 50 нг/мл антитела, включающего 15 мин в присутствии 5 нг/мл IL-7, при 37°C, уровень экспрессии CD127 на клеточной поверхности составляет по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90% от этого уровня в контрольных клетках, инкубируемых в среде, не содержащей антитело или IL-7.

Нарушение взаимодействия CD127- γ с-цепь

В соответствии с конкретным вариантом осуществления макромолекула, в частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, согласно настоящему изобретению может нарушать связывание CD127 с γ с-цепью в IL-7-R. Это означает, что в условиях (в частности, химических и физических условиях), когда CD127 и γ с-цепь связываются вместе в отсутствие антитела и, в частности, в присутствии IL-7, присутствие антитела значительно снижает указанное связывание. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, в присутствии антитела и IL-7 CD127 не связывается с γ с. В частности, в присутствии антитела и IL-7 количество γ с-цепи, которое обнаруживается связавшимся (или связавшимся) с CD127 составляет менее чем 80%, предпочтительно менее чем 50%, еще более предпочтительно менее чем 25 или 10% от количества, связавшегося в отсутствие антитела (или в присутствии другого антитела).

к CD-127, такого как MD707-13) в идентичных в других отношениях условиях, в частности в присутствии IL-7. Такой признак антитела можно оценивать, в частности, с помощью методов совместного иммуноосаждения, хорошо известных специалисту в данной области техники для исследования взаимодействия белков и проиллюстрированных в данном документе в примере 21. В частности, клетки можно инкубировать в присутствии или в отсутствие исследуемого антитела, затем солиобилизовать в условиях, обеспечивающих возможность сохранения белковых комплексов, и полученный в результате лизат можно подвергнуть иммуноосаждению с использованием антитела к CD127, а присутствие γ с в содержащем CD127 и подвергшемся иммуноосаждению комплексе можно оценивать с помощью вестерн-блоттинга с использованием антител к γ с (и наоборот, иммуноосаждение можно осуществлять с использованием антител к γ с, а присутствие CD127 можно оценивать с использованием антител к CD127).

Один способ получения таких антител заключается в индукции образования указанных антител к эпитопу, содержащему последовательности из сайта 2b в CD127, или в отборе антител, которые распознают такой эпитоп. В действительности, связывание антитела с этим сайтом, критически важным для взаимодействия с γ с, вероятно, нарушает взаимодействие γ с с CD127, например, за счет конкуренции или стерического несоответствия.

Также представляется возможным, в частности, отбор антител, имеющих этот желательный признак, из антител к CD127, например, из библиотеки антител (в том числе, когда эта библиотека не получена с использованием иммуногена, содержащего последовательности сайта 2b) посредством традиционных процедур скрининга, известных специалисту в данной области техники и легко адаптируемых для такой цели. В частности, например, CD127 (или только его внеклеточный домен) может быть связан с 96-луночными планшетами или подобными подложками, зачастую используемыми для такого скрининга. Антитела, составляющие библиотеку, можно добавлять по отдельности, каждое в одну лунку, а γ с-цепь можно добавлять в каждую лунку. После промывания планшетов можно исследовать присутствие γ с в каждой лунке, например, с помощью методов, основывающихся на флуоресценции. В лунках, содержащих антитело с желаемым признаком, не выявлялся γ с (или его малые количества). Очевидно, что возможно модифицировать эту процедуру, например, наоборот, нанести антитела на твердую подложку в виде отдельных пятен; обеспечить возможность связывания CD127 с нанесенными в виде пятен антителами и обеспечить возможность связывания γ с-цепи с иммобилизованными таким образом цепями CD127.

Антагонист в отношении взаимодействия IL-7 - IL-7R

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, макромолекула, в частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в соответствии с настоящим изобретением дополнительно характеризуется антагонистическими свойствами в отношении интерлейкина 7 (IL-7), тем самым противодействуя доступу, т.е. связыванию IL-7 с CD127, на CD127-положительных клетках.

Выражение "антагонистические свойства в отношении взаимодействия IL-7-IL-7R" означает, что антитела или их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением, которые целенаправленно воздействуют на IL-7R α , оказывают эффект, заключающийся в ограничении доступности рецептора IL-7, экспрессируемого на CD127-клетках, в особенности на человеческих эффекторных Т-клетках, в частности на человеческих Т-клетках памяти, для его партнера по образованию связи, IL-7, в особенности, человеческого IL-7. В результате противодействия связыванию IL-7 антитела в соответствии с настоящим изобретением или их функциональные фрагменты приводят к лимфопении, предотвращая зависящее от IL-7 образование Т-клеток в тимусе.

Антагонистические свойства могут представлять собой, в частности, антагонизм в отношении передачи сигнала с участием IL-7R, индуцируемой IL-7. Антагонист передачи сигнала с участием IL-7R, индуцируемой IL-7, можно идентифицировать посредством измерения ингибирования фосфорилирования STAT5, как описано в разделе Примеры. Индуцируемое IL-7 фосфорилирование STAT5 является маркером активации IL-7R, и антитело, противодействующее взаимодействию IL-7-IL-7R, как ожидается, снижает индуцируемое IL-7 фосфорилирование STAT5.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления макромолекула согласно настоящему изобретению представляет собой антагонист передачи сигнала с участием IL-7R, индуцируемой IL-7. В соответствии с конкретным вариантом осуществления макромолекула согласно настоящему изобретению ингибирует индуцируемое IL-7 фосфорилирование STAT5. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления ингибирование фосфорилирования STAT5 составляет более чем 50% при концентрациях антитела до 50 нг/мл, и/или ингибирование фосфорилирования STAT5 составляет более чем 80% при концентрациях антитела до 100 нг/мл. Ингибирование фосфорилирования STAT5 можно оценить с помощью методов, известных специалисту в данной области техники, и, в частности, с помощью метода, изложенного в разделе Примеры (в частности, примере 3).

Антагонист в отношении связывания TSLP

Поскольку антитела в соответствии с настоящим изобретением связываются с CD127 в IL-7R, они также могут связываться с CD127 в TSLPR и они могут ингибировать связывание TSLP с TSLPR, в частности, за счет стерического несоответствия и/или за счет конкуренции в общих сайтах связывания. Ины-

ми словами, антитела в соответствии с настоящим изобретением могут проявлять антагонистическую активность в отношении связывания TSLP.

Ингибитор индуцируемой TSLP продукции TARC

В соответствии с конкретным вариантом осуществления антитела согласно настоящему изобретению могут ингибировать индуцируемую TSLP продукцию TARC у CD127-положительных клеток. Как упоминается выше, стимулируемые TSLP дендритные клетки продуцируют повышенные уровни TARC. Это может являться результатом их связывания с TSLP и их потенциального действия в качестве антагонистов связывания TSLP.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления антитела согласно настоящему изобретению и их антигенсвязывающие фрагменты подверглись отбору в отношении своей способности не повышать созревание (причем созревание определяется, например, повышением экспрессии маркера клеточной поверхности CD40 и/или CD80).

Уровень индуцируемой TSLP продукции TARC может быть ниже у клеток, обработанных TSLP вместе с антителами к CD127 или их фрагментами или химерными молекулами, которые описаны в данном документе, чем у клеток, обработанных только TSLP. Иными словами, макромолекулы в соответствии с настоящим изобретением могут представлять собой ингибиторы индуцируемой TSLP продукции TARC. В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения антитело или его фрагмент или химерная молекула, которые описаны в данном документе, снижают уровни продукции TARC. В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения уровень продукции TARC в клетках, обработанных TSLP и антителом, фрагментом или химерной молекулой снижается более чем на 10%, предпочтительно более чем на 20% по сравнению с уровнем в клетках, обработанных только TSLP, при концентрациях антитела до 1 мкг/мл. Измерение продукции TARC иллюстрируется в разделе Примеры (в частности, в примере 9), и его можно выполнять на CD127-положительных иммунных клетках, в частности, дендритных клетках, из образца крови с использованием стандартного метода, известного специалисту в данной области техники.

Цитотоксическая активность

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения антитела в соответствии с настоящим изобретением или их антигенсвязывающие фрагменты, направленные на молекулу CD127, присутствующую в рецепторе IL-7, характеризуются дополнительным свойством, заключающемся в цитотоксичности в отношении человеческих клеток, в особенности, человеческих Т-клеток, экспрессирующих указанный рецептор. Человеческие клетки, экспрессирующие CD127 в виде цепи рецептора IL-7, которые являются мишенями антител в соответствии с настоящим изобретением и их фрагментов, представляют собой, главным образом, Т-лимфоциты, и более точно, они представляют собой субпопуляции эффекторных Т-лимфоцитов, включающие в себя наивные Т-клетки и Т-клетки памяти, но не представляют собой регуляторные Т-клетки (Treg), в особенности, не представляют собой покоящиеся натуральные Treg. Т-клетки памяти образуются в результате примирования антигеном и определяются, главным образом, по своим функциональным характеристикам, в том числе по способности подвергаться пролиферации при вторичном иммунном ответе после повторной активации и дифференцировки во вторичные эффекторные клетки и клетки памяти. Подобным образом, являющийся мишенью рецептор TSLP (в виде комплекса, включающего в себя альфа-цепь IL-7-R) регулирует дифференцировку Т-хелперных лимфоцитов, В-клеток и дендритных клеток.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, характеризующиеся цитотоксической активностью в отношении Т-клеток или цитотоксическими свойствами (цитотоксические антитела), вызывают сокращение популяции эффекторных Т-клеток посредством цитолиза этих клеток, и, соответственно, количество этих клеток снижается при их введении. Тем не менее, эти антитела не изменяют субпопуляцию регуляторных Т-клеток или не изменяют ее в значительной мере, позволяя Treg клеткам выполнять свою функцию. В этом контексте, в соответствии с конкретным вариантом осуществления наблюдалось, что доля регуляторных Т-клеток (Treg) в сравнении с эффекторными Т-клетками (Teff) возрастает после введения антител в соответствии с настоящим изобретением. В соответствии с конкретным вариантом осуществления антитела согласно настоящему изобретению обеспечивают возможность роста указанной приблизительно на 10% или более. В соответствии с конкретным вариантом осуществления повышение доли Treg в сравнении с Teff составляет приблизительно 20%.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения цитотоксические антитела проявляют антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). В соответствии с другим вариантом осуществления антитела согласно настоящему изобретению не характеризуются свойствами ADCC. Потенциал антитела к ADCC считается положительным, когда специфичная цитотоксичность превышала 10%. Свойства ADCC можно оценить в анализе ADCC, таком как анализ, описанный в разделе Примеры (в частности, в примере 10). Если антитело представляет собой крысиное антитело, эффекторные клетки, используемые в анализе ADCC, представляют собой LAK (лимфокин-активированные киллеры) клетки крысы. Если антитела являются гуманизированными, анализ ADCC можно выполнять на человеческих NK-клетках.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением, которые характеризуются свойствами как цитотоксичности, так и антагонизма в отношении CD127-положительных клеток, обеспечивают возможность кумулятивных эффектов от этих свойств в отношении сокращения количества эффекторных Т-клеток, в особенности, Т-клеток памяти, тем самым обеспечивая возможность более сильного сокращения (истощения пула CD127⁺-клеток) и соответствующего снижения количества Т-клеток-мишеней.

В абзацах выше, а также в разделе Примеры описывается то, как исследовать эти функциональные характеристики. В следующих разделах будут подробно описываться различные структурные характеристики и возможные модификации антител, или фрагментов, или химерных молекул. С учетом этих указаний специалист в данной области техники будет способен получить антитела или фрагменты с нижеприведенными структурными характеристиками вместе с желаемыми функциональными характеристиками, в частности, исходя из антитела, которое имеет желаемые функциональные характеристики, такого как N13B2, поскольку в некоторых случаях можно спрогнозировать, что заимствование некоторых из структурных признаков не будет модифицировать функциональные признаки, и/или при помощи анализа в отношении потери функциональных характеристик после введения новой структурной характеристики. Более того, в соответствии с раскрытием в данном документе эпитопа, распознаваемого антителом, разработка других антител, у которых присутствуют те же функциональные признаки, является стандартной процедурой, поскольку антитела, образование которых индуцируют против одинакового или подобного эпитопа, можно подвергнуть отбору в отношении их способности вызывать подобные эффекты при связывании с CD127. Более того, в данном документе раскрыты несложные процедуры анализа, специалист в данной области техники может использовать эти анализы для отбора подходящих антител.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения макромолекула представляет собой N13B2 или антитело, имеющее по меньшей мере один из CDR N13B2, или фрагменты представляют собой фрагменты N13B2. Соответственно, настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, V_H которых содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных последовательностей или один из их предпочтительных гуманизованных вариантов, описанных ниже:

VHCDR1 SEQ ID No: 10;

VHCDR2 SEQ ID No: 12;

VHCDR3 SEQ ID No: 14;

и/или V_L которых содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных последовательностей или один из их предпочтительных гуманизованных вариантов, описанных ниже:

VLCDR1 SEQ ID No: 16;

VLCDR2 SEQ ID No: 18;

VLCDR3 SEQ ID No: 20.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления макромолекула содержит по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 из последовательностей CDR N13B2, т.е. VHCDR1 SEQ ID No: 10, VHCDR2 SEQ ID No: 12, VHCDR3 SEQ ID No: 14, VLCDR1 SEQ ID No: 16, VLCDR2 SEQ ID No: 18 и VLCDR3 SEQ ID No: 20, любое количество из которых может быть заменено одним из их предпочтительных гуманизованных вариантов, описанных ниже. В соответствии с конкретным вариантом осуществления макромолекула содержит все шесть последовательностей CDR N13B2, любое количество из которых может быть заменено одним из их предпочтительных гуманизованных вариантов, описанных ниже. В соответствии с конкретными вариантами осуществления макромолекула содержит V_H-цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No: 22, и/или V_L-цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No: 24. В соответствии с конкретными вариантами осуществления макромолекула содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No: 2 и/или SEQ ID No: 6, и/или легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No: 4. Другие конкретные варианты осуществления, относящиеся к V_H- и V_L-цепям, представляют собой гуманизованные варианты, раскрытые ниже. В соответствии с конкретным вариантом осуществления константная цепь имеет последовательность Fc-цепи крысиного IgG1 с фиг. 12 (Uniprot P20759) и/или последовательность SEQ ID No: 34.

Фрагменты

"Антигенсвязывающий фрагмент" антитела в соответствии с настоящим изобретением представляет собой часть антитела, т.е. молекулу, соответствующую части структуры антитела в соответствии с настоящим изобретением, которая проявляет антигенсвязывающую способность в отношении альфа-цепи рецептора IL-7 для человеческого IL-7, возможно, в его нативной форме; такой фрагмент, в особенности, проявляет такую же или практически такую же специфичность связывания с антигеном в отношении указанного антигена по сравнению со специфичностью связывания с антигеном у соответствующего четырехцепочечного антитела. Преимущественно антигенсвязывающие фрагменты характеризуются аналогичной аффинностью связывания, что и соответствующие 4-цепочечные антитела. Тем не менее, антигенсвязывающий фрагмент, который характеризуется пониженной аффинностью связывания антигена в сравнении с соответствующими 4-цепочечными антителами, также охватывается настоящим изобретением. Антигенсвязывающую способность можно определить посредством измерения аффинно-

сти антитела и рассматриваемого фрагмента. Эти антигенсвязывающие фрагменты можно также называть функциональными фрагментами антител.

Антигенсвязывающие фрагменты антител представляют собой фрагменты, которые содержат их гипервариабельные домены, обозначаемые CDR (определяющие комплементарность участки), или их часть(части), охватывающие сайт распознавания для антигена, т.е. IL-7Ra для человеческого IL-7, тем самым определяя специфичность распознавания антигена. Каждая легкая и тяжелая цепь (соответственно, V_L и V_H) в четырехцепочечном иммуноглобулине имеет три CDR, обозначаемые VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3 и VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3., соответственно. Таким образом, настоящее изобретение относится, в частности, к фрагментам антител в соответствии с настоящим изобретением, которые содержат или состоят из всех CDR или набора CDR из числа VL-CDR1 (SEQ ID No: 16), VL-CDR2 (SEQ ID No: 18), VL-CDR3 (SEQ ID No:20) и VH-CDR1 (SEQ ID No: 10), VH-CDR2 (SEQ ID No: 12) и VH-CDR3 (SEQ ID No: 14), их гуманизированным вариантам, раскрытым ниже, или их функциональными частями, т.е. частям, которые проявляют желаемую специфичность связывания, предпочтительно с высокой аффинностью в отношении IL-7Ra для человеческого IL-7.

Конкретные антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением представляют собой фрагменты V_H -цепи антитела в соответствии с настоящим изобретением, в которых объединены его CDR1, CDR2 и CDR3 домены, в частности, домены, имеющие аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе, в том числе гуманизированные варианты, раскрытые ниже. Другие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением представляют собой фрагменты V_L -цепи антитела в соответствии с настоящим изобретением, в которых объединены его CDR1, CDR2 и CDR3 домены, в частности, домены, имеющие аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе, в том числе гуманизированные варианты, раскрытые ниже. Фрагменты, которые содержат или состоят из VH-CDR3 и/или VL-CDR3, в частности, имеющих аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе, в том числе гуманизированные варианты, раскрытые ниже, или их функциональные части являются особенно предпочтительными, когда CDR3 участки оказываются детерминантами специфичности распознавания антигена.

Специалист в данной области техники будет способен определить расположение различных участков/доменов антител, исходя из стандартных определений, изложенных в этой связи, включая эталонную систему нумерации (Martin, 2001), или исходя из системы нумерации по Kabat (Kabat et al., 1992), или посредством применения IMGT алгоритма "collier de perle" (<http://www.imgt.org/IMGTindex/Colliers.html>, Lefranc et al., 1999). В связи с этим для определения последовательностей в соответствии с настоящим изобретением, следует отметить, что разграничение участков/доменов может изменяться от одной эталонной системы к другой. Соответственно, участки/домены, которые определены в соответствии с настоящим изобретением, охватывают последовательности, у которых проявляются изменения в длине или локализации рассматриваемых последовательностей в пределах полноразмерной последовательности вариабельных доменов антител, составляющие примерно +/-10%.

Кроме того, деиммунизирующие остатки могут присутствовать в CDR доменах вариабельного участка у антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В соответствии с конкретным вариантом осуществления антитело или его фрагмент являются деиммунизированными.

Исходя из структуры четырехцепочечных иммуноглобулинов, антигенсвязывающие фрагменты можно, таким образом, определить посредством сравнения с последовательностями антител в доступных базах данных и в источниках из уровня техники (Martin, 2001) и, в особенности, посредством сравнения расположения функциональных доменов в этих последовательностях, учитывая, что положения каркасных и константных доменов хорошо определены для различных классов антител, в особенности, для IgG, в частности, для IgG млекопитающих. Такое сравнение также включает данные, относящиеся к 3-мерным структурам антител.

С целью иллюстрации конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающие фрагменты антитела, которые содержат вариабельные домены, содержащие CDR указанного антитела, охватывают Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, которые хорошо определены в источниках (Kabat et al., 1992), (Martin, 2001), а также (Delves et al., 2011). Fv фрагменты состоят из V_L - и V_H -доменов антитела, связанных вместе за счет гидрофобных взаимодействий; в dsFv фрагментах гетеродимер V_H : V_L стабилизируется дисульфидной связью; в scFv фрагментах V_L - и V_H -домены соединены друг с другом посредством гибкого пептидного линкера, образуя таким образом одноцепочечный белок. Fab фрагменты представляют собой мономерные фрагменты, которые можно получить посредством расщепления антитела папаином; они содержат полную L-цепь и V_H -CH1 фрагмент H-цепи, связанные вместе посредством дисульфидной связи. F(ab')₂ фрагмент можно получить посредством расщепления антитела пепсином ниже дисульфидной связи в шарнирном участке; он содержит два Fab' фрагмента и дополнительно часть шарнирного участка молекулы иммуноглобулина. Fab' фрагменты можно получить из F(ab')₂ фрагментов посредством разрезания дисульфидной связи в шарнирном участке. F(ab')₂ фрагменты являются бивалентными, т.е. они содержат два антигенсвязывающих сайта, подобно нативной молекуле иммуноглобулина; с другой стороны Fv (димер V_H - V_L , составляющий вариабельную часть Fab), dsFv, scFv, Fab и Fab' фрагменты являются моновалентными, т.е. они содержат один антигенсвязывающий сайт.

Химерные антитела

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения антитела являются модифицированными и в результате представляют собой химерные антитела, содержащие домены или нить(нити) аминокислотных остатков из разных антител, в частности антител, полученных из животных разных видов, объединенные вместе в функциональном антителе. В соответствии с конкретным вариантом осуществления макромолекула в соответствии с настоящим изобретением представляет собой химерное антитело, состоящее из сборки фрагментов антитела по меньшей мере из двух разных видов. В соответствии с конкретным вариантом осуществления химерное антитело содержит константный участок человеческого антитела. Такие константные участки иллюстрируются в примерах Fc фрагментами G1 (SEQ ID No: 26) или Fc фрагментами G4 (SEQ ID No:28) или CL фрагментом каппа-цепи (SEQ ID No: 30). В качестве альтернативы, можно применять человеческие Fc фрагменты, представленные на фиг. 12 (Uniprot P01857, Uniprot P01859, Uniprot P01861) и/или имеющие последовательности SEQ ID No:31, SEQ ID No:32, SEQ ID No:33 или SEQ ID No: 112. В соответствии с конкретным вариантом осуществления химерное антитело содержит переменный участок из антитела грызуна и константный участок из человеческого антитела. В соответствии с конкретным вариантом осуществления химерное антитело содержит VH-цепь с последовательностью SEQ ID No:2 (N13B2-G1m-VH-FcG1m(E333A)) или последовательностью SEQ ID No:6 (N13B2-G4m-VH-FcG4m(S228P)) и VL-цепь с последовательностью SEQ ID No:4 (N13B2-G1m-VL-CLkappa).

Аффитины, антикалины и другие миметики антител

Макромолекулы в соответствии с настоящим изобретением также содержат искусственные белки со способностью связываться с антигенами, имитируя такую способность антител, также называемые в данном документе антигенсвязывающим миметиком антитела. Такие белки включают аффитины и антикалины. Аффитины представляют собой искусственные белки со способностью к селективному связыванию с антигенами. В плане структуры они происходят из ДНК-связывающего белка Sac7d, обнаруженного в *Sulfolobus acidocaldarius*, микроорганизму, относящемуся к домену архей. Располагая в случайном порядке аминокислоты на участвующей в связывании поверхности Sac7d, например, создавая варианты, соответствующие случайным заменам 11 остатков на участвующей в связывании поверхности Sac7d, можно создать библиотеку аффитинов и подвергнуть полученный в результате библиотеку белков раундам рибосомного дисплея, аффинность может быть направлена в отношении различных мишеней, таких как пептиды, белки, вирусы и бактерии. Аффитины представляют собой миметики антител, и их разрабатывают в качестве инструментов в биотехнологии. Их также использовали в качестве специфичных ингибиторов для различных ферментов (Kreihenbrink et al, 2008). Специалист в данной области техники легко сможет разработать аффитины с требуемыми свойствами связывания с использованием способов, известных в уровне техники, в частности, раскрытых в патентной заявке WO2008068637 и в вышеприведенной публикации, в частности, создание библиотек для фагового дисплея и/или рибосомного дисплея и их скрининг с использованием антигена, который раскрыт в данном документе. Антикалины представляют собой искусственные белки, которые способны к связыванию с антигенами, либо с белками, либо с малыми молекулами. Они представляют собой миметики антитела, полученные из человеческих липокалинов, которые являются семейством природных связывающих белков. Антикалины приблизительно в восемь раз меньше, причем их длина составляет приблизительно 180 аминокислот, а масса приблизительно 20 кДа (Skerra, 2008). Были созданы библиотеки фагового дисплея антикалинов, которые обеспечивают возможность скрининга и отбора, в частности, антикалинов со свойствами специфичного связывания. Специалист в данной области техники легко сможет разработать аффитины с требуемыми свойствами связывания с использованием способов, известных в уровне техники, в частности, раскрытых в европейском патенте EP 1270725 B1, патенте США US 8536307 B2, (Schlehuber and Skerra, 2002) и в вышеприведенной публикации, в частности, создание библиотек для фагового дисплея и/или рибосомного дисплея и их скрининг с использованием антигена, который раскрыт в данном документе. Как и антикалины, так и аффитины можно получать в ряде экспрессионных систем, включающем бактериальные экспрессионные системы. Таким образом, настоящим изобретением предполагаются аффитины, антикалины и другие подобные миметики антител с признаками антител, описанных в данном документе, в частности, в том, что касается связывания с CD127, отсутствия индукции и/или ингибирования интернализации CD127, созревания DC, причем все они предполагаются в качестве макромолекул в соответствии с настоящим изобретением.

Гуманизация

В соответствии с конкретным вариантом осуществления макромолекулы в согласно настоящему изобретению представляют собой гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Соответственно, будучи первоначально полученными у животных, в особенности, у грызунов и, в частности, у крыс после иммунизации животных и получения моноклональных антител из гибридомы, у антител в соответствии с настоящим изобретением модифицируют последовательности их V_H и/или V_L посредством замены аминокислотных остатков в кармашковой области и, необязательно, дополнительно в последовательностях CDR. Гуманизацию можно осуществлять посредством рекомбинации поверхностных остатков или посредством CDR-прививки в соответствии с известными методиками. Рекомбинации

поверхностных остатков, в частности, достигают посредством замены остатков из грызуна на человеческие аминокислотные остатки. Замену выполняют таким образом, чтобы сохранялась структура каркасной области исходного антитела, а также презентирование CDR, тем самым обеспечивая возможность того, что взаимодействия каркасных областей и CDR в антителе, подвергшемся рекомбинации поверхностных остатков, сохраняют нативную конформацию поверхности, контактирующей с антигеном для того, чтобы у антитела сохранялась аффинность связывания с антигеном.

Предпочтительные варианты осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением представлены гуманизированными вариантами антитела N13B2 (крысиного), содержащего следующие легкие и тяжелые цепи:

Тяжелая цепь N13B2-h1, имеющая последовательность SEQ ID No: 36, в котором последовательности CDR крысиного N13B2 были сохранены, также как и несколько других аминокислот за пределами последовательностей CDR, и в котором все остальные аминокислоты совпадают с последовательностью человеческого антитела. Эта тяжелая цепь на 87,8% идентична тяжелой цепи человеческого антитела. Следующие остатки за пределами последовательностей CDR были сохранены: V в положении H24 по Kabat (положение 24 на фиг. 23; A - в человеческой последовательности), V в положении H37 по Kabat (положение 37 на фиг. 23; I - в человеческой последовательности), A в положении H49 по Kabat (положение 49 на фиг. 23; S - в человеческой последовательности) и D в положении H73 по Kabat (положение 74 на фиг. 23; N - в человеческой последовательности);

Тяжелая цепь N13B2-h2, имеющая последовательность SEQ ID No: 38, в которой, в сравнении с тяжелой цепью N13B2-h1, аминокислоты в положениях H37, H49 и H73 по Kabat за пределами последовательностей CDR были модифицированы таким образом, чтобы они совпадали с последовательностью тяжелой цепи человеческого антитела;

Тяжелая цепь N13B2-h3, имеющая последовательность SEQ ID No: 40, в которой, в сравнении с тяжелой цепью N13B2-h2, M в положении H96 по Kabat (положение 100 на фиг. 23) в пределах последовательности CDR3 был мутирован в L для того, чтобы она совпадала с последовательностью тяжелой цепи человеческого антитела и/или во избежание посттрансляционной модификации. Другие возможные остатки для этого положения включают в себя, в частности, A, F и I и, более предпочтительно, F или I. Соответственно, возможный гуманизированный вариант для последовательности CDR3 в VH N13B2 имеет последовательность SEQ ID No: 48.

Легкая цепь N13B2-h1, имеющая последовательность SEQ ID No: 42, в котором последовательности CDR крысиного N13B2 были сохранены, также как и несколько других аминокислот за пределами последовательностей CDR, и в котором все остальные аминокислоты совпадают с последовательностью человеческого антитела. Эта легкая цепь на 80% идентична легкой цепи человеческого антитела. Следующие остатки за пределами последовательностей CDR были сохранены: V в положении L48 по Kabat (положение 48 на фиг. 24; I - в человеческой последовательности), Y в положении L71 по Kabat (положение 71 на фиг. 24; F - в человеческой последовательности) и F в положении L87 по Kabat (положение 87 на фиг. 24; Y - в человеческой последовательности);

Легкая цепь N13B2-h2, имеющая последовательность SEQ ID No: 44, в которой, в сравнении с легкой цепью N13B2-h1, аминокислоты в положениях L48, L71 и L87 по Kabat за пределами последовательностей CDR были модифицированы таким образом, чтобы они совпадали с последовательностью легкой цепи человеческого антитела;

Легкая цепь N13B2-h3, имеющая последовательность SEQ ID No: 46, в которой, в сравнении с легкой цепью N13B2-h2, аминокислоты в положениях L31 (положение 31 на фиг. 24) и/или L52 (положение 53 на фиг. 24) по Kabat в пределах последовательностей CDR1 и CDR2, соответственно, были мутированы с N в Q и с S в T, соответственно, для того, чтобы она совпадала с последовательностью легкой цепи человеческого антитела и/или во избежание посттрансляционной модификации. Другие возможные аминокислоты для положения L31 включают в себя H и R. Другие возможные мутации для последовательности CDR3 включают сохранение S в положении L52 и мутирование N в положении L51 (положение 52 на фиг. 24) в Q, H, K или R. Соответственно, возможный гуманизированный вариант для последовательности CDR1 в VL N13B2 имеет последовательность SEQ ID No: 50, и возможный гуманизированный вариант для последовательности CDR2 в VL N13B2 имеет последовательность SEQ ID No: 52.

Мультифункциональные антитела или фрагменты

Эти основные антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением можно объединить вместе с получением мультивалентных антигенсвязывающих фрагментов, таких как диатела, триотела или тетратела. Эти мультивалентные антигенсвязывающие фрагменты также являются частью настоящего изобретения.

Вышеупомянутые модификации можно комбинировать в тех случаях, когда это уместно. В соответствии с конкретными вариантами осуществления макромолекула представляет собой антитело, которое представляет собой химерное антитело, или гуманизированное антитело, и/или деиммунизированное антитело.

Способы получения антител в соответствии с настоящим изобретением

Образование антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением

бретением преимущественно индуцируют, в частности, в отношении молекулы, которая представляет собой CD127, экспрессируемый человеческими Т-клетками, возможно, их образование также индуцируется иммунизацией под действием формы нативного полипептида или рекомбинантной молекулы.

Иммунизацию можно выполнять в соответствии с протоколом, раскрытым в разделе Примеры ниже: Рекомбинантную химеру CD127-Fc (10975-H03H Sino Biological, Пекин, Китай) использовали для иммунизации крыс, таких как крысы линии LOU/C Igk1a, доступной от Левенского университета, Бельгия). В качестве альтернативы, антиген, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID No: 115 (в частности, содержащий SEQ ID No: 110), и/или SEQ ID No: 117 (в частности, содержащий SEQ ID No: 111), и/или SEQ ID No: 116, причем указанный антиген дополнительно содержит другие последовательности, в частности, другие последовательности из человеческого CD127, которые раскрыты выше, или не содержащий их, можно применять в качестве иммуногена. Гибридому получали посредством слияния мононуклеарных клеток селезенки с клетками линии LOU, линии несекретирующих и устойчивых к азагуанину Т-клеток крысиной иммуноцитомы IR983F, в соответствии с ранее описанной процедурой (Chassoux et al., 1988). Гибридому вначале подвергали скринингу по признаку способности секретируемых моноклональных антител связываться с рекомбинантной молекулой CD127 (химера CD127-Fc; 10975-H03H, Sino Biological, Пекин, Китай). Гибридомы затем подвергали скринингу в отношении способности моноклональных антител из нее к связыванию с CD127, экспрессируемым человеческими Т-клетками и в отношении способности к ингибированию индукции фосфорилирования STAT-5, индуцируемого IL-7 в человеческих лейкоцитах, что проиллюстрировано на фиг. 1, и в отношении их способности не повышать созревание дендритных клеток, индуцируемое TSLP.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения гуманизованное антитело согласно настоящему изобретению получают из антитела, обозначенного N13B2, посредством мутации одного или нескольких из CDR участков в его варибельной тяжелой цепи (V_H) и/или в варибельной легкой цепи (V_L), в частности, антитело сохраняет по меньшей мере один или два исходных CDR участка из числа CDR3, CDR2 и CDR1 участков в любом из V_H и/или V_L , причем указанное модифицированное антитело имеет менее чем 10% мутированных аминокислотных остатков, предпочтительно один мутированный аминокислотный остаток, или не имеет мутированных аминокислотных остатков в рассматриваемых по отдельности CDR участках в сравнении с исходным CDR1, CDR2 или CDR3 участком, причем указанные исходные CDR участки представляют собой:

- i) VHCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID No: 10;
- ii) VHCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID No: 12;
- iii) VHCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID No 14;
- iv) VLCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID No: 16;
- v) VLCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID No: 18;
- vi) VLCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID No: 20.

Соответственно VHCDR3 может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID No: 48; VLCDR1 может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID No: 50; VLCDR2 может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID No: 52.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела N13B2, который модифицирован, как описано в предыдущих абзацах, причем указанный модифицированный антигенсвязывающий фрагмент имеет менее чем 10% мутированных аминокислотных остатков в сравнении с исходным антигенсвязывающим фрагментом.

С учетом идей, представленных настоящим изобретением, для экспрессии антител в соответствии с настоящим изобретением специалист в данной области техники будет способен получить гибридому или применить альтернативные технологии, такие как экспрессионные библиотеки и экспрессионные системы, с последующим отбором антител, имеющих структуру таких антител, секретируемых гибридомой, и имеющие их свойства, в частности, их свойствами связывания и нейтрализации. Библиотеки кДНК можно соответствующим образом получить из РНК, экспрессируемой в гибридоме в соответствии с настоящим изобретением, и соответствующие последовательности можно подвергнуть отбору и осуществлять их экспрессию. В качестве альтернативы, кДНК, кодирующую антитела в соответствии с настоящим изобретением или их фрагменты, получают посредством синтеза.

"Клетки гибридомы" в соответствии с настоящим изобретением представляют собой клетки, образованные в результате слияния антителопродуцирующих клеток (В-лимфоцитов) из животного, которое ранее иммунизировали выбранным иммуногеном, и партнера по слиянию, который представляет собой клетки миеломы, обеспечивающие возможность иммортализации полученной в результате слияния клетки. Клетки миеломы и антителопродуцирующие клетки (В-клетки, такие как спленоциты) могут иметь одинаковое происхождение и представляют собой эукариотические клетки, в частности, клетки млекопитающего из одного и того же животного. В качестве альтернативы, они могут иметь разное происхождение, таким образом приводя к образованию гетерогибридомы. Клетки миеломы, такие как клетки линии LOU, линии несекретирующих и устойчивых к азагуанину Т-клеток крысиной иммуноцитомы IR983F, выбирают из числа клеток, которые неспособны продуцировать иммуноглобулины, для того,

чтобы обеспечить возможность секреции гибридомой только моноклональных антител с желаемой специфичностью. Вместо крысиной иммуноцитомы можно применять другие клетки, подходящие для стимуляции ADCC, такие как описанные на следующих страницах для получения антител посредством экспрессии в рекомбинантных клетках. Такие клетки преимущественно представляют собой клетки, которые характеризуются низкой способностью к фукозилированию, или у которых отсутствует способность к фукозилированию.

Получение гибридомы, подходящей для осуществления настоящего изобретения, выполняют в соответствии с традиционными методиками. В разделе Примеры в настоящей заявке подробно описаны варианты осуществления, конкретные раскрытые признаки которых можно адаптировать к другим клеткам, используемым в качестве партнеров по слиянию.

Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получить, исходя из антитела, в особенности, при использовании ферментативного расщепления в соответствии с хорошо известными методиками, в том числе расщепления папаином или пепсином, или с помощью любой подходящей методики расщепления. В качестве альтернативы, они могут экспрессироваться в клетках-хозяевах, модифицированных посредством рекомбинации с использованием последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих аминокислотную последовательность указанных фрагментов, или их можно синтезировать, в особенности, химически синтезировать. Соответственно антитела в соответствии с настоящим изобретением, в том числе модифицированные антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, также можно получить с помощью классических методик генной инженерии, таких как описанные Sambrook et al. (Deininger, 1990) и обновленные версии). Настоящее изобретение, соответственно, относится к вариантам полипептидов V_H и V_L , которые включают или не включают в себя сигнальный пептид. Сигнальный пептид может быть необходим в ходе получения полипептидов в клетках.

Рассчитывая на применение антител в соответствии с настоящим изобретением или их функциональных фрагментов для введения пациенту-человеку, может быть выгодным получение гуманизированных моноклональных антител, или химерных моноклональных антител, и/или деиммунизированных антител из антител в соответствии с настоящим изобретением, которые будут представлять собой антитела животного, не относящегося к приматам, такие как иллюстрируемые в разделе Примеры, в особенности, для снижения иммунной реакции в отношении указанных антител у получающего их хозяина или пациента. Функциональные фрагменты этих вариантов антител можно получить так же, как и гуманизированные, химерные или деиммунизированные варианты.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые представляют собой гуманизированное антитело, также можно получить посредством замены аминокислотного остатка(остатков), присутствующего(присутствующих) в константном участке(участках) переменных цепей (V_H и/или V_L) антитела в соответствии с настоящим изобретением, которое не является человеческим антителом, на человеческий аминокислотный остаток(остатки) с соответствующим расположением в человеческих антителах в соответствии со стандартным определением и нумерацией, причем уровень замены составляет от 1 до 20%, в частности от 1 до 18% остатков в указанных каркасных участках. Указанные константные участки включают в себя таковые из каркасных участков (FwR), определенных в четырехцепочечных антителах, идентифицированных, в частности, в соответствии с нумерацией по Kabat.

Конкретные примеры модифицированных антител в соответствии с настоящим изобретением охватывают химерные антитела, гуманизированные антитела и/или деиммунизированные антитела.

Конкретное модифицированное антитело имеет модифицированные аминокислотные остатки в CDR участках, причем указанная модификация приводит в результате к деиммунизации за счет потери Т-клеточных эпитопов в переменном домене антитела, не являющегося человеческим. Деиммунизацию можно провести после определения Т-клеточных эпитопов в переменном домене антитела, в особенности посредством *in silico* прогнозирования, с последующим введением точечной мутации в последовательность переменных цепей антитела, которая ликвидирует функциональные Т-клеточные эпитопы. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения модификация CDR участка(участков), в особенности, CDR3 участка ограничивается степенью, необходимой для деиммунизации с расчетом на введение в человеческий организм, например, для снижения аффинности связывания Т-клеточных рецепторов в отношении комплексов HLA-класса II/пептид. В соответствии с конкретным вариантом осуществления CDR3 участок(участки) V_H и/или V_L не является(не являются) модифицированным(модифицированными). В соответствии с еще одним вариантом осуществления FR участки и/или CH участки также являются модифицированными, в особенности, гуманизированными.

Антитела в рамках настоящего изобретения охватывают, соответственно, антитело, характеризующееся определенными выше признаками, которое представляет собой гуманизированное антитело, в особенности антитело, полученное посредством замены аминокислотного остатка(остатков), присутствующего(присутствующих) в каркасном участке(участках) антитела в соответствии с настоящим изобретением, на человеческий аминокислотный остаток(остатки) с соответствующим расположением в человеческих антителах в соответствии со стандартным определением и нумерацией. Уровень замены аминокислотных остатков в каркасных участках и/или в CDR для гуманизации, включая деиммунизацию, составляет от 1 до 20% в частности от 1 до 18% остатков в указанных каркасных участках и/или CDR уча-

ствах. Как упомянуто выше, мишенью гуманизации преимущественно являются каркасные участки исходных антитела. В некоторых случаях гуманизация, в качестве альтернативы или в дополнение, может затрагивать CDR участки(участки), в особенности CDR1 и/или CDR2 участки(участки), и более конкретно называется деиммунизацией. В соответствии с конкретными вариантами осуществления в каждом CDR участке модифицируют не более чем одну аминокислоту. Примеры гуманизованных и/или деиммунизованных антител, происходящих из крысиного антитела N13B2, раскрыты в данном документе.

Гуманизацию, следовательно, можно осуществлять, рассматривая человеческие каркасные области легкой цепи или тяжелой цепи зародышевой линии, которые проявляют наиболее высокую идентичность последовательности с последовательностью антитела или фрагмента, не являющихся человеческими, и выбирая аминокислотные остатки, в особенности остатки, проявляющиеся на поверхности в антителе, подлежащие замене в указанных антителе или его фрагменте, не являющихся человеческими, для того, чтобы обеспечить соответствие с соответствующим человеческим остатком(остатками). В соответствии с конкретным вариантом осуществления некоторые или все FRL и/или некоторые или все FRH участки являются полностью человеческими, т.е. являются характерными для человеческих каркасных последовательностей. В соответствии с другим вариантом осуществления замененными являются выбранные остатки в некоторых или всех FR участках.

Способы гуманизации антител также хорошо известны в уровне техники и описаны, например, Routledge et al. (Edward G. Routledge, 1993). Эти способы также можно применять к антигенсвязывающим фрагментам, таким как scFv. В качестве примера, способ, известный как "рекомбинация поверхностных остатков", заключается в замене ряда поверхностных остатков в каркасных участках варибельного участка антитела, не являющегося человеческим, на ряд человеческих поверхностных остатков, в то время как способ, известный как CDR-прививка, состоит из переноса CDR из антитела, не являющегося человеческим, в каркасные участки человеческого антитела. CDR-прививку обычно дополняют оптимизацией каркасных участков, заключающейся в замене некоторых остатков в человеческих каркасных участках с целью оптимизации аффинности связывания. Стадию оптимизации каркасных участков недавно упростили путем применения комбинаторных библиотек (Rosok et al., 1996) (Baca et al., 1997).

Настоящее изобретение относится, в частности, к гуманизованным антителам, полученным с помощью CDR-прививки из крысиного антитела N13B2. Из базы данных выбирали человеческие последовательности V_H и V_L , имеющие последовательности с сильной гомологией с последовательностями V_H и V_L , соответственно, из крысиного N13B2. Последовательности CDR из N13B2 прививали на эти человеческие последовательности. Некоторые остатки за пределами последовательностей CDR могут оказывать значительное воздействие на распознавание антигена или аффинность к нему, в частности, остатки, находящиеся в непосредственной близости от CDR, и остатки, известные как остатки зоны Vernier. Как подробно описано ниже, а также в разделе Примеры, в частности, в примере 12 исследовали несколько вариантов гуманизованных антител: наиболее консервативные, в которых сохранялись все крысиные последовательности для CDR и вышеупомянутых важных в плане структуры остатков, варианты, в которых человеческие последовательности подвергали отбору в отношении важных в плане структуры остатков, и вариант, наиболее близкий к человеческим последовательностям, в котором, в дополнение к важным в плане структуры остаткам за пределами CDR, несколько остатков внутри CDR модифицировали из исходной крысиной последовательности, в частности с целью предотвращения посттрансляционных модификаций, таких как окисление или дезамидирование.

В другой современной стратегии, доступной для гуманизации антитела, сохраняют только исходные, не являющиеся человеческими, последовательности CDR3 легкой и тяжелой цепей, тогда как остальную последовательность выбирают из библиотек человеческих V-генов, ранее не подвергавшихся воздействию (Rader et al., 1998).

Химерные, гуманизованные и/или деиммунизованные антитела в соответствии с настоящим изобретением могут относиться к любому классу иммуноглобулинов, как и немодифицированные антитела. Предпочтительно они относятся к подклассу класса IgG, как например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Способы получения рекомбинантных антигенсвязывающих фрагментов или химерных антител посредством объединения варибельных участков антитела с использованием подходящих линкеров или с использованием константных участков из другого антитела известны в уровне техники.

Как указано, антитела в соответствии с настоящим изобретением представляют собой моноклональные антитела, это означает, что строение этих антител является однородным, в особенности идентичным, в плане специфичности связывания с антигеном и, соответственно, в плане строения варибельного участка. Следовательно, антитела можно классифицировать как моноклональные, даже если их получают с помощью методик, альтернативных методикам с использованием гибридомы.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение также относится к химерной молекуле, которая содержит антитело в соответствии с определением, представленным в данном документе, или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или его функциональный фрагмент связаны с функционально отличающейся молекулой. Химерная молекула в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой либо слитый химерный белок, либо конъюгат, полученный в результате любого подходящего вида прикрепления, в том числе ковалентного прикрепле-

ния, прививки, химического связывания с химической или биологической группой или с молекулой, такой как полимер PEG или другая защитная группа или молекула, подходящая для защиты от расщепления протеазами *in vivo*, для улучшения стабильности и/или периода полувыведения антитела или функционального фрагмента. С использованием аналогичных методик, в особенности, посредством химического присоединения или прививки, можно получить химерную молекулу с биологически активной молекулой, причем указанная активная молекула выбрана, например, из числа токсинов, в частности, экзотоксина A *Pseudomonas* (Risberg et al., 2011), А-цепи растительного токсина рицина (van Oosterhout et al., 2001) или токсина сапорина (Flavell et al., 2006), в особенности, терапевтического активного ингредиента, вектора (в том числе, в особенности, вектора для белка), подходящего для целенаправленного воздействия антитела или функционального фрагмента на конкретные клетки или ткани человеческого организма, или она может быть связана с меткой или с линкером, в особенности, в случае, когда используются фрагменты антитела.

Пегилирование антител или их функциональных фрагментов является вариантом осуществления, представляющим особый интерес, поскольку оно улучшает условия доставки активного вещества к хозяину, в особенности, для терапевтического применения. Пегилирование может быть сайт-специфичным для предотвращения созданию помех сайтам распознавания в антителах или функциональных фрагментах, и его можно осуществлять с использованием PEG с высоким молекулярным весом. Пегилирование можно осуществлять по свободным цистеиновым остаткам, присутствующим в последовательности антитела или функционального фрагмента, или по добавленным свободным цистеиновым остаткам в аминокислотной последовательности антитела или функционального фрагмента.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей антитела или их функциональные фрагменты, как определено в данном документе, причем антитела или их функциональные фрагменты представляют собой однородную популяцию антител или их функциональных фрагментов или представляют собой моноклональные антитела или их функциональные фрагменты.

В некоторых случаях возможно применение композиции из продуктов для получения желаемого эффекта в случае, когда каждый из продуктов в композиции создает по меньшей мере один желаемый эффект. В данном случае, например, представляется возможным объединение молекул, характеризующихся ингибирующим эффектом в отношении взаимодействия IL-7 - IL-7R, и молекул, характеризующихся цитотоксическим эффектом в отношении CD127-положительных клеток. Такие комбинации включены в настоящее изобретение. Важно, что в соответствии с настоящим изобретением композиция из продуктов не должна проявлять синергизм с TSLP в отношении созревания дендритных клеток. Обычно подразумевается объединение в комбинацию продуктов, ни один из которых отдельно не проявляет синергию с TSLP в отношении созревания дендритных клеток.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящее изобретение относится к композиции или совокупности соединений, содержащих антитела, фрагменты или химерные молекулы, которые описаны в данном документе, причем указанная композиция содержит (i) популяцию антител или их антигенсвязывающих фрагментов или химерных молекул, характеризующихся цитотоксической активностью в отношении CD127-положительных клеток, в особенности CD127⁺-Т-клеток, и (ii) популяцию антитела или их функциональных фрагментов или химерных молекул, характеризующихся антагонистическими свойствами в отношении человеческого IL-7, эти популяции антител либо объединяют в смеси, либо разделяют и, в этом последнем варианте, составляют для комбинированного или последовательного введения. Антитела, и/или функциональные фрагменты, и/или химерные молекулы не проявляют синергизм с TSLP в отношении созревания дендритных клеток.

Определения, представленные в данном документе, в особенности, по отношению к антителам в соответствии с настоящим изобретением, аналогично, применимы к их антигенсвязывающим фрагментам, за исключением тех случаев, когда очевидно, что с технической точки зрения это неуместно. Эти определения также применимы к макромолекулам (в частности, химерным антителам или химерным молекулам) или композициям, содержащим эти антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или полученным из этих антител, которые раскрыты в настоящей заявке. Дополнительно определяется, что с точки зрения идеи или создания антигенсвязывающие фрагменты антител в соответствии с настоящим изобретением получены из антител, но их можно получать посредством различных методик, к которым прибегают для получения продуктов, не обязательно представляющих собой антитела.

Настоящее изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей макромолекулу в соответствии с любым из определений, представленных в данном документе. В соответствии с конкретными вариантами осуществления нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению кодирует аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 2; SEQ ID No: 4; SEQ ID No: 6; SEQ ID No: 8; SEQ ID No: 10; SEQ ID No: 12; SEQ ID No: 14; SEQ ID No: 16; SEQ ID No: 18; SEQ ID No: 20; SEQ ID No: 22; SEQ ID No: 24; SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 40; SEQ ID No: 42; SEQ ID No: 44; SEQ ID No: 46; SEQ ID No: 48; SEQ ID No: 50; SEQ ID No: 52; SEQ ID No: 54; SEQ ID No: 56; SEQ ID No: 110; SEQ ID No: 111; SEQ ID No: 86; SEQ ID No: 115; SEQ ID No: 116 и SEQ ID No: 117. В соответствии с конкретными вариантами осуществления нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению содержит или состоит из последовательности SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 35, 37, 39,

41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 или 55.

Такая нуклеиновая кислота, подходящая для получения макромолекул в соответствии с настоящим изобретением, выбрана, в частности, из группы следующих:

i) полинуклеотид, кодирующий V_H -участок и имеющий последовательность SEQ ID No: 1, или SEQ ID No: 5, или SEQ ID No: 54, или вариабельный участок V_H -участка и имеющий последовательность SEQ ID No: 21, или SEQ ID No: 35, или SEQ ID No: 37 или SEQ ID No: 39;

ii) полинуклеотид, кодирующий V_L -участок, имеющий последовательность SEQ ID No: 3, или SEQ ID No: 7, или SEQ ID No: 56, или вариабельный участок V_L -участка и имеющий последовательность SEQ ID No: 23, или SEQ ID No: 41, или SEQ ID No: 43, или SEQ ID No: 45;

iii) полинуклеотид, кодирующий VHCDR1 участок, имеющий последовательность SEQ ID No: 9,

iv) полинуклеотид, кодирующий VHCDR2 участок, имеющий последовательность SEQ ID No: 11,

v) полинуклеотид, кодирующий VHCDR3 участок, имеющий последовательность SEQ ID No: 13 или SEQ ID No: 47,

vi) полинуклеотид, кодирующий VLCDR1 участок, имеющий последовательность SEQ ID No: 15 или SEQ ID No: 49,

vii) полинуклеотид, кодирующий VLCDR2 участок, имеющий последовательность SEQ ID No: 17 или SEQ ID No: 51,

viii) полинуклеотид, кодирующий VLCDR3 участок, имеющий последовательность SEQ ID No: 19.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, имеющему модифицированные нуклеотиды по отношению к последовательности SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 или 55, и который:

(a) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, соответственно, SEQ ID No: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 или 56, и/или

(b) характеризуется по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью по всей своей длине с одним из полинуклеотидов, имеющих последовательность, соответственно, SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 или 55, и/или

(c) представляет собой фрагмент полинуклеотида, имеющего последовательность из последовательности SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 21, 23, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 53 или 55, и кодирует полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент или состоящий из него.

Полинуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением также могут представлять собой оптимизированные последовательности, в особенности, для экспрессии в клетках-хозяевах. Методики оптимизации в этой области представляют собой традиционные методики.

Фрагменты полинуклеотида в соответствии с настоящим изобретением преимущественно имеют последовательность по меньшей мере из 9 нуклеотидов, в частности по меньшей мере из 18 нуклеотидов, и являются более короткими, чем последовательность, из которой они происходят, в особенности, более короткими, чем проиллюстрированные полноразмерные последовательности V_H или V_L соответственно.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления полинуклеотиды согласно настоящему изобретению преимущественно могут содержать, помимо последовательности, кодирующей макромолекулу в соответствии с настоящим изобретением, выше последовательности, кодирующей цепи антитела, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, обеспечивающий возможность секреции указанного белка при экспрессии в продуцирующей клетке. Они также могут содержать одну или несколько последовательностей, кодирующих один или несколько маркерных пептидов для выявления и/или облегчения очистки указанного белка.

Настоящее изобретение также относится к вектору для клонирования и/или для экспрессии полинуклеотида, раскрытого в данном документе. В соответствии с конкретным вариантом осуществления вектор согласно настоящему изобретению представляет собой плазмиду, подходящую для клонирования и/или экспрессии в клетках млекопитающего, которая содержит регуляторные последовательности для транскрипции и экспрессии.

Настоящее изобретение дополнительно относится к клеткам или клеточным линиям, в которую был встроен посредством рекомбинации полинуклеотид в соответствии с настоящим изобретением, в особенности, клетки или клеточные линии млекопитающих или птиц. Например, клетки яичника китайского хомячка, генетически модифицированные для снижения общего фукозилирования. В действительности, антитела, у которых отсутствует фукозилирование коровой части, проявляют значительно усиленную антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) (von Horsten et al., 2010). Другим примером является клеточная линия EB66, которая по своей природе характеризуется свойствами слабого фукозилирования (Olivier et al., 2010).

Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который предусматривает:

(a) получение гибридомы после иммунизации животного, в особенности, млекопитающего человеческой альфа-цепью человеческого рецептора IL-7, предпочтительно ее антигеном, содержащим после-

довательности человеческого CD127 с последовательностями SEQ ID No: 115 (и/или SEQ ID No: 110), и/или SEQ ID No: 117 (и/или SEQ ID No: 111), и/или SEQ ID No: 116 (и/или SEQ ID No: 86), причем указанный антиген содержит другие последовательности человеческого CD127 или не содержит их, как раскрыто выше, и в случае, когда это необходимо, бустер-иммунизации указанного животного тем же иммуногеном, выделения клеток селезенки или лимфатических узлов из животного, отвечающего на иммунизацию, и слияния указанных клеток с клетками миеломы с выделением моноклональных антител, и/или

(b) экспрессию полинуклеотидов, кодирующих такие антитела, как например, полинуклеотидов, раскрытых в данном документе, причем их нуклеотидная последовательность присутствует в рекомбинантной форме в клетках в условиях, обеспечивающих возможность выделения антител, и

(c) выделение антител, распознающих эпитоп, который определен в данном документе, в частности, содержащий последовательности из сайта 2b в CD127 и, в частности, содержащий такие последовательности, а также дополнительно последовательности из домена D1 в CD127, в частности, антител, характеризующихся желаемой аффинностью связывания в отношении альфа-цепи человеческого рецептора IL-7.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения антитела или их фрагменты получают в клетках, у которых проявляются свойства слабого фукозилирования, такие как EB66 клетки птиц.

Настоящее изобретение также относится к способу отбора антител, предусматривающему стадии получения, возможно, посредством одного из способов, описанных в данном документе, антител или их фрагментов, которые специфично связываются с CD127, в частности, с его антигеном, который раскрыт выше, и осуществления отбора из числа этих антител таковых, которые не повышают индуцируемое TSLP созревание иммунных клеток, в частности, дендритных клеток, которые не индуцируют интернализацию CD127, и/или которые ингибируют индуцируемую IL-7 интернализацию CD127, и/или которые ингибируют *in vitro* и/или *in vivo* экспрессию $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и/или $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов. Отбор можно осуществлять с использованием любой из процедур, описанных в разделе Примеры, для анализа в отношении повышения или снижения индуцируемой TSLP экспрессии маркеров клеточной поверхности CD40 и/или CD80, или для анализа эффектов в отношении интернализации CD127, или для анализа эффектов в отношении экспрессии $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов. Такие анализы можно подходящим образом осуществлять, например, в 96-луночных планшетах для обеспечения возможности быстрого и эффективного скрининга большого количества антител-кандидатов и считывание результатов можно осуществлять посредством классического иммуноокрашивания и проточно-цитометрического анализа. Таким образом, настоящее изобретение относится к способу отбора антител, их антигенсвязывающих фрагментов или других макромолекул, который предусматривает или состоит из по меньшей мере одной из следующих стадий:

a) исследование (например, как описано в примере 1, примере 2, примере 6 и/или примере 7) макромолекулы со связывающей способностью макромолекулы в отношении CD127, в частности, в отношении его антигена, который раскрыт в данном документе;

b) исследование (например, как описано на фиг. 16 и/или в примере 5) интернализации CD127 в экспрессирующих CD127 клетках, индуцируемой присутствием макромолекулы;

c) исследование (например, как описано на фиг. 16 и/или в примере 5) ингибирования макромолекулой индуцируемой IL-7 интернализации CD127 в экспрессирующих CD127 клетках;

d) исследование (например, как на фиг. 5, фиг. 6 и/или в примере 9) повышения созревания DC, индуцируемое TSLP в присутствии макромолекулы;

и необязательно предусматривающий по меньшей мере одну из следующих стадий:

e) исследование (например, как на фиг. 1, 2 и/или в примере 3) ингибирования макромолекулой индуцируемой IL-7 передачи сигнала, в частности, фосфорилирования STAT5;

f) исследование (например, как в примере 9, на фиг. 5 и/или на фиг. 6) ингибирования макромолекулой индуцируемой TSLP продукции TARC;

g) исследование (например, как в примере 16, на фиг. 19 и/или на фиг. 20) ингибирования макромолекулой экспрессии $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и/или $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов, в частности, экспрессии на клеточной поверхности на Т-лимфоцитах;

h) исследование (например, как в примере 21, на фиг. 28) нарушения антителом связывания CD127 с ус-цепью, в частности, в присутствии IL-7.

За каждой из этих стадий исследования следует отбор одной или нескольких макромолекул с желаемыми функциональными признаками, которые раскрыты в данном документе.

Как упоминается выше, в случае, если желательно, чтобы антитело распознавало эпитоп, содержащий последовательности, которые не являются смежными в последовательности CD127, возможно последовательно анализировать распознавание фрагментов эпитопа (или связывание с ними), состоящего (или, по сути, состоящего) из одной смежной последовательности CD127. Например, если желательным является получение антитела, распознающего эпитоп, содержащий последовательности SEQ ID No: 115, SEQ ID No: 116 и SEQ ID No: 117, возможно, во-первых, провести отбор антител, распознающих эпитоп,

состоящий, по сути, из SEQ ID No: 116, а затем, во-вторых, отобрать из числа отобранных в первом отборе антител антитела, распознающие эпитоп, состоящий, по сути, из SEQ ID No: 115, а затем отобрать из числа отобранных во втором отборе антител антитела, распознающие эпитоп, состоящий, по сути, из SEQ ID No: 117. Очевидно, что порядок проведения отбора можно модифицировать по отношению к данному порядку, приведенному исключительно в качестве примера.

Другой целью настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая макромолекулу в соответствии с настоящим изобретением с фармацевтической средой, причем указанная фармацевтическая композиция необязательно дополнительно содержит отличающийся активный ингредиент.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей в качестве активного ингредиента макромолекулу в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтическую композицию, которая определена выше, в составе, подходящем для контроля выживания или размножения положительных по человеческому CD127 клеток, в частности, положительных по человеческому CD127⁺ Т-клеток памяти, в особенности, Т-клеток памяти, которые являются и CD127⁺, и CD8⁺, или которые являются и CD127⁺, и CD4⁺-клеток, при введении пациенту-человеку. В соответствии с конкретным вариантом осуществления композиция, содержащая макромолекулу в соответствии с настоящим изобретением в качестве активного ингредиента, присутствует в составе, подходящем для контроля дифференцировки и/или созревания дендритных клеток при введении пациенту.

Композиция в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно содержать дополнительное соединение, характеризующееся терапевтическим иммуномодулирующим эффектом, в частности, в отношении клеток, вовлеченных в аллергию или аутоиммунную реакцию. С целью иллюстрации, представляющие интерес иллюстративные иммуномодуляторы представляют собой другие моноклональные антитела, целенаправленно воздействующие на Т-клетки, такие как антитела к CD3, антитела к ICOS или антитела к CD28, или рекомбинантные белки или антитела, целенаправленно воздействующие на аксессуарные клетки, такие как антитела к CTLA4Ig или антитела к CD40.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или химерной молекуле, которые определены или проиллюстрированы в данном документе, для применения в качестве активного ингредиента в комбинации или в составе схемы дополнительной терапии у пациента, нуждающегося в этом. Также предполагается применение макромолекулы, нуклеиновой кислоты, клетки или клеточной линии в соответствии с настоящим изобретением в качестве терапевтически активного ингредиента в комбинации или в составе схемы дополнительной терапии у пациента, нуждающегося в этом.

Макромолекула в соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновая кислота, вектор, клетка, клеточная линия, фармацевтическая композиция или композиция, которые определены в данном документе, предполагаются, в частности, для применения у пациента-человека для лечения патологических состояний, на которые оказывают влияние иммунные реакции, в особенности, реакции с участием Т-клеток памяти. Соответственно авторы настоящего изобретения предполагают, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерная молекула в соответствии с настоящим изобретением, фармацевтическая композиция или композиция, которые определены в данном документе, можно применять для лечения аутоиммунных или аллергических заболеваний, в частности кожных аллергических расстройств, кишечных расстройств, или при отторжении трансплантата, или для лечения лейкоза, такого как острый лимфобластный лейкоз (например, Т-ALL), или лимфомы, такой как лимфома Ходжкина, или лечения злокачественного заболевания, такого как злокачественная опухоль молочной железы, ассоциированная с CD127⁺-клетками, злокачественная опухоль почки, злокачественная опухоль мочевого пузыря, злокачественная опухоль легкого, злокачественная опухоль поджелудочной железы, или для лечения кожной Т-клеточной лимфомы, такой как лимфома при синдроме Сезари, или для лечения острого лимфобластного лейкоза с мутацией с приобретением функции в рамках пути с участием IL-7-R/TSLP.

В соответствии с различными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к применению макромолекул, которые определены в данном документе, с целью сокращения количества CD127-положительных клеток при сохранении CD127-отрицательных клеток.

В соответствии с вариантами осуществления настоящее изобретение относится к применению макромолекул, которые определены в данном документе, с целью предотвращения дифференцировки, и/или размножения, и/или созревания CD127-положительных клеток, в частности, дифференцировки, размножения или созревания, индуцируемых IL-7 и/или TSLP, при этом оказывая незначительный эффект или не оказывая эффект в отношении CD127-отрицательных клеток.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящее изобретение относится к применению макромолекул, определенных в данном документе, с целью ликвидации/нейтрализации наивных Т-клеток и Т-клеток памяти путем создания препятствий индуцируемой IL-7 передаче сигнала при сохранении Трег клеток.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящее изобретение также относится к применению макромолекул, определенных в данном документе, с целью сокращения субпопуляций

лимфоцитов или других клеточных популяций, экспрессирующих CD127 (в том числе нормальных или патологических Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток, дендритных клеток и других типов клеток, в том числе эпителиальных клеток), в результате цитотоксического действия антител, возможно, но не исключительно, посредством ADCC (антителозависимой клеточной цитотоксичности) и, необязательно, посредством CDC (комплементзависимой цитотоксичности).

В соответствии с вышеизложенными вариантами осуществления предполагаемые применения также применимы к нуклеиновым кислотам, векторам, клеткам, клеточным линиям и композициям в соответствии с настоящим изобретением.

Под термином "лечение" или "терапевтическое лечение" подразумевается, что осуществляемые стадии введения приводят в результате к улучшению клинического состояния животного или пациента-человека, нуждающегося в этом, который страдает от нарушения(нарушений), связанных с путем IL-7, т.е. включающих активацию или пролиферацию CD127-положительных клеток. Такое лечение имеет своей целью улучшение клинического статуса животного или пациента-человека посредством устранения или ослабления симптомов, ассоциированных с нарушениями(нарушениями), связанными с путем с участием IL-7, т.е. включающими активацию или пролиферацию CD127-положительных клеток. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления лечение согласно настоящему изобретению обеспечивает возможность восстановления здоровья. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления указанное лечение не оказывает нежелательных отрицательных эффектов, обусловленных повышенным созреванием иммунных клеток, в частности, дендритных клеток.

Настоящее изобретение включает в себя применение макромолекул в лечении патологических состояний, включающих изменение иммунной реакции у пациента-человека, приводящее к доминантному толерогенному состоянию или, напротив, к недостатку толерантности, в случае, когда будет необходим контроль уровня иммунной реакции, а также для разрушения злокачественных CD127-положительных клеток.

Настоящим изобретением предполагаются средства, подходящие для применения при патологиях, таких как патологии, вызываемые отторжением трансплантата, аутоиммунными заболеваниями, аллергическими заболеваниями, респираторными заболеваниями, хроническими вирусными инфекциями, лимфомой, лейкозом или другими злокачественными заболеваниями, в том числе заболеваниями, являющегося результатом солидных опухолей (например, злокачественная опухоль молочной железы), в случае, когда эти патологии ассоциированы с CD127-положительными клетками, а также с путем передачи сигнала с участием IL-7, и когда нужно избегать повышения созревания дендритных клеток.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящее изобретение относится к применению макромолекулы, нуклеиновой кислоты, клетки, клеточной линии или композиции в соответствии с настоящим изобретением у пациента-человека для лечения аутоиммунного заболевания или аллергического заболевания, или для лечения лейкоза, такого как острый лимфобластный лейкоз, или для лечения лимфомы, или для лечения злокачественного заболевания, или для лечения хронической вирусной инфекции, или для лечения воспалительных заболеваний, или для лечения респираторных заболеваний, или для лечения симптомов, связанных с трансплантацией.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения, предусматривающему введение макромолекулы, нуклеиновой кислоты, клетки, клеточной линии или композиции в соответствии с настоящим изобретением у пациента-человека для лечения аутоиммунного заболевания или аллергического заболевания, или для лечения лейкоза, такого как острый лимфобластный лейкоз, или для лечения лимфомы, или для лечения злокачественного заболевания, или для лечения хронической вирусной инфекции, или для лечения воспалительных заболеваний, или для лечения респираторных заболеваний, или для лечения симптомов, связанных с трансплантацией.

Дополнительные признаки и свойства в соответствии с настоящим изобретением будут понятны из следующих примеров и описания фигур.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Ингибирование передачи сигнала с участием IL-7R. Ингибирование индуцируемых IL-7 pSTAT5⁺ Т-лимфоцитов в зависимости от дозы моноклональных антител к человеческому IL-7R α . N13B2 (квадрат), N13E5 (круг) и N13K12 (треугольник). pSTAT5 (%): доля (%) клеток, положительных в отношении фосфо-STAT5, которая измерена с помощью метода FACS. Дозозависимое ингибирование фосфорилирования STAT5 является подобным для трех клонов, причем все три ингибируют фосфорилирование эффективно в концентрации 50 нг/мл (примерно 50% ингибирование) и полностью в концентрации 100-500 нг/мл (> 95% ингибирование).

Фиг. 2. Ингибирование передачи сигнала с участием IL-7R mAb N13B2. Оси соответствуют фиг. 1. (А) Ингибирование индуцируемых IL-7 pSTAT5⁺ Т-лимфоцитов в зависимости от дозы mAb N13B2 (квадраты) по сравнению с mAb MD707-3 (кружки), причем оба из них в формате антитела грызуна. (В) Тот же эксперимент, что и в (А), с химерными формами N13B2 в форме человеческого IgG1 (квадрат) и человеческого IgG4 (круг) в присутствии 0,1 (незакрашенные символы) или 5 нг/мл (закрашенные символы) рекомбинантного человеческого IL-7. N13B2 является более эффективным в ингибировании

STAT5, чем MD707-13 (~50% ингибирование в концентрации 100 нг/мл для N13B2 по сравнению с 1000 нг/мл для MD707-13), тогда как у разных изоформ IgG N13B2 проявляется сравнимая эффективность ингибирования.

Фиг. 3(А) Исследования связывания крысиного антитела N13B2 к CD127.

Антитело N13B2 или MD707-1 впрыскивали на иммобилизованный антиген CD127 в разной концентрации. Отлич. отв.: отличие ответа. Время: время в секундах (общая длительность: 20 мин.). Холост.: холостая проба (без антитела). Кривые ассоциации и диссоциации анализировали с использованием модели "Бивалентный аналит" в программном обеспечении BIAeval 4. Результаты представлены в табл. 1 ниже.

Таблица 1. Результаты исследований связывания

| | Ka (1/М с) | Kd (1/с) | KA (1/М) | KD (М) |
|---------|------------|----------|----------|----------|
| MD707-1 | 2,66 E+05 | 1,21E-04 | 2,19E+09 | 4,56E-10 |
| N13B2 | 2,01E+05 | 1,60E-05 | 1,26E+10 | 7,96E-11 |

Таблица 2. Kd для N13B2 и его химер, описанных в (А) в отдельном эксперименте

| Антитело | Ka1 (1/М с) | Kd1 (1/с) | Rmax (Отн. Ед.) | KA (1/М) | KD (М) |
|----------------|-------------|-----------|-----------------|----------|----------|
| Крысиное N13B2 | 9,63E+04 | 4,75E-06 | 115 | 2,03E+10 | 4,93E-11 |
| N13B2-G1 | 1,49E+05 | 5,62E-05 | 109 | 2,65E+09 | 3,77E-10 |
| N13B2-G4 | 2,01E+04 | 3,41E-06 | 94,9 | 5,89E+09 | 1,70E-10 |

Фиг. 4. Активность в отношении CD127 нового антитела N13B2 измеряли с помощью анализа методом ELISA с использованием рекомбинантного антигена hCD127. OD 450 нм: оптическая плотность при 450 нм. А. Активность связывания N13B2 (закрашенный круг) с CD127 сравнивали с предыдущим поколением антител (MD707-1 (незакрашенный ромб), 3 (незакрашенный треугольник) и 6 (закрашенный квадрат)). Оказывается, что N13B2 наиболее эффективно связывается в анализе. В. Сравнивали активность CD127 у разных форматов N13B2 (крыса, IgG1 (круг) или IgG4 (квадрат)). Не наблюдали значимого различия в активности связывания.

Таблица 3. ED50 у отобранных антител

| | ED 50 (нг/мл) | | ED 50 (нг/мл) |
|---------|---------------|----------------|---------------|
| N13B2 | 65,64 | St cMD707-3-G1 | 16,1 |
| MD707-1 | 122,93 | cN13B2-G1 | 12 |
| MD707-3 | 293,32 | cN13B2-G4 | 12,6 |
| MD707-6 | 2789,41 | | |

Фиг. 5. Индуцируемая TSLP продукция TARC (регулирующий активацию хемокин тимуса, CCL17) и экспрессия маркера клеточной поверхности CD80 миелоидными дендритными клетками. Отсутствует: без стимуляции. LPS: стимуляция липополисахаридом. TSLP: стимуляция TSLP. А) Количественное определение продукции TARC в супернатанте с помощью метода ELISA; и В) экспрессии CD80 на клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии человеческих CD1C⁺-дендритных клеток крови, культивируемых в течение 24 ч только со средой, с 1 мкг/мл LPS или 15 нг/мл TSLP. Данные представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка или средняя квадратичная ошибка (SEM) для концентрации из 3 независимых экспериментов.

Фиг. 6. Ингибирование индуцируемой TSLP продукции TARC антителами к человеческому CD127. Количественное определение методом ELISA продукции TARC в супернатанте человеческих CD1C⁺-дендритных клеток крови, культивируемых в течение 24 ч с 15 нг/мл TSLP и разными концентрациями антител к человеческому CD127: антитело N13B2 (круг), MD707-6 (треугольник) и антитело к TSLP в качестве контроля (X). Данные являются репрезентативными для трех независимых доноров крови. N13B2 лишь очень умеренно ингибирует индукцию секреции TARC (~20% ингибирование в концентрации 6 мкг/мл), тогда как MD707-13 и антитело к TSLPR являются более эффективными ингибиторами (соотв., ~50% и ~70% ингибирование).

Фиг. 7. Эффект антител к CD127 в отношении индуцируемой TSLP экспрессии маркеров созревания дендритных клеток CD80 и CD40. Клетки активировали TSLP в концентрации 15 нг/мл в течение 24 часов. Антитела к CD127N13B2, MD707-3 и MD707-6 добавляли к супернатанту в концентрации 6 мкг/мл. Экспрессию CD80 (А) и CD40 (В) на клеточной поверхности анализировали с помощью метода FACS. Данные являются репрезентативными для 3 независимых экспериментов и выражены в % от уровня экспрессии в контрольных клетках (среда = без антитела, с TSLP). Из анализируемых антител только N13B2 не повышает экспрессию CD40 и CD80 на клеточной поверхности у обработанных TSLP клеток.

Фиг. 8. Антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) химерного (IgG1 или IgG4) N13B2 антитела к человеческому CD127. Человеческие NK-клетки, используемые в качестве эффекторных (Е), инкубировали в течение 4 часов с линией клеток BAF/3, трансфицированных человеческим CD127, в

качестве клеток-мишеней (соотношение клеток: 10 эффекторных на 1 мишень) и с разными концентрациями химерного N13B2 IgG1 (закрашенный квадрат), N13B-IgG4 (незакрашенный квадрат) или химерного MD707-3 (X). Процентное значение специфичной цитотоксичности определяли по высвобождению ⁵¹Cr.

Фиг. 9. Эффективность крысиных mAb N13B2 к CD127 в плане ослабления химически индуцируемого колита у гуманизированных иммунодефицитных мышей. Выживаемость (А) и изменение веса (В) отслеживали ежедневно со Дня 0, начала химической обработки 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS), которая индуцирует тяжелое воспаление толстого кишечника при интратректальном введении, после инъекции PBS (сплошная линия/закрашенный треугольник) или антитело N13B2 к IL-7R α (пунктирная линия, незакрашенный треугольник). На секции (В) каждая точка представляет данные среднего веса (+/- SEM); n = 6 для группы Nu-TNBS + PBS и n = 6 для группы TNBS + антитело к IL-7R α . В обработанной группе выживаемость повышена, а потеря веса снижена.

Фиг. 10. Нуклеотидная и аминокислотная последовательность V_H- и V_L-цепей химеры N13B2G1M. Fc-цепи напечатаны строчными буквами, три CDR в каждой последовательности подчеркнуты. Звездочкой (*) обозначен стоп-кодон в аминокислотной последовательности.

Фиг. 11. Нуклеотидная и аминокислотная последовательность химеры N13B2G4M. Fc-цепи напечатаны строчными буквами, три CDR в каждой последовательности подчеркнуты. Звездочкой (*) обозначено расположение стоп-кодона в аминокислотной последовательности.

Фиг. 12. Аминокислотная последовательность трех альтернативных человеческих Fc-цепей (IgG1, IgG2 и IgG4) и Fc-цепи крысиного антитела (IgG1) N13B2.

Фиг. 13. Анализ связывания с CD127 с помощью метода ELISA: нанесение в виде покрытия человеческого CD127-Fc и выявление антитела к человеческой каппа-цепи. Активность в отношении CD127 нового антитела N13B2 измеряли с помощью анализа методом ELISA с использованием рекомбинантного антигена hCD127. Сравнивали активность в отношении CD127 у разных форматов антитела N13B2 (антитело wt (X), h1 (закрашенный квадрат), h2 (незакрашенный круг) или h3 (закрашенный треугольник) гуманизированное антитело IgG4). OD: оптическая плотность.

Таблица 4. ED 50 у отобранных антител

| | ED 50 (нг/мл) |
|----------|---------------|
| N13B2 wt | 3 |
| N13B2-h1 | 2,4 |
| N13B2-h2 | 0,6 |
| N13B2-h3 | 0,6 |

Фиг. 14. Ингибирование P-STAT5 антителами к CD127. А. Ингибирование индуцируемого IL-7 P-STAT5 гуманизированными mAb N13B2 на Т-лимфоцитах (N13B2 h1 (черный квадрат), h2 (незакрашенный круг) и h3 (черный треугольник) в зависимости от дозы и в сравнении с крысиным антителом N13B2 wt (X) в присутствии 0,1 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-7. В. Разные антитела к CD127 из предыдущих поколений антител сравнивали в отношении их способности к ингибированию IL-7-зависимого P-STAT5: MD707 3 (круг), MD707 4 (треугольник) и MD707 13 (квадрат).

Таблица 5. IC 50 у отобранных антител

| | IC 50 (нг/мл) |
|----------|---------------|
| N13B2 wt | 50,2 |
| N13B2-h1 | 63,8 |
| N13B2-h2 | 18,7 |
| N13B2-h3 | 21,2 |

Фиг. 15. Анализ стабильности гуманизированных антител к CD127 в сравнении с крысиным антителом к CD127. Концентрации антител измеряли с помощью метода ELISA после 7 суток при 37°C (крысиное N13B2wt (+) или гуманизированное N13B2 h3 (квадрат)) и при -80°C (крысиное N13B2wt (X) или гуманизированное N13B2 h3 (треугольник)) и после четырех действий по замораживанию/размораживанию (ромбики).

Таблица 6. Активность связывания у антитела после 7 суток при 37°C или при -80°C и после действий по замораживанию/размораживанию, выполненных 4 раза.

| | |
|---------------------------------------------------|---------------|
| | ED 50 (нг/мл) |
| N13B2 wt хранение при -80°C | 3,6 |
| N13B2 wt хранение 7 суток при 37°C | 3,5 |
| N13B2-h3 хранение при -80°C | 1,3 |
| N13B2-h3 хранение 7 суток при 37°C | 1,1 |
| N13B2-h3 4-кратное замораживание и размораживание | 1,7 |

Таблица 1. Анализ стабильности гуманизированных антител к CD127 в сравнении с крысиным антителом к CD127. Анализ образования агрегатов с помощью гель-фильтрации после инкубирования в течение 7 суток при 37°C или при -80°C.

| | N13B2-wt | | N13B2-h ³ | |
|-------------|--------------|-------------|----------------------|-------------|
| | D7 при -80°C | D7 при 37°C | D7 при -80°C | D7 при 37°C |
| % агрегатов | 3 | 4 | 2,8 | 3,2 |
| % мономеров | 97 | 96 | 97,2 | 96,8 |

Фиг. 16. Анализы конкуренции и интернализации с помощью цитометрии. Человеческие мононуклеарные клетки периферической крови инкубировали с несколькими mAb к CD127 в течение 30 мин либо при 4°C (заштрихованный столбец) или 37°C (черный столбец) или при 37°C в течение 30 мин без IL-7, а затем в течение 15 мин с 5 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-7 (серый столбец): (А) 10 мкг клонов MD707-5, MD707-12 или MD707-13 или химерного N13B2-G4; (В) 50 нг N13B2, HAL клона H3L4 или 1A11 или среда в качестве контроля. Клетки затем окрашивали при 4°C с использованием коммерчески доступных mAb к человеческому CD127 для оценки уровня экспрессии альфа-цепи рецептора IL-7 на клеточной мембране.

Антитела MD707-5, MD707-12 и MD707-13 индуцировали интернализацию рецептора при 37°C с или без IL-7, тогда как химерное N13B2-G4 не индуцировало. Антитело HAL индуцировало снижение экспрессии CD127 на клеточной поверхности в любых условиях. Результаты при 4°C показывают, что антитело 1A11 незначительно конкурирует с антителом, используемым для мечения, тогда как HAL проявляет сильную конкуренцию, а N13B2 не проявляет конкуренцию. При 37°C не наблюдали окрашивания клеточной поверхности в присутствии HAL, тогда как 1A11 само по себе индуцировало сильное снижение экспрессии CD127 на клеточной поверхности, а в сочетании с IL-7 экспрессия на клеточной поверхности снижалась на ~90%. В отличие от этого N13B2 не снижало экспрессию CD127 на клеточной поверхности при 4°C, а также не индуцировало снижение экспрессии CD127 на клеточной поверхности при использовании отдельно, и оно ингибировало снижение, наблюдаемое в присутствии IL-7.

Фиг. 17. (А) Изучение фармакокинетических и фармакодинамических характеристик введения mAb N13B2 и MD707-13 приматам, отличным от человека. Павианов (*Papio anubis*) обрабатывали внутривенно 10 мг/кг N13B2-IgG1 (n=3, закрашенный квадрат), N13B2-IgG4 (n=3, закрашенный круг) или MD707-13-IgG4 (n=3, незакрашенный круг). Концентрацию mAb к CD127 в сыворотке отслеживали с помощью метода ELISA. (В) Параллельно экспрессию CD127 на поверхности Т-лимфоцитов в крови отслеживали с помощью проточной цитометрии и нормализовали к уровню, измеренному перед инъекцией mAb (показан пунктирной линией). * p<0,05. Общие уровни в плазме сравнимы со временем для всех трех антител. Экспрессия CD127 на клеточной поверхности снижается после ~8 суток обработки MD707-13, в то время как такое снижение не наблюдается с любым из исследуемых клонов N13B2.

Фиг. 18. Павианов (*Papio anubis*) обрабатывали внутривенно 10 мг/кг N13B2-IgG1 (n=3, закрашенный квадрат), N13B2-IgG4 (n=3, закрашенный круг) или MD707-13-IgG4 (n=3, незакрашенный круг). Частоту обнаружения регуляторных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺CD25^{Mgh}Foxp3⁺) в крови и лимфатических узлах (выраженную в % CD4-положительных Т-клеток), а также рассчитанное абсолютное количество регуляторных Т-лимфоцитов (выраженное в количестве клеток/мл) отслеживали в День 0 и через 2 недели после введения mAb. ** p<0,01, *** p<0,001. Все три антитела повышают общее количество регуляторных Т-клеток в крови и долю регуляторных Т-клеток как в крови, так и в лимфатических узлах.

Фиг. 19. *In vitro* ингибирование экспрессии α 4-, β 7- и α 4/ β 7-интегринов. А. Процент α 4-положительных и α 4/ β 7-положительных человеческих Т-лимфоцитов после 9 суток культивирования с 5 нг/мл человеческого IL-7 или без него анализировали с помощью метода FACS. В. То же, что и выше, причем указанные концентрации mAb N13B2 добавляли к культуре в День 0. Пунктирными линиями указан фоновый уровень в контрольных условиях (без IL-7 и mAb N13B2). Индуцируемое IL-7 повышенное экспрессии α 4-, β 7- и α 4/ β 7-интегринов предотвращается гуманизированным mAb N13B2 *in vitro* (она полностью ингибируется при концентрации антитела ~2 мкг/мл).

Фиг. 20. *In vivo* ингибирование экспрессии α 4-, β 7- и α 4/ β 7-интегринов. 40×10^6 человеческих мононуклеарных клеток периферической крови вводили инъекцией внутрибрюшинно подвергшимся облучению иммунодефицитным мышам (NOD/SCID/нокаутным по гамма-цепи рецептора IL-2 мышам). Процент β 7-положительных Т-лимфоцитов в крови (слева) и приживление β 7-положительных человеческих

T-лимфоцитов (справа) после двух недель обработки контрольным буфером (n=5) или mAb N13B2 (5 мг/кг, n=5) оценивали с помощью метода FACS. ** p<0,01. N13B2 значительно снижает долю β 7-положительных T-клеток и приживление β 7-положительных T-клеток.

Фиг. 21. Эффект антитела N13B2 в модели DTH, in vivo модели псориаза. Вакцинированных BCG (бацилла Кальмета-Герена) павианов (*Papio anubis*) сенсибилизировали посредством интрадермальной инъекции 2000 (A) или 1000 (B) единиц очищенного туберкулина для индукции реакции гиперчувствительности замедленного типа и диаметры области эритемы записывали каждый день (звездочка; пунктирная линия). Месяц спустя животных обрабатывали внутривенно 10 мг/кг N13B2-IgG1 (n=3, закрашенный квадрат), N13B2-IgG4 (n=3, закрашенный круг) или MD707-13-IgG4 (n=3, незакрашенный круг). Через четыре недели после введения mAb животных снова сенсибилизировали посредством интрадермальной инъекции 2000 (A) или 1000 (B) единиц очищенного туберкулина для индукции реакции гиперчувствительности замедленного типа и диаметры области эритемы записывали каждый день (сплошные линии). Антитело N13B2, но не MD707-13 ингибирует реакцию лимфоцитов памяти, что измеряли по диаметру области эритемы после второй сенсибилизации.

Фиг. 22. Павианов (*Papio anubis*) обрабатывали внутривенно 10 мг/кг N13B2-IgG1 (n=3, закрашенный квадрат), N13B2-IgG4 (n=3, закрашенный круг), или MD707-13-IgG4 (n=3, незакрашенный круг), или контрольным буфером (n=3, пунктирная линия). Спустя четыре часа животные получали внутривенную инъекцию 1,5 мл бараньих эритроцитов (SRBC) в концентрации 10%. Титры специфичных антител IgG к SRBC отслеживали спустя 1 неделю и 2 недели после введения SRBC и нормализовали к их титрам в День 0. * p<0,05. N13B2, но не MD707-13 ингибирует гуморальный иммунный ответ, что измеряли по титру специфичного IgG.

Фиг. 23. Последовательность белка гуманизированного N13B2 VH IgG4 S228P_h3: в последовательности серым цветом выделены CDR, выделенные подчеркиванием и жирным шрифтом аминокислоты являются мутированными (V42I, A54S, D82N, M108L), подчеркнутая последовательность является мутированной последовательностью IgG4 (S228P).

Фиг. 24. Последовательность белка гуманизированного N13B2 VL Скарпа h3: в последовательности серым цветом выделены CDR, выделенные подчеркиванием и жирным шрифтом аминокислоты являются мутированными (V54I, Y77F, F93Y+ N31Q, S59T), подчеркнутая последовательность является мутированной последовательностью IgG4 (S228P).

Фиг. 25. N13B2 защищает от гибели в модели воспаления у мышей: у гуманизированных мышей индуцировали реакцию "трансплантат против хозяина" (см. пример 13). Процент выживших NSG мышей, которым вводили инъекцией 50 миллионов человеческих PBMC в День 0 и не подвергавшихся обработке (белый квадрат, n=14) или обрабатываемых три раза в неделю посредством внутрибрюшинной инъекции 5 мг/кг химерного N13B2 (черный круг, n=19).

Фиг. 26. N13B2 специфично предотвращает воспаление толстого кишечника в модели воспаления у мышей (см. пример 13). На момент умерщвления (т.е. при 25% потере веса или через 100 суток после инъекции) инфильтрацию воспалительных клеток в каждую ткань NSG мышей, которым вводили инъекцией 50 млн человеческих PBMC в День 0 и обрабатывали (показано черным) три раза в неделю 5 мг/кг N13B2 или не обрабатывали (показано белым), анализировали с помощью гистологического анализа 10 мкм срезов, окрашенных гематоксилином и эозином. Результаты представлены следующим образом: А. толстый кишечник, В. тонкий кишечник, С. печень и D. легкое. Данные представляют собой среднее значение +/- SEM от по меньшей мере n=8 на группу.

Фиг. 27. Эпитопные домены на белке CD127 (Uniprot P16871), которые распознаются антителом N13B2. Аминокислоты, выделенные жирным шрифтом, соответствуют последовательностям, образующим конформационный эпитоп, распознаваемый N13B2; аминокислоты на сером фоне являются важными для взаимодействия с IL-7; аминокислоты, которые являются зачеркнутыми, составляют сигнальный пептид CD127.

Фиг. 28. Исследование совместного иммуноосаждения комплекса CD127/IL-7/CD132 с антителами к hCD127 (пример 21). Полосы: 1- только PBL, 2- PBL+IL-7, 3-PBL+IL-7+N13B2, 4- PBL+IL-7+MD707-13, 5- CD132-Fc (72 кДа) или CD-127-Fc (80 кДа). Совместное иммуноосаждение образцов на колонке с антителом hCD127 (MD707-9). Элюаты анализировали с помощью вестерн-блоттинга (A) с использованием кроличьего антитела к человеческому CD132, выявляемого с использованием меченого пероксидазой козьего антитела к кроличьему антителу, или (B) с использованием крысиного антитела к человеческому CD127, выявляемого с использованием меченого пероксидазой ослиного антитела к крысиному антителу.

Примеры

Пример 1. Получение и отбор новых Mab к человеческому CD127

Клетки иммунизировали рекомбинантным hCD127-Ig (hCD127, слитым с константным фрагментом иммуноглобулина, - Sino Biologicals, Пекин, Китай; код 10975-H03H) и моноклональные антитела получали в соответствии с традиционными методиками. Используемый протокол иммунизации был следующим: рекомбинантную химеру CD127-Fc (10975-H03H Sino Biological, Пекин, Китай) использовали для

иммунизации крыс линии LOU/C Igk1a. Пятьдесят микрограмм белков суспендировали в полном адьюванте Фрейнда и вводили подкожно. После 20 суток осуществляли вторичную инъекцию белка, суспендированного в неполном адьюванте Фрейнда. Другую подобную вторичную инъекцию осуществляли в День 60 и бустер-инъекцию осуществляли в День 90 с использованием 100 мкг белков за 4 суток до сбора клеток селезенки.

Гибридому получали посредством слияния моноклеарных клеток селезенки с клетками линии LOU, линии несекретирующих и устойчивых к азагуанину Т-клеток крысиной иммуноцитомы IR983F, в соответствии с ранее описанной процедурой (Chassoux et al, 1988). Гибридому вначале подвергали скринингу по признаку способности секретируемых моноклональных антител к связыванию с рекомбинантной молекулой CD127 (химера CD127-Fc; 10975-H03H, Sino Biological, Пекин, Китай).

После отбора гибридому культивировали в полной среде DMEM. Супернатант концентрировали с помощью ультрафильтрации (Centramate, Pall) и очищали с помощью аффинной хроматографии на белке G (HiTrap, GeHealthcare). Элюирование осуществляли с использованием 0,1 М глицинового буфера для элюирования с pH 2,8. Полученные в результате очищенные иммуноглобулины оценивали в плане активности в анализе ELISA в отношении человеческого CD127.

Из числа первых отобранных клонов, отобранных, исходя из распознавания секретируемыми антителами рекомбинантного CD127, 2 подвергали дополнительному отбору с помощью проточной цитометрии в отношении распознавания CD127, экспрессируемого человеческими Т-клетками и в отношении их антагонистических свойств по отношению к TSLP.

Антитела получали и их изотип, также как и значения их аффинности, характеризовали с помощью измерения поверхностного плазмонного резонанса с использованием технологии BIAcore.

Пример 2. Распознавание rCD127 Mab к h-CD127, оцениваемое с помощью ELISA

Рекомбинантный hCD127 (Sino Biologicals, Пекин, Китай; код 10975-H08H) иммобилизовали на пластике и возрастающие дозы Mab добавляли для измерения связывания. После инкубирования и промывки добавляли меченое пероксидазой мышинное антитело к крысиной каппа-цепи (AbdSerotec) и выявляли его с помощью традиционных методов. Связывание подтверждали для каждого антитела.

Пример 3. Ингибирование передачи сигнала с участием IL-7 (pSTAT5)

Человеческие моноцитарные клетки периферической крови (PBMC), собранные в градиенте плотности фикола от здоровых добровольцев, инкубировали в бессывороточной среде с разными концентрациями антител, представляющих интерес, в течение 15 мин при комнатной температуре перед инкубированием с 0,1 или 5 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-7 (rhIL-7; AbD Serotec, код PHP046) в течение 15 мин при 37°C. PBMC, не обработанные rhIL-7, анализировали в качестве фонового сигнала, в то время как обработанные IL-7 клетки без антитела использовали в качестве отрицательного контроля. PBMC затем быстро охлаждали и промывали FACS буфером для остановки реакции. Клетки затем инкубировали в течение 15 мин с холодным раствором Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, код 554722), промывали дважды буфером Perm/Wash (Bd Bioscience) и окрашивали меченым FITC антителом к человеческому CD3 (Bd Bioscience, код 557694) в течение 30 минут на льду. PBMC затем дважды промывали буфером Perm/Wash и пермеабилizировали в буфере BD Perm Buffer III (Bd Bioscience, код 558050) в течение 30 мин. Клетки затем дважды промывали в FACS буфере (и/или PBS с 1% BSA и 0,1% азида) и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре с меченым Alexa 647 антителом к человеческому pSTAT5 (BD Bioscience, код 612599). Образцы анализировали на FACS-инструменте BD CANTO II. Как показано на фиг. 1 и 2, N13B2 и химерные антитела, полученные из него (N13B2-G1 и N13B2-G4), являлись сильными ингибиторами фосфорилирования STAT5; с более чем 50% ингибированием при концентрациях до 50 нг/мл и более чем 80% (для 0,1 нг/мл IL-7) или более чем 90% (для 5 нг/мл IL-7) ингибированием при концентрациях антитела до 100 нг/мл.

Пример 4.

Значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC50) для разных моноклональных антител к человеческому IL-7R α представлены в табл. 1.

Таблица 8. IC50 для разных антител к CD127 в отношении P-STAT5, индуцируемого 100 пг/мл rhIL-7

| IC50 | N13B2 | N13E5 | N13K12 | MD707-3 | N13B2-G1 | N13B2-G4 |
|-------|-------|-------|--------|---------|----------|----------|
| пг/мл | 43 | 50 | 62 | 1090 | 28 | 37 |

Пример 5. Анализ интернализации IL-7R с использованием цитофлуориметрии

Анализ интернализации можно осуществлять с использованием конфокального микроскопа, как подробно описано в разделе "Материалы и методы" в Henriques et al. (2010) и Luo et al. (2011). Для наблюдения интернализации CD127 в отсутствие IL-7 антитела hN13B2, клон H3L4 HAL (патент США № 863727) или 1A11 (международная патентная заявка WO2011094259) в конечной концентрации 50 нг/мл (или антитела MD707-5, MD707-12, MD707-13 или N13B2-G4 в конечной концентрации 10 мкг/мл) инкубировали с человеческими PBMC (100000 клеток/лунка) в бессывороточной среде (TechMACS, Miltenyi Biotec) в течение 30 мин при 4 или 37°C. Для наблюдения интернализации CD127 в отсутствие IL-7 использовали те же условия предварительного инкубирования при 37°C с антителами и клетки затем

стимулировали рекомбинантным IL-7 (AbD Serotec, код PHP046) в концентрации 0,1 нг/мл в течение 15 мин при 37°C. Реакцию останавливали при 4°C и клетки промывали 3 раза PBS-1%BSA-0,1% азида перед окрашиванием меченым PE антителом к CD127 (клон hIL-7R-M21, BD Bioscience, код 557938), разведенным в соотношении 1/10 в PBS-1%BSA-0,1% азида и инкубировали 15 мин при 4°C. После промывания клетки анализировали с использованием цитофлуориметрии на цитометре CantoII (BD Biosciences). Результаты, представленные на фиг. 16, являются репрезентативными для трех независимых экспериментов.

Этот способ можно легко адаптировать к 96-луночным планшетах с целью осуществления скрининга и проведения отбора антител, которые блокируют зависимую или независимую от IL-7 интернализацию CD127.

Пример 6. Изучение аффинности антитела к CD127

Аффинность антитела к hCD127 измеряли с помощью поверхностного плазменного резонанса на Biacore 3000 (GE Healthcare).

Чип CM5 (GE healthcare) активировали впрыскиванием смеси NHS/EDC в течение 7 мин. CD-127Fc (500 мкг/мл) разводили в 5 мМ малеатном буфере с pH 6,2 и остатки сукцинимидного сложного эфира впрыскивали до улавливания сигнала в 300 RU (относительные единицы). Свободные реакционноспособные остатки инактивировали посредством инъекции 1 М этаноламина с pH 8,5. Антитела впрыскивали на иммобилизованный CD127 в диапазоне концентраций, определенном в разделе Результаты. Скорость инъекции устанавливали на 40 мкл/мин, ассоциацию измеряли в течение 3 мин, а диссоциацию - в течение 10 мин. Между каждым циклом анализа чип регенерировали инъекцией раствора 5 М MgCl₂ в течение 60 с.

Полученные сенсограммы анализировали с использованием модели "Бивалентный аналит" в программном обеспечении BIAeval 4.

Как показано на фиг. 3 и в табл. 2 в данном документе, N13B2 из крысы и химеризованное антитело проявляли высокую аффинность в отношении CD127, причем KD находилась в диапазоне 4,9E-11 М - 8,Е-11 М (N13B2 от крысы), 3,77.Е-10 (N13B2-G1) и 1,70.Е-10 (N13B2-G4). Антитело MD707-1 из крысы проявляло более низкую аффинность в отношении CD127, чем N13B2 из крысы.

Пример 7. Активность связывания антитела к CD127

Для осуществления сэндвич-ELISA, ослиное антитело к человеческому IgG (Fc-специфичное) наносили в виде покрытия в концентрации 1,2 мкг/мл на P96-планшет и очищенные антитела добавляли для измерения концентрации в зависимости от стандартного диапазона. После инкубирования и промывания добавляли мышинное специфичное в отношении каппа-цепи антитело к человеческой легкой цепи (Abcam, код ab79115, или Effimune, клон NaM76-5F3) и меченое пероксидазой ослиное антитело к мышинному антителу (Jackson Immunoresearch, код 715-036-151) и выявляли их с помощью традиционных методов.

Активность связывания антитела к hCD127 оценивали с помощью ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ). В случае ELISA анализа рекомбинантный hCD127 (Sino Biologicals, Пекин, Китай; код 10975-H08H) иммобилизовали на пластике в концентрации 1 мкг/мл и очищенное антитело добавляли для измерения связывания. После инкубирования и промывки добавляли меченое пероксидазой мышинное антитело к крысиной каппа-цепи (AbdSerotec) и выявляли его с помощью традиционных методов.

Как показано на фиг. 4 и в табл. 3, измеренная с помощью ELISA активность связывания антитела N13B2 является высокой, причем ED50 = 65,6 нг/мл (ED50 < 75 нг/мл и ED50 < 100 нг/мл) для крысиного N13B2 антитела к hCD127, и ED50 составляла 12,0 нг/мл и 12,6 нг/мл (ED50 < 15 нг/мл) для двух химерных антител, полученных из N13B2 (cN13B2-G1 и CN13B2-G4).

Пример 8. Анализ стабильности

Гуманизованные и химерные очищенные N13B2-G1 инкубировали при 37°C или при -80°C в течение 7 суток. Два анализа использовали для измерения стабильности антитела: анализ связывания антитела с CD127 с помощью ELISA и образование агрегатов с помощью гель-фильтрации. В случае ELISA анализа активности рекомбинантный hCD127 (Sino Biologicals, Пекин, Китай; код 10975-H08H) иммобилизовали на пластике в концентрации 1 мкг/мл и разведенные образцы супернатанта добавляли для измерения связывания. После инкубирования и промывки добавляли мышинное антитело к человеческой легкой цепи (специфичное в отношении каппа-цепи) и меченое пероксидазой ослиное антитело к мышинному антителу и выявляли их с помощью традиционных методов. В случае анализа образования агрегатов образец анализировали на колонке для гель-фильтрационной хроматографии (Superdex 200, 10/300GL, GeHealthcare) для разделения и оценки агрегата и мономера из образцов.

Пример 9. Индуцируемая TSLP продукция TARC и экспрессия маркеров зрелых дендритных клеток CD80 и CD40

Миелоидные дендритные клетки (DC) выделяли с использованием набора для выделения CD1c (BOCA-1)⁺-дендритных клеток (Miltenyi Biotec, Бергиш-Гладбах, Германия) из крови здоровых добровольцев (Etablissement Francais du Sang, Нант, Франция). Миелоидные дендритные клетки культивирова-

ли в среде RPMI, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, 1% пирувата, 1% Нерес, 1% L-глутамин и 1% пенициллина-стрептомицина. Клетки высевали в количестве 5.10⁴ клетки/лунку в плоскодонные 96-луночные планшеты в присутствии TSLP (15 нг/мл), LPS (1 мкг/мл) или только среды культивирования и при добавлении крысиных антител к человеческому CD127 в разных концентрациях. Через 24 ч культивирования клетки анализировали с помощью проточной цитометрии в отношении маркера созревания CD80 на клеточной поверхности (антитело к CD80-V450 (BD#560442) и супернатанты собирали и анализировали в отношении продукции TARC с помощью ELISA анализа (R&D systems, Миннеаполис, США).

Ингибирование индуцируемой TSLP продукции TARC оценивали путем измерения указанной продукции, как описано выше, в отсутствие антитела или в присутствии N13B2, или MD707-6, или коммерческого антитела к TSLP (R&Dsystems, код AF981) в концентрации 1 мкг/мл или 6 мкг/мл. Как показано на фиг. 6, N13B2 ингибировало индуцируемую TSLP продукцию TARC более чем на 25% в концентрациях до 1 мкг/мл, т.е. также эффективно, как и MD707-6 в этой концентрации.

Ингибирование индуцируемой TSLP экспрессии маркеров клеточной поверхности CD40 и CD80 оценивали посредством измерения указанной экспрессии, как описано выше (в случае CD40 использовали антитело (антитело к CD40-FITC от Beckton Dickinson, код 555588) в условиях, подобным описанным выше для CD80), в отсутствие антитела (в этом случае экспрессию нормализуют к 100%) или в присутствии антител N13B2, MD707-3 или MD707-6 в концентрации 6 мкг/мл. Как показано на фиг. 7, как MD707-3, так и MD707-6 индуцировали повышение экспрессии CD40 и CD80, тогда как MD707-3 являлось хорошим ингибитором активации STAT5 и хорошо связывалось с CD127 (фиг. 2 и 4), и MD707-6 являлось сильным ингибитором индуцируемой TSLP продукции TARC (фиг. 6). Повышение составляло по меньшей мере 20% для CD80 и 50% для CD40. В отличие от этого антитело в соответствии с настоящим изобретением, N13B2, не повышало индуцируемую TSLP экспрессию CD40 или CD80. Вместе с тем, указанные уровни экспрессии были ниже в присутствии TSLP и антитела, чем в присутствии только TSLP.

Пример 10. Антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) Mab к человеческому CD127

ADCC называется связывание антитела с эпитопом, экспрессируемым на клетках-мишенях, и последующее Fc-зависимое привлечение эффекторных иммунных клеток, экспрессирующих Fc-рецепторы (в основном NK-клеток и активированных лимфоцитов), приводя в результате к цитолизу клеток-мишеней преимущественно посредством механизмов на основе гранзима/перфорина.

Эффекторные клетки представляли собой свежие первичные человеческие NK-клетки, выделенные из мононуклеарных клеток периферической крови посредством отрицательного отбора с использованием магнитных гранул (набор для выделения NK-клеток, Miltenyi Biotec, Бергиш-Гладбах, Германия) и инструмента для клеточного сортирования AutoMACS. NK-клетки инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO₂ в среде RPMI1640 (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), дополненной 10% FBS (Life Technologies), 100 МУ/мл пенициллина (Life Technologies), 0,1 мг/мл стрептомицина (Life Technologies), 2 мМ L-глутамин (Life Technologies) и 150 МУ/мл человеческого IL-2 (Roche, Базель, Швейцария). Клетки-мишени (клеточная линия BAF/3, трансфицированная человеческим CD127 (Park et al., 2000)) метили 100 мкКи (3,7 МБк) 51Cr (PerkinElmer) в течение 1 ч при 37°C и промывали пять раз средой культивирования. Клетки-мишени инкубировали с разбавленными антителами или с вспомогательным средством (средой культивирования) в течение 15 мин при комнатной температуре и 10000 клеток помещали в 96-луночный планшет с U-образным дном. Эффекторные T-клетки добавляли при соотношении клеток 10:1 (конечный объем: 200 мкл) в течение 4-часового периода инкубирования при 37°C. Затем собирали в общей сложности 25 мкл супернатанта и производили подсчет на счетчике гамма-частиц (Packard Instrument).

Как Mab MD707-3 крысиного происхождения, так и химерное Mab N13B2-G1 (имеющее, следовательно, Fc-домен типа IgG1) проявляли ADCC. Химерное N13B2-G4 (имеющее Fc-домен типа IgG4) не проявляло никакой активности ADCC и использовалось в качестве отрицательного контроля. Интересно, что не существовало прямой корреляции между аффинностью, свойствами связывания и ADCC, указывая на то, что свойства ADCC нельзя спрогнозировать, исходя из анализов связывания.

Пример 11. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности Mab к человеческому CD127

V_H- и V_L-участки клона N13B2 секвенировали с использованием технологии ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (RACE PCR). Вкратце, общую РНК экстрагировали, подвергали обратной транскрипции и полученную в результате кДНК подвергали полиаденилированию по 3'-концу молекул с использованием dATP и фермента терминальной трансферазы. Первые 35 циклов реакции ПЦР проводили с использованием якорного праймера олиго(dT) и фермента геркулазы (Stratagene). Вторые 35 циклов ПЦР проводили с использованием якорных праймеров для гнездовой ПЦР. Полученный в результате ПЦР-продукт затем подвергали ГА-клонированию в E. Coli и после отбора на ампициллине полученные в результате колонии подвергали скринингу посредством анализа профиля фрагментов с использованием рестрикционных ферментов и встроившуюся кДНК секвенировали.

Пример 12. Гуманизация

Гуманизацию крысиного моноклонального антитела N13B2 выполняли с использованием стандартной технологии CDR-прививки. Принцип этого метода заключается в структурной перестройке человеческого антитела таким образом, чтобы оно содержало только определяющие комплементарности участки (CDR) из крысиного моноклонального антитела для того, чтобы не только снизить иммуногенность антитела у людей, но также улучшить биофизические свойства молекулы с привитыми CDR.

Гуманизация посредством CDR-прививки требует того, чтобы антигенсвязывающие остатки из исходного крысиного антитела сохранялись у гуманизированного варианта. Было обнаружено, что остатки, смежные с CDR, называемые остатками "из зоны Vernier", оказывают воздействие на конформации CDR и на точную регулировку распознавания антигена. Chothia and Lesk, (1987), выделяли конформации CDR в соответствии с "каноническими" остатками, некоторые из которых сами располагаются в пределах CDR, а другие - в каркасных участках. Таким образом, идентификация этих остатков "из зоны Vernier" и "канонических" остатков является критически важной стадией. Используемый протокол основывается на подходе, впервые предложенном Грегом Винтером и коллегами (Paus and Winter, 2006) в Совете по исследованиям в области медицины, Кембридж, Великобритания, и в котором используются остатки CDR, определенные по Kabat.

Отбор акцепторных человеческих каркасных участков, на которые прививают CDR участки крысиного N13B2, выполняли посредством IMGT поиска в базах данных V-генов для крысы и человека с использованием IgBLAST - инструмента, разработанного в NCBI для облегчения анализа последовательностей переменных участков иммуноглобулинов (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>; Ye et al., 2013), причем в качестве вводимых данных использовали последовательности V_H и V_L крысиного N13B2. Помимо этого, в применяемой в данном случае стратегии используются человеческие последовательности зародышевой линии, которые представляют собой природные человеческие последовательности, не содержащие соматические сверхмутации, обнаруживаемые в белке и полученных из кДНК последовательностях. Обычно отбирали гены зародышевой линии, наиболее подобные крысиным последовательностям V_L и V_H . Акцепторные человеческие каркасные V_H - и V_L -участки зародышевой линии идентифицировали посредством выравнивания последовательностей V_H и V_L исходного антитела N13B2 и на основе следующих критериев: 1. идентичность последовательности по каркасной области и CDR, как определено Kabat, 2. идентичные и совместимые остатки на поверхности взаимодействия между цепями 3, поддерживающие петли с исходными каноническими конформациями CDR и остатками из зоны Vernier.

Несколько разных последовательностей, полученных в результате гуманизации, исследовали в отношении N13B2 для выбора лучшей, которая сохраняет связывание и биологическую активность. Для гуманизированных вариантов N13B2 переменную последовательность гуманизированной тяжелой цепи (V_H) антитела N13B2 клонировали с помощью EcoRV в экспрессионную плазмиду pFuseCHlg-hGle4 (Invivogen, Тулуза), содержащую CH1-CH2-CH3 домены hlgG1, в которые была введена мутация E333A для повышения ADCC. Переменную последовательность гуманизированной легкой цепи (V_L) антитела N13B2 клонировали с помощью BsiWI в экспрессионную плазмиду pFuse2CLlg-hk (Invivogen, Тулуза), содержащую человеческий CLкаппа.

В COS-клетках, которые авторы настоящего изобретения подвергли совместной трансфекции с помощью метода с использованием липофектамина, присутствовали плазмиды, содержащая V_H -hFcG1, с плазмидой, содержащей V_L -CLk. После 48-72-часового инкубирования супернатант выделяли и очищали с помощью аффинной хроматографии на белке G (HiTrap, GE Healthcare) с 0,1 М глициновым буфером для элюирования с pH 2,8. Очищенное антитело подвергали диализу в PBS и концентрировали. Их количественное определение осуществляли с помощью сэндвич-ELISA и исследовали в анализе активности в отношении антигена CD127.

Пример 13. Исследование воздействия антител к IL-7R α в отношении IL-7 в разных *in vivo* моделях воспалительного заболевания

С целью оценки эффекта антагонистического антитела в индукции колита у гуманизированных NSG мышей авторы настоящего изобретения провели ряд экспериментов в модели с TNBS, которые показали измеримый эффект. Применение гаптенов, таких как TNBS (2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота), позволяет обеспечить имитацию иммунологической модели (Nancey et al., 2008). Колит индуцируется у мышей путем интравектального введения TNBS (Sigma Chemical, L'Isle d'Abeau Chesne, Франция), разведенного в этаноле, в День 0 четырем гуманизированным мышам. Первоначально, мышам подвергали анестезии посредством ингаляции газовой смесью. В День 7 животных умерщвляли под анестезией посредством интоксикации CO₂ для нескольких исследований (данные не показаны). Некоторых животных умерщвляли до Дня 7 вследствие их плохой клинической оценки.

Таким образом, две новые группы мышей обрабатывали либо PBS, либо инъекциями 210 мкл антитела к IL-7R α N13B2 в концентрации 0,7 мг/мл каждые 2 суток, начиная с дня перед обработкой TNBS. Осуществляли анализы, подобные выполняемым при разработке модели.

Затем авторы настоящего изобретения исследовали эффективность антитела N13B2 в модели реакции «трансплантат против хозяина» (GVHD) с использованием гуманизированных мышей. Эта модель

имитирует общего воспалительного заболевания. Некоторых NOD/scid/IL-2R γ -/- (NSG) мышей (Charles River, Л'Арбрель, Франция) возрастом 7-12 недель облучали (3Gy) и вводили инфузией внутривенно (i.p.) 50 миллионов человеческих РВМС от здоровых доноров, как ранее описано Poirier et al., 2012. Животных затем содержали в асептических условиях и подвергали мониторингу три раза в неделю в отношении изменения веса и клинической оценки. Контрольную группу оставляли необработанной после инфузии клеток, а обрабатываемая группа получала, начиная со Дня 0 и три раза в неделю, i.p. инъекции 5 мг/кг химерного mAb N13B2. Диагноз GVHD ставили мышши после 20% потери веса. Животных, у которых была обнаружена более чем 25% потеря веса, и животных, выживших после 100 суток с Дня 0, умерщвляли. После умерщвления ткани толстого кишечника, тонкого кишечника, печени и легких замораживали в жидком азоте и реактиве Tissu-tek для гистологического анализа. Замороженные срезы (10 мкм) из этих тканей сушили на воздухе при комнатной температуре в течение 1 ч до фиксации в ацетоне в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем окрашивали раствором гематоксилина и эозина. Результаты представлены на фиг. 25 и 26.

Пример 14. Анализ различных клинических параметров

Выживание (фиг. 9А): авторы настоящего изобретения оценивали выживаемость в связи с химической обработкой и применением антител к IL-7R α . Проявлялась тенденция, что процент выживших оказывался более значительным для группы Hu-TNBS + IL-7R α , чем для группы Hu-TNBS + PBS (фиг. 9А). Действительно, авторы настоящего изобретения наблюдали, что 100% из мышшей группы Hu-TNBS + IL-7R α выживали до 5 суток, тогда как в группе Hu-TNBS + PBS три животных пришлось умертвить до J5.

Вес (фиг. 9В): в обработанных TNBS группах, начиная с интравенной инъекции 5% TNBS/50% этанола со Дня 0, авторы настоящего изобретения наблюдали снижение веса до 20% для обеих групп. Тем не менее, в группе Hu-TNBS + IL-7R α животные набирали вес с J3, тогда как в группе Hu-TNBS + PBS потеря веса продолжалась (фиг. 9В). Важно отметить, что мышши должны были быть умерщвлены для сбора биологических данных, и более долгосрочный протокол подтвердил бы повторный набор веса.

Выживаемость (фиг. 25): авторы настоящего изобретения оценивали выживаемость в связи с инъекцией человеческих РВМС (развитие GvHD) и применением антитела к IL-7R α N13B2. Выживаемость животных была на 30% лучше, когда животных обрабатывали антителом, чем у контрольных животных (100% смертность контрольных животных после 60 суток). Эти результаты показывают, что антитело N13B2 защищает от GvHD и смерти.

Инфильтрат в тканях (фиг. 26): толстый кишечник, тонкий кишечник, печень и легкие из умерших и выживших (но умерщвленных) животных, обработанных или не обработанных, подвергали гистологическому анализу в отношении показателя инфильтрации воспалительных клеток в них (определяли гистологическую оценку). Авторы настоящего изобретения наблюдали, что толстый кишечник животного, обработанного N13B2, содержал меньшее количество клеточного инфильтрата, чем контроль. Не наблюдали различия в тонком кишечнике, печени и легком между обоими состояниями.

У животных, обработанных N13B2, проявлялась 30% выживаемость по сравнению с контролем. Клеточный инфильтрат, характеризующий воспаление, не модифицировался при обработке в тканях тонкого кишечника, печени и легкого, это показывало, что в этой модели воспаления N13B2 не защищает от воспаления в этих тканях. Тем не менее, N13B2 индуцировало 50% снижение количества клеточного инфильтрата в толстом кишечнике. Можно увидеть корреляцию этого эффекта с активностью антитела N13B2 в отношении экспрессии $\alpha 4\beta 7$ -интегрин, что представлено на фиг. 19 и 20. Действительно, $\alpha 4\beta 7$ -интегрин, как известно, играет важную роль в хоуминге активированных лимфоцитов в кишечник. Таким образом, снижение экспрессии интегрин, индуцируемое антителом N13B2, может быть ответственно за снижение количества клеточного инфильтрата, наблюдаемого в толстом кишечнике (фиг. 26). Следует подчеркнуть, что явное отсутствие защиты в других тканях может быть специфичным для модели, используемой в данном случае, и это не должно приводить к выводу, что защитный эффект антитела ограничивается толстым кишечником. В частности, гораздо более высокая выживаемость обработанных животных показывает, что защитный эффект антитела оказывает сильное положительное воздействие на общее состояние животных.

Пример 15. In vivo эффективность антитела в отношении неинтернализованного CD127

Животные

Павианы (*Papio anubis*, из Центра приматологии CNRS, Руссе, Франция) были отрицательными в отношении всех карантинных анализов, в том числе по туберкулиновой кожной пробе. Животных содержали в большом виварии при лаборатории, следуя этическим нормативам Institutional Ethical Guidelines института Institut National de la Sante Et de la Recherche Medicale, Франция. Все эксперименты выполняли под общей анестезией с использованием золетила (Virbac, Карро, Франция). Фармакокинетические и фармакодинамические исследования осуществляли в ходе экспериментов с ДТН на пяти павианах, получающих i.v. болюсную инъекцию 10 мг/кг любого из N13B2-IgG1, или N13B2-IgG4, или MD707-13-IgG4.

BCG вакцинация и ДТН анализ

В соответствии с Poirier и соавт. (Poirier et al., 2011) павианов иммунизировали интрадермально

(i.d.) дважды вакциной на основе бациллы Кальмета-Герена (BCG) (0.1 мл; 2-8 ¥ 105 UFS; Sanofi Pasteur MSD, Лион, Франция) в верхнюю область нижней конечности за 4 и 2 недели до анализа кожной DTH. Для изучения антигенспецифичного Т-клеточного иммунитета перед анализом кожной DTH успешную иммунизацию подтверждали с помощью иммуноферментного спот-анализа (ELISPOT) интерферона (IFN)-g (набор для ELISPOT-анализа IFN-g примата, отличного от человека; R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота, США) на свежесыведенных РВМС в соответствии с инструкциями производителя. Интрадермальные реакции (IDR) проводили с использованием дублирующих интрадермальных инъекций двух доз (1000 МУ или 2000 МУ) очищенного белкового продукта туберкулина (PPD; Symbiotics Corporation, Сан-Диего, Калифорния, США) в 0,1 мл в кожу на правой части спины животных. Солевой раствор (0,1 мл) использовали в качестве отрицательного контроля. Кожные реакции в местах инъекции измеряли с использованием штангенциркуля. Диаметр каждой уплотненной области эритемы измерялся двумя наблюдателями, начиная с Дней 3-8, и результат считался положительным, когда диаметр области составлял >4 мм. Записывали среднее значение показаний. Образцы биопсии кожи из места DTH или места введения контроля (солевого раствора) забирали в День 4 на месте одной дублирующей инъекции и помещали в реактив Tissue Тек для обеспечения оптимальной температуры получения срезов (ОСТ) (Sakura Finetek, Вильнев-д'Аск, Франция) для иммуногистохимического анализа. Вторую IDR проводили после 3-недельного "отмывочного периода", и животные получали одну i.v. инъекцию 10 мг/кг любого из химерных антител к CD127 (N13B2-IgG1, или N13B2-IgG4, или MD707-13-IgG4) за 1 сутки до этой второй сенсибилизации PPD. Третью IDR проводили после дополнительного 3-6-недельного "отмывочного периода" и животных оставляли необработанными. В некоторых случаях проводили четвертую IDR после еще одного 3-месячного "отмывочного периода" и животных также оставляли необработанными.

Пример 16. Экспрессия $\alpha 4\beta 7$ на поверхности Т-клеток *in vitro* и *in vivo* в мышинной модели

Для измерения индуцируемой IL-7 экспрессии $\alpha 4\beta 7$ на поверхности Т-клеток человеческие Т-лимфоциты стимулировали в течение 9 суток при 37°C с использованием IL-7 (AbD Serotec, код PHP046) в концентрации 5 нг/мл. Реакцию останавливали при 4°C и промывали перед окрашиванием меченым PerCP/Cy5 антителом к $\alpha 4$ (BD Bioscience, 563644, клон 9F10) и меченым PE антителом к $\beta 7$ (BD Bioscience, клон FIB504). Положительные в отношении $\alpha 4$ -интегрина клетки, а затем $\beta 7$ -положительные клетки подвергали измерению с помощью проточной цитометрии. Гуманизированное антитело N13B2 добавляли в День 0 в культуру клеток в разных концентрациях, составляющих от 0,01 до 20 мкг/мл.

In vivo, 40×10^6 человеческих мононуклеарных клеток периферической крови вводили инъекцией внутривенно подвергшимся облучению иммунодефицитным мышам (NOD/SCID/ нокаутным по гамма-цепи рецептора IL-2 мышам). Через две недели после обработки контрольным буфером (n=5) или mAb N13B2 (5 мг/кг, n=5) процент $\beta 7$ -положительных Т-лимфоцитов в крови измеряли с помощью проточной цитометрии и приживление $\beta 7$ -положительных человеческих Т-лимфоцитов измеряли с помощью проточной цитометрии. Это приживление измеряли с помощью проточной цитометрии посредством отделения человеческих CD45-положительных клеток от мышинных CD45-положительных клеток с использованием специфичных антител (PECy7 антитело к человеческому CD45 от BD, код 57748, и PerCP/Cy5.5 антитело к мышинному CD45 от BD, код 550994), затем анализировали человеческие $\beta 7$ -положительные клетки (BD Bioscience, клон FIB504).

Пример 17. Определение антигенного профиля антител с использованием микроматриц с пептидами

Микроматрицы с пептидами PepStar™ от Peptide Technologies содержат очищенные синтетические пептиды, полученные из антигенов или других источников, которые хемоселективно и ковалентно иммобилизованы на стеклянной поверхности. Оптимизированный гидрофильный линкерный фрагмент вводили между стеклянной поверхностью и полученной из антигена пептидной последовательностью во избежание получения ложноотрицательных результатов, вызванных стерическим несоответствием. По техническим причинам все пептиды содержали С-концевой глицин. Эксперименты по определению антигенного профиля образцов выполняли на пептидной библиотеке, состоящей из 52 пептидов. Полный перечень пептидов приведен ниже.

Таблица 9. Перечень пептидов, используемых в анализе с использованием микроматриц с пептидами

| SEQ ID | Последовательность | SEQ ID | Последовательность | SEQ ID | Последовательность |
|--------|---------------------|--------|---------------------|--------|-----------------------------|
| 58 | ESGYAQNGLLEDA EL | 76 | FIETKKFLLIGKSNI | 94 | HDVAYRQEKDENK WT |
| 59 | AQNGDLEDAELDD YS | 77 | KKFLLIGKSNICVK V | 95 | YRQEKDENKWT NL |
| 60 | DLEDAELDDYSFS CY | 78 | LIGKSNICVKVGEK S | 96 | KDENKWT NLSS TK |
| 61 | AELDDYSFSCYSQ L | 79 | SNICVKVGEKSLTC K | 97 | KWTHVNLSS TKLTL L |
| 62 | DYSFSCYSQLEVN GS | 80 | VKVGEKSLTCKKID L | 98 | VNLSS TKLTL LQRL L |
| 63 | SCYSQLEVNGSQH SL | 81 | EKSLTCKKIDLT TIV | 99 | STKLTLLQRL LQPA A |

| | | | | | |
|----|----------------------|----|----------------------|-----|----------------------|
| 64 | QLEVNGSQHSLTC AF | 82 | TCKKIDLTIVKPEA | 100 | TLLQRKQLQAAMY EI |
| 65 | NGSQHSLTCAFEDP D | 83 | IDLTTIVKPEAPFDL | 101 | RKLQAAMYEIKVRS S |
| 66 | HSLTCAFEDPDVNT TT | 84 | TIVKPEAPFDLSVIY | 102 | PAAMYEIKVRSIPD H |
| 67 | CAFEDPDVNTTNL EF | 85 | PEAPFDLSVIYREGA | 103 | YEIKVRSIPDHYFKG |
| 68 | DPDVNTTNLEFEIC G | 86 | FDLSVIYREGANDF | 104 | VRSIPDHYFKGFWS E |
| 69 | NTTNLEFEICGALV E | 87 | VYIYREGANDFVVTF N | 105 | PDHYFKGFWSSEWS PS |
| 70 | LEFEICGALVEVKC L | 88 | EGANDFVVFNTSHL L | 106 | FKGFWSSEWSPSYYF R |
| 71 | ICGALVEVKCLNFR K | 89 | DFVVFNTSHLQKK Y | 107 | WSEWSPSYYFRTPE I |
| 72 | LVEVKCLNFRKLQ EI | 90 | TFNTSHLQKKYVK VL | 108 | SPSYYFRTPEINNSS |
| 73 | KCLNFRKLQEIYFI E | 91 | SHLQKKYVKVLMH DV | 109 | YFRTPEINNSSGEM D |
| 74 | FRKLQEIYFIETKKF | 92 | KKYVKVLMHDVA YRQ | | |
| 75 | QEIYFIETKKFLIG | 93 | KVLMHDVAYRQEK DE | | |

В сумме 9 образцов инкубировали на стеклах с микроматрицами с использованием многолуночного формата. Для антитела N13B2 и других образцов применяли 4 разные концентрации (10, 1, 0,1 и 0,01 мкг/мл). Инкубирование одного отрицательного контроля (только вторичное антитело) осуществляли параллельно. Белки человеческого и мышинного IgG подвергали совместной иммобилизации наряду с каждым набором пептидов, чтобы они служили в качестве контролей при анализе. Все процедуры инкубирования осуществляли параллельно с использованием двух стекол. Две пептидные мини-матрицы на каждом стекле использовали в качестве контроля инкубирования, внося на них только содержащее флуоресцентную метку выявляющее антитело для оценки ложноположительного связывания с пептидами. После промывания и высушивания стекол их сканировали с использованием лазерного сканера с высокой разрешающей способностью при длине волны 635 нм с получением изображений данных интенсивностей флуоресценции. Изображения подвергали количественной оценке для получения среднего значения интенсивности пикселя для каждого пептида. Вторичное антитело к крысиному IgG (JIR 212-175-082), меченое Су5 в концентрации 1 мкг/мл. Буферы и растворы Используемый буфер представлял собой TBS-буфер, включающий в себя 0,05% Tween20 (JPT), и T20 буфер для анализа (Pierce, SuperBlock TBS T20, #37536).

Сбор и анализ осуществляли с использованием микроматриц с пептидами (JPT Peptide Technologies GmbH, Берлин, Германия; партия № 2668), многолуночной инкубационной камеры, сканера Axon GenePix Scanner 4200AL, программного обеспечения для распознавания пятен GenePix и Microsoft Excel, R.

Пример 18. Картирование эпитопов с помощью масс-спектрометрического анализа

Масс-спектрометрию использовали для идентификации конформационного эпитопа. Определение последовательности эпитопа выполняли с использованием масс-спектрометра с MALDI. Этот инструмент обеспечивает возможность анализа пептидной последовательности весом от 800 до 4000 Да. Расщепление белка, представляющего интерес, позволяет разрезать белок на небольшие фрагменты (потенциальные эпитопы). В идеале, расщепляющий фермент должен осуществлять разрезание как можно ближе к границам эпитопа. Выбор расщепляющего фермента следует выполнять с учетом частоты разрезания ферментом в последовательности рекомбинантного белка. Второе расщепление предусматривается для уменьшения размера эпитопов, полученных в конце первого расщепления. В зависимости от выбранного фермента профили значительно отличаются. Ферментом, характеризующимся наилучшим распределением расщепленных фрагментов по последовательности, является химотрипсин. Вторым ферментом с подходящей частотой разрезания и хорошим распределением расщепленных фрагментов по последовательности, представляющей интерес, является Glu C.

Поскольку эпитоп является конформационным, предпочтение отдают расщеплению комплекса в ходе аффинной хроматографии. Идентификация последовательности, представляющей интерес, основывается на защите эпитопа от ферментативного расщепления посредством образования комплекса антиген-антитело. После прохождения аффинной хроматографии и расщепления фрагменты эпитопа элюируют и определяют последовательность при помощи масс-спектрометрии (MALDI-TOF-TOF Bruker). 3D-структура белка, представляющего интерес, является доступной, и ее сравнивают с полученными результатами.

Последовательность в базе данных Uniprot под номером доступа P16871 [21-239] (Seq ID No: 114):

ESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLEVNGSQHSLTCAFEDPDVNTTNLEFEICGALVEVK
CLNFRKLQEIYFIETKKFLIGKSNICVKVGEKSLTCKKIDLTIVKPEAPFDLSVIYRE
GANDFVVFNTSHLQKKYVKVLMHDVAYRQEKDENKWTNVNLSSTKLT
LLQRKQLQAAMYEIKVRSIPDHYFKGFWSSEWSPSYYFRTPEINNSSGEMD

Определенные *in silico* возможные варианты выбора фермента, расщепляющего CD127, (см. подчеркнутые аминокислоты выше в последовательности, соответствующей Seq ID No: 114): Химотрипсин выбрали в качестве расщепляющего фермента. Сайты разрезания (жирные линии), количество пептидов, частота разрезания являются подходящими. Фермент Glu-C выбирали в качестве второго расщепляющего фермента. Количество полученных пептидов с весом, составляющим от 800 до 4000 Да, является подходящим. Частота разрезания Glu-C и расположение сайтов разрезания (тонкая линия) являются подходящими. Используемая процедура является традиционной и хорошо известна специалисту в данной области техники, также она описана в Suckau et al, 1990, и Papas et al., 1994.

Материалы и реактивы: масс-спектрометр MALDI-TOF/TOF II de Bruker; Hi-trap NHS колонки (код: 17-0716-01 - GE healthcare); химотрипсин (код: 11418467001 - Roche); Glu C (код: 11420399001 - Roche); Zip/TIP C18 (код: ZTC18S096 - Millipore); бикарбонат аммония (код: 09830 - Sigma); глицин (код: G7126 - Sigma); NaCl (код: 27800.360-VWR).

Фаза 1. Расщепление несвязанного белка и антитела в растворе.

Расщепление в растворе несвязанного антигена и антитела химотрипсином или Glu C в течение 1, 2, 3, 4, 5 ч и в течение ночи при комнатной температуре или при 37°C. Анализ расщепленных пептидов осуществляли посредством масс-спектрометрии (MS) расщепленных пептидов. Эти эксперименты позволяют установить подходящие условия для ферментативного расщепления (время и температура). Цель заключается в том, чтобы иметь достаточное расщепление антигена при минимальном воздействии на структуру антитела, насколько это возможно. Определенными оптимальными условиями были следующие: Расщепление химотрипсином: 1 ч при комнатной температуре; расщепление Glu-C: в течение ночи при 37°C. Каждый расщепленный фрагмент антигена и антитела анализируют с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF/TOF.

Фаза 2. Полное расщепление комплекса из целого связанного Ac + целого антигена.

Связывание моноклонального антитела N13B2-G1 к CD127 (партия 210415) осуществляли на Hi-Trap NHS колонке, следуя стандартной процедуре. Захват антигена антителом на колонке осуществляли в течение 1 ч, что обеспечивало возможность образования комплекса антиген-антитело. Эффективность связывания антитела N13B2-G1 на четырех колонках Hi-Trap NHS была следующей: 84%, 84%, 83% и 83%. Получали соответствующие и идентичные продукты связывания.

Расщепление комплекс осуществляли при соотношении 1/50, или 1 мг фермента на 50 мг антитела, при температуре и в течение периода, определенных с помощью вышеупомянутых контрольных экспериментов. Колонку затем промывали промывочным буфером (25 mM бикарбонат аммония) для удаления и выделения несвязанных пептидов антигена. Стадию промывания в буферном солевом растворе (PBS-2M NaCl) также осуществляли для удаления неспецифичных пептидов. После промывания осуществляли элюирование с использованием растворителя для элюирования (50 mM глицин с pH 2), чтобы специфично экстрагировать и выделить специфично связавшиеся пептиды (которые по прогнозу соответствуют эпипептиду).

MALDI анализ: фракции, полученные в результате промывания и элюирования, концентрировали с помощью гидрофобной хроматографии на C18 матрице. Затем их анализировали с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF/TOF. В MS-анализе можно точно измерить массу пептидов, и сравнение полученных в эксперименте масс с теоретическими массами у пептидов, полученных в результате расщепления *in silico* несвязанного антигена, обеспечивает возможность идентификации пептидов; MS/MS анализ можно осуществлять для подтверждения последовательности пептида, если это необходимо.

Спектр элюата после расщепления химотрипсином выявил присутствие пептидов с массой, составляющей: 912,49; 1086,47; 1843,03; 2104,16; 1944,97; 1564,73; 1835,97; 2022,05; 2424,22 и 2858,42 Да, которые могут соответствовать пептидам антигена в табл. 10 ниже.

Таблица 10. Пептиды, полученные после расщепления химотрипсином (последовательности, защищенные от протеолиза)

| Масса (Да) | Последовательность | SEQ ID No: |
|------------|-------------------------|------------|
| 912,49 | FIETKKF | 115 |
| 1843,03 | RKLQEIYFIETKKF | 118 |
| 2104,16 | NFRKLQEIYFIETKKF | 119 |
| 1944,97 | DLSVIYREGANDFVVF | 120 |
| 1564,73 | VVTFNTSHLQKKY | 121 |
| 1835,97 | EIKVRSIPDHYFKGF | 122 |
| 2022,05 | EIKVRSIPDHYFKGFW | 123 |
| 2424,22 | EIKVRSIPDHYFKGFWSEW | 124 |
| 2858,42 | EIKVRSIPDHYFKGFWSEWSPSY | 125 |
| 1086,47 | FKGFWSEW | 126 |

Спектр элюата после расщепления Glu-C выявлял присутствие расщепленных пептидов из белка, представляющего интерес, с массой, составляющей 1200,43; 1309,68; 2108,97; 2191,04; 2699,43; 3170,68 и 3264,70 Да, которые могут соответствовать пептидам антигена в табл. 11 ниже.

Таблица 11. Пептиды, полученные после расщепления Glu-C
(последовательности, защищенные от протеолиза)

| Масса (Да) | Последовательность | SEQ ID No: |
|------------|-----------------------------|------------|
| 2699,43 | YFIEYTKKFLIGKSNICVKVGE | 127 |
| 3264,70 | KSLTCKKIDLTIVKPEAPFDLSVIYRE | 128 |
| 2191,04 | LTTIVKPEAPFDLSVIYRE | 129 |
| 1309,68 | APFDLSVIYRE | 130 |
| 3170,68 | NKWTHTVNLSTKLTLLQRKLQPAAMYE | 131 |
| 2108,97 | IKVRSIPDHYFKGFWE | 132 |

Два расщепления позволили авторам настоящего изобретения идентифицировать три сайта (табл. 12 ниже), вовлеченные во взаимодействие между hN13B2 и антигеном CD127. Пептиды, полученные на этапе промывки солевым буферным раствором, исключали для ограничения последовательностей, представляющих.

Таблица 12. Последовательности пептидов человеческого CD127, защищенные N13B2 от протеолиза

| | |
|--------------------|----------------|
| A (SEQ ID No:115) | FIETKKF |
| B (SEQ ID No:116) | DLSVIY |
| C (Seq ID No: 117) | FKGF |

Картирование эпитопов для антитела N13B2 на антигене CD127 показало 3 разные последовательности, важные для активности антитела в отношении пути с участием IL-7/CD127 (фиг. 27). По результатам 3D-кристаллографического анализа взаимодействия IL-7/CD127 (McElroy et al., Structure 2009, PDB:3DI2) две из последовательностей (Seq ID № 115 и ID № 117) являются близкими в плане структуры и располагаются в участке, вовлеченном в связывание IL-7 с CD127. Третья идентифицированная последовательность (seq ID № 116) располагается в сайте 2b в домене D2 рецептора, домене, который согласно прогнозу взаимодействует с CD132, гамма-цепью рецептора (Walsh et al., 2012). N13B2 распознает конформационный эпитоп на CD127, расположенный в 2 частях белка, который ингибирует взаимодействие IL-7-CD127 и образование гетеродимера CD127-CD132. Связывание N13B2 должно дестабилизировать образование "тройного комплекса IL-7Ra/IL-7/g-цепь", как предсказывалось Walsh ST, что блокирует интернализацию комплекса.

Пример 19. Результаты

Как описано ранее (Henriques et al., 2010), IL-7 сам по себе индуцирует быструю интернализацию (30-40%) альфа-цепи (CD127) рецептора IL-7 на поверхности Т-лимфоцитов, что необходимо для опосредованной IL-7 передачи сигнала. В данном документе авторы настоящего изобретения описывали, что mAb N13B2 предотвращает индуцируемую IL-7 интернализацию CD127 и само не индуцирует эту интернализацию (фиг. 16). В отличие от этого, авторы настоящего изобретения описывали, что клон 1A11 антитела к человеческому CD127 от GSK (патентная заявка WO 2011094259) резко снижает экспрессию CD127 на поверхности Т-лимфоцитов при применении его отдельно или в комбинации с IL-7 при 37°C (фиг. 16). Этот эффект наблюдали с использованием дифференциального окрашивания несколькими коммерческими антителами к IL-7R (eBioRDR5 и MB15-18C9, данные не показаны). После внутривенного введения химерного mAb N13B2 (в формате с Fc-доменом человеческого IgG1 или IgG4) в концентрации 10 мг/кг приматам, отличным от человека, авторы настоящего изобретения в ходе измерений не наблюдали снижения экспрессии CD127 на поверхности Т-лимфоцитов в течение 2-недельного периода последующего наблюдения (фиг. 17B). В отличие от этого, у других приматов, отличных от человека, параллельно обработанных внутривенно 10 мг/кг клон MD707-13 антитела к человеческому CD127 (в формате с Fc-доменом человеческого IgG4; WO 2013/056984), авторы настоящего изобретения наблюдали значительное снижение (60%) CD127 на поверхности Т-лимфоцитов (фиг. 17B). Информация об этой интернализации CD127 после связывания mAb к человеческому CD127 на Т-лимфоцитах, также ранее публиковалась группой Pfizer, где было описано, что их mAb к человеческому CD127 (клон HAL-H3L4, патент США № 8637273) значительно индуцирует интернализацию CD127 ex vivo на человеческих клетках крови и клетках крови примата, отличного от человека, а также in vivo после внутривенного введения приматам, отличным от человека, (Kern et al., 2013).

В недавней публикации за авторством Kern et al. (Kern et al., 2015) исследовали занятость CD127 и проводили конкурентные анализы. Клон HIL-7R-M21 антитела к CD127 от BD biosciences, как было показано, конкурировал с антителом HAL/Ab1 (от группы Pfizer) за связывание с CD127. Как показано на фиг. 16 в соответствии с настоящим изобретением, антитело HAL (клон H3L4, патент США № 8637273) сравнивали с N13B2 и 1A11 с точки зрения экспрессии и интернализации CD127. Эти результаты показали конкуренцию между антителом HAL и HIL-7R-M21, подтверждая данные Kern et al., 2015. Тем не менее, N13B2 не конкурирует с HIL-7R-M21. Kern и соавт. также показали, что HAL/Ab1 сам по себе индуцирует in vivo понижающую регуляцию экспрессии CD127 на клеточной поверхности спустя 4-8 ч после инъекции. Эти результаты являются сравнимыми с результатами, представленными на фиг. 17B в соответствии с настоящим изобретением с клоном MD707-13. На фиг. 17B показана понижающая регуляция

экспрессии на клеточной поверхности спустя 4-10 суток после инъекции антитела. Также наблюдали, что этот *in vivo* эффект может коррелировать с MD707-13-зависимой интернализацией CD127 в клетку *in vitro*.

В исследовании эпитопов с помощью микроматриц с пептидами и масс-спектрометрии идентифицировали конформационный эпитоп, распознаваемый N13B2 на CD127. Этот эпитоп располагается в доменах D1 и D2, в отличие от антител из уровня техники, которые распознают эпитоп, расположенный только в D1 (пример 17). Более того, на фиг. 16 показано, что антитела из уровня техники индуцируют интернализацию CD127, тогда как N13B2 не индуцирует. Таким образом, авторы настоящего изобретения сделали вывод, что свойство N13B2 заключается в том, что оно не индуцирует интернализацию CD127, коррелирует с его свойством, заключающимся в распознавании эпитопа, расположенного в обоих доменах D1 и D2.

В общем, эти, а также ранее описанные результаты показали, что mAb к человеческому CD127 (клон 1A11, клоны HAL/Ab1 и H3L4 и клон MD707-13), которые, как описано, блокируют связывание IL-7 на рецепторе IL-7, также индуцируют интернализацию альфа-цепи рецептора IL-7, которая находилась в ассоциации с рецептором IL-7 и требовалась для передачи сигнала с его участием. Неожиданно и в отличие от этого, mAb N13B2 имеет уникальное свойство, заключающееся в том, что оно не индуцирует интернализацию CD127 и предотвращает такую интернализацию, индуцируемую IL-7. Эти результаты должны коррелировать с наблюдением, что mAb-индуктор интернализации CD127 (например, клон MD707-13), которые являются эффективными *in vitro* для предотвращения передачи сигнала с участием рецептора IL-7 (например, фосфорилирование STAT5, фиг. 14B), не способны предотвращать иммунные реакции клеток памяти (фиг. 21) или гуморальные иммунные реакции (фиг. 22) *in vivo*. В отличие от этого авторы настоящего изобретения описали, что mAb N13B2, которое эффективно блокирует передачу сигнала с участием рецептора IL-7 (фосфорилирование STAT5), но не индуцирует интернализацию CD127 *ex vivo* на человеческих Т-лимфоцитах и *in vivo* у приматов, отличных от человека, предотвращает реакции гиперчувствительности замедленного типа с участием клеток памяти (фиг. 21), а также иммунизацию в ответ на ксеногенные бараньи эритроциты (фиг. 22). Хотя не наблюдалось различия между изотипом N13B2 в отношении контроля гуморальной реакции клеток памяти, авторы настоящего изобретения заметили, что N13B2 в формате IgG4 было более эффективным в предотвращении реакций с участием клеток памяти по сравнению с IgG1. Не наблюдали различий в плане воздействия mAb и их концентраций в сыворотке между животными, обработанными MD707-13 и обработанными N13B2. Аналогично, авторы настоящего изобретения также наблюдали значительное повышение количества регуляторных Т-лимфоцитов у животных, обработанных любым из mAb N13B2 или MD707-13 (фиг. 22).

Человеческий IL-7 индуцировал сильную экспрессию $\alpha 4$ - и $\beta 7$ -интегринов *in vitro* на человеческих Т-лимфоцитах и резко повышал частоту обнаружения человеческих Т-лимфоцитов, экспрессирующих $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и $\alpha 4/\beta 7$ -интегрины (фиг. 19A), которые требуются для хоуминга Т-лимфоцитов и их удержания в тканях, не относящихся к лимфоидным, таких как ткани кишечника, головного мозга и кожи (Gofgu et al., 2009, DeNucci et al., 2009). Соответственно авторы настоящего изобретения наблюдали, что mAb N13B2 дозозависимо ингибирует *in vitro* экспрессию и $\alpha 4$, и $\beta 7$, а также снижает частоту обнаружения $\alpha 4$ -положительных и $\alpha 4/\beta 7$ -положительных человеческих Т-лимфоцитов (фиг. 19B). Аналогично, после переноса человеческих мононуклеарных клеток периферической крови в иммунодефицитных мышей, авторы настоящего изобретения наблюдали, что антитело N13B2 значительно и быстро снижает процент $\beta 7$ -положительных Т-лимфоцитов, а также количество (*i.d.* приживление) этих клеток после одной (данные не показаны) и двух недель обработки (фиг. 20). Результаты, полученные в двух разных моделях воспаления, показывают, что антитело N13B2 к IL-7R α может являться эффективным лечебным средством против воспалительных заболеваний и, в частности, при колите.

Пример 20. Создание конформационного эпитопа

Пептиды CLIPS можно использовать для соответствующей имитации нативной вторичной и третичной структуры антигена с целью преобразования этих пептидов CLIPS в активные и сильнодействующие иммуногены, которые индуцируют желаемые антитела (Boshuizen et al., 2014). Технология CLIPS включает циклизацию (многократную) линейных пептидов посредством реакции с небольшой жесткой молекулой (химический остов), которая несет 2, 3 или 4 якорные точки. Якорные группы реагируют исключительно с одним типом функциональных групп пептида (т.е. тиолами) и прикрепляются к пептиду посредством многих ковалентных связей. Пептид сворачивается вокруг остова и теряет гибкость, при этом медленно принимая четко определенную трехмерную структуру с молекулой остова в центре, подобную "пауку в паутине".

В технологии используются полностью синтетические специально разработанные остовы. Остовы CLIPS варьируют преимущественно по размеру, полярности, жесткости, растворимости, функциональным группам и расстоянию "разделяющему SS-связи". Эти остовы используются для прикрепления свободных концов пептида. При надлежащем расположении внутри пептидной последовательности, полученный в результате пептид CLIPS, вероятно, имеет намного большее сходство с 3D-структурой соответствующего участка на интактном белке по сравнению с линейной последовательностью. CLIPS-

циклизации можно осуществлять на нативных остатках L-цистеина, но также на искусственно введенных D- и L-(гомо)цистеинах в практически любом желательном положении в последовательности. Следовательно, структуру и размеры скрепленных с помощью CLIPS пептидов можно изменять, как угодно. Реакция циклизации длится не более 30 мин, проходит при комнатной температуре и не требует какого-либо вида катализатора. Более того, ее можно осуществлять полностью в водных условиях и при нейтральном pH (7,5-8,0), и, следовательно, она является совместимой с высокочувствительными биологическими системами, подобными бактериофагам. Наконец, реакции можно проводить в условиях сильного разведения (10-100 мкМ), что способствует высоким выходам циклических продуктов и избегает полимеризации. Эта технология является очень универсальной, и она уникальна в плане простоты ее применения.

Стремясь реконструировать как линейные, так и прерывающиеся эпитопы для антитела к рецептору, линейные перекрывающиеся пептиды из множества мономерных звеньев синтезируют непосредственно на полипропиленовых планшетах размером с кредитную карту, причем их C-конец ковалентно присоединен к дну каждой лунки с объемом 3 мкл (455 лунок на планшет), и каждая лунка содержит разный пептид. В каждом из однодоменных пептидов циклизованный дицистеиновый мостик образовывали для встраивания ограничивающей петли в прикрепленный к планшету пептид. В Teeling et al, 2006, объясняется, как создавать циклизованные пептиды с пептидами, представляющими интерес, с целью воссоздания прерывающегося эпитопа, распознаваемого антителом, представляющим интерес. Вкратце, вначале синтезировали связанные с планшетом дицистеин-содержащие пептиды, у которых цистеины были разделены 4-13 аминокислотами в пептиде, например, CXXXXC-планшет, XXXCXXXXCXXXXXXпланшет или CXXXXC-планшет и т.д. Пептиды затем циклизировали посредством обработки α,α-дибромксилолом в водном растворе с получением цистеиновых петель, содержащих разные количества аминокислот. Эта химическая модификация обеспечивает более стабильные петли, чем дисульфидные мостики. (Niederfellner et al, 2011).

Пример 21. Совместное иммуноосаждение CD127 и γ с

Для исследования эффекта антитела N13B2 и антител из уровня техники в отношении связывания CD127 с γ с-цепью эксперимент по совместному иммуноосаждению осуществляли в клетках, стимулируемых IL-7 и инкубируемых в отсутствие антител или в присутствии антител MD707-13 или N13B2. В отсутствие антител было показано, что CD127 и γ с подвергаются совместному иммуноосаждению. Инкубирование клеток с MD707-13 не предотвращало это совместное иммуноосаждение, тогда как инкубирование с N13B2 приводило к отсутствию такого совместного иммуноосаждения. Разработанное авторами настоящего изобретения антитело, таким образом, способно нарушать связывание CD127 с γ с-цепью, тогда как антитела из уровня техники не характеризуются таким признаком.

Для совместного иммуноосаждения комплекса CD127-CD132-IL-7 в присутствии антитела к CD127, человеческие PBL инкубировали с крысиным антителом к hCD127 (крысиное N13B2 или MD707-13 в концентрации 10 мкг/мл) в течение 30 мин при 37°C перед стимуляцией IL-7 (AbD Serotec, код PNP046) в концентрации 5 нг/мл в течение 15 мин при 37°C. Реакцию останавливали при 4°C и промывали два раза холодным PBS перед добавлением лизирующего буфера из набора для совместного иммуноосаждения (набор Pierce Direct IP kit, код 26148).

Колонку для очистки с использованием антитела к человеческому CD127 готовили с использованием набора для совместного иммуноосаждения (набор Pierce Direct IP kit, код 26148). С колонкой связывали 75 мкг неконкурирующего крысиного антитела к человеческому CD127 (Effimune, MD707-9), следуя процедуре, рекомендованной производителем. Лизат подвергали предварительной очистке на несвязанной колонке с целью удаления молекул, приводящих к неспецифическому связыванию. Затем лизат добавляли в колонку с антителом к CD127 и инкубировали 2 ч при 4°C при перемешивании на роликовой мешалке. Колонку промывали дважды промывочным буфером, а затем элюировали буфером для элюирования. Выделенные образцы анализировали с помощью метода вестерн-блоттинга.

В случае вестерн-блоттинга готовили SDS-Page гель (10% для разделяющего, 4% для концентрирующего геля толщиной 1,5 мм) и 50 мкл денатурированного элюата (для денатурации: DTT 0,1 М и 10 мин при 95°C) добавляли в каждую лунку. Рекомбинантный белок CD127Fc (Sino Biologicals, Пекин, Китай; код 10975-H08H) и CD132Fc (Sino Biologicals, Пекин, Китай; код 10555-H02H) добавляли (5 мкг/лунку) в качестве контроля для выявления с помощью метода вестерн-блоттинга. После миграции в течение 1 ч 30 мин при 200 В и переноса на нитроцеллюлозную мембрану в течение 35 мин при 20 В выполняли насыщение в течение 2 ч при комнатной температуре в 5% молоке.

Для начала выявления кроличье антитело к человеческому CD132 (anticorps-en-ligne, Франция, код ABIN741840) добавляют в соотношении 1/50 в течение ночи при 4°C, а затем выявляют с использованием меченого пероксидазой козьего антитела к антителу кролика (Jackson Immunoresearch, код 111-035-144) в соотношении 1/2000 в течение 1 ч при комнатной температуре. После дегибридизации мембрану инкубировали с крысиным антителом к человеческому CD127 (Effimune, MD707-9) в соотношении 1/200 в течение ночи при 4°C и выявляли с использованием меченого пероксидазой ослиного антитела к крысиному антителу (Jackson Immunoresearch, код 712-035-153) в соотношении 1/1000 в течение 1 ч при

комнатной температуре. В случае каждого выявления ECL (Thermo Scientific, код 34080) использовали для выявления пероксидазы посредством хемоллюминисценции и результаты считывали с использованием камеры Fuji 4000.

На фиг. 28 показаны результаты совместного иммуноосаждения комплекса CD127/IL-7/CD132. Авторы наблюдали, что цепь CD132 (60 кДа) подвергается совместному иммуноосаждению с CD127 в любых условиях, за исключением тех, когда клетки инкубировали с антителом N13B2 (28A). Тем не менее, в каждом наборе условий CD127 (70 кДа) хорошо подвергается иммуноосаждению антителом MD707-9, что показано на фиг. 28B, это указывает на то, что N13B2 и MD707-9 не конкурирует с MD707-9 за распознавание CD127. Антитело N13B2 ингибирует образование комплекса CD127/CD132 в присутствии IL-7. Эти результаты согласуются с картированием эпитопов для антитела N13B2 на CD127, показывающим, что N13B2 связывается с аминокислотной последовательностью в пределах сайта 2b в домене D2 альфа-цепи IL-7R (Walsh et al, Immunol rev. 2012).

Вместе эти результаты показали, что антитело N13B2 является антагонистом взаимодействия IL-7/CD127, а также является антагонистом взаимодействия CD127/CD132 в сайте 2b в присутствии IL-7, что может объяснять ингибирующую активность антитела в отношении интернализации CD127, наблюдаемой с IL-7 и/или антителами к CD127 из уровня техники.

Следующие пронумерованные варианты осуществления составляют предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения.

1. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент антитела, или антигенсвязывающий миметик антитела, которые специфично связываются с CD127, и не индуцируют интернализацию CD127.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, в частности, в соответствии с вариантом осуществления 1, которые ингибируют индуцируемую IL-7 интернализацию CD127.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик в соответствии с вариантом осуществления 1 или 0, причем экспрессия CD127 на клеточной поверхности у обработанных IL-7 клеток в присутствии антитела или фрагмента составляет по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90% от ее уровня у клеток, инкубируемых в отсутствие антитела.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с CD127 и тем самым нарушают связывание CD127 с общей ус-цепью цитокиновых рецепторов.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-0, которые нарушают связывание CD127 с общей ус-цепью цитокиновых рецепторов при связывании с CD127.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вариантов осуществления 0 или 0, в присутствии которого количество ус, связавшееся с CD127, составляет менее чем 80%, предпочтительно менее чем 50%, еще более предпочтительно менее чем 25 или 10% от указанного количества, измеренного в отсутствие антител в идентичных в других отношениях условиях, в частности, когда указанное измерение осуществляют на клеточных лизатах, содержащих молекулярные комплексы, содержащие CD127, из интактных клеток, экспрессирующих рецептор IL-7 на клеточной поверхности, инкубируемых в присутствии или в отсутствие указанных антител.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления, которые являются антагонистами передачи сигнала с участием IL-7R, индуцируемой IL-7.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, в частности, в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления, которые специфично связываются с антигеном в соответствии с любым из вариантов осуществления 53-67 или эпитопом в указанном антигене.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, которые специфично связываются с CD127, в частности, в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления, что не повышает созревание дендритных клеток, индуцируемое TSLP.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления, которые ингибируют экспрессию $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и/или $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик в соответствии с вариантом осуществления, 10 которые ингибируют экспрессию $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и/или $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов *in vivo*, в частности, в человеческих Т-клетках, вводимых инъекцией иммунодефицитной мыши.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, которые специфично связываются с CD127, в частности, в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления, содержащие V_H -цепь, которая содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных последовательностей:

VHCDR1 SEQ ID No: 10;

VHCDR2 SEQ ID No: 12;

VHCDR3 SEQ ID No: 14 или SEQ ID No: 48; или

VH SEQ ID No: 22;

и/или V_L -цепь, содержащую по меньшей мере одну из следующих аминокислотных последовательностей:

VLCDR1 SEQ ID No: 16 или SEQ ID No: 50;

VLCDR2 SEQ ID No: 18 или SEQ ID No: 52;

VLCDR3 SEQ ID No: 20; или

VL SEQ ID No: 24.

13. Антитело или его фрагмент или миметик в соответствии с вариантом осуществления 12, которые содержат по меньшей мере две, три, четыре или пять последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из VHCDR1 SEQ ID No: 10, VHCDR2 SEQ ID No: 12, VHCDR3 SEQ ID No: 14 или SEQ ID No: 48, VLCDR1 SEQ ID No: 16 или SEQ ID No: 50, VLCDR2 SEQ ID No: 18 или SEQ ID No: 52 и VLCDR3 SEQ ID No: 20.

14. Антитело или его фрагмент или миметик в соответствии с вариантом осуществления 13, которые содержат все шесть последовательностей CDR VHCDR1 SEQ ID No: 10, VHCDR2 SEQ ID No: 12, VHCDR3 SEQ ID No: 14 или SEQ ID No: 48, VLCDR1 SEQ ID No: 16 или SEQ ID No: 50, VLCDR2 SEQ ID No: 18 или SEQ ID No: 52 и VLCDR3 SEQ ID No: 20.

15. Антитело в соответствии с вариантом осуществления 14, в котором

V_H -цепь состоит из V_H -цепи с последовательностью SEQ ID No: 2, или SEQ ID No: 6, или SEQ ID No: 54 или содержит последовательность SEQ ID No: 22 или SEQ ID No: 36 или SEQ ID No: 38 или SEQ ID No: 40 и

V_L -цепь состоит из V_L -цепи с последовательностью SEQ ID No: 4 или SEQ ID No: 56 или содержит последовательность SEQ ID No: 24, или SEQ ID No: 42, или SEQ ID No: 44, или SEQ ID No: 46.

16. Антитело в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления, которое представляет собой химерное антитело, или гуманизованное антитело, или деиммунизированное антитело.

17. Антитело в соответствии с вариантом осуществления 13, которое представляет собой гуманизованное и деиммунизированное антитело, в котором тяжелая цепь имеет последовательность SEQ ID No: 52, и легкая цепь имеет последовательность SEQ ID No: 54.

18. Макромолекула, которая представляет собой химерную молекулу, содержащую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления, причем указанное антитело связано с функционально отличающейся молекулой, при этом указанная химерная молекула является либо слитым химерным белком, либо конъюгатом, полученным в результате ковалентного прикрепления химической группы или молекулы, такой как полимер PEG или меченое антитело.

19. Макромолекула в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления, которая представляет собой аффитин или антикалин.

20. Макромолекула, в частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления, которая связывается с CD127 с K_d , которая ниже чем $5E-10$ M, в особенности, ниже чем $1E-10$ M, в особенности ниже чем $5E-11$ M.

21. Макромолекула, в частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления, которая проявляет цитотоксическую активность в отношении CD127-положительных клеток.

22. Макромолекула, в частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления, которая не повышает созревание дендритных клеток, индуцируемое TSLP, причем повышение созревания дендритных клеток, индуцируемое TSLP, оценивают посредством определения повышенной экспрессии маркера клеточной поверхности CD40 и/или CD80 в положительных по рецептору TSLP клетках, обработанных TSLP и указанной макромолекулой, по сравнению с клетками, обработанными только TSLP.

23. Макромолекула, в частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, в соответствии с вариантом осуществления 22, причем экспрессия CD80 повышается не более чем на 25%, предпочтительно не более чем на 10% в положительных по рецептору TSLP клетках, обработанных TSLP и указанной макромолекулой, по сравнению с клетками, обработанными только TSLP.

24. Макромолекула, в частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, в соответствии с вариантом осуществления 23, причем экспрессия CD80 не повышается или снижается в положительных по рецептору TSLP клетках, обработанных TSLP и указанной макромолекулой, по сравнению с клетками, обработанными только TSLP.

25. Макромолекула, в частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик в соответствии с вариантом осуществления 22, причем экспрессия CD40 повышается не более чем на 50%, предпочтительно не более чем на 25% в положительных по рецептору TSLP клетках, обработанных TSLP и указанной макромолекулой, по сравнению с клетками, обработанными только TSLP.

26. Макромолекула, в частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, в соответствии с вариантом осуществления 25, причем экспрессия CD40 не повышается или снижается в положительных по рецептору TSLP клетках, обработанных TSLP и указанной макромолекулой, по сравнению с клетками, обработанными только TSLP.

27. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или макромолекулу в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления.

28. Молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с вариантом осуществления 27, которая кодирует аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 2; SEQ ID No: 4; SEQ ID No: 6; SEQ ID No: 8; SEQ ID No: 10; SEQ ID No: 12; SEQ ID No: 14; SEQ ID No: 16; SEQ ID No: 18; SEQ ID No: 20; SEQ ID No: 22; SEQ ID No: 24; SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 40; SEQ ID No: 42; SEQ ID No: 44; SEQ ID No: 46; SEQ ID No: 48; SEQ ID No: 50; SEQ ID No: 52; SEQ ID No: 54 и SEQ ID No: 56.

29. Молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с вариантом осуществления 28, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID No: 1; SEQ ID No: 3; SEQ ID No: 5; SEQ ID No: 7; SEQ ID No: 9; SEQ ID No: 11; SEQ ID No: 13; SEQ ID No: 15; SEQ ID No: 17; SEQ ID No: 19; SEQ ID No: 21; SEQ ID No: 23; SEQ ID No: 35; SEQ ID No: 37; SEQ ID No: 39; SEQ ID No: 41; SEQ ID No: 43; SEQ ID No: 45; SEQ ID No: 47; SEQ ID No: 49; SEQ ID No: 51; SEQ ID No: 53 и SEQ ID No: 55.

30. Вектор для клонирования и/или для экспрессии полинуклеотида в соответствии с любым из вариантов осуществления 27-29, в особенности плазида, подходящий для клонирования и/или экспрессии в клетках млекопитающего.

31. Клетка или клеточная линия, в которую был встроен посредством рекомбинации полинуклеотид в соответствии с любым из вариантов осуществления 27-30, в особенности клетка или клеточная линия млекопитающего.

32. Фармацевтическая композиция, содержащая макромолекулу, в частности антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-26 с фармацевтическим носителем, причем указанная фармацевтическая композиция необязательно содержит дополнительный отличающийся активный ингредиент.

33. Фармацевтическая композиция, содержащая в качестве терапевтически активного ингредиента макромолекулу, в частности антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-26, или фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 32 в составе, подходящем для контроля дифференцировки/созревания дендритных клеток при введении пациенту-человеку.

34. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантами осуществления 32 или 33, которая дополнительно содержит дополнительное соединение, характеризующееся терапевтическим иммуномодулирующим эффектом, в частности в отношении клеток, вовлеченных в аутоиммунное заболевание или аллергическое заболевание, лейкоз, такой как острый лимфобластный лейкоз, лимфому, злокачественное заболевание, хроническую вирусную инфекцию, воспалительные заболевания, трансплантацию, респираторные заболевания или аутоиммунную реакцию.

35. Макромолекула, в частности антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-26, или нуклеиновая кислота в соответствии с любым из вариантов осуществления 27-30, или клетка или клеточная линия в соответствии с вариантом осуществления 31 для применения в качестве терапевтически активного ингредиента в комбинации или в составе схемы дополнительной терапии у пациента, нуждающегося в этом.

36. Макромолекула, в частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-26, или нуклеиновая кислота в соответствии с любым из вариантов осуществления 27-30, или клетка или клеточная линия в соответствии с вариантом осуществления 31, или фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 32-34 для применения в лечении пациента, в частности, пациента-человека, с заболеванием.

37. Макромолекула, в частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-26, или нуклеиновая кислота в соответствии с любым из вариантов осуществления 27-30, или клетка или клеточная линия в соответствии с вариантом осуществления 31, или фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 32-34 для применения в лечении пациента, в частности пациента-человека, с риском заболевания.

38. Макромолекула, нуклеиновая кислота, клетка, клеточные линии или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 36 и/или вариантом осуществления 37, причем заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание, в частности, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, диабет I типа, аутоиммунный тиреоидит и волчанку.

39. Макромолекула, нуклеиновая кислота, клетка, клеточные линии или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 36 и/или вариантом осуществления 37, причем заболевание представляет собой воспалительное заболевание, в частности, IBD и энцефаломиелит.

40. Макромолекула, нуклеиновая кислота, клетка, клеточные линии или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 36 и/или вариантом осуществления 37, причем заболевание представляет собой аллергическое заболевание.

41. Макромолекула, нуклеиновая кислота, клетка, клеточные линии или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 36 и/или вариантом осуществления 37, причем заболевание представляет собой злокачественное заболевание.

42. Макромолекула, нуклеиновая кислота, клетка, клеточные линии или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 36 и/или вариантом осуществления 37, причем заболевание представляет собой респираторные заболевания.

43. Макромолекула, нуклеиновая кислота, клетка, клеточные линии или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 36 и/или вариантом осуществления 37, причем заболевание связано с трансплантацией, в частности является ее последствием.

44. Способ лечения, предусматривающий введение макромолекулы, в частности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или миметика в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-26, или нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вариантов осуществления 27-30, или клетки или клеточной линии в соответствии с вариантом осуществления 31, или фармацевтической композиции в соответствии с вариантами осуществления 32-34 пациенту с заболеванием или с риском заболевания.

45. Способ лечения в соответствии с вариантом осуществления 44, причем заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание, в частности ревматоидный артрит, рассеянный склероз, диабет I типа, аутоиммунный тиреоидит и волчанку.

46. Способ лечения в соответствии с вариантом осуществления 44, причем заболевание представляет собой воспалительное заболевание, в частности IBD и энцефаломиелит.

47. Способ лечения в соответствии с вариантом осуществления 44, причем заболевание представляет собой аллергическое заболевание.

48. Способ лечения в соответствии с вариантом осуществления 44, причем заболевание представляет собой злокачественное заболевание.

49. Способ лечения в соответствии с вариантом осуществления 44, причем заболевание представляет собой респираторные заболевания.

50. Способ лечения в соответствии с вариантом осуществления 44, причем заболевание связано с трансплантацией, в частности является ее последствием.

51. Макромолекула, в частности антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или миметик, в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-26, или нуклеиновая кислота в соответствии с любым из вариантов осуществления 27-30, или клетка или клеточная линия в соответствии с вариантом осуществления 31, или фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 32-34 для применения в лечении пациента, в частности пациента-человека, который нуждается в трансплантации, и/или которому вскоре предстоит трансплантация, и/или пациента, который перенес трансплантацию.

52. Способ лечения, предусматривающий введение макромолекулы, в частности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или миметика в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-26, или нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вариантов осуществления 27-30, или клетки или клеточной линии в соответствии с вариантом осуществления 31, или фармацевтической композиции в соответствии с вариантами осуществления 32-34 пациенту, который нуждается в трансплантации, и/или которому вскоре предстоит трансплантация, и/или пациента, который перенес трансплантацию.

53. Антиген, в котором эпитоп содержит или состоит из последовательностей из сайта 2b в CD127, в частности, содержащих по меньшей мере 3, 4, 5, 6 или 7 последовательных аминокислот из сайта 2b в CD127.

54. Антиген в соответствии с вариантом осуществления 53, в котором эпитоп содержит или состоит из последовательностей из сайта, состоящего из аминокислот 109-127 в SEQ ID No: 114, в частности, из сайта, состоящего из аминокислот 110-125, 112-125, 112-120, в частности, содержащих по меньшей мере 3, 4, 5, 6 или 7 последовательных аминокислот из указанного сайта.

55. Антиген в соответствии с любым из вариантов осуществления 53 или 54, в котором эпитоп содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6 или 7 последовательных аминокислот из CD127, при этом указанные последовательные аминокислоты содержат P112 и/или L115.

56. Антиген в соответствии с любым из вариантов осуществления 53-55, в котором эпитоп состоит из или содержит последовательность SEQ ID No: 116, в частности содержит последовательность SEQ ID No:86.

57. Антиген в соответствии с любым из вариантов осуществления 53-56, в котором эпитоп также содержит последовательности, в частности по меньшей мере 3, 4, 5, 6 или 7 последовательных аминокислот, из домена D1 в CD127, в частности из аминокислот 1-98 в SEQ ID No: 114.

58. Антиген в соответствии с вариантом осуществления 57, в котором эпитоп содержит последовательность человеческого CD127, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID No: 115, в частности, содержащую или состоящую из SEQ ID No: 110.

59. Антиген в соответствии с любым из вариантов осуществления 53-58, в котором эпитоп также содержит последовательности, в частности по меньшей мере 3, 4, 5, 6 или 7 последовательных аминокислот, из аминокислот 180-220 в SEQ ID No: 114, в частности при этом указанные последовательности из аминокислот 180-220 в SEQ ID No: 114 состоят из или содержат последовательность SEQ ID No: 117, в частности, содержат или состоят из SEQ ID No: 111.

60. Антиген в соответствии с любым из вариантов осуществления 53-59, в котором эпитоп состоит

из или содержит последовательности человеческого CD127, состоящие из последовательности SEQ ID No: 110 или последовательности SEQ ID No: 115; последовательности SEQ ID No: 111 или последовательности SEQ ID No: 117; и последовательности SEQ ID No: 86 или последовательности SEQ ID No: 116.

61. Антиген в соответствии с любым из вариантов осуществления 53-60, в котором эпитоп не содержит более чем 3, 4 или 5 последовательных аминокислот из последовательности аминокислот 99-108 в SEQ ID No: 114, и/или не содержит более чем 3, 4 или 5 последовательных аминокислот из последовательности аминокислот 128-179 в SEQ ID No: 114, и/или не содержит более чем 3, 4 или 5 последовательных аминокислот из последовательности аминокислот 220-239 в SEQ ID No: 114, в частности, не содержит более чем 3, 4 или 5 последовательных аминокислот из любой из указанных аминокислотных последовательностей в SEQ ID No: 114.

62. Антиген в соответствии с любым из вариантов осуществления 53 или 60, в котором последовательность эпитопа человеческого CD127, содержащая SEQ ID No: 111, не продолжается так, чтобы она содержала аминокислоты, смежные с указанной последовательностью в последовательности человеческого CD127 более чем на 1 аминокислоту с N-конца или более чем на 7 аминокислот с C-конца.

63. Антиген в соответствии с вариантом осуществления 61, в котором последовательность эпитопа человеческого CD127, содержащая SEQ ID No: 110, не продолжается так, чтобы она содержала любую из N-концевых и/или C-концевых аминокислот, смежных с указанной последовательностью в последовательности человеческого CD127.

64. Антиген в соответствии с любым из вариантов осуществления 53-63, в котором последовательность эпитопа человеческого CD127, содержащая SEQ ID No: 111, не продолжается так, чтобы она содержала аминокислоты, смежные с указанной последовательностью в последовательности человеческого CD127 более чем на 30 аминокислот с N-конца или более чем на 30 аминокислот с C-конца.

65. Антиген в соответствии с вариантом осуществления 64, в котором последовательность эпитопа человеческого CD127, содержащая SEQ ID No: 111, не продолжается так, чтобы она содержала любую из N-концевых и/или C-концевых аминокислот, смежных с указанной последовательностью в последовательности человеческого CD127.

66. Антиген в соответствии с любым из вариантов осуществления 53-65, в котором эпитоп представляет собой конформационный эпитоп, в частности в котором пептиды из CD127, содержащиеся в указанном эпитопе, присутствуют в конформации, которая имитирует конформацию соответствующих пептидов в нативном CD127 или его внеклеточном домене, в частности в CD127 в его мономерной форме без лиганда, в его форме, связанной с γ s, и/или в его форме, связанной с IL-7.

67. Антиген в соответствии с вариантом осуществления 66, в котором эпитоп представляет собой конформационный эпитоп, в котором пептиды из CD127 связаны с жестким молекулярным остовом, который поддерживает их в желаемой конформации, в частности такой антиген, полученный с использованием технологии CLIPS.

68. Эпитоп, который определен в любом из вариантов осуществления 53-67.

69. Нуклеиновая кислота, кодирующая антиген, который определен любым из вариантов осуществления 53-67.

70. Способ получения антитела, предусматривающий иммунизацию животного, отличного от человека, антигеном, который определен в любом из вариантов осуществления 53-67.

71. Способ отбора антитела, фрагмента антитела или миметика антитела, в частности антитела, полученного, как описано в варианте осуществления 70, его фрагмента или миметика, предусматривающий стадию анализа связывающей способности указанного антитела в отношении по меньшей мере одного антигена, который определен в любом из вариантов осуществления 53-67, в частности, при этом указанный способ предусматривает несколько таких последовательных стадий, причем на каждой стадии анализируют связывающую способность в отношении отдельного пептида, состоящего из одной смежной последовательности в CD127.

72. Способ отбора макромолекулы, в частности антитела, в частности антитела, полученного, как описано в варианте осуществления 70, или антигенсвязывающего фрагмента или миметика такого антитела, предусматривающий или состоящий из стадии исследования связывающей способности макромолекулы в отношении CD127, в частности, в отношении его антигена, который определен в любом из вариантов осуществления 53-67, и необязательно проведения отбора макромолекул в соответствии с вариантом осуществления 70.

73. Способ отбора макромолекулы в соответствии с любым из вариантов осуществления 71 или 72, причем антиген содержит несколько несмежных пептидов в CD127 и при этом способ предусматривает несколько стадий, причем каждая из указанных стадий состоит из исследования связывающей способности макромолекулы в отношении одного из указанных пептидов CD127.

74. Способ, в частности, в соответствии с любым из вариантов осуществления 71-73, отбора макромолекулы, в частности, антитела, в частности, антитела, полученного, как описано в варианте осуществления 70, или антигенсвязывающего фрагмента или миметика такого антитела, предусматривающей или состоящий из стадии исследования интернализации CD127 в экспрессирующие CD127 клетки, индуци-

руемой присутствием макромолекулы.

75. Способ, в частности, в соответствии с любым из вариантов осуществления 71-74, отбора макромолекулы, в частности антитела, в частности антитела, полученного, как описано в варианте осуществления 70, или антигенсвязывающего фрагмента или миметика такого антитела, предусматривающий или состоящий из стадии исследования ингибирования макромолекулой индуцируемой IL-7 интернализации CD127 в экспрессирующие CD127 клетки и, необязательно, проведения отбора макромолекул в соответствии с вариантом осуществления 3.

76. Способ, в частности, в соответствии с любым из вариантов осуществления 71-75, отбора макромолекулы, в частности антитела, в частности антитела, полученного, как описано в варианте осуществления 70, или антигенсвязывающего фрагмента или миметика такого антитела, предусматривающей или состоящий из стадии анализа способности указанной макромолекулы к нарушению, посредством своего связывания с CD127, связывания CD127 с γ с-цепью.

77. Способ, в частности, в соответствии с любым из вариантов осуществления 71-76, отбора макромолекулы, в частности антитела, в частности антитела, полученного, как описано в варианте осуществления 70, или антигенсвязывающего фрагмента или миметика такого антитела, предусматривающей или состоящий из стадии исследования повышения созревания DC, индуцируемого TSLP в присутствии макромолекулы, и, необязательно, проведения отбора макромолекул в соответствии с любым из вариантов осуществления 22-26.

78. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 71-77, дополнительно предусматривающий одну или несколько из следующих стадий:

- a) исследование ингибирования макромолекулой индуцируемой IL-7 передачи сигнала, в частности, фосфорилирования STAT5;
- b) исследование ингибирования макромолекулой индуцируемой TSLP продукции TARC;
- c) исследование ингибирования макромолекулой экспрессии α 4-, β 7- и/или α 4/ β 7-интегринов, в частности экспрессии на клеточной поверхности на Т-лимфоцитах.

Список литературы

Adams, A.B., Pearson, T.C., and Larsen, C.P. (2003). Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance. *Immunol. Rev.* 196, 147–160.

Albuquerque, A.S., Cortesão, C.S., Foxall, R.B., Soares, R.S., Victorino, R.M.M., and Sousa, A.E. (2007). Rate of increase in circulating IL-7 and loss of IL-7R α expression differ in HIV-1 and HIV-2 infections: two lymphopenic diseases with similar hyperimmune activation but distinct outcomes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 3252–3259.

Baca, M., Presta, L.G., O'Connor, S.J., and Wells, J.A. (1997). Antibody humanization using monovalent phage display. *J. Biol. Chem.* 272, 10678–10684.

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

Boshuizen, R.S., Marsden, C., Turkstra, J., Rossant, C.J., Slootstra, J., Copley, C., and Schwamborn, K. (2014). A combination of in vitro techniques for efficient discovery of functional monoclonal antibodies against human CXC chemokine receptor-2 (CXCR2). *mAbs* 6, 1415–1424.

Bour-Jordan, H., Esensten, J.H., Martinez-Llordella, M., Penaranda, C., Stumpf, M., and Bluestone, J.A. (2011). Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunol. Rev.* 241, 180–205.

Broux, B., Hellings, N., Venken, K., Rummens, J.-L., Hensen, K., Van Wijmeersch, B., and Stinissen, P. (2010). Haplotype 4 of the multiple sclerosis-associated interleukin-7 receptor alpha gene influences the frequency of recent thymic emigrants. *Genes Immun.* *11*, 326–333.

Chassoux, D.M., Linares-Cruz, L.G., Bazin, H., and Stanislawski, M. (1988). K-cell-mediated cytotoxicity induced with rat monoclonal antibodies. I. Antibodies of various isotypes differ in their ability to induce cytotoxicity mediated by rat and human effectors. *Immunology* *65*, 623–628.

Chothia, C., and Lesk, A.M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* *196*, 901–917.

Deininger, P. (1990). *Molecular cloning: A laboratory manual*: 2nd ed. Edited by J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (in 3 volumes). *Anal. Biochem.* *186*, 182–183.

Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., and Roitt, I.M. (2011). *Roitt's Essential Immunology* (John Wiley & Sons).

Denucci, C.C., Mitchell, J.S., and Shimizu, Y. (2009). Integrin function in T-cell homing to lymphoid and nonlymphoid sites: getting there and staying there. *Crit. Rev. Immunol.* *29*, 87–109.

Dustin, M.L., and Shaw, A.S. (1999). Costimulation: building an immunological synapse. *Science* *283*, 649–650.

Edward G. Routledge, S.D.G. (1993). Reshaping antibodies for therapy. 13–44.

Flavell, D.J., Warnes, S.L., Bryson, C.J., Field, S.A., Noss, A.L., Packham, G., and Flavell, S.U. (2006). The anti-CD20 antibody rituximab augments the immunospecific therapeutic effectiveness of an anti-CD19 immunotoxin directed against human B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* *134*, 157–170.

Gaseitsiwe, S., Valentini, D., Mahdaviifar, S., Reilly, M., Ehrnst, A., and Maeurer, M. (2010). Peptide microarray-based identification of *Mycobacterium tuberculosis* epitope binding to HLA-DRB1*0101, DRB1*1501, and DRB1*0401. *Clin. Vaccine Immunol.* *CVI 17*, 168–175.

Gorfu, G., Rivera-Nieves, J., and Ley, K. (2009). Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr. Mol. Med.* *9*, 836–850.

Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* *285*, 221–227.

Haas, J., Korporal, M., Schwarz, A., Balint, B., and Wildemann, B. (2011). The interleukin-7 receptor α chain contributes to altered homeostasis of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* *41*, 845–853.

Haudebourg, T., Poirier, N., and Vanhove, B. (2009). Depleting T-cell subpopulations in organ transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* *22*, 509–518.

He, R., and Geha, R.S. (2010). Thymic stromal lymphopoietin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1183*, 13–24.

Henriques, C.M., Rino, J., Nibbs, R.J., Graham, G.J., and Barata, J.T. (2010). IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7R α in T cells. *Blood* *115*, 3269–3277.

Von Horsten, H.H., Ogorek, C., Blanchard, V., Demmler, C., Giese, C., Winkler, K., Kaup, M., Berger, M., Jordan, I., and Sandig, V. (2010). Production of non-fucosylated antibodies by co-expression of heterologous GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase. *Glycobiology* *20*, 1607–1618.

Inaba, K., Inaba, M., Witmer-Pack, M., Hatchcock, K., Hodes, R., and Steinman, R.M. (1995). Expression of B7 costimulator molecules on mouse dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* *378*, 65–70.

Jariwala, S.P., Abrams, E., Benson, A., Fodeman, J., and Zheng, T. (2011). The role of thymic stromal lymphopoietin in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *41*, 1515–1520.

Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.M. and Gottesman, K.S. (1992) Sequences of Proteins of Immunological Interest (DIANE publishing, 1992).

Kern, B., Kraynov, E., Lee, L.-F., Ray, R. (2013). Receptor occupancy and internalization of an anti-IL-7 receptor antibody. *Cytokine* *63*, 276–277.

Kern, B., Li, W., Bono, C., Lee, L.-F., and Kraynov, E. (2015). Receptor occupancy and blocking of STAT5 signaling by an anti-IL-7 receptor α antibody in cynomolgus monkeys. *Cytometry B Clin. Cytom.*

Krehenbrink, M., Chami, M., Guilvout, I., Alzari, P.M., Pécorari F., Pugsley A.P. (2008). Artificial binding proteins (Affitins) as probes for conformational changes in secretin PulD. *J Mol Biol.* 2008 Nov 28.

Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Bodmer, J., Müller, W., Bontrop, R., Lemaitre, M., Malik, A., Barbié, V., and Chaume, D. (1999). IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* *27*, 209–212.

Lei, L., Zhang, Y., Yao, W., Kaplan, M.H., and Zhou, B. (2011). Thymic Stromal Lymphopoietin Interferes with Airway Tolerance by Suppressing the Generation of Antigen-Specific Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 186, 2254–2261.

Luo, H., Wu, Z., Qi, S., Jin, W., Han, B., Wu, J. (2011). Ephrinb1 and Ephrinb2 are associated with interleukin-7 receptor α and retard its internalization from the cell surface. *J Biol Chem.* 2011 Dec 30;286(52):44976-87.

Martin, A.C.R. (2001). Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In *Antibody Engineering*, D.R. Kontermann, and D.S. Dübel, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 422–439.

Mazzucchelli, R., Hixon, J.A., Spolski, R., Chen, X., Li, W.Q., Hall, V.L., Willette-Brown, J., Hurwitz, A.A., Leonard, W.J., and Durum, S.K. (2008). Development of regulatory T cells requires IL-7R α stimulation by IL-7 or TSLP. *Blood* 112, 3283–3292.

McElroy, C.A., Dohm, J.A., and Walsh, S.T.R. (2009). Structural and biophysical studies of the human IL-7/IL-7R α complex. *Struct. Lond. Engl.* 1993 17, 54–65.

McElroy, C.A., Holland, P.J., Zhao, P., Lim, J.-M., Wells, L., Eisenstein, E., and Walsh, S.T.R. (2012). Structural reorganization of the interleukin-7 signaling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2503–2508

Michel, L., Berthelot, L., Pettré, S., Wiertlewski, S., Lefrère, F., Braudeau, C., Brouard, S., Souillou, J.-P., and Laplaud, D.-A. (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis. *J. Clin. Invest.* 118, 3411–3419.

Nancey, S., Hamzaoui, N., Moussata, D., Graber, I., Bienvenu, J., and Flourie, B. (2008). Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and Crohn's disease activity. *Dig. Dis. Sci.* 53, 242–247.

Niederfellner, G., Lammens, A., Mundigl, O., Georges, G.J., Schaefer, W., Schwaiger, M., Franke, A., Wiechmann, K., Jenewein, S., Slotstra, J.W., et al. (2011). Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood* 118, 358–367.

Olivier, S., Jacoby, M., Brillon, C., Bouletreau, S., Mollet, T., Nerriere, O., Angel, A., Danet, S., Souttou, B., Guehenneux, F., et al. (2010). EB66 cell line, a duck embryonic stem cell-derived substrate for the industrial production of therapeutic monoclonal antibodies with enhanced ADCC activity. *mAbs* 2, 405–415.

Olkhanud, P.B., Rochman, Y., Bodogai, M., Malchinkhuu, E., Wejksza, K., Xu, M., Gress, R.E., Hesdorffer, C., Leonard, W.J., and Biragyn, A. (2011). Thymic stromal lymphopoietin is a key mediator of breast cancer progression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 5656–5662.

Van Oosterhout, Y.V., van Emst, J.L., Bakker, H.H., Preijers, F.W., Schattenberg, A.V., Ruiten, D.J., Evers, S., Koopman, J.P., and de Witte, T. (2001). Production of anti-CD3 and anti-CD7 ricin A-immunotoxins for a clinical pilot study. *Int. J. Pharm.* *221*, 175–186.

Papac, D.I., Hoyes, J., and Tomer, K.B. (1994). Epitope mapping of the gastrin-releasing peptide/anti-bombesin monoclonal antibody complex by proteolysis followed by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Protein Sci.* *3*, 1485–1492.

Park, L.S., Martin, U., Garka, K., Gliniak, B., Di Santo, J.P., Muller, W., Largaespada, D.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Farr, A.G., et al. (2000). Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J. Exp. Med.* *192*, 659–670.

Paus, D., and Winter, G. (2006). Mapping epitopes and antigenicity by site-directed masking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 9172–9177.

Poirier, N., Haudebourg, T., Brignone, C., Dilek, N., Hervouet, J., Minault, D., Coulon, F., de Silly, R.V., Triebel, F., Blancho, G., et al. (2011). Antibody-mediated depletion of lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3(+)) -activated T lymphocytes prevents delayed-type hypersensitivity in non-human primates. *Clin. Exp. Immunol.* *164*, 265–274.

Racapé, M., Vanhove, B., Soulillou, J.-P., and Brouard, S. (2009). Interleukin 7 receptor alpha as a potential therapeutic target in transplantation. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* *57*, 253–261.

Rader, C., Cheresch, D.A., and Barbas, C.F. (1998). A phage display approach for rapid antibody humanization: designed combinatorial V gene libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 8910–8915.

Reche, P.A., Soumelis, V., Gorman, D.M., Clifford, T., Liu Mr, null, Travis, M., Zurawski, S.M., Johnston, J., Liu, Y.J., Spits, H., et al. (2001). Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 336–343.

Risberg, K., Fodstad, Ø., and Andersson, Y. (2011). Synergistic anticancer effects of the 9.2.27PE immunotoxin and ABT-737 in melanoma. *PloS One* *6*, e24012.

Roan, F., Bell, B.D., Stoklasek, T.A., Kitajima, M., Han, H., and Ziegler, S.F. (2012). The multiple facets of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) during allergic inflammation and beyond. *J. Leukoc. Biol.* *91*, 877–886.

Rochman, Y., Kashyap, M., Robinson, G.W., Sakamoto, K., Gomez-Rodriguez, J., Wagner, K.-U., and Leonard, W.J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 19455–19460.

Rosok, M.J., Yelton, D.E., Harris, L.J., Bajorath, J., Hellström, K.E., Hellström, I., Cruz, G.A., Kristensson, K., Lin, H., Huse, W.D., et al. (1996). A combinatorial library strategy for the rapid humanization of anticarcinoma BR96 Fab. *J. Biol. Chem.* *271*, 22611–22618.

Schlehuber, S., Skerra, A. (2002). Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant -- a so-called 'anticalin' -- using a molecular random approach. *Biophys Chem.* 2002 May 2;96(2-3):213-28

Shaw, A.S., and Dustin, M.L. (1997). Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* *6*, 361–369.

Shinohara, T., Nemoto, Y., Kanai, T., Kameyama, K., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Totsuka, T., Ikuta, K., and Watanabe, M. (2011). Upregulated IL-7 receptor α expression on colitogenic memory CD4⁺ T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 2623–2632.

Shochat, C., Tal, N., Bandapalli, O.R., Palmi, C., Ganmore, I., te Kronnie, G., Cario, G., Cazzaniga, G., Kulozik, A.E., Stanulla, M., et al. (2011). Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *J. Exp. Med.* *208*, 901–908.

Skerra, A. (2008). Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J.* 2008 Jun;275(11):2677-83. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06439.x. Epub 2008 Apr 24.

Suckau, D., Köhl, J., Karwath, G., Schneider, K., Casaretto, M., Bitter-Suermann, D., and Przybylski, M. (1990). Molecular epitope identification by limited proteolysis of an immobilized antigen-antibody complex and mass spectrometric peptide mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 9848–9852

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

Teeling, J.L., Mackus, W.J.M., Wiegman, L.J.J.M., van den Brakel, J.H.N., Beers, S.A., French, R.R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J.W., et al. (2006). The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 362–371.

Timmerman, P., Puijk, W.C., and Melen, R.H. (2007). Functional reconstruction and synthetic mimicry of a conformational epitope using CLIPS technology. *J. Mol. Recognit. JMR* 20, 283–299.

Walsh, S.T.R. (2012). Structural insights into the common γ -chain family of cytokines and receptors from the interleukin-7 pathway. *Immunol. Rev.* 250, 303–316.

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

Watanabe, N., Hanabuchi, S., Marloie-Provost, M.-A., Antonenko, S., Liu, Y.-J., and Soumelis, V. (2005b). Human TSLP promotes CD40 ligand-induced IL-12 production by myeloid dendritic cells but maintains their Th2 priming potential. *Blood* 105, 4749–4751.

Ye, J., Ma, N., Madden, T.L., and Ostell, J.M. (2013). IgBLAST: an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool. *Nucleic Acids Res.* 41, W34–W40.

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

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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с человеческим CD127, причем указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат V_H цепь, содержащую следующие аминокислотные последовательности:

VHCDR1 SEQ ID No: 10;

VHCDR2 SEQ ID No: 12 и

VHCDR3 SEQ ID No: 14 или SEQ ID No: 48; и

V_L-цепь, содержащую следующие аминокислотные последовательности:

VLCDR1 SEQ ID No: 16 или SEQ ID No: 50;

VLCDR2 SEQ ID No: 18 или SEQ ID No: 52 и

VLCDR3 SEQ ID No: 20.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которые специфично связываются с последовательностями эпитопа из домена D1 и из сайта 2b человеческого CD127, причем эпитоп содержит или состоит из:

(a) последовательности SEQ ID No: 86 или последовательности SEQ ID No: 116;

(b) последовательности SEQ ID No: 110 или последовательности SEQ ID No: 115 и

(c) последовательности SEQ ID No: 111 или последовательности SEQ ID No: 117,

i) причем последовательность эпитопа человеческого CD127, содержащая SEQ ID No: 110, не продолжается так, чтобы она содержала аминокислоты, смежные с указанной последовательностью в последовательности человеческого CD127 более чем на 1 аминокислоту с N-конца или более чем на 7 аминокислот с C-конца; и/или

ii) причем последовательность эпитопа человеческого CD127, содержащая SEQ ID No: 111, не продолжается так, чтобы она содержала аминокислоты, смежные с указанной последовательностью в последовательности человеческого CD127 более чем на 30 аминокислот с N-конца или более чем на 30 аминокислот с C-конца.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, которые специфично связываются с последовательностями эпитопа из домена D1 и из сайта 2b человеческого CD127, причем последовательности эпитопа содержат или состоят из последовательности SEQ ID No: 116, последовательности SEQ ID No: 115 и последовательности SEQ ID No: 117.

4. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, которое представляет собой антагонист передачи сигнала с участием IL-7R, индуцированного IL-7.

5. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент любому из пп.1-4, которое не индуцирует интернализацию CD127 и/или ингибирует IL7-индуцированную интернализацию CD127.

6. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, которое не повышает созревание дендритных клеток, индуцируемое TSLP.

7. Антитело по любому из пп.1-6, которое содержит тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID No: 2, или SEQ ID No: 6, или SEQ ID No: 54 или которая содержит последовательность SEQ ID No: 22, или SEQ ID No: 36, или SEQ ID No: 38, или SEQ ID No: 40; и

легкую цепь с последовательностью SEQ ID No: 4 или SEQ ID No: 56 или которая содержит последовательность SEQ ID No: 24, или SEQ ID No: 42, или SEQ ID No: 44, или SEQ ID No: 46.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, которые представляет собой химерное антитело, или гуманизированное антитело

9. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, которое является деиммунизированным антителом.

10. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность тяжелой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 2; SEQ ID No: 6; SEQ ID No: 22; SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 40; SEQ ID No: 54.

11. Молекула нуклеиновой кислоты по п.10, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID No: 1; SEQ ID No: 5; SEQ ID No: 21; SEQ ID No: 35; SEQ ID No: 37; SEQ ID No: 39 и SEQ ID No: 53.

12. Молекула нуклеиновой кислоты кодирующая аминокислотную последовательность легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 4; SEQ ID No: 8; SEQ ID No: 24; SEQ ID No: 42; SEQ ID No: 44; SEQ ID No: 46 и SEQ ID No: 56.

13. Молекула нуклеиновой кислоты по п.12, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID No: 3; SEQ ID No: 7; SEQ ID No: 23; SEQ ID No: 41; SEQ ID No: 43; SEQ ID No: 45 и SEQ ID No: 55.

14. Фармацевтическая композиция для лечения состояния, которое можно улучшить или предотвратить путем антагонизации IL-7-индуцируемой передачи сигнала с участием IL-7R, причем указанная фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9 или молекулы нуклеиновой кислоты по п.10 или 11 и п.12 или 13 с фармацевтическим носителем.

15. Фармацевтическая композиция для лечения пациента с аутоиммунным заболеванием или с риском аутоиммунного заболевания, такого как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, диабет I типа, аутоиммунный тиреоидит или волчанка, или воспалительного заболевания, такого как воспалительное заболевание кишечника (IBD) и энцефаломиелит, или аллергического заболевания, или злокачественного заболевания, или респираторного заболевания, или заболевания или состояния пациента, нуждающегося в трансплантации, которому предстоит трансплантация или который перенес трансплантацию, причем указанная фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9 или молекулы нуклеиновой кислоты по п.10 или 11 и п.12 или 13 с фармацевтическим носителем.

16. Фармацевтическая композиция по п.14 или 15, которая содержит дополнительный другой активный ингредиент, выбранный из группы, состоящей из других моноклональных антител, целенаправленно воздействующих на T клетки, или рекомбинантных белков или антител, целенаправленно воздействующих на аксессуарные клетки.

17. Фармацевтическая композиция по п.16, в которой указанный дополнительный другой активный ингредиент представляет собой соединение, характеризующееся терапевтическим иммуномодулирующим эффектом.

18. Фармацевтическая композиция по п.17, в которой указанный дополнительный другой активный ингредиент характеризуется терапевтическим иммуномодулирующим эффектом в отношении клеток, вовлеченных в аутоиммунное заболевание или аллергическое заболевание, лейкоз, лимфому, злокачественное заболевание, хроническую вирусную инфекцию, воспалительные заболевания, трансплантацию,

респираторные заболевания или аутоиммунную реакцию.

19. Способ лечения пациента, имеющего заболевание или состояние, которое можно улучшить или предотвратить путем антагонизации IL-7-индуцируемой передачи сигнала с участием IL-7R, включающий введение пациенту макромолекулы, которая представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, или фармацевтической композиции по любому из пп.14-18.

20. Способ лечения пациента с аутоиммунным заболеванием или с риском аутоиммунного заболевания, такого как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, диабет I типа, аутоиммунный тиреоидит или волчанка, или воспалительного заболевания, такого как воспалительное заболевание кишечника (IBD) и энцефаломиелит, или аллергического заболевания, или злокачественного заболевания, или респираторного заболевания, или заболевания или состояния пациента, нуждающегося в трансплантации, которому предстоит трансплантация или который перенес трансплантацию, включающий введение пациенту макромолекулы, которая представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, или фармацевтической композиции по любому из пп.14-16.

21. Способ получения антитела по любому из пп.1-9, предусматривающий иммунизацию животного, отличного от человека, антигеном, состоящим из фрагмента полипептида с последовательностью SEQ ID No: 114, причем фрагмент содержит последовательность(и) эпитопа из домена D1 и из сайта 2b человеческого CD127, причем последовательности эпитопа содержат или состоят из последовательности SEQ ID No: 86 (или SEQ ID No: 116) и последовательности SEQ ID No: 110 (или SEQ ID No: 115) и последовательности SEQ ID No: 111 (или SEQ ID No: 117), в частности содержат или состоят из последовательностей SEQ ID No: 116 и последовательности SEQ ID No: 115 и последовательности SEQ ID No: 117,

(i) причем последовательность эпитопа человеческого CD127, содержащая SEQ ID No: 110, не продолжается так, чтобы она содержала аминокислоты, смежные с указанной последовательностью в последовательности человеческого CD127 более чем на 1 аминокислоту с N-конца или более чем на 7 аминокислот с C-конца; и/или

(ii) причем последовательность эпитопа человеческого CD127, содержащая SEQ ID No: 111, не продолжается так, чтобы она содержала аминокислоты, смежные с указанной последовательностью в последовательности человеческого CD127 более чем на 30 аминокислот с N-конца или более чем на 30 аминокислот с C-конца,

отбор антитела, соответствующего любому из пп.1-9.

22. Способ получения антитела по любому из пп.1-9, предусматривающий

экспрессию первого полинуклеотида, содержащего или состоящего из нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 1; SEQ ID No: 5; SEQ ID No: 21; SEQ ID No: 35; SEQ ID No: 37 и SEQ ID No: 39; и экспрессию второго полинуклеотида, содержащего или состоящего из нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 3; SEQ ID No: 7; SEQ ID No: 23; SEQ ID No: 41; SEQ ID No: 43 и SEQ ID No: 45; в частности в клетках, которые характеризуются низкой способностью к фукозилрованию, таких как EB66 клетках птиц, в условиях, позволяющих восстановление антител; или

экспрессию полинуклеотида, содержащего 6 следующих полинуклеотидных последовательностей: полинуклеотидную последовательность согласно SEQ ID No: 9, которая кодирует SEQ ID No: 10; и полинуклеотидную последовательность согласно SEQ ID No: 11, которая кодирует SEQ ID No: 11; и полинуклеотидную последовательность согласно SEQ ID No: 13, которая кодирует SEQ ID No: 14, или SEQ ID No: 47, которая кодирует SEQ ID No: 48; и полинуклеотидную последовательность согласно SEQ ID No: 15, которая кодирует SEQ ID No: 16, или SEQ ID No: 49, которая кодирует SEQ ID No: 50; и полинуклеотидную последовательность согласно SEQ ID No: 17, которая кодирует SEQ ID No: 18, или SEQ ID No: 51, которая кодирует SEQ ID No: 52; и

полинуклеотидную последовательность согласно SEQ ID No: 19, которая кодирует SEQ ID No: 20; в частности в клетках, которые характеризуются низкой способностью к фукозилрованию, таких как EB66 клетках птиц, в условиях, позволяющих восстановление антител; и

выделение антитела, которое является антагонистом передачи сигнала с участием IL-7R, индуцированного IL-7.

23. Способ отбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9, включающий или состоящий по меньшей мере из одной из следующих стадий:

a) исследование связывающей способности макромолекулы;

b) исследование интернализации CD127 в экспрессирующих CD127 клетках, индуцируемой присутствием макромолекулы;

c) исследование ингибирования макромолекулой индуцируемой IL-7 интернализации CD127 в экспрессирующих CD127 клетках;

d) исследование повышения созревания DC, индуцируемого TSLP в присутствии макромолекулы;

и где каждая из этих стадий исследования сопровождается отбором одного или более антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, имеющих желательное исследуемое функциональное свойство.

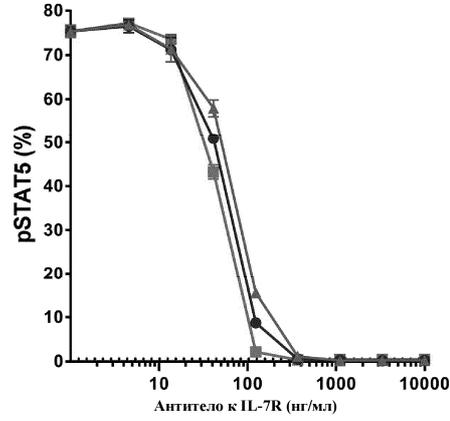
24. Способ отбора антитела по п.23, который дополнительно включает одну или более из следую-

щих стадий:

е) исследование ингибирования макромолекулой индуцируемой IL-7 передачи сигнала, в частности фосфорилирования STAT5;

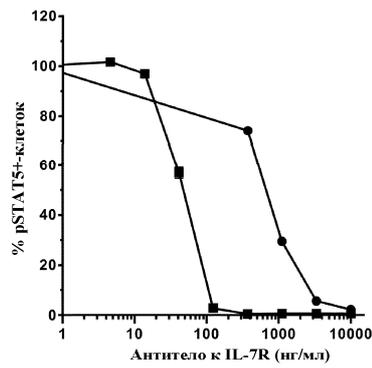
ф) исследование ингибирования макромолекулой индуцируемой TSLP продукции TARC;

г) исследование ингибирования макромолекулой экспрессии $\alpha 4$ -, $\beta 7$ - и/или $\alpha 4/\beta 7$ -интегринов, в частности экспрессии на клеточной поверхности на Т-лимфоцитах.

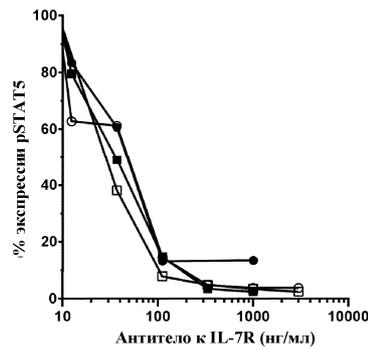


Фиг. 1

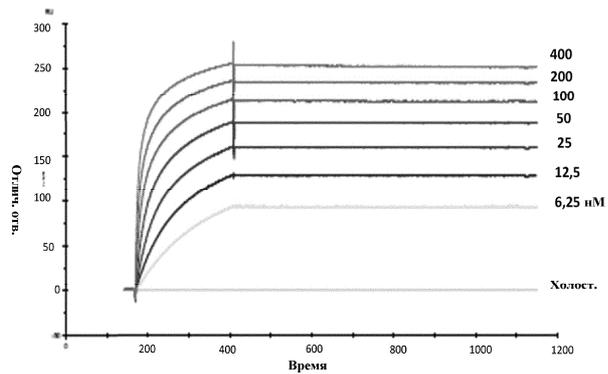
А.



В.

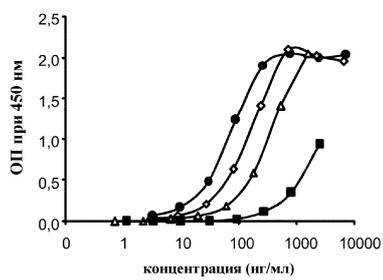


Фиг. 2

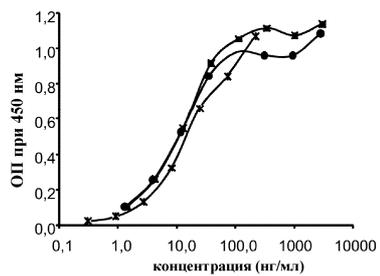


Фиг. 3

А.

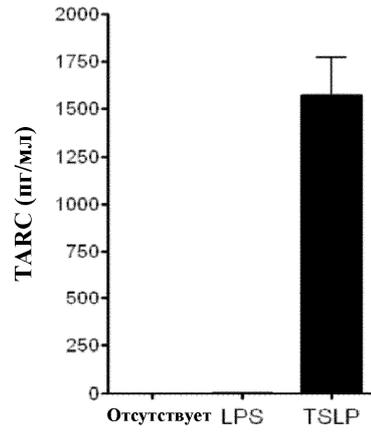


В.

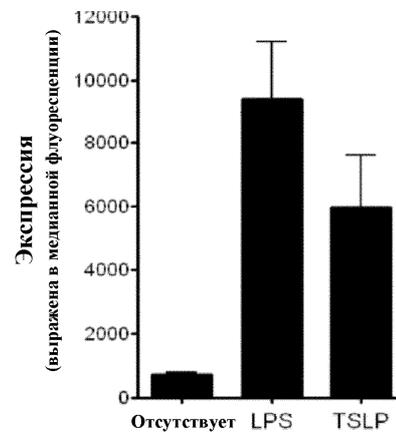


Фиг. 4

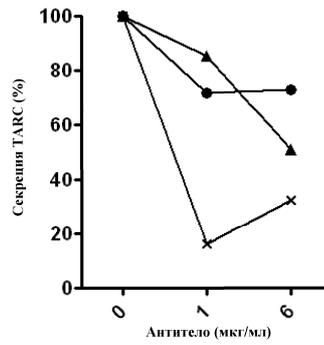
A.



B.

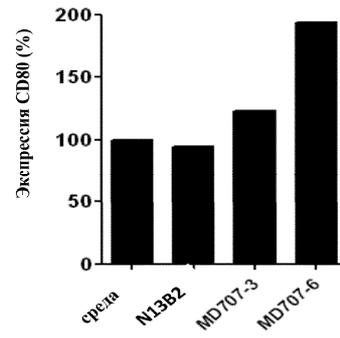


Фиг. 5

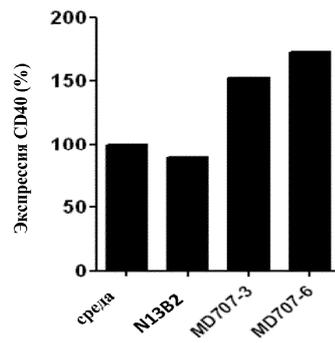


Фиг. 6

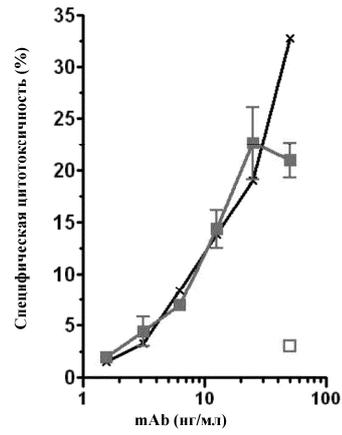
A.



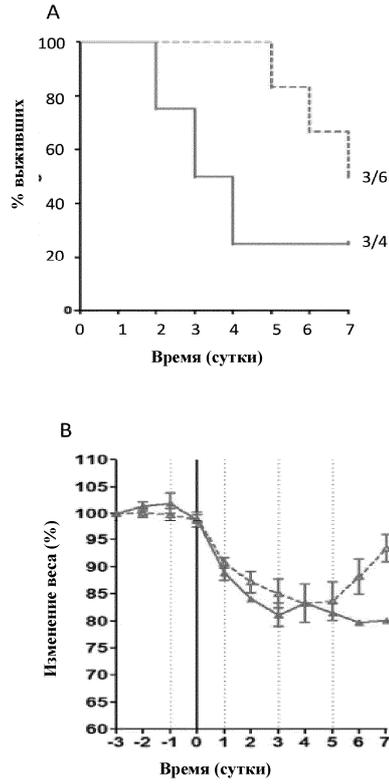
B.



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

VH-FcG1M (E333A) - ДНК

GCGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTAGTGCAGCCTGGAGGGTC
 CCTGAACTCTCTGTGCAGTCTCAGGATCACTCTCAGTGACTATTACATGGC
 CTGGGTCCGCCAGGCTCCAAGAAGGGTCTGGAATGGGTCGCAACCATTAGT
 GCCAGTGGGCTCAGAACTTACTATCCAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACTAT
 CTCCAGAGATGATGCAAAAAGGAGCCTCTTCTGCAATGACCACTGAAGT
 CTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTGCAAGACCGATGCTGCACACTATGGT
 TTTAACTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCAATGGTCACTCTCCTCAgta
 gccaaggccatcgtcttccccctggcaccctctccaagagcacctctgggggcaacagcggccctgggc
 tgcctggtcaaggactactccccgaaccggtgacggtgctggtgaactcagcggccctgaccagcggcgtgac
 acctccggctgctctacagctcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacccgtccctccagcagctggg
 caccagaactacatctgcaacgtgaatcaaacgcccagcaacaccaaggtggacaagaagttgagcccaa
 atcttgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccctcagctctctctcc
 ccccaaacccaaggacacctcatgctccccggaccctgaggtcacatgctggtggtggagcgtgagccac
 gaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtcataatgccaagacaagccgagg
 aggagcagtaacaacagcagtcaccgtggtgagcgtctcaccgtcctcaccagcagctgctgaatggcaag
 gagtaacagtgcaaggctccaacaagccctccagccccatcgcaaaacctcacaagccaaggc
 cagccccgagaaccacaggtgacacccctgccccatccccggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctg
 acctcctggtcaaggcttctatccagcagacatcgccgtggagtgaggagcaatggcagccggagaaca
 actacaagaccagcctcccgctgctgactccagcggctctctctctacagcaagctcaccgtggacaagac
 cagggtgagcaggggaaactctctcatgctccgtgatgaggtcctgcacaacctacacagcagaaga
 gcctctccctgctccgggtaaatga

VL-CLKAPPA - ДНК

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAGTTCCTGTCTGCATCTCTGGGAGAAAC
 TGTCAACCATCGAATGTCGAACAAGTGAGGACATTTACAATGGTTTAGCATGGTA
 TCAGCAGAAGCCAGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAGTGCAAATAGCT
 TACATATTGGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACACAGTATT
 CTCTCAAGATAAACAGCCTGCAATTTGAAGATGTGCAAGTTATTTCTGTCAAC
 AGTATTACGATTATCCGCTCGCCTTCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
 CGGacgggtgctgaccatctgtcttcatctcccccatctgatgagcagttgaaatctggaactgctctgtg
 gctctgataactctatcccagagagccaaagtacagtggaagtgataacgcccctcaatcggttaact
 cccagagagtgacagagcagcagcaagacagcactacagcctcagcagcaccctgacgctgagc
 aaagcagactacgagaacacaagctctacgctgcaagtcacccatcaggcctgagctgcccctcacaac
 agagctcaacaggggagagtgtag

VH-FcG1M (E333A) - белок

AVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSGFTLSDYIMAVWVRQAPKKGLEWVATISASGLRITYPDSVKGRF
 TISRDDAKRSLFLQMTSLKSEDTATYYCARPMSAHYGFNYFDYWGQGMVTVSSastkpsvflaplsks
 sgtaalgclvkdypcptvswnsgaltsghvtfpavlqssgylslsvvtpssslgtqyicvnhkpsntkvdkkepkscd
 khtkpcpapellggsvffppkpkdltmirsrtevtcvvdvshedpevkfnwydgvvhnaktkpreeqynstyrvv
 svtlvhqdwingkeykckvsnkalpaiaiktiskakgprepyvtlppsremtknqvslctlvkgfypsdiaivesngq
 pennykttppvldsgsfflyskltvdksrwqgnvfscvsmhealhnhytqkslslspgk*

VL-CLKAPPA - белок

DIQMTQSPASLSASLGETVITERTSEDIYNGLAWYQQKPGKSPQLLVYSANSLHIGVPSRFSGSGSGTQ
 YSLKINSLQFEDVASYFCQQYDYPLAFSGGTKLEIKRtvaapsvffpppsdeqlksqstasvcllnfyreakvqw
 kvdnalqsgnsqesvteqdkdstylsstltskadyekhkvyacevthqglspvtksfnrgec*

Фиг. 10

VH-FCG4M (S228P) - ДНК

GCGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTAGTGCAGCCTGGAGGGT
CCCTGAAACTCTCCTGTGCAGTCTCAGGATTCACTCTCAGTGACTATTACAT
GGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAAAGAAGGGTCTGGAATGGTTCGCAACC
ATTAGTGCCAGTGGGGCTCAGAACTTACTATCCAGACTCCCGTGAAGGGCCCGC
TTCACTATCTCCAGAGATGATGCAAAAAGGAGCCTCTTCTGCAAATGACCA
GTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTGCAAGACCGATGTCTG
CACACTATGGTTTTAACTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCA
AGTCTCCTCAgctagcaccaggccatcggtctccccctggccctgctccaggagcacctccg
agagcacagccgcccctgggtgctggtcaaggactactccccgaaccggtgacggtgctggtggaactcag
gcccctgaccagcggcgtgcaacactccccggctgctctacagtctcaggactctacctcagcagcgt
ggtgaccgtgcccctccagcagctgggcaagacctacacctgcaactagatcacaagcccagcaac
accaagggtgacaagagagtggtccaatatggtccccatgccaccatgccagcacctgagttcctg
gggggaccatcagctctctgttcccccaaaaccaaggacactctcatgatctccggaccctgaggtca
cgtgctggtggtggagcgtgaccaggaagaccgaggtccagttcaactggtacgtggtggtggtggtg
gtgcataatgccaagacaagccggtggagagcagttcaacagcagctaccgtggtgagcgtctctcac
cgtcctgaccaggactggtgaacggcaaggagtacaagtgaagggtccaacaaggcctcccgtct
ccatcgagaaaaccatctccaagccaaggcagccccgagagccacaggtgtacacctgcccccatc
ccaggaggagatgaccaagaaccaggctgacctgacctggtcaaggcttctaccccagcagcctcc
ccgtggagtggtgagacaatgggagcgggagaacaactacaagaccacgctcccgtggtgactccg
acggctcctctctctacagcagcctaaccgtgacaagagcaggtgagagggggaatgctctctcatg
ctccgtgatgatgaggtctgcacaacctacacagaagagcctctcctgctccgggtaaatga

VL-CLKAPPA - ДНК

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGCATCTCTGGGAGAA
ACTGTACCATCGAATGTCGAACAAGTGAGGACATTTACAATGGTTTAGCAT
GGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAGTGCAA
ATAGCTTACATATTGGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTAC
ACAGTATTCTCTCAAGATAAACAGCCTGCAATTTGAAGATGTCGCAAGTTATT
TCTGTCAACAGTATTACGATTATCCGCTCGCGTTCGGTTCTGGGACCAAGCT
GGAGATCAAACGAcggtgctgcaccatctgtcttctctccgccatctgatgagcagttgaaatct
ggaactgcctctgtgtgctgctgaataactctatcccagagagccaaagtacagtggaagggtgataa
cgccctcaatcgggtaactcccaggagagtgacacagcagggacagcaaggacagcacctacagcctc
agcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaaacacaagctacgctcgaagtcaccatc
agggcctgagctgcccctcacaagagctcaacaggggagagtgtag

VH-FCG4M (S228P) - белок

AVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSGFTLSDYYMAWVRQAPKKGLEWVATISASGLRTPYDPSVKG
RFTISRDDAKRSLFLQMTSLKSEDTATYYCARPMSAHYGFNYFDYWGQGVMTVSSastkgspsvflpa
pcsrstsestaalglvldyfpvptvswngaltsghvhtfpavlsqsglyslsvvtvpssslgtktytcndhkpntkvdk
rveskygppcpapeflgppsflfpkpkdtlmsrtpevtcvvdvsqedepevqfnwyvdgvevhnaktkpree
qfnstyrwsvitvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiectiskakgqprepqvytlppsqeemtknqvstclvkgfyps
diavewesngqpennykttppvlidsdgsfflysrvtvdksrwqegnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk*

VL-CLKAPPA - белок

DIQMTQSPASLSASLGETVTIECRTSEDIYNGLAWYQQKPKGKSPQLLVYSANSL
HIGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQFEDVASYFCQQYYDYPLAFSGGKLEIKR
tvaapsvfifppsdeqlksgtasvvlInnfyreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsdstylsstitlska
dyeKhkvyacevthqglsspvtkfsfrgec*

Фиг. 11

Последовательности Fc**Человеческий IgG1** (Uniprot P01857):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

Человеческий IgG2 (Uniprot P01859):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP
 PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
 VHNAAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAIEKTI
 S KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPEN
 NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 LSPGK

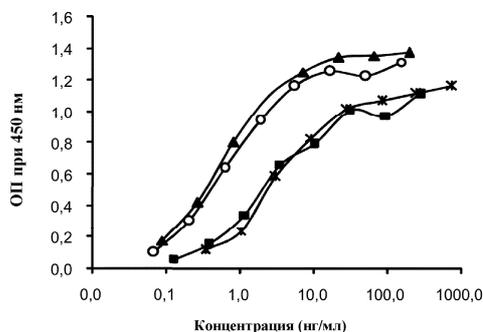
Человеческий IgG4 (Uniprot P01861):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP
 SCAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG
 VE VHNAAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSIEKTI
 S KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 LSLGK

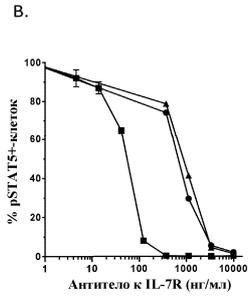
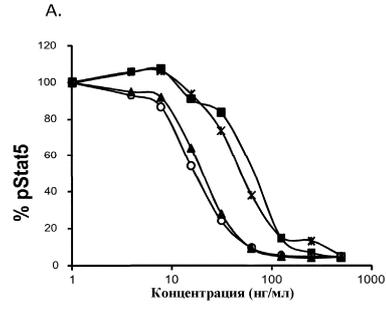
Крысиный IgG1 (Uniprot P20759) используемый в N13B2

AETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLVKGYFPEPVTVWNSGALSSGVHTF
 PAVLQSGLYLTSSVTPSSWPSQTVCNVAHPASSTKVDKIVPRNCGGDCK
 PCICTGSEVSSVFIFFPKPKDVLITLTPKVTVCVVVDISQDDPEVHFSWFVDDVE
 VHTAQTRPREEQFNSTFRSVSELPILHQDWLNGRTRFRCKVTSAAFPSPIEKTI
 SKPEGRTQVPHVYTMSPKTEEMTQNEVSITCMVKGFPDIIYVEWQMNGQPQ
 ENYKNTPTMDTDGSYFLYKLNKKEKWQQGNTFTCSVLHEGLHNHHTKES
 LSHSPGK

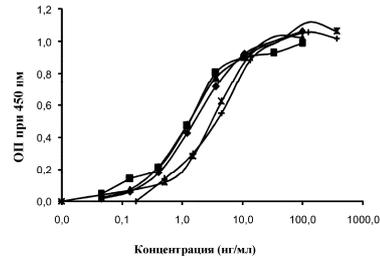
Фиг. 12



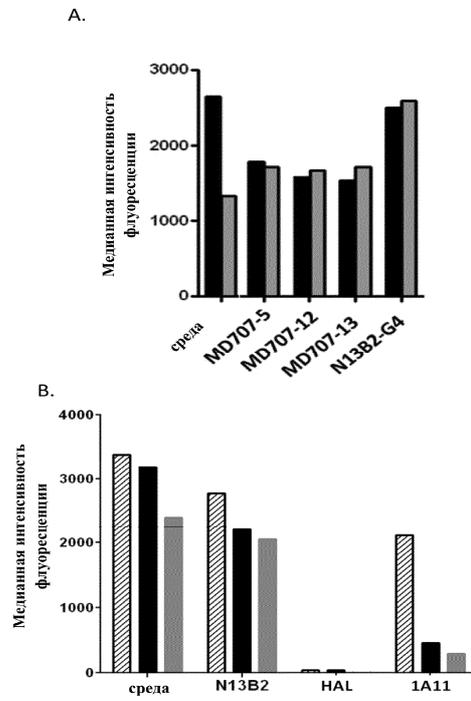
Фиг. 13



Фиг. 14

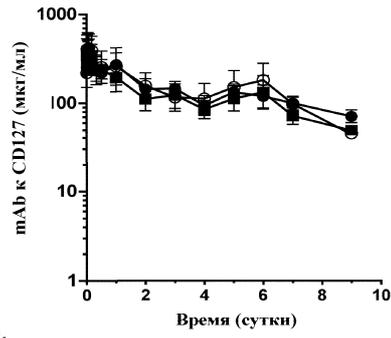


Фиг. 15

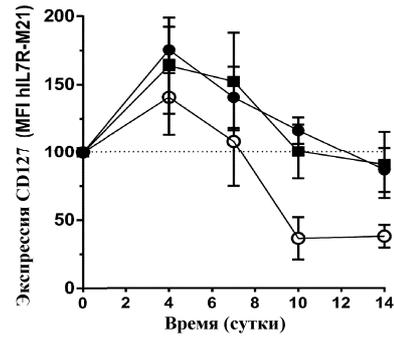


Фиг. 16

A.

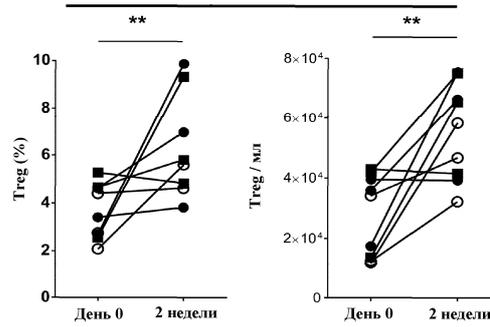


B.

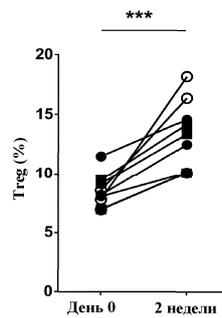


Фиг. 17

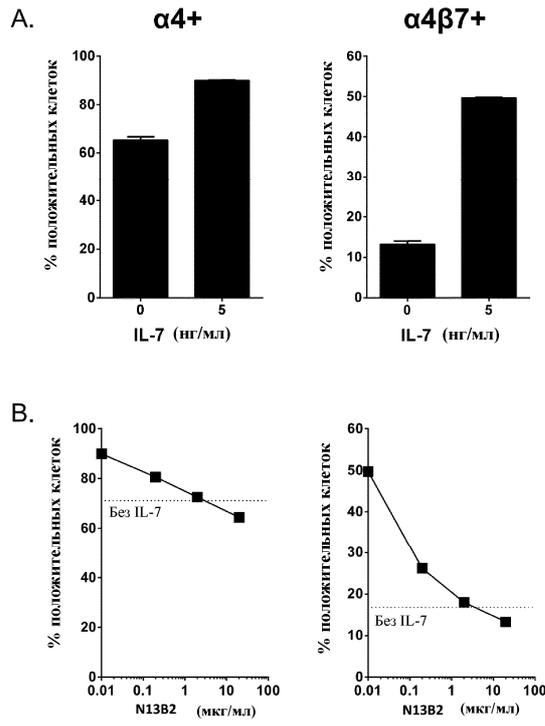
Периферическая кровь



Лимфатические узлы

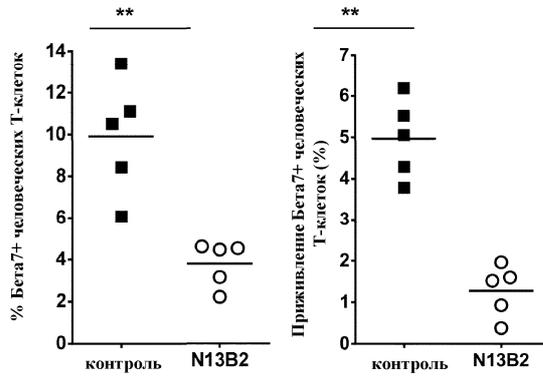


Фиг. 18

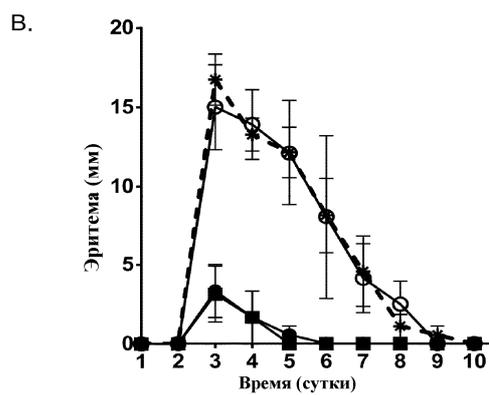
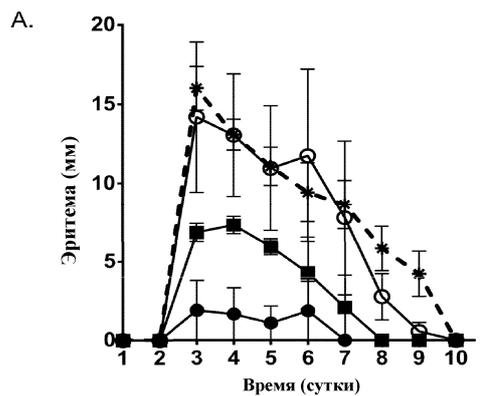


Фиг. 19

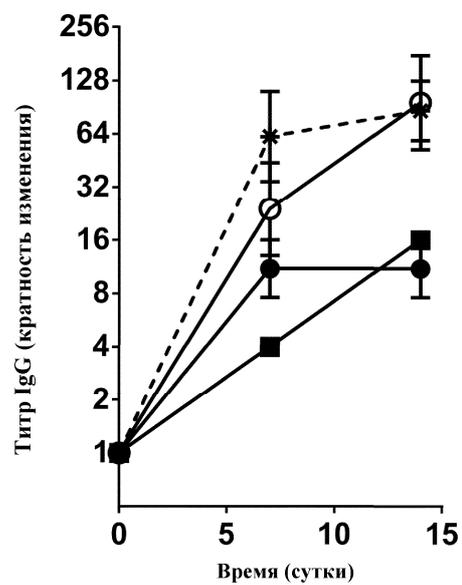
2 недели



Фиг. 20



Фиг. 21



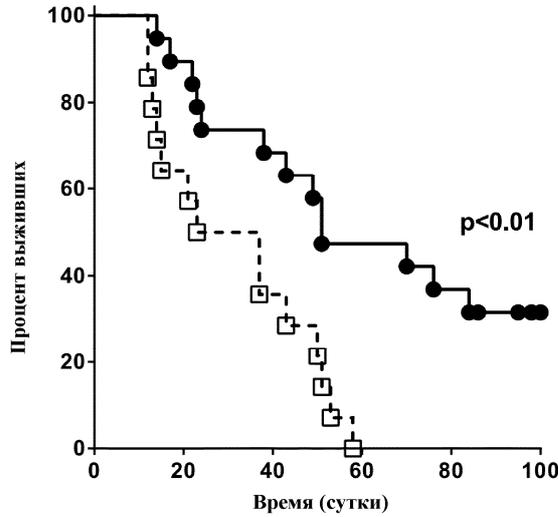
Фиг. 22

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAVSGFTLSDYYMAWIRQAPG
KGLEWVSTISASGLRTYYPDSVKGRRFTISRDNAKNSLYLQMNS
LRAEDTAVYYCARPLSAHYGFNYFDYWGQGLTVTVSSASTKGP
SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

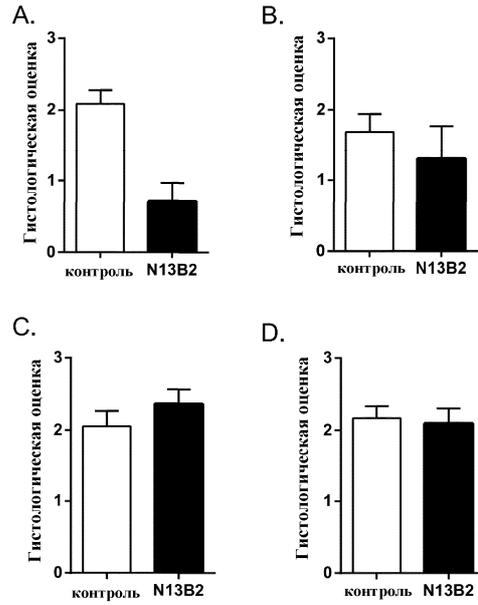
Фиг. 23

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRTSEDIYQGLAWYQQKPGQA
PRLIYSANTLHIGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQ
QYYDYPLAFGGGTKVEIKTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

Фиг. 24



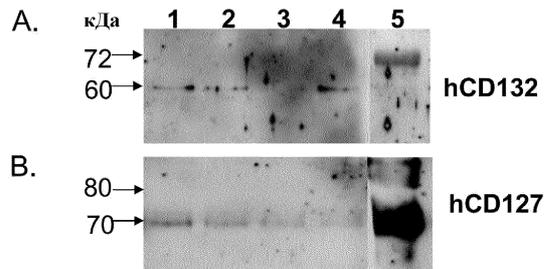
Фиг. 25



Фиг. 26

MTILGTTFCGMVFSLLQVVSGESGYAQNGDLEDAELDDYSFS
 CYSQLEVNGSQHSLTCAFEDPDVNTTNLEFEICGALVEVKC
 LNFRLQEIY**FIETKKF**LLIGKSNICVKVGEKSLTCKKIDI
 TTIVKPEAPF**DLSVIY**REGANDFVVTFNTSHLQKKYVKVLM
 HDVAYRQEKDENKWHVNLSSTKLTLQKLPAAAMYEIKV
 RSIPDHY**FKGF**WSEWSPSYFRTPINNSSGEMDPILLTIS
 ILSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLC
 KKPRKNLNVSNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTF
 PQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVIITPESFGRDSSLTC
 LAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGT
 TNSTLPPPFSLQSGILTLNPFVAQQQPILTSLSGNSQEEAYVT
 MSSFYQNQ

Фиг. 27



Фиг. 28