

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392507 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.22

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.03.17

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ СВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА, КОТОРАЯ СВЯЗЫВАЕТСЯ С CCR9

(31) 63/162,603

(32) 2021.03.18

(33) US

(86) PCT/EP2022/057029

(87) WO 2022/195028 2022.09.22

(88) 2022.10.27

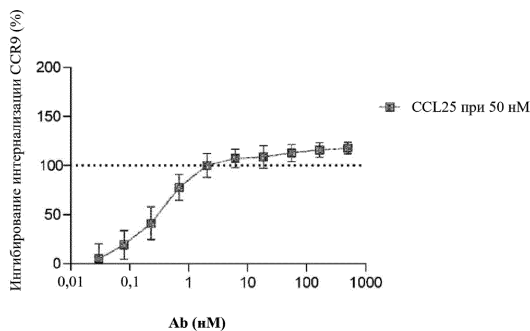
(71) Заявитель:
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:

Нис Жоскин Арно, Том Альберт
Джордж, Карьюк Питер, Шофилд
Дарен Джонатан, Райли Эйдан,
Хантингтон Кэтрин Юджини
Чайллан, Риз Дэвид Гарет, Ирвинг
Лоррейн, Робинсон Мэттью (GB)

(74) Представитель:
Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, таким как антитела, которые связываются с хемокиновым рецептором CCR9. Более конкретно, настоящее изобретение относится к лечению CCR9-опосредованных заболеваний или состояний, таких как воспалительное заболевание кишечника (IBD), и способам выявления CCR9, в которых используются связывающие молекулы по настоящему изобретению.



A1

202392507

202392507

A1

ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ СВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА, КОТОРАЯ СВЯЗЫВАЕТСЯ С CCR9

1 ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, таким как антитела, которые связываются с хемокиновым рецептором CCR9. Более конкретно, настоящее изобретение относится к лечению CCR9-опосредованных заболеваний или состояний, таких как воспалительное заболевание кишечника (IBD), и способам выявления CCR9, в которых используются связывающие молекулы по настоящему изобретению.

2 ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] IBD представляет собой группу хронических нарушений желудочно-кишечного тракта, характеризующихся с точки зрения патологии воспалением кишечника и повреждением эпителия. Две формы IBD – болезнь Крона и язвенный колит, связаны с выраженной заболеваемостью и могут оказывать значительное влияние на качество жизни индивидуума и его трудоспособность [1]. Такие осложнения подчеркивают необходимость улучшения видов терапии IBD.

[0003] Терапевтические вмешательства при IBD ориентированы на разрешение проблемы симптоматического ответа и последующей переносимости вмешательства. Современные средства терапии включают аminosалицилаты, кортикостероиды и антитела. Однако, несмотря на эти средства лечения, согласно оценкам, проведение хирургических вмешательств необходимо у вплоть до двух третей пациентов, страдающих болезнью Крона, в течение их жизни [2]. При клиническом лечении болезни Крона традиционно применяли поэтапный подход, начинающийся со стероидов, иммунодепрессантов (тиопуринов и метотрексата) и/или аminosалицилатов, хотя доказательства эффективности последних весьма ограничены [3]. Ни одна лицензированная терапия не позволяет достичь стойкой ремиссии у большинства пациентов.

[0004] В качестве механизма лечения рака были предложены нацеливающиеся антитела к CCR9. Аберрантная экспрессия CCR9 при видах карциномы яичника, раке предстательной железы, раке молочной железы и видах меланомы коррелирует с инвазивностью *in vitro* в ответ на CCL25. Вовлечение CCL25 повышает выживаемость клеток и устойчивость к апоптозу. В работе Somovilla-Crespo *et al.* 2018 [4] и WO2015075269 A1 описаны антитела мыши к CCR9, представляющие собой 91R (антитела мыши к CCR9 человека – IgG2b) и 92R (антитела мыши к CCR9 человека – IgG2a).

[0005] Следовательно, существует потребность в улучшенном лекарственном препарате для лечения или предупреждения таких нарушений. Настоящее изобретение позволяет решить одну или несколько из вышеупомянутых проблем.

3 СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Авторы настоящего изобретения обнаружили, что хемокиновый рецептор, CCR9, на высоком уровне экспрессируется в толстой и подвздошной кишке пациентов с IBD, где он экспрессируется совместно с цитокинами воспаления – IFN- γ , IL-4 и IL-17. Авторы настоящего изобретения успешно получили связывающие молекулы, которые связываются с клетками, экспрессирующими CCR9, ингибируют взаимодействие между CCR9 и его природным лигандом CCL25 и предотвращают интернализацию CCR9, опосредованную CCL25. Преимущественно связывающие молекулы могут индуцировать гибель клеток, экспрессирующих CCR9, с которыми они связываются, например, опосредуя антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) в отношении клеток, экспрессирующих CCR9, с которыми они связываются. Разработка связывающей молекулы, которая ингибирует связывание CCL25 с CCR9 и вызывает гибель клетки, экспрессирующей CCR9, с которой она связывается, является особенно преимущественной для субъектов с IBD.

[0007] Таким образом, настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, которые связываются с CCR9. Связывающие молекулы по настоящему изобретению предпочтительно ингибируют связывание CCL25 с CCR9. Связывающие молекулы по настоящему изобретению предпочтительно способны индуцировать гибель клеток, экспрессирующих CCR9, с которыми они связываются. Например, связывающие молекулы могут быть способны опосредовать ответ в виде ADCC в отношении клеток, с которыми они связываются. Связывающие молекулы по настоящему изобретению предпочтительно способны предупреждать или ингибировать миграцию клеток, экспрессирующих CCR9, с которыми они связываются. Например, связывающие молекулы могут обеспечивать предупреждение миграции клеток, экспрессирующих CCR9, в ответ на CCL25, или связывающие молекулы могут быть способны обеспечивать предупреждение миграции клеток, экспрессирующих CCR9, от периферии в кишечник субъекта.

[0008] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена связывающая молекула, которая связывается с CCR9 и содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую набор CDR из HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую набор CDR из LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где (a) аминокислотная последовательность VH-области содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 3, и где аминокислотная последовательность VL-области содержит LCDR1 под SEQ ID NO: 4 (RSSQSLVHX₁NX₂NTYLH, где X₁ и X₂ представляют собой любую аминокислоту), LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 6; (b) аминокислотная

последовательность VH-области содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 7, HCDR2 под SEQ ID NO: 8 и HCDR3 под SEQ ID NO: 9, и где аминокислотная последовательность VL-области содержит LCDR1 под SEQ ID NO: 10, LCDR2 под SEQ ID NO: 11 и LCDR3 под SEQ ID NO: 12; или (с) аминокислотная последовательность VH-области содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 13, HCDR2 под SEQ ID NO: 14 и HCDR3 под SEQ ID NO: 15, и где аминокислотная последовательность VL-области содержит LCDR1 под SEQ ID NO: 16, LCDR2 под SEQ ID NO: 17 и LCDR3 под SEQ ID NO: 18; или где любая одна или несколько из указанных HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат 1, 2 или 3 аминокислотные замены по сравнению с указанными последовательностями.

[0009] Связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность VH-области, содержащую HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 3, и аминокислотную последовательность VL-области, содержащую LCDR2 под SEQ ID NO: 5, и LCDR3 под SEQ ID NO: 6; и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 19 (RSSQSLVHX₁NX₂NTYLH, где X₁ из последовательности под SEQ ID NO: 19 представляет собой P или S, и X₂ из последовательности под SEQ ID NO: 19 представляет собой R, T или G), SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22.

[0010] Связывающие молекулы по настоящему изобретению предпочтительно содержат Fc-домен иммуноглобулина или его фрагмент, который сохраняет способность связываться с одним или несколькими Fc-рецепторами. Например, связывающая молекула может содержать Fc-домен IgG1 человека или его фрагмент. Связывающие молекулы по настоящему изобретению предпочтительно являются афукозилированными. Например, связывающие молекулы могут являться афукозилированными в положении аминокислоты 297. Связывающая молекула по настоящему изобретению может присутствовать в композиции, содержащей множество копий указанной связывающей молекулы, где по меньшей мере 50%, 75%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% копий связывающей молекулы в композиции являются афукозилированными.

[0011] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена связывающая молекула, которая связывается с CCR9, где связывающая молекула не конкурирует за связывание с CCR9 с другой связывающей молекулой по настоящему изобретению, как, например, не конкурирует за связывание с CCR9 со связывающей молекулой, описанной выше, как, например, не конкурирует за связывание с CCR9 со связывающей молекулой, описанной в данном документе, для применения в терапии. Связывающую молекулу по

данному аспекту можно применять для определения численности CCR9⁺ клеток в образце, который был приведен в контакт со связывающей молекулой по настоящему изобретению.

[0012] Подобным образом, в настоящем изобретении предусмотрен способ оценки степени истощения по клеткам, экспрессирующим CCR9, с помощью связывающей молекулы по настоящему изобретению, при этом способ включает: (i) приведение указанной связывающей молекулы в контакт с популяцией клеток, где популяция клеток содержит клетки, экспрессирующие CCR9, и иммунные эффекторные клетки, в условиях, подходящих для обеспечения проявления антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности эффекторными клетками; (ii) приведение указанной популяции клеток в контакт со связывающей молекулой, которая связывается с CCR9 и которая не конкурирует за связывание с CCR9 со связывающей молекулой из стадии (i); (iii) выявление клеток, экспрессирующих CCR9, в популяции клеток, которые связаны связывающей молекулой из (ii); (iv) сравнение количества клеток, экспрессирующих CCR9, выявленных на стадии (iii), с количеством клеток, экспрессирующих CCR9, в исходной популяции клеток, используемой на стадии (i), и определение таким образом количества клеток, экспрессирующих CCR9, которые были подвергнуты истощению на стадии (i).

[0013] В настоящем изобретении также предусмотрен выделенный полинуклеотид, кодирующий любую связывающую молекулу по настоящему изобретению. Также предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотид по настоящему изобретению, функционально ассоциированный с промотором. Также предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий VH-область связывающей молекулы по настоящему изобретению, и полинуклеотид, кодирующий VL-область связывающей молекулы по настоящему изобретению, где указанные полинуклеотиды функционально ассоциированы с одним или несколькими промоторами.

[0014] В настоящем изобретении предусмотрена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по настоящему изобретению или вектор по настоящему изобретению. Также предусмотрен способ получения связывающей молекулы по настоящему изобретению, включающий экспрессию полинуклеотида по настоящему изобретению или вектора по настоящему изобретению в клетке-хозяине.

[0015] В настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая связывающую молекулу по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

[0016] Настоящее изобретение также относится к применению связывающих молекул по настоящему изобретению в медицине, как, например, применение связывающей молекулы по настоящему изобретению в терапии. Настоящее изобретение относится к

лечению CCR9-опосредованного заболевания или состояния у субъекта с помощью способа, включающего введение субъекту эффективного количества связывающей молекулы по настоящему изобретению или композиции по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также относится к лечению CCR9-опосредованного заболевания или состояния у субъекта с помощью способа, включающего введение субъекту эффективного количества связывающей молекулы, которая связывается с CCR9, где указанная связывающая молекула способна (i) ингибировать связывание CCL25 с CCR9 и (ii) опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении клетки, экспрессирующей CCR9, с которой она связывается.

[0017] Связывающие молекулы, описанные в данном документе, также можно применять для выявления CCR9. Например, в настоящем изобретении предусмотрен способ выявления присутствия полипептида CCR9 в образце, включающий: (a) приведение образца в контакт со связывающей молекулой, которая связывается с CCR9, такой как любая связывающая молекула по настоящему изобретению или связывающая молекула, описанная в данном документе, с получением комплекса связывающая молекула-антиген; (b) выявление присутствия или отсутствия указанного комплекса связывающая молекула-антиген; (c) где присутствие комплекса связывающая молекула-антиген подтверждает присутствие полипептида CCR9.

[0018] Настоящее изобретение относится к улучшенным антителам к CCR9 и их применению для лечения воспалительного заболевания кишечника. Настоящее изобретение в частности относится к гуманизированному афукозилированному моноклональному антителу, которое специфически связывается с хемокиновым рецептором 9 с мотивом C-C (CCR9). Благодаря функциональности его Fc-рецептора, связывание антитела с рецептором CCR9 инициирует ответ в виде ADCC, приводящий в результате к истощению популяций клеток, экспрессирующих CCR9. Антитела по настоящему изобретению являются гуманизированными, CDR-оптимизированными. Антитела афукозилируют без какой-либо потери активности.

4 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1: экспрессия CCR9 в различных типах клеток.

[0019] **Фигура 1А:** экспрессия CCR9 в CD4⁺ клетках из клеток яванского макака и человека из крови, брыжеечного лимфатического узла (только у яванского макака), толстого кишечника, подвздошной кишки и тимуса; **фигура 1В:** экспрессия CCR9 в В-клетках подвздошной кишки (слева) и толстого кишечника (справа) здоровых людей и пациентов с IBD; **фигура 1С:** экспрессия CCR9 в эффекторных Т-клетках и клетках Treg толстого кишечника или подвздошной кишки здоровых людей или пациентов с IBD.

Фигура 2: ассоциация CCR9 с провоспалительными цитокинами в CD4+ Т-клетках.

[0020] **Фигура 2А:** экспрессия IFN- γ , IL-4 и IL-17 в CCR9⁻ и CCR9⁺ клетках; **фигура 2В:** кратность изменения уровня экспрессии цитокинов, оцененного на **фигуре 2А**, между CD4+CCR9⁻ клетками и CD4+CCR9⁺ клетками.

Фигура 3: выровненные аминокислотные последовательности переменных областей девяти антител к CCR9.

[0021] **Фигура 3А:** VH-область; **фигура 3В:** VL-область. Местоположения CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3) указаны подчеркиванием. Также указаны месторасположения каркасных (FW) областей.

Фигура 4: выровненные VH- и VL-области антитела AB1020243, гуманизованная форма этого антитела (AB1020243-fgl) и две CDR-оптимизированные формы антитела (243LO0326 и 243LO0331)

Фигура 5: связывание антител к CCR9 с клетками, экспрессирующими или не экспрессирующими CCR9.

[0022] **Фигура 5А:** связывание с линией клеток Molt 4; **фигура 5В:** связывание с линиями клеток Molt 4 и Jurkat.

Фигура 6: связывание AB1020243 с различными формами CCR9 в клетках НЕК.

[0023] В качестве контроля оценивали связывание в клетках НЕК, не трансфицированных с помощью CCR9 (исходных НЕК), а затем связывание также оценивали в клетках НЕК, сверхэкспрессирующих CCR9А человека (Hu А НЕК), CCR9В человека (Hu В НЕК), CCR9 яванского макака (Суно НЕК), CCR9 мыши (НЕК мыши) и CCR9 крысы (НЕК крысы).

Фигура 7: активация NK-клеток афукозилированными антителами к CCR9, предварительно инкубированными с клетками НЕК, экспрессирующими CCR9А (вверху), или клетками Molt 4 (внизу).

Фигура 8: эффекты лечения антителами к CCR9 в отношении числа CCR9+ CD4+PBMC.

Фигура 9: сравнение связывания с разнообразными лигандами химерного антитела AB1020243 и его гуманизированной версии.

[0024] **Фигура 9А:** CCR9В человека; **фигура 9В:** CCR9 яванского макака; **фигура 9С:** CXCR1; **фигура 9D:** CXCR2; **фигура 9Е:** CCR5; **фигура 9F:** CCR8; **фигура 9G:** клетки НЕК, не трансфицированные с помощью CCR9.

Фигура 10: сравнение антитела AB1020243 с его гуманизированной версией.

[0025] Фигура 10А: активация NK-клеток после связывания с линией клеток Molt 4; **фигура 10В:** кинетические свойства гуманизированных и химерных афукозилированных антител АВ1020243.

Фигура 11: способность антител к CCR9 конкурировать с CCL25 за связывание с CCR9.

Фигура 12: связывание 243LO0326 и АВ1020243 с лигандами.

[0026] Фигура 12А: CCR9А человека; **фигура 12В:** CCR9В человека; **фигура 12С:** CCR9А яванского макака; **фигура 12D:** CCR5; **фигура 12Е:** CCR8; **фигура 12F:** CXCR1 и **фигура 12F:** CXCR2.

Фигура 13: изменение количества антитела АВ1020243 или антитела 243LO0326, связанных с клеточной поверхностью, с течением времени.

[0027] Изменение количества антитела АВ1020243 или антитела 243LO0326, связанных с клеточной поверхностью, с течением времени (фигура 13А), и эффект обработки с помощью антитела или CCL25 в отношении изменения уровней рецептора CCR9 на клеточной поверхности с течением времени (фигура 13В).

Фигура 14: эффекты антител к CCR9 в отношении уничтожения клеток Molt 4.

[0028] Фигура 14А: клетки PBMC и Jurkat (фигура 14В); и PBMC человека или яванского макака (фигура 14С).

Фигура 15: влияние фукозилирования на активность.

[0029] Фигура 15В: эффект афукозилирования в отношении ADCC. **Фигура 15А:** сравнение активности в виде ADCC у фукозилированных и афукозилированных молекул в исследовании с введением фукозилирования. RP: относительная активность.

Фигура 16: направленное истощение по CCR9+ Т-клеткам *in vivo*.

[0030] Фигура 16А: эффект внутривенной инъекции 243LO0326 в отношении количества CCR9+ CD4+ Т-клеток памяти в крови яванских макаков. **Фигура 16В:** высокие и низкие дозы 243LO0326 снижают уровни CCR4+CCR9+ клеток в периферической крови яванских макаков в течение 2 дней. **Фигура 16С:** высокие и низкие дозы 243LO0326 снижают уровни CCR4+CCR9+ клеток в подвздошной кишке яванских макаков при измерении на день 15 с помощью FACS. **Фигура 16D:** высокие и низкие дозы 243LO0326 снижают уровни CCR4+CCR9+ клеток в слизистой оболочке кишечника яванских макаков, что измеряют на день 15 с помощью IHC.

Фигура 17: селективное истощение по CCR9+ лимфоцитам кишечника.

Фигура 18: эффекты 243LO0326 в отношении маркеров IBD в эксплантатах кишечника человека, взятых у пациентов с IBD.

[0031] **Фигура 18A:** уровни CCR9; **фигура 18B:** уровни IL-6; **фигура 18C:** уровни GM-CSF; **фигура 18D:** уровни IL-22.

Фигура 19: блокирование интернализации CCR9.

[0032] 243LO0326 ингибировало индуцированную CCL25 интернализацию CCR9.

Фигура 20: выравнивание CCR9A и CCR9B.

5 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0033] Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно специалисту в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. В Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994) и Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) специалист в данной области техники найдет общий словарь многих терминов, используемых в настоящем изобретении.

[0034] Настоящее изобретение не ограничено иллюстративными способами и материалами, раскрытыми в данном документе, и при осуществлении на практике или тестировании вариантов осуществления настоящего изобретения можно использовать любые способы и материалы, сходные с теми, которые описаны в данном документе, или эквивалентные им. Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, любые последовательности нуклеиновой кислоты записываются слева направо в 5'-3'-ориентации; аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от аминоконца к карбоксиконцу соответственно.

[0035] Заголовки, предусмотренные в данном документе, не ограничивают различные аспекты или варианты осуществления настоящего изобретения.

[0036] В данном документе для обозначения аминокислот используются название аминокислоты, трехбуквенное сокращение или однобуквенное сокращение. Используемый в данном документе термин "белок" включает белки, полипептиды и пептиды. Используемый в данном документе термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "полипептид" и/или термина "белок". В некоторых случаях термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "пептид". В некоторых случаях термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "фермент". Термины "белок" и "полипептид" в данном документе используются взаимозаменяемо. В настоящем изобретении и в формуле изобретения могут использоваться традиционные однобуквенные и трехбуквенные коды для аминокислотных остатков. 3-буквенный код для аминокислот определен в соответствии с Объединенной комиссией IUPACIUB по биохимической номенклатуре (JCBN). Также понятно, что

полипептид может кодироваться более чем одной нуклеотидной последовательностью вследствие вырожденности генетического кода.

[0037] На протяжении описания могут встречаться другие определения терминов. Прежде чем будут описаны иллюстративные варианты осуществления более подробно, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления и поэтому они могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена исключительно для описания конкретных вариантов осуществления и не подразумевается в качестве ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения будет определяться исключительно прилагаемой формулой изобретения.

[0038] Если предусмотрен диапазон значений, подразумевается, что также конкретно раскрыто каждое промежуточное значение до десятых долей единицы нижнего предела, если в контексте явно не указано иное, между верхним и нижним пределами данного диапазона. Объемом настоящего изобретения охватывается каждый меньший диапазон между любым заданным значением или промежуточным значением в заданном диапазоне и любым другим заданным или промежуточным значением в данном заданном диапазоне. Верхний и нижний пределы данных меньших диапазонов могут быть независимо включены в диапазон или исключены из него, и каждый диапазон, в который включены один из пределов, ни один из них или оба из них, включен в меньшие диапазоны и также охватывается объемом настоящего изобретения с учетом любого специально исключенного предела в заданном диапазоне. Если заданный диапазон включает один или оба предела, в настоящее изобретение также включены диапазоны, исключаящие любой предел или оба данных включенных предела.

[0039] Следует отметить, что используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают объекты во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Так, например, ссылка на "средство" включает множество таких средств, и ссылка на "данное средство" включает ссылку на одно или несколько средств и их эквивалентов, которые известны специалистам в данной области техники, и так далее.

[0040] "Приблизительно" в целом может означать приемлемую степень погрешности для измеряемого количества с учетом характера или точности измерений. Иллюстративные степени погрешности находятся в пределах 20 процентов (%), как правило, в пределах 10% и более типично в пределах 5% от заданного значения или диапазона значений. Предпочтительно термин "приблизительно" в данном случае

понимается как плюс или минус ($\pm$) 5%, предпочтительно $\pm$ 4%, $\pm$ 3%, $\pm$ 2%, $\pm$ 1%, $\pm$ 0,5%, $\pm$ 0,1% от числового значения числа, с которым он используется.

[0041] Варианты осуществления, описанные в данном документе как "содержащие" один или несколько признаков, также могут считаться как раскрытие соответствующих вариантов осуществления, "состоящих из" и/или "по существу состоящих из" таких признаков.

[0042] Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регуляторным органом федерального правительства, или правительства штата, или перечисленный в Фармакопее США, Европейской Фармакопее или другой общепризнанной Фармакопее для применения у животных, и более конкретно у людей.

[0043] Концентрации, количества, объемы, процентные доли и другие числовые значения могут быть представлены в данном документе в формате диапазона. Также следует понимать, что такой формат диапазона применяют только для удобства и краткости, и его следует интерпретировать свободно, чтобы он включал не только числовые значения, четко упомянутые в качестве пределов диапазона, но также включал все отдельные числовые значения или поддиапазоны, охватываемые таким диапазоном, как если бы каждое числовое значение и поддиапазон явно упоминались.

[0044] Термин "эпитоп" относится к области белка-мишени (например, полипептида), способной связываться со связывающей молекулой по настоящему изобретению (например, быть связанным с его помощью).

[0045] "Аффинность связывания" в целом относится к силе суммы всех нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, "аффинность связывания", как используется в данном документе, относится к внутренней присущей аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y в целом может быть представлена константой диссоциации (KD). Аффинность можно измерить с помощью способов, общеизвестных из уровня техники, в том числе описанных в данном документе. Антитела с низкой аффинностью, как правило, связывают антиген медленно и склонны легко диссоциировать, тогда как антитела с высокой аффинностью, как правило, связываются с антигеном быстрее и склонны дольше оставаться связанными. Из уровня техники известен ряд способов измерения аффинности связывания, любой из которых можно применять для целей настоящего изобретения.

[0046] Активность связывающей молекулы может быть выражена в виде значения IC50. IC50 представляет собой медианную ингибирующую концентрацию связывающей молекулы. В функциональных анализах IC50 представляет собой концентрацию, которая снижает биологический ответ на 50% от его максимума. IC50 можно рассчитать любым из ряда способов, известных из уровня техники.

[0047] Активность связывающей молекулы может быть выражена в виде значения EC50. В функциональных анализах EC50 представляет собой концентрацию, которая индуцирует ответ, соответствующий медиане между ответом на исходном уровне и максимальным ответом после определенного времени воздействия. EC50 можно рассчитать любым из ряда способов, известных из уровня техники.

5.1 Связывающие молекулы

[0048] Настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, которые связываются с CCR9. Хемокиновый рецептор 9, CCR9 (также известный как CDw199 и GPR-9-6), является представителем семейства бета-хемокиновых рецепторов. CCR9 организован в виде 15 доменов, соответствующих N-концевому внеклеточному домену (Nt), семи трансмембранным доменам, трем внутриклеточным доменам, трем внеклеточным доменам и внутриклеточному C-концевому домену (Ct). У людей CCR9 существует в виде двух изоформ – CCR9A и CCR9B. Изоформа A содержит 12 дополнительных N-концевых аминокислот и характеризуется более высокой аффинностью в отношении лиганда CCL25 по сравнению с изоформой B. Сообщается, что изоформы A и B экспрессируются совместно в соотношении 10:1. Описанные ранее антитела к CCR9 91R и 92R связывают только изоформу CCR9A и не связывают CCR9B [4].

[0049] Без ограничения какой-либо теорией наблюдение авторов настоящего изобретения в отношении того, что в кишечнике более высокая доля CCR9-положительных CD4 Т-лимфоцитов совместно экспрессирует провоспалительные цитокины IFN- γ , IL-4 и IL-17 по сравнению с CCR9-отрицательными CD4 Т-лимфоцитами, предполагает, что CCR9 позволяет идентифицировать CD4 Т-лимфоциты, которые вносят вклад в патогенез IBD.

[0050] РНК, ДНК и аминокислотные последовательности CCR9 известны специалистам в данной области техники, и их можно найти во многих базах данных, например в базах данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и UniProt. Примерами таких последовательностей, которые находятся в UniProt, являются P51686-1 для CCR9A человека и P51686-2 для CCR9B человека; Q0H741 для CCR9 яванского макака; Q9WUT7 для CCR9 мыши и Q8CH33 для CCR9 крысы.

[0051] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению связывается с CCR9 человека. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с CCR9A человека и/или CCR9B человека. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с CCR9A человека и связывается с CCR9B человека.

[0052] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с CCR9, полученным от вида млекопитающего, отличного от человека, такого как примата, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с CCR9 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с CCR9 человека и яванского макака, например, связывается с CCR9A человека, и CCR9B человека, и CCR9 яванского макака.

[0053] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула не связывается с CCR9 мыши и/или крысы. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с CCR9 человека и яванского макака, например CCR9A человека, и CCR9B человека, и CCR9 яванского макака, но не связывается с CCR9 мыши или крысы.

[0054] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула селективно (что также взаимозаменяемо обозначается в данном документе как "специфически") связывается с CCR9. Под селективным связыванием следует понимать, что CDR связывающей молекулы вместе связываются с CCR9 без значительной перекрестной реактивности с какой-либо другой молекулой. В частности, связывающая молекула, которая селективно связывается с CCR9 может характеризоваться отсутствием значительной перекрестной реактивности с любым другим цитокиновым рецептором. Связывающая молекула, которая селективно связывается с CCR9, может характеризоваться отсутствием значительной перекрестной реактивности с любым одним, любыми двумя, любыми тремя или всеми четырьмя из CCR5, CCR8, CXCR1 и CXCR2. Например, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула не связывается с CCR5, CCR8, CXCR1 или CXCR2.

[0055] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула, которая селективно связывается с CCR9 человека, например CCR9A человека и/или CCR9B человека, характеризоваться отсутствием значительной перекрестной реактивности с CCR9, полученным от другого вида, например с CCR9 мыши и/или крысы. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула, которая селективно связывается с CCR9 человека, может характеризоваться наличием перекрестной реактивности с близкородственной молекулой CCR9, такой как CCR9 яванского макака, но может

характеризоваться отсутствием значительной перекрестной реактивности с CCR9, который является более отдаленным по родству, таким как CCR9 мыши и/или крысы.

[0056] Перекрестную реактивность можно оценить любым подходящим способом. Например, связывание можно измерить путем анализа связывания связывающей молекулы со сверхэкспрессирующими линиями клеток, экспрессирующими представляющий интерес рецептор. Связывание также можно измерить, например, посредством радиоиммуноанализа (RIA), BIACORE® (с применением рекомбинантного CCR9 в качестве аналита и связывающей молекулы в качестве лиганда или наоборот), KINEXA®, системы ForteBio Octet или других анализов связывания, известных из уровня техники. В качестве неограничивающего примера перекрестную реактивность связывающей молекулы с молекулой, отличной от CCR9, можно считать значительной, если связывающая молекула связывается с другой молекулой с силой, составляющей по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 100% от силы ее связывания с CCR9. Связывающая молекула, которая селективно связывается с CCR9, может связываться с другой молекулой, такой как другой цитокиновый рецептор, например, любой один, два, три или все четыре из CCR5, CCR8, CXCR1 и CXCR2, с силой, составляющей менее 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% или 20% от силы ее связывания с CCR9. Предпочтительно связывающая молекула связывается с другой молекулой с силой, составляющей менее 20%, менее 15%, менее 10% или менее 5%, менее 2% или менее 1% от силы ее связывания с CCR9. В случае использования в данном документе термин "CCR9" предпочтительно представляет собой встречающийся в природе CCR9, такой как CCR9 человека, например, CCR9A человека и/или CCR9B человека.

[0057] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с клеткой, экспрессирующей CCR9. Связывающая молекула может связываться с рецептором CCR9, который присутствует в клеточной мембране клетки. Клетка может представлять собой клетку, которая в природных условиях экспрессирует CCR9, или клетка может быть сконструирована таким образом, чтобы экспрессировать CCR9, например, путем введения нуклеиновой кислоты, кодирующей CCR9, в условиях, обеспечивающих экспрессию CCR9. Клетка может быть сконструирована таким образом, чтобы сверхэкспрессировать CCR9, так, что сконструированная линия клеток экспрессирует более высокие уровни CCR9, чем соответствующая клетка, в отношении которой не применяли конструирования. Клетка может экспрессировать CCR9A человека или CCR9B человека.

[0058] Клетка может представлять собой линию клеток НЕК, сконструированную для экспрессии CCR9, как, например, CCR9A человека и/или CCR9B человека.

[0059] Линия клеток Molt 4 представляет собой линию клеток Т-лимфоцитов человека, полученную от пациента с острым лимфобластным лейкозом, которая естественным образом экспрессирует CCR9 на высоких уровнях. Линию клеток Molt 4 можно получить из ATCC, CRL-1582. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с клеткой Molt 4. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с клеткой Molt 4 путем связывания с CCR9 на поверхности указанной клетки Molt 4 или CCR9, присутствующим в клеточной мембране указанной клетки Molt 4.

[0060] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула не связывается с клеткой, которая не экспрессирует CCR9, например клеткой Jurkat. Линию клеток Jurkat можно получить из ATCC в виде Jurkat, клон E6.1. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с CCR9 (например, CCR9 человека) со значением константы диссоциации (KD), составляющим ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 5 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,5$ нМ, $\leq 0,1$ нМ или ≤ 10 пМ. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с CCR9 (например, CCR9, присутствующим на клетке Molt 4) со значением KD, составляющим от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,45 нМ, от приблизительно 0,025 нМ до приблизительно 0,25 нМ или от приблизительно 0,05 нМ до приблизительно 0,1 нМ. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с CCR9 (например, CCR9, присутствующим на клетке Molt 4) со значением KD, составляющим приблизительно 0,09 нМ.

[0061] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с CCR9 (например, CCR9, присутствующим на клетке Molt 4) со значением KD, составляющим от приблизительно 2 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 2,5 нМ до приблизительно 4 нМ или от приблизительно 3 нМ до приблизительно 3,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с CCR9 (например, CCR9, присутствующим на клетке Molt 4) со значением KD, составляющим приблизительно 3,4 нМ.

[0062] Измерения KD (аффинности связывания) можно проводить посредством любого подходящего анализа, известного из уровня техники. Подходящие анализы включают анализ аффинности, проводимый с помощью системы Ligand Tracer, системы KinExA (например, KinExA 3100, KinExA 3200 или KinExA 4000) (Sapidyne Instruments, Айдахо) или системы ForteBio Octet.

[0063] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула представляет собой антагонист CCR9. Например, связывающая молекула может предупреждать или ингибировать нормальную функцию CCR9. Например, связывающая молекула может

предупреждать или ингибировать миграцию клетки, экспрессирующей CCR9, путем оказания антагонистического воздействия на CCR9, присутствующий на клетке.

[0064] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула ингибирует связывание лиганда с CCR9. Например, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с CCR9 и блокирует или ингибирует связывание лиганда с молекулой CCR9. Это можно оценить с помощью способов, общеизвестных из уровня техники, в том числе описанных в данном документе.

[0065] Связывающая молекула может представлять собой конкурентный ингибитор CCR9. Например, связывающая молекула может конкурировать с лигандом CCR9 за связывание с CCR9. Конкурентное связывание можно оценить с помощью способов, общеизвестных из уровня техники, в том числе описанных в данном документе.

[0066] В некоторых вариантах осуществления лигандом CCR9 является CCL25. CCL25 (также известный как TECK) представляет собой цитокин, принадлежащий к семейству CC-хемокинов. РНК, ДНК и аминокислотные последовательности CCL25 известны специалистам в данной области техники, и их можно найти во многих базах данных, например в базах данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и UniProt. Примерами таких последовательностей, которые находятся в UniProt, являются O15444 для CCL25 человека; O35903 для CCL25 мыши; Q32PX4 для CCL25 крысы и A0A2K5TSD9 и A0A2K5TSC0 для CCL25 яванского макака.

[0067] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула блокирует или ингибирует связывание CCL25 с CCR9. Например, CCL25 может характеризоваться пониженным связыванием с CCR9 в присутствии связывающей молекулы по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула способна связываться с CCR9, присутствующими на поверхности или мембране клетки, и ингибировать связывание CCL25 с CCR9 на клетке.

[0068] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула способна предупреждать или ингибировать миграцию клетки, экспрессирующей CCR9, с которой она связывается. Например, клетка, связанная связывающей молекулой по настоящему изобретению, может мигрировать с меньшей эффективностью в ответ на раздражитель, чем клетка, не связанная связывающей молекулой по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула предупреждает или ингибирует миграцию клетки, экспрессирующей CCR9, в ответ на CCL25. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула способна предупреждать или ингибировать миграцию клетки, экспрессирующей CCR9, от периферии в кишечник субъекта.

[0069] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению способна индуцировать гибель клетки, экспрессирующей CCR9, с которой она связывается. Например, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула способна опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) в отношении клетки, экспрессирующей CCR9, с которой она связывается. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула способна опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) в отношении лимфоцита, экспрессирующего CCR9, с которым она связывается. Используемые в данном документе термины "опосредование антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности" или "опосредование ADCC" означают, что связывающая молекула способна индуцировать ADCC.

[0070] ADCC представляет собой механизм клеточно-опосредованной иммунной защиты, при котором иммунная эффекторная клетка активируется с обеспечением лизиса клетки-мишени, антигены поверхности мембраны которой были связаны связывающими молекулами. Примеры таких иммунных эффекторных клеток включают естественные клетки-киллеры (NK-клетки), макрофаги, нейтрофилы и эозинофилы. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула способна индуцировать активацию такой иммунной эффекторной клетки. Например, связывающая молекула по настоящему изобретению может быть способна индуцировать активацию такой иммунной эффекторной клетки, если связывающая молекула связывается с клеткой, экспрессирующей CCR9.

[0071] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению способна обеспечивать истощение по клеткам, экспрессирующим CCR9, в популяции клеток, содержащей клетки, экспрессирующие CCR9, и иммунные эффекторные клетки.

[0072] Способность связывающей молекулы индуцировать гибель, истощение или опосредовать ADCC у клетки, экспрессирующей CCR9, с которой она связывается, можно определить с применением любого из способов, описанных в данном документе. Например, связывающую молекулу по настоящему изобретению можно инкубировать с PBMC, и процент CD4+CCR9+ клеток, остающихся в конце периода инкубации, можно определить с применением неконкурирующей молекулы, связывающей CCR9. Различные концентрации связывающей молекулы можно использовать для расчета зависящего от концентрации цитолитического эффекта связывающей молекулы. Исходя из этого, можно рассчитать значение EC50 связывающей молекулы. Используемое в данном документе значение EC50 может быть рассчитано на основе цитолиза CD4+CCR9+ клеток

посредством РВМС после связывания связывающей молекулы по настоящему изобретению с CD4+CCR9+ клетками.

[0073] В некоторых вариантах осуществления значение EC50 связывающей молекулы по настоящему изобретению (например, измеренная, как описано в данном документе) составляет менее 100 нМ, например, менее 50 нМ, менее 25 нМ, менее 10 нМ или менее 5 нМ. Значение EC50 может составлять менее 3 нМ, менее 2 нМ, менее 1 нМ, менее 500 пМ или менее 250 пМ. Значение EC50 может составлять от приблизительно 2 пМ до приблизительно 200 пМ, например от приблизительно 3,5 пМ до приблизительно 200 пМ. В некоторых вариантах осуществления значение EC50 составляет от приблизительно 1 пМ до приблизительно 5 нМ, например от приблизительно 4 пМ до приблизительно 3 нМ. В некоторых вариантах осуществления значение EC50 составляет от приблизительно 2 нМ до приблизительно 3 нМ, например от приблизительно 2,5 нМ до приблизительно 3 нМ, например приблизительно 2,6 нМ. В некоторых вариантах осуществления значение EC50 составляет от приблизительно 0,25 нМ до приблизительно 2,5 нМ, например от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 1 нМ, например приблизительно 0,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления значение EC50 составляет от приблизительно 50 пМ до приблизительно 250 пМ, например от приблизительно 150 пМ до приблизительно 250 пМ, например приблизительно 200 пМ. В некоторых вариантах осуществления значение EC50 составляет от приблизительно 3,5 пМ до приблизительно 50 пМ, например от приблизительно 3,5 пМ до приблизительно 25 пМ. В некоторых вариантах осуществления значение EC50 составляет от приблизительно 3,5 пМ до приблизительно 5 пМ или от приблизительно 4 пМ до приблизительно 10 пМ. В некоторых вариантах осуществления значение EC50 составляет от приблизительно 6 пМ до приблизительно 60 пМ, например от приблизительно 25 пМ до приблизительно 60 пМ, предпочтительно от приблизительно 25 пМ до приблизительно 35 пМ, например приблизительно 30 пМ.

[0074] В некоторых вариантах осуществления, если связывающая молекула связана с CCR9 человека, то значение EC50 составляет от приблизительно 3,5 пМ до приблизительно 10 пМ, например от приблизительно 4 пМ до приблизительно 5 пМ. В некоторых вариантах осуществления, если связывающая молекула связана с CCR9 яванского макака, значение EC50 составляет от приблизительно 6 пМ до приблизительно 60 пМ, например от приблизительно 25 пМ до приблизительно 60 пМ, предпочтительно от приблизительно 25 пМ до приблизительно 35 пМ, например приблизительно 30 пМ.

[0075] Для того чтобы инициировать ADCC, связывающие молекулы могут перекрестно связывать иммунную эффекторную клетку с клеткой, экспрессирующей CCR9.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы по настоящему изобретения способны перекрестно связывать иммунную эффекторную клетку с клеткой, экспрессирующей CCR9. Например, связывающие молекулы могут быть способны перекрестно связывать иммунную эффекторную клетку с клеткой, экспрессирующей CCR9, путем связывания Fc-рецептора на иммунной эффекторной клетке. Существует ряд Fc-рецепторов, являющихся специфичными в отношении антител различных классов, включая IgG (гамма-рецепторы), IgE (эта-рецепторы), IgA (альфа-рецепторы) и IgM (мю-рецепторы). Следовательно, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула способна связываться с Fc-рецептором. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула способна связываться с Fc γ R, таким как рецептор, выбранный из Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa и Fc γ RIIIb. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула способна связываться с Fc γ RIIIa. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула способна связываться с Fc-рецептором, присутствующим на иммунной эффекторной клетке.

[0076] Связывающие молекулы могут быть связаны Fc-рецептором на иммунной эффекторной клетке посредством Fc-домена, присутствующего в связывающей молекуле. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит область, которая способна связываться с Fc-рецептором, таким как Fc-рецептор, определенный выше. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит Fc-домен иммуноглобулина или его фрагмент, который сохраняет способность связываться с одним или несколькими Fc-рецепторами, такими как один или несколько Fc-рецепторов, определенных выше. Используемый в данном документе термин "Fc-домен" относится к части одиночной тяжелой цепи иммуноглобулина, которая берет начало в шарнирной области и заканчивается на С-конце антитела. Соответственно, полный Fc-домен может содержать по меньшей мере часть шарнирного домена (например, верхнюю, среднюю и/или нижнюю шарнирную область) CH2 домена и CH3 домена. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит гомодимер Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит область, которая связывается с CCR9, и дополнительно содержит такой Fc-домен иммуноглобулина или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула представляет собой молекулу иммуноглобулина или ее фрагмент, которые содержат антигенсвязывающую область, которая связывает CCR9, и Fc-связывающую область, которая связывается с одним или несколькими Fc-рецепторами, определенными выше.

[0077] В некоторых вариантах осуществления Fc-связывающая область, Fc-домен иммуноглобулина или его фрагмент представляют собой Fc-домен IgG или его фрагмент, такой как Fc-домен IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления Fc-связывающая область, Fc-домен иммуноглобулина или его фрагмент представляют собой Fc-домен IgG1 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления Fc-связывающая область, Fc-домен иммуноглобулина или его фрагмент представляют собой Fc-домен иммуноглобулина человека или его фрагмент, такой как Fc-домен IgG1 человека или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит Fc-домен иммуноглобулина, характеризующийся аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 78. Например, в некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит аминокислоты 111-330 из последовательности под SEQ ID NO: 78.

[0078] Связывание связывающей молекулы по настоящему изобретению с Fc-рецептором на иммунной эффекторной клетке может привести к перекрестному связыванию иммунной эффекторной клетки с клеткой, с которой связана антигенсвязывающая часть связывающей молекулы. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению способна индуцировать активацию иммунных эффекторных клеток. В некоторых вариантах осуществления перекрестное связывание иммунной эффекторной клетки с клеткой, экспрессирующей CCR9, посредством связывающей молекулы обеспечивает активацию ADCC у эффекторной клетки.

[0079] Активацию иммунных эффекторных клеток можно оценить с помощью способов, описанных в данном документе, таких как биологический анализ ADCC *in vitro*. Вкратце, иммунные эффекторные клетки можно модифицировать таким образом, чтобы они экспрессировали репортерный ген, такой как репортерный ген люциферазы, который выступает в качестве заменителя эффекторной функции. Иммунные эффекторные клетки, содержащие такой репортер, добавляют к клеткам-мишеням, которые предварительно инкубировали со связывающей молекулой. После инкубации эффекторных клеток и клеток-мишеней количественно определяют функцию репортерного гена (например, люминесценцию). Таким образом, такой способ можно использовать для идентификации связывающей молекулы, которая способна активировать иммунную эффекторную клетку. Например, если анализ предназначен для оценки эффективности связывающей молекулы в отношении активации иммунных эффекторных клеток, клетка-мишень может представлять собой клетку, которая, как известно, экспрессирует CCR9. Такой способ можно использовать для идентификации клетки-мишени, которая экспрессирует CCR9. Например,

если анализ предназначен для оценки того, экспрессирует ли клетка-мишень CCR9, то связывающая молекула представлять собой связывающую молекулу, которая, как известно, связывается с CCR9, такую как связывающая молекула по настоящему изобретению.

[0080] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению характеризуется способностью активировать NK-клетки, составляющей ≤ 5 нМ, например ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ или $\leq 0,5$ нМ, как определено с использованием линии клеток НЕК, экспрессирующей CCR9A. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению характеризуется способностью активировать NK-клетки, составляющей 0,8 нМ, как определено с использованием линии клеток Molt 4. В некоторых вариантах осуществления активация антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности эффекторной клеткой вызывает лизис клетки, экспрессирующей CCR9.

[0081] Для того чтобы связывающая молекула считалась способной опосредовать ADCC в отношении клетки, экспрессирующей CCR9, с которой она связывается, связывающая молекула должна характеризоваться способностью активировать иммунные эффекторные клетки, как, например, способностью активировать NK-клетки, составляющей ≤ 20 нМ при определении с применением линии клеток Molt 4, или ≤ 30 нМ при определении с применением линии клеток НЕК, экспрессирующей CCR9A, и/или значением EC50 для уничтожения РВМС, составляющим ≤ 3 нМ.

[0082] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению предусматривает измененные эффекторные функции, которые в свою очередь влияют на биологический профиль связывающей молекулы. Например, изменение профиля гликозилирования домена константной области молекулы иммуноглобулина может обеспечивать повышение уровня связывания Fc-рецептора модифицированной связывающей молекулы. В других случаях модификации константной области, соответствующие настоящему изобретению, могут обеспечивать ослабление связывания комплемента. Еще можно применять другие модификации константной области, обеспечивающие устранение дисульфидных связей или олигосахаридных фрагментов, что обеспечивает усиление локализации благодаря повышенной специфичности в отношении антигена или гибкости антитела. Сходным образом, модификации константной области в соответствии с настоящим изобретением можно без труда осуществлять с применением хорошо известных методик биохимической или молекулярной инженерии, которые находятся вполне в пределах компетенции специалиста в данной области техники.

[0083] Следовательно, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению может характеризоваться усиленными эффекторными функциями, что увеличивает способность связывающей молекулы взаимодействовать с иммунной эффекторной клеткой, как, например, увеличивает способность связывающей молекулы перекрестно связывать иммунную эффекторную клетку с клеткой, экспрессирующей CCR9, которая связана связывающей молекулой, или что увеличивает способность связывающей молекулы индуцировать ADCC. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен иммуноглобулина связывающей молекулы, предусмотренной в данном документе, является модифицированным по сравнению с соответствующим Fc-доменом дикого типа, где указанная модификация приводит к повышенной аффинности к одному или нескольким Fc-рецепторам, предпочтительно одному или нескольким Fcγ-рецепторам. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен иммуноглобулина модифицирован по сравнению с соответствующим Fc-доменом дикого типа, при этом указанная модификация приводит к усиленному ответу в виде антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности.

[0084] Можно получить связывающую молекулу, которая характеризуется измененным типом гликозилирования, такую как афукозилированная/гипофукозилированная связывающая молекула, содержащая сниженные количества фукозильных остатков, или связывающая молекула, характеризующаяся повышенным содержанием структур с GlcNac в точках ветвления. Было продемонстрировано, что такие измененные профили гликозилирования повышают способность связывающих молекул к ADCC. Такие модификации могут быть выполнены любыми известными из уровня техники способами, такими как те, что описаны в разделе "Примеры" в данном документе.

[0085] Следовательно, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула, предусмотренная в данном документе, может быть афукозилирована. Связывающая молекула может не содержать фукозу. Связывающая молекула может содержать по меньшей мере один N-связанный гликан, в котором отсутствует центральное сахарное звено, представляющее собой фукозу.

[0086] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула афукозилирована в положении 297 согласно EU, также обозначаемом в данном документе как положение N297 (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63(1): 78-85). То есть N-связанный гликан в положении N297 может отсутствовать, может не содержать фукозу или может не содержать центральное сахарное звено, представляющее собой фукозу. N-связанный гликан в положении аминокислоты N297 соответствует положению N180 в

последовательности под SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит последовательность под SEQ ID NO: 78, где N180 из последовательности под SEQ ID NO: 78 является афукозилированным. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит Fc-домен, содержащий аминокислоты 111-330 из последовательности под SEQ ID NO: 78, где N180 из последовательности под SEQ ID NO: 78 является афукозилированным.

[0087] Как описано в данном документе, связывающая молекула может содержать Fc-домен или его фрагмент, такие как Fc-домен hIgG1 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит афукозилированный Fc-домен или его фрагмент, такие как афукозилированный Fc-домен hIgG1 или его фрагмент. Любой из Fc-доменов или фрагментов Fc-доменов, описанных в данном документе, может присутствовать в афукозилированной форме. Fc-домен или фрагмент может не содержать фукозу. По меньшей мере один N-связанный гликан Fc-домена или фрагмента может не содержать центральное сахарное звено, представляющее собой фукозу. Fc-домен или фрагмент может являться афукозилированным в положении 297 согласно EU. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит афукозилированный Fc-домен, содержащий аминокислоты 111-330 из последовательности под SEQ ID NO: 78. Например, связывающая молекула может содержать афукозилированный Fc-домен, содержащий аминокислоты 111-330 из последовательности под SEQ ID NO: 78, где N180 из последовательности под SEQ ID NO: 78 является афукозилированным. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит афукозилированный Fc-домен и неафукозилированный Fc-домен. Например, связывающая молекула может содержать афукозилированный Fc-домен, содержащий аминокислоты 111-330 из последовательности под SEQ ID NO: 78, где N180 из последовательности под SEQ ID NO: 78 является афукозилированным, и неафукозилированный Fc-домен, содержащий аминокислоты 111-330 из последовательности под SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула является полностью афукозилированной. Например, все N-связанные гликаны связывающей молекулы могут являться афукозилированными. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен связывающей молекулы является полностью афукозилированным. Например, все N-связанные гликаны Fc-домена могут являться афукозилированными.

[0088] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула присутствует в композиции, содержащей множество копий указанной связывающей молекулы, где по меньшей мере 50%, 75%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% копий связывающей молекулы в композиции являются афукозилированными, например, не содержат фукозу, не содержат

центральное сахарное звено, представляющее собой фукозу, в по меньшей мере одном N-связанном гликане, или являются афукозилированными в положении 297 согласно EU, как описано в данном документе. В такой композиции связывающая молекула характеризуется аминокислотной последовательностью, раскрытой в данном документе, но копии связывающей молекулы в композиции могут различаться по профилю гликозилирования, например, некоторые копии могут содержать фукозу, а некоторые копии могут не содержать фукозу, например, не содержать центральное сахарное звено, представляющее собой фукозу, в по меньшей мере одном N-связанном гликане, или могут являться афукозилированными в положении 297 согласно EU, как описано в данном документе.

[0089] В любом из вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, клетка, экспрессирующая CCR9, представляет собой оседлую клетку кишечника. В любом из вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, клетка, экспрессирующая CCR9, представляет собой клетку периферической крови. В любом из вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, клетка, экспрессирующая CCR9, экспрессирует CD4, CD8, CD20, CD19, CD69 и/или CD103. В любом из вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, клетка, экспрессирующая CCR9, экспрессирует GM-CSF, IL-22, TNF α , IL-6, IFN γ , IL-4 и/или IL-17. Например, клетка, экспрессирующая CCR9, может экспрессировать IFN γ , IL-4 и/или IL-17. В любом из вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, клетка, экспрессирующая CCR9, представляет собой лимфоцит, например лимфоцит кишечника или лимфоцит периферической крови. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой Т-лимфоцит, такой как CD4⁺ Т-лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой В-лимфоцит.

[0090] В любом из вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, иммунная эффекторная клетка представляет собой NK-клетку, макрофаг, нейтрофил, эозинофил или их комбинацию. В любом из вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, иммунная эффекторная клетка представляет собой NK-клетку.

[0091] Связывающая молекула по настоящему изобретению может характеризоваться любой одной или несколькими функциональными характеристиками, указанными выше. Дополнительно или в качестве альтернативы она может характеризоваться любой одной или несколькими структурными (например, последовательностью) характеристиками, как изложено ниже.

[0092] На **фигуре 3** и **фигуре 4** проиллюстрированы последовательности приведенных в качестве примера связывающих молекул по настоящему изобретению. Связывающие молекулы, проиллюстрированные на **фигуре 3** и **фигуре 4**, представляют

собой антитела, где антитела содержат последовательность области переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL), как проиллюстрировано на этих фигурах. Связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать VH и VL любого антитела, проиллюстрированного на **фигуре 3** или **фигуре 4**. Связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать VH и VL любого антитела, проиллюстрированного на **фигуре 4**.

[0093] В **таблице 3** представлены аминокислотные последовательности областей VH и VL, а в **таблице 4** представлены последовательности CDR иллюстративных связывающих молекул по настоящему изобретению. Связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать VH и VL любой связывающей молекулы, проиллюстрированной в **таблице 3**. Связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать набор из шести CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3) любой связывающей молекулы, проиллюстрированной в **таблице 4**.

[0094] Связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать последовательности CDR любого антитела, как показано на **фигуре 3** или **фигуре 4**. Например, связывающая молекула может содержать все шесть из последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано для любого из антител, проиллюстрированных на **фигуре 3** или **фигуре 4**. Связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать последовательности CDR любого антитела, как показано на **фигуре 4**. Например, связывающая молекула может содержать все шесть из последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано для любого из антител, проиллюстрированных на **фигуре 4**. Связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать набор из шести CDR, как проиллюстрировано в **таблице 4**. Например, связывающая молекула может содержать все шесть из последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано для любого из антител, проиллюстрированных в **таблице 4**.

[0095] Связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую набор CDR из HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую набор CDR из LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Таким образом, связывающая молекула может содержать переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, как указано для любого из антител, проиллюстрированных на **фигуре 3** или **фигуре 4**, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано для того же антитела, проиллюстрированного на **фигуре 3** или **фигуре 4**. Связывающая молекула может содержать переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит HCDR1,

HCDR2, HCDR3, как указано для любого из антител, проиллюстрированных на **фигуре 4**, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано для того же антитела, проиллюстрированного на **фигуре 4**. Связывающая молекула может содержать переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, как указано для любого из антител, проиллюстрированных в **таблице 4**, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано для того же антитела, проиллюстрированного в **таблице 4**.

[0096] Например, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит:

- a) HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2, HCDR3 под SEQ ID NO: 3, LCDR1 под SEQ ID NO: 4, LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 6, где X_1 и X_2 из последовательности под SEQ ID NO: 4 представляют собой любую аминокислоту;
- b) HCDR1 под SEQ ID NO: 7, HCDR2 под SEQ ID NO: 8, HCDR3 под SEQ ID NO: 9, LCDR1 под SEQ ID NO: 10, LCDR2 под SEQ ID NO: 11 и LCDR3 под SEQ ID NO: 12; или
- c) HCDR1 под SEQ ID NO: 13, HCDR2 под SEQ ID NO: 14, HCDR3 под SEQ ID NO: 15, LCDR1 под SEQ ID NO: 16, LCDR2 под SEQ ID NO: 17 и LCDR3 под SEQ ID NO: 18.

[0097] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит:

- a) VH-область, содержащую HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 3, и VL-область, содержащую LCDR1 под SEQ ID NO: 4, LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 6, где X_1 и X_2 из последовательности под SEQ ID NO: 4 представляют собой любую аминокислоту;
- b) VH-область, содержащую HCDR1 под SEQ ID NO: 7, HCDR2 под SEQ ID NO: 8 и HCDR3 под SEQ ID NO: 9, и VL-область, содержащую LCDR1 под SEQ ID NO: 10, LCDR2 под SEQ ID NO: 11 и LCDR3 под SEQ ID NO: 12; или
- c) VH-область, содержащую HCDR1 под SEQ ID NO: 13, HCDR2 под SEQ ID NO: 14 и HCDR3 под SEQ ID NO: 15, и VL-область, содержащую LCDR1 под SEQ ID NO: 16, LCDR2 под SEQ ID NO: 17 и LCDR3 под SEQ ID NO: 18.

[0098] Связывающая молекула может содержать HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2, HCDR3 под SEQ ID NO: 3, LCDR2 под SEQ ID NO: 5, LCDR3 под SEQ ID NO: 6 и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей под (a) SEQ ID NO: 4; (b) SEQ ID NO: 19; (c) SEQ ID NO: 20; (d) SEQ ID NO: 21; и (e) SEQ ID NO: 22, где X_1 и X_2 из последовательности под SEQ ID NO: 4

представляют собой любую аминокислоту, и где X_1 из последовательности под SEQ ID NO: 19 представляет собой Р или S, и X_2 из последовательности под SEQ ID NO: 19 представляет собой R, T или G. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит:

- a) HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2, HCDR3 под SEQ ID NO: 3, LCDR1 под SEQ ID NO: 4, LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 6, где X_1 и X_2 из последовательности под SEQ ID NO: 4 представляют собой любую аминокислоту;
- b) HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2, HCDR3 под SEQ ID NO: 3, LCDR1 под SEQ ID NO: 19, LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 6, где X_1 из последовательности под SEQ ID NO: 19 представляет собой Р или S, и X_2 из последовательности под SEQ ID NO: 19 представляет собой R, T или G;
- c) HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2, HCDR3 под SEQ ID NO: 3, LCDR1 под SEQ ID NO: 20, LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 6;
- d) HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2, HCDR3 под SEQ ID NO: 3, LCDR1 под SEQ ID NO: 21, LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 6; или
- e) HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2, HCDR3 под SEQ ID NO: 3, LCDR1 под SEQ ID NO: 22, LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 6.

[0099] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит:

- a) VH-область, содержащую HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 3, и VL-область, содержащую LCDR1 под SEQ ID NO: 4, LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 6, где X_1 и X_2 из последовательности под SEQ ID NO: 4 представляют собой любую аминокислоту;
- b) VH-область, содержащую HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 3, и VL-область, содержащую LCDR1 под SEQ ID NO: 19, LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 6, где X_1 из последовательности под SEQ ID NO: 19 представляет собой Р или S, и X_2 из последовательности под SEQ ID NO: 19 представляет собой R, T или G;
- c) VH-область, содержащую HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 3, и VL-область, содержащую LCDR1 под SEQ ID NO: 20, LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 6;
- d) VH-область, содержащую HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 3, и VL-область, содержащую LCDR1 под SEQ ID NO: 21, LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 6; или

- е) VH-область, содержащую HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 3, и VL-область, содержащую LCDR1 под SEQ ID NO: 22, LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 6.

[0100] Настоящее изобретение охватывает связывающие молекулы, определенные в данном документе, содержащие приведенные последовательности CDR (эталонные связывающие молекулы), а также их функциональные варианты. Функциональный вариант связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонная связывающая молекула, и предпочтительно проявляет такой же профиль перекрестной реактивности в отношении антигена, что и эталонная связывающая молекула. Например, функциональный вариант может связываться с теми же встречающимися в природе формами CCR9, что и эталонная связывающая молекула, например, связываться с той же подгруппой молекул из следующего списка: CCR9A человека, CCR9B человека, CCR9 яванского макака, CCR9 крысы и CCR9 мыши. Функциональные варианты могут характеризоваться отличающейся аффинностью к антигену-мишени по сравнению с эталонной связывающей молекулой, но предпочтительной является по сути такая же аффинность.

[0101] В некоторых вариантах осуществления функциональные варианты эталонной связывающей молекулы демонстрируют изменение последовательности в одной или нескольких CDR по сравнению с соответствующими эталонными последовательностями CDR. Таким образом, функциональный вариант связывающей молекулы может предусматривать функциональный вариант CDR. Если термин "функциональный вариант" используется в контексте последовательности CDR, то это означает, что данная CDR характеризуется наличием 1, 2 или 3 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR и в сочетании с оставшимися 5 CDR (или их вариантами) обеспечивает возможность связывания вариантной связывающей молекулы с тем же антигеном-мишенью, что и эталонная связывающая молекула, и предпочтительно проявляет такой же профиль перекрестной реактивности в отношении антигена, что и эталонная связывающая молекула.

[0102] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит: CDR1 легкой цепи, характеризующуюся наличием 1, 2 или 3 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; CDR2 легкой цепи, характеризующуюся наличием 1, 2 или 3 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; CDR3 легкой цепи, характеризующуюся наличием 1, 2 или 3 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; CDR1 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием 1, 2 или 3 аминокислотных различий по сравнению с

соответствующей эталонной последовательностью CDR; CDR2 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием 1, 2 или 3 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; и CDR3 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием 1, 2 или 3 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; где связывающая молекула связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонная связывающая молекула, и предпочтительно проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена, что и эталонная связывающая молекула.

[0103] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит: CDR1 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; CDR2 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; CDR3 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; CDR1 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; CDR2 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; и CDR3 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; где связывающая молекула связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонная связывающая молекула, и предпочтительно проявляет такой же профиль перекрестной реактивности в отношении антигена, что и эталонная связывающая молекула. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит CDR1 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR.

[0104] Связывающая молекула может содержать: CDR1 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; CDR2 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; CDR3 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; CDR1 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с

соответствующей эталонной последовательностью CDR; CDR2 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; и CDR3 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR; где связывающая молекула связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонная связывающая молекула, и предпочтительно проявляет такой же профиль перекрестной реактивности в отношении антигена, что и эталонная связывающая молекула.

[0105] В некоторых вариантах осуществления вариантная связывающая молекула может характеризоваться наличием в общей сложности не более чем 5, 4 или 3 аминокислотных различий в ее CDR по сравнению с соответствующей эталонной связывающей молекулой при условии, что имеется не более 3, не более 2 или не более 1 аминокислотного различия на CDR. Предпочтительно, вариантная связывающая молекула характеризуется наличием в общей сложности не более чем 2 (более предпочтительно не более чем 1) аминокислотных различий в ее CDR по сравнению с соответствующей эталонной связывающей молекулой при условии, что имеется не более 2 аминокислотных различий на CDR. Более предпочтительно, вариантная связывающая молекула характеризуется наличием в общей сложности не более чем 2 (более предпочтительно не более чем 1) аминокислотных различий в ее CDR по сравнению с соответствующей эталонной связывающей молекулой при условии, что имеется не более 1 аминокислотного различия на CDR.

[0106] Например, такая связывающая молекула может содержать все шесть из последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 эталонной связывающей молекулы (например, любое из антител, проиллюстрированных на **фигуре 3**, или **фигуре 4**, или в **таблице 3**), где любая одна или несколько из указанных последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат 1, 2 или 3 изменения аминокислот по сравнению с соответствующими последовательностями CDR эталонной связывающей молекулы. Связывающая молекула может содержать все шесть из последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 эталонной связывающей молекулы (например, любое из антител, проиллюстрированных на **фигуре 3** или **фигуре 4**), за исключением наличия 1, 2 или 3 изменений аминокислот, например, замен в любой из указанных последовательностей CDR. Связывающая молекула может содержать 1, 2 или 3 изменения аминокислот, например замены, в любой одной или нескольких из указанных CDR легкой цепи и/или в любой одной или нескольких из указанных CDR тяжелой цепи. Связывающая молекула может содержать 1, 2 или 3

изменения аминокислот, например замены, в любой одной или нескольких из HCDR1, HCDR2, LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Связывающая молекула может содержать 1, 2 или 3 изменения аминокислот, например замены, в LCDR1.

[0107] Вышеизложенное можно применять в отношении любого из антител, проиллюстрированных на **фигуре 3**, или **фигуре 4**, или в **таблице 4**, или в отношении любой из связывающих молекул, описанных в данном документе, где аминокислотные различия определены относительно их последовательностей CDR, и где вариантная связывающая молекула связывается с тем же антигеном-мишенью, что и указанные связывающие молекулы, и предпочтительно проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена. Таким образом, эталонная связывающая молекула в любом из вариантов осуществления в данном документе может представлять собой антитело, содержащее последовательности VH и VL любого из антител, проиллюстрированных на **фигуре 3** или **фигуре 4**, или связывающих молекул из **таблицы 3**, или антитело, содержащее набор из шести CDR любого из антител, проиллюстрированных на **фигуре 3**, или **фигуре 4**, или в **таблице 4**.

[0108] Аминокислотное различие может представлять собой аминокислотную замену, вставку или делецию. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное различие представляет собой консервативную аминокислотную замену, описанную в данном документе.

[0109] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит все шесть из последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, указанных для любого из антител, проиллюстрированных на **фигуре 3**, или **фигуре 4**, или в **таблице 4**, или как указано выше, или функциональный вариант любого из них. Например, такая связывающая молекула может содержать все шесть из последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, указанных для любого из антител, проиллюстрированных на **фигуре 3**, или **фигуре 4**, или в **таблице 4**, или как указано выше, где любая одна или несколько из указанных последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат 1, 2 или 3 изменения аминокислот, например замены, по сравнению с соответствующими последовательностями, указанными на **фигуре 3**, или **фигуре 4**, или в **таблице 4**, или выше. Связывающая молекула может содержать все шесть из последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано для любого из антител, проиллюстрированных на **фигуре 3** или **фигуре 4**, или связывающих молекул из **таблицы 3**, или как указано выше, за исключением наличия 1, 2 или 3 изменений аминокислот, например замен, в любой из указанных последовательностей CDR. Связывающая молекула

может содержать 1, 2 или 3 изменения аминокислот, например замены, в любой одной или нескольких из указанных CDR легкой цепи и/или в любой одной или нескольких из указанных CDR тяжелой цепи. Связывающая молекула может содержать 1, 2 или 3 изменения аминокислот, например замены, в любой одной или нескольких из HCDR1, HCDR2, LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Связывающая молекула может содержать 1, 2 или 3 изменения аминокислот, например замены, в LCDR1.

[0110] Связывающая молекула по настоящему изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL) любого антитела, показанного на **фигуре 3** или **фигуре 4**, или связывающей молекулы из **таблицы 3**.

[0111] Например, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит:

- a) аминокислотную последовательность VH-области, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 51, и аминокислотную последовательность VL-области, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 52;
- b) аминокислотную последовательность VH-области, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 51, и аминокислотную последовательность VL-области, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 53;
- c) аминокислотную последовательность VH-области, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 51, и аминокислотную последовательность VL-области, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 54;
- d) аминокислотную последовательность VH-области, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 51, и аминокислотную последовательность VL-области, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 55 (DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHX₁NX₂NTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVFFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIK, где (a) каждый из X₁ и X₂ представляет собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 76); или (b) X₁ представляет собой P или S, и X₂ представляет собой R, T или G (SEQ ID NO: 77)); или
- e) аминокислотную последовательность VH-области, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 56, и аминокислотную последовательность VL-области, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 57.

[0112] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит:

- a) аминокислотную последовательность VH-области, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 58, и аминокислотную последовательность VL-области, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 59; или
- b) аминокислотную последовательность VH-области, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 60, и аминокислотную последовательность VL-области, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 61.

[0113] Настоящее изобретение охватывает связывающие молекулы, описанные в данном документе, содержащие указанные последовательности VH- и VL-областей (эталонные связывающие молекулы), а также их функциональные варианты. Функциональный вариант связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонная связывающая молекула, и предпочтительно проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена, что и эталонная связывающая молекула. Функциональные варианты могут характеризоваться отличающейся аффинностью в отношении антигена-мишени по сравнению с эталонной связывающей молекулой, но предпочтительной является по сути такая же аффинность.

[0114] Последовательность VH-области связывающей молекулы может характеризоваться по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности соответствующей последовательности VH-области эталонной связывающей молекулы. Последовательность VL-области связывающей молекулы может характеризоваться по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности соответствующей последовательности VL-области эталонной связывающей молекулы.

[0115] В некоторых вариантах осуществления CDR такой связывающей молекулы идентичны CDR эталонной связывающей молекулы, и все отличия лежат за пределами этих CDR, например, отличия между связывающей молекулой и эталонной связывающей молекулой находятся в каркасных областях последовательностей VH и/или VL.

[0116] В некоторых вариантах осуществления CDR такой связывающей молекулы представляют собой функциональные варианты, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления такая связывающая молекула содержит аминокислотные различия в одной или нескольких CDR и аминокислотные различия в одной или нескольких каркасных областях по сравнению с последовательностями VH и/или VL соответствующей эталонной связывающей молекулы.

[0117] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит те же каркасные последовательности, что и эталонные связывающие молекулы. В другом варианте осуществления связывающая молекула содержит каркасную область, характеризующуюся наличием не более чем 2, предпочтительно не более чем 1 аминокислотного различия (по сравнению с соответствующей эталонной каркасной последовательностью). Таким образом, каждая каркасная область может характеризоваться наличием не более чем 2, предпочтительно не более чем 1 аминокислотного различия (по сравнению с соответствующей эталонной каркасной последовательностью).

[0118] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула может характеризоваться наличием в общей сложности не более чем 5, 4 или 3 аминокислотных различий в ее каркасных областях по сравнению с соответствующей эталонной связывающей молекулой при условии, что имеется не более чем 2 (предпочтительно не более чем 1) аминокислотных различия на каркасную область. Такая связывающая молекула может характеризоваться наличием в общей сложности не более чем 2 (более предпочтительно не более чем 1) аминокислотных различий в ее каркасных областях по сравнению с соответствующей эталонной связывающей молекулой при условии, что имеется не более чем 2 аминокислотных различия на каркасную область. Такая связывающая молекула может характеризоваться наличием в общей сложности не более чем 2 (более предпочтительно не более чем 1) аминокислотных различий в ее каркасных областях по сравнению с соответствующей эталонной связывающей молекулой при условии, что имеется не более чем 1 аминокислотное различие на каркасную область.

[0119] Таким образом, связывающая молекула может содержать VH-область и VL-область, как описано в данном документе, где VH-область характеризуется наличием не более чем 14 аминокислотных различий (не более чем 2 аминокислотных различий в каждой CDR и не более чем 2 аминокислотных различий в каждой каркасной области) по сравнению с VH-областью эталонной связывающей молекулы в данном документе; и VL-область характеризуется наличием не более чем 14 аминокислотных различий (не более чем 2 аминокислотных различий в каждой CDR и не более чем 2 аминокислотных различий в каждой каркасной области) по сравнению с VL-областью эталонной связывающей молекулы в данном документе; где вариантная связывающая молекула связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонная связывающая молекула, и предпочтительно проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена, что и эталонная связывающая молекула.

[0120] Указанные вариантные VH- или VL-области могут называться "функциональными эквивалентами" эталонных VH- или VL-областей.

[0121] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула может содержать VH-область и VL-область, описанные в данном документе, где VH-область характеризуется наличием не более чем 7 аминокислотных различий (например, не более чем 1 аминокислотного различия в каждой CDR и не более чем 1 аминокислотного различия в каждой каркасной области) по сравнению с VH-областью эталонной связывающей молекулы в данном документе; и VL-область характеризуется наличием не более чем 7 аминокислотных различий (например, не более чем 1 аминокислотного различия в каждой CDR и не более чем 1 аминокислотного различия в каждой каркасной области) по сравнению с VL-областью эталонной связывающей молекулы в данном документе; где вариантная связывающая молекула связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонная связывающая молекула, и предпочтительно проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена, что и эталонная связывающая молекула.

[0122] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит:

- a) VH-область, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней; и
- b) VL-область, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 55, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней, где (i) каждый из X_1 и X_2 из последовательности под SEQ ID NO: 55 представляет собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 76); или (ii) X_1 из последовательности под SEQ ID NO: 55 представляет собой P или S, и X_2 из последовательности под SEQ ID NO: 55 представляет собой R, T или G (SEQ ID NO: 77).

[0123] Например, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит:

- a) VH-область, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней; и
- b) VL-область, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 76, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

[0124] Например, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит:

- a) VH-область, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 58, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней; и
- b) VL-область, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

[0129] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит:

- a) VH-область, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней; и
- b) VL-область, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

[0130] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит:

- a) VH-область, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 51, 56, 58, 60, или ее функциональный вариант; и
- b) VL-область, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 57, 59, 61, или ее функциональный вариант, где (i) каждый из X1 и X2 из последовательности под SEQ ID NO: 55 представляет собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 76); или (ii) X1 из последовательности под SEQ ID NO: 55 представляет собой P или S, и X2 из последовательности под SEQ ID NO: 55 представляет собой R, T или G (SEQ ID NO: 77).

[0131] Вышеизложенное можно применять в отношении любого из антител, проиллюстрированных на **фигуре 3** или **фигуре 4**, или связывающих молекул из **таблицы 3**, или любой из связывающих молекул, описанных в данном документе, где аминокислотные различия определены относительно их последовательностей VH и/или VL, и где связывающая молекула связывается с тем же антигеном-мишенью, что и указанные связывающие молекулы, и предпочтительно проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена. Таким образом, эталонная связывающая молекула в

любом из вариантов осуществления в данном документе может представлять собой антитело, содержащее последовательность VH и VL любого из антител, проиллюстрированных на **фигуре 3** или **фигуре 4**, или связывающих молекул из **таблицы 3**.

[0132] Аминокислотное различие может представлять собой аминокислотную замену, вставку или делецию. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное различие представляет собой консервативную аминокислотную замену, описанную в данном документе.

[0133] Связывающая молекула по настоящему изобретению может быть представлена в выделенной форме.

[0134] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой молекулу иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0135] В частности, антитело представляет собой белок, содержащий по меньшей мере одну или две переменные области тяжелой (H) цепи (что сокращается в данном документе как VH), и по меньшей мере одну или две переменные области легкой (L) цепи (что сокращается в данном документе как VL). Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые термином "определяющие комплементарность области" ("CDR"), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми термином "каркасные области" (FW). Границы каркасных областей и CDR были точно определены (см. Kabat, E.A., et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991 и Chothia, C. et al, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987). Предпочтительно каждая VH- и VL-область состоит из трех CDR и четырех FW, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4.

[0136] Тяжелая или легкая цепь антитела могут дополнительно содержать всю или часть константной области тяжелой или легкой цепей. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит всю или часть константной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 78 и всю или часть константной области легкой цепи под SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, показанные в **таблице 7**. Связывающая молекула может содержать функциональный фрагмент константной области тяжелой цепи и/или константной области легкой цепи, показанных в **таблице 7**, такой как фрагмент, где связывающая молекула сохраняет способность

связываться с одним или несколькими Fc-рецепторами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула может содержать константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, показанные в **таблице 7**, и может дополнительно содержать VH-область и VL-область, раскрытые в данном документе, например, последовательности VH и VL любого из антител, проиллюстрированных на **фигуре 3** или **фигуре 4**, или связывающих молекул из **таблицы 1**. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула представляет собой антитело, являющееся тетрамером из двух тяжелых цепей иммуноглобулина и двух легких цепей иммуноглобулина, где тяжелая и легкая цепи иммуноглобулина взаимно соединены, например, дисульфидными связями. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит константную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 78. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит константную область легкой цепи под SEQ ID NO: 79. Варибельная область тяжелой и легкой цепей содержит связывающий домен, который взаимодействует с антигеном.

[0137] Обычно при обозначении остатка в варибельной области (примерно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) применяют "систему нумерации по Kabat" (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[0138] Нумерация положений аминокислот согласно Kabat относится к системе нумерации, применяемой к варибельным доменам тяжелой цепи или варибельным доменам легкой цепи антител в соответствии с собранными сведениями в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). При применении данной системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению FW или CDR варибельного домена или вставке в них. Например, варибельный домен тяжелой цепи может содержать вставку из одной аминокислоты (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 в H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т. д. согласно Kabat) после остатка 82 FW тяжелой цепи.

[0139] Нумерацию остатков согласно Kabat можно определить для данного антитела с помощью выравнивания по гомологичным областям последовательности антитела со "стандартной" последовательностью, пронумерованной согласно Kabat. В отличие от этого Chothia ссылается на расположение структурных петель (Chothia and Lesk,

J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Chothia при нумерации с использованием системы нумерации по Kabat варьируется от H32 до H34 в зависимости от длины петли (это обусловлено тем, что в соответствии со схемой нумерации по Kabat вставки расположены в H35A и H35B; при этом если не присутствуют ни 35A, ни 35B, то петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, то петля заканчивается на 33; если присутствуют как 35A, так и 35B, то петля заканчивается на 34). Определение гипервариабельных областей по AbM представляет собой компромисс между определением CDR по Kabat и структурных петель по Chothia и применяется в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular. В таблице ниже перечислены положения аминокислот, составляющих вариабельные области антител в каждой системе.

Таблица 1. Положения аминокислот, составляющих вариабельные области антител

Область	Kabat	AbM	Chothia
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
HCDR1 ¹	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
HCDR1 ²	H31-H35	H26-H35	H26-H32
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

¹Нумерация по Kabat

²Нумерация по Chothia

[0140] ImMunoGeneTics (IMGT) также представляет систему нумерации для вариабельных областей иммуноглобулинов, в том числе CDR. См., например, Lefranc, M.P. et al., Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77(2003). Система нумерации IMGT основана на выравнивании более 5000 последовательностей, данных о структуре и определении характеристик гипервариабельных петель, и она обеспечивает возможность легкого сравнения вариабельных и CDR-областей для всех видов. В соответствии со схемой нумерации IMGT HCDR1 находится в положениях 26-35, HCDR2 находится в положениях 51-57, HCDR3 находится в положениях 93-102, LCDR1 находится в положениях 27-32, LCDR2 находится в положениях 50-52, и LCDR3 находится в положениях 89-97.

[0141] Термин "антитело" включает интактные иммуноглобулины типов IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также их подтипов), где легкие цепи иммуноглобулина могут принадлежать к типам каппа или лямбда. Связывающая молекула по настоящему изобретению может представлять собой или может содержать полноразмерное антитело или может

представлять собой или содержать его антигенсвязывающий фрагмент. Термин "антигенсвязывающий фрагмент", используемый в данном документе, относится к части антитела, которая связывается с CCR9, например молекуле, в которой одна или несколько цепей иммуноглобулина не являются полноразмерными, но которая связывается с CCR9. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой один или несколько, выбранные из Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, Fab-фрагмента, dsFv-фрагмента, scFv-фрагмента, sc(Fv)₂-фрагмента, dAb-фрагмента, или их комбинацию. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab'-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит Fab-домен.

[0142] Антитела по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты могут характеризоваться любым форматом антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело характеризуется "традиционным" форматом, описанным выше. В качестве альтернативы в некоторых вариантах осуществления антитело может представлять собой Fab-фрагмент. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением также может представлять собой Fab', Fv, scFv, Fd, домен V NAR, IgNAR, интратело, IgG CH₂, минитело, однодоменное антитело, Fcab, scFv-Fc, F(ab')₂, di-scFv, биспецифический активатор Т-клеток (BiTE®), F(ab')₃, тетратело, триатело, диатело, DVD-Ig, (scFv)₂ или mAb₂.

[0143] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула представляет собой моноклональное антитело (mAb). В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула представляет собой поликлональное антитело.

[0144] "Моноклональное антитело" (mAb) относится к гомогенной популяции антител, участвующих в высокоспецифичном распознавании и связывании одной антигенной детерминанты или эпитопа. Этим они отличаются от поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных антигенных детерминант. Термин "моноклональное антитело" охватывает как интактные и полноразмерные моноклональные антитела, так и фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные (scFv) мутантные варианты, слитые белки, содержащие часть, представляющую собой антитело, и любые другие модифицированные молекулы иммуноглобулина, содержащие антигенраспознающий сайт. Кроме того, "моноклональное антитело" относится к таким антителам, которые получены любым путем, в том числе без ограничения посредством гибридомной технологии, отбора с помощью фагового дисплея, рекомбинантной экспрессии и с применением трансгенных животных.

[0145] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой одно или несколько, выбранные из антитела мыши, гуманизированного антитела, химерного антитела, полностью человеческого антитела, моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, полиспецифического антитела, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению не индуцирует ответ в виде антитела к иммуноглобулину человека, например ответ в виде мышинового антитела к иммуноглобулину человека.

[0146] Антитела по настоящему изобретению и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены из любых видов с помощью рекомбинантных средств. Например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой таковые мыши, крысы, козы, лошади, свиньи, крупного рогатого скота, курицы, кролика, верблюда, осла, человека или их химерные варианты. Для применения при введении людям антитела или антигенсвязывающие фрагменты, полученные не от человека, можно изменять генетически или структурно с целью уменьшения их антигенности при введении пациенту-человеку.

[0147] Особенно предпочтительными являются человеческие или гуманизированные антитела, особенно в виде рекомбинантных человеческих или гуманизированных антител. Термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, полученному из иммуноглобулина, отличного от иммуноглобулина человека (например, мыши), которое было сконструировано с обеспечением содержания в нем минимального количества последовательностей, отличных от последовательностей человека (например, мыши). Гуманизированные антитела обычно представляют собой иммуноглобулины человека, в которых остатки области, определяющей комплементарность (CDR), заменены остатками CDR от видов, отличных от человека (например, мыши, крысы, кролика или хомяка), которые характеризуются требуемой специфичностью, аффинностью и функциональной способностью (Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeven et al., 1988, Science, 239:1534-1536). В некоторых случаях остатки каркасной области Fv иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками, присутствующими в антителе из видов, отличных от человека, которое характеризуется требуемой специфичностью, аффинностью и функциональной способностью.

[0148] Гуманизированные антитела можно дополнительно модифицировать посредством замены дополнительных остатков либо в каркасной области Fv и/либо в

пределах заменяемых остатков, отличных от человеческих, для усовершенствования и оптимизации специфичности, аффинности и/или функциональной способности антитела. Как правило, гуманизированные антитела будут содержать по сути все из по меньшей мере одного и обычно двух или трех переменных доменов, содержащих все или по сути все из CDR-областей, которые соответствуют таковым в иммуноглобулине, отличном от иммуноглобулина человека, тогда как все или по сути все из FR-областей являются таковыми из консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело может также содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, обычно иммуноглобулина человека. Примеры способов, применяемых для получения гуманизированных антител, описаны в патентах США №№ 5225539 или 5639641.

[0149] В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело человека. Термин "антитело человека" означает антитело, продуцируемое в организме человека, или антитело с аминокислотной последовательностью, соответствующей антителу, продуцируемому в организме человека, полученное с использованием любых методик, известных из уровня техники. Это определение антитела человека включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид тяжелой и/или легкой цепей человека, как, например, антитело, содержащее полипептиды легкой цепи мыши и тяжелой цепи человека.

[0150] В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой химерное антитело. Термин "химерные антитела" относится к антителам, в которых аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина происходит от двух или более видов. Переменная область как легкой, так и тяжелой цепи, как правило, соответствует переменной области антител, происходящих от одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т. д.), с требуемой специфичностью, аффинностью и функциональной способностью, тогда как константные области гомологичны последовательностям в антителах, происходящих от другого вида (обычно человека), во избежание вызывания иммунного ответа у этого вида.

[0151] Существует пять основных классов константных областей тяжелой цепи, классифицируемых как IgA, IgG, IgD, IgE и IgM, каждый из которых характеризуется отличительными эффекторными функциями, определенными изотипом. Например, IgG подразделяется на четыре подкласса, известных как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Молекулы Ig взаимодействуют со многими классами клеточных рецепторов. Например, молекулы IgG взаимодействуют с тремя классами рецепторов Fc γ (Fc γ R), специфичных в отношении

класса антител IgG, а именно с FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Сообщалось, что последовательности, важные для связывания IgG с рецепторами FcγR, расположены в доменах CH2 и CH3. Антитела по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты могут относиться к любому изотипу, т. е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и синтетическим мультимерам в виде четырехцепочечной структуры иммуноглобулина (Ig). В предпочтительных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой изотип IgG. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут относиться к любому подклассу IgG, например изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В предпочтительных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты относятся к изотипу IgG1 или IgG2.

[0152] В некоторых вариантах осуществления антитела содержат константную область тяжелой цепи, относящуюся к изотипу IgG. В некоторых вариантах осуществления антитела содержат часть константной области тяжелой цепи, относящуюся к изотипу IgG. В некоторых вариантах осуществления константная область IgG или ее часть представляют собой константную область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Предпочтительно константная область IgG или ее часть представляют собой константную область IgG1 или IgG2. Молекулы антитела также могут иметь другие форматы, например IgG1 с мутациями YTE (Dall'Acqua et al. (2002) *J. Immunology*, 169: 5171-5180; Dall'Acqua et al. (2006) *J Biol. Chem.* 281 (33):23514-24) и/или TM (Oganessian et al. (2008) *Acta Cryst D* 64:700-4) в Fc-области.

[0153] Антитела по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать легкую лямбда-цепь или легкую каппа-цепь. Сконструированные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты включают антитела, в которых были осуществлены модификации каркасных остатков в пределах VH-области и/или VL-области. Такие модификации могут обеспечивать улучшение свойств антитела, например снижение иммуногенности антитела и/или улучшение получения и очистки антител.

[0154] Связывающие молекулы по настоящему изобретению включают как интактные, так и модифицированные формы раскрытых в данном документе связывающих молекул. Например, связывающая молекула по настоящему изобретению может быть функционально связана (например, путем химического связывания, слияния на генетическом уровне, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими молекулярными структурами, такими как фармацевтическое средство, средство для выявления и/или белок или пептид, которые могут опосредовать ассоциацию связывающей молекулы, раскрытой в данном документе, с другой молекулой (например, центральной областью стрептавидина или полигистидиновой меткой).

Неограничивающие примеры средств для выявления включают: ферменты, такие как щелочная фосфатаза, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа ("G6PDH"), альфа-D-галактозидаза, глюкозооксидаза, глюкоамилаза, карбоангидраза, ацетилхолинэстераза, лизоцим, малатдегидрогеназа и пероксидаза, например пероксидаза хрена; красители; флуоресцентные метки или флуоресцентные вещества, такие как флуоресцеин и его производные, флуорохром, соединения и производные родамина, GFP (GFP означает "зеленый флуоресцентный белок"), дансил, умбеллиферон, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, о-фталальдегид и флуорескамин; флуорофоры, такие как криптаты и хелаты лантаноидов, например европия и т. д. (Perkin Elmer и Cis Biointernational); хемолюминесцентные метки или хемилюминесцентные вещества, такие как изолуминол, луминол и диоксетаны; биолюминесцентные метки, такие как люцифераза и люциферин; сенсibiliзаторы; коферменты; субстраты ферментов; радиоактивные метки, включая без ограничения бром-77, углерод-14, кобальт-57, фтор-8, галлий-67, галлий-68, водород-3 (тритий), индий-111, индий-113m, йод-123m, йод-125, йод-126, йод-131, йод-133, ртуть-107, ртуть-203, фосфор-32, рений-99m, рений-101, рений-105, рутений-95, рутений-97, рутений-103, рутений-105, скандий-47, селен-75, сера-35, технеций-99, технеций-99m, теллур-121m, теллур-122m, теллур-125m, тулий-165, тулий-167, тулий-168 и иттрий-199; частицы, такие как каучуковые или углеродные частицы, золь металлов, кристаллиты, липосомы, клетки и т. д., которые могут быть дополнительно мечены красителем, катализатором или другой выявляемой группой; молекулы, такие как биотин, дигоксигенин или 5-бромдезоксисуридин; фрагменты токсинов, такие как, например, фрагмент токсина, выбранный из группы экзотоксина *Pseudomonas* (PE или его цитотоксический фрагмент или мутант), токсина дифтерии или его цитотоксического фрагмента или мутанта, ботулинического токсина A, B, C, D, E или F, рицина или его цитотоксического фрагмента, например рицина A, абрина или его цитотоксического фрагмента, сапорина или его цитотоксического фрагмента, противовирусного токсина фитолакки американской или его цитотоксического фрагмента и бриодина 1 или его цитотоксического фрагмента.

[0155] Связывающие молекулы по настоящему изобретению также включают производные, которые модифицированы (например, путем ковалентного присоединения любого типа молекулы к связывающей молекуле) таким образом, что ковалентное присоединение не препятствует связыванию связывающей молекулы с ее мишенью (например, эпитопом) или каким-либо иным способом не ухудшает биологическую активность связывающей молекулы. Подходящие производные можно получать с помощью способов, включающих без ограничения фукозилирование, гликозилирование, ацетилирование, пэгилирование, фосфорилирование и амидирование.

[0156] Дополнительные варианты осуществления представляют собой мультиспецифическую связывающую молекулу (биспецифическую, триспецифическую и т. д.) и другие конъюгаты, например, с цитотоксическими малыми молекулами. Связывающие молекулы по настоящему изобретению, включая антитела по настоящему изобретению, можно получать с применением традиционных методик, известных специалистам в данной области техники, и их применимость подтверждена традиционными исследованиями связывания – иллюстративные способы описаны в примерах 3 и 4. Например, простой анализ связывания заключается в инкубации клетки, экспрессирующей антиген, с антителом. Если антитело помечено флуорофором, связывание антитела с антигеном можно выявить посредством FACS-анализа.

[0157] Можно обеспечивать выработку антител по настоящему изобретению у различных животных, в том числе мышей, крыс, кроликов, коз, овец, обезьян или лошадей. Можно обеспечивать выработку антител после иммунизации отдельными капсульными полисахаридами или множеством капсульных полисахаридов. Кровь, выделенная из организма таких животных, содержит поликлональные антитела – различные антитела, которые связываются с одним и тем же антигеном. Антигены также можно вводить курам для получения поликлональных антител в яичном желтке. Для получения моноклонального антитела, которое является специфическим в отношении одного эпитопа антигена, выделяют секретирующие антитела лимфоциты из организма животного и обеспечивают их иммортализацию посредством их слияния с линией раковых клеток. Слитые клетки называются гибридами, и они будут постоянно расти и секретировать антитело в культуре. Отдельные клетки гибридомы выделяют посредством клонирования с разбавлением для получения клонов клеток, все из которых продуцируют одно и то же антитело; эти антитела называются моноклональными антителами. Способы получения моноклональных антител являются традиционными методиками, известными специалистам в данной области техники (см., например, *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*. GC Howard. CRC Books. 2006. ISBN 0849335280). Поликлональные и моноклональные антитела часто очищают посредством аффинной хроматографии с применением белка A/G или антигена.

[0158] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно получать в виде моноклонального антитела к CCR9, которое можно получать с применением гибридных способов, таких как способы, описанные в Kohler and Milstein, *Nature* 256:495 (1975). При применении гибридного способа мышью, хомяком или другое подходящее животное-хозяина иммунизируют, как описано выше, чтобы вызвать продуцирование лимфоцитами антител, которые будут специфически связываться

с иммунизирующим антигеном. Лимфоциты также можно иммунизировать *in vitro*. После иммунизации лимфоциты выделяют и обеспечивают их слияние с подходящей линией клеток миеломы, например, с применением полиэтиленгликоля с образованием клеток гибридомы, которые затем можно выборочно отделять от неслитых лимфоцитов и клеток миеломы. Гибридомы, которые продуцируют моноклональные антитела, специфически направленные против выбранного антигена, как определено посредством иммунопреципитации, иммуноблоттинга или анализа связывания *in vitro*, например радиоиммуноанализа (RIA) или твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), затем можно размножать либо в культуре *in vitro* с применением стандартных способов (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986), либо *in vivo* в виде асцитных опухолей у животных. Затем моноклональные антитела можно очищать из культуральной среды или асцитной жидкости с применением известных способов.

[0159] В качестве альтернативы связывающую молекулу (например, моноклональное антитело) также можно получать с применением способов на основе рекомбинантной ДНК, как описано в патенте США № 4816567. Полинуклеотиды, кодирующие моноклональное антитело, выделяют из зрелых В-клеток или клетки гибридомы, например посредством RT-PCR с применением олигонуклеотидных праймеров, которые позволяют специфически амплифицировать гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела, и их последовательность определяют с применением традиционных процедур. Выделенные полинуклеотиды, кодирующие тяжелую и легкую цепи, затем клонируют в подходящие векторы экспрессии, которые при трансфекции ими клеток-хозяев, таких как клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые в других случаях не продуцируют белок иммуноглобулина, обеспечивают выработку моноклональных антител клетками-хозяевами. Также рекомбинантные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты требуемых видов можно выделять из библиотек фагового дисплея, экспрессирующих CDR требуемых видов, как описано в McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991).

[0160] Полинуклеотид(полинуклеотиды), кодирующий(кодирующие) связывающую молекулу, можно дополнительно модифицировать с помощью целого ряда различных способов с применением технологии рекомбинантных ДНК для получения альтернативных связывающих молекул. В некоторых вариантах осуществления константные домены легкой и тяжелой цепей, например, моноклонального антитела мыши можно заменять (1) на такие области, например, антитела человека с получением химерного

антитела или (2) на отличный от иммуноглобулина полипептид с получением слитого антитела. В некоторых вариантах осуществления константные области подвергаются усечению или удалению с получением требуемого фрагмента антитела из моноклонального антитела. Для оптимизации специфичности, аффинности и т. п. моноклонального антитела можно использовать сайт-направленный мутагенез или мутагенез высокой плотности в отношении вариабельной области.

[0161] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитела человека можно получать непосредственно с применением различных методик, известных из уровня техники. Можно получать иммортализованные В-лимфоциты человека, иммунизированные *in vitro* или выделенные из организма иммунизированного индивидуума, у которого вырабатывается антитело, направленное против антигена-мишени. См., например, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., *J. Immunol.* 147 (1):86-95 (1991); патент США № 5750373.

[0162] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно отбирать из фаговой библиотеки, где в такой фаговой библиотеке экспрессируются антитела человека, как описано, например, в Vaughan et al., *Nat. Biotech.* 14:309-314 (1996); Sheets et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6157-6162 (1998); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991). Методики получения и применения фаговых библиотек антител также описаны в патентах США №№ 5969108, 6172197, 5885793, 6521404; 6544731; 6555313; 6582915; 6593081; 6300064; 6653068; 6706484 и 7264963, а также в Rothe et al., *J. Molec. Biol.*, 376:1182-1200 (2008), каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте.

[0163] Стратегии обеспечения созревания аффинности и стратегии обеспечения перестановки цепей известны из уровня техники и могут применяться для получения высокоаффинных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов. См. работу Marks et al., *BioTechnology* 10:779-783 (1992), включенную посредством ссылки во всей своей полноте.

[0164] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, моноклональное антитело) могут представлять собой гуманизированное антитело. Можно также использовать способы конструирования, гуманизации или изменения поверхности отличных от человеческих или человеческих антител, и они широко известны из уровня техники. Гуманизированное, имеющее

измененную поверхность или сходным образом сконструированное антитело может содержать один или несколько аминокислотных остатков из источника, отличного от человека, например без ограничения мыши, крысы, кролика, примата, отличного от человека, или другого млекопитающего. Эти аминокислотные остатки, отличные от аминокислотных остатков человека, заменяются остатками, часто называемыми "импортируемыми" остатками, которые обычно взяты из "импортируемого" переменного, константного или другого домена известной человеческой последовательности. Такие импортируемые последовательности можно использовать для снижения иммуногенности или снижения, усиления или модификации связывания, аффинности, скорости ассоциации, скорости диссоциации, avidности, специфичности, периода полужизни или любых других подходящих характеристик, известных из уровня техники. Соответствующим образом остатки CDR могут быть непосредственно и в наиболее существенной степени вовлечены в оказание влияния на связывание CCR9. Соответственно, часть отличных от человеческих или человеческих последовательностей CDR или все они предпочтительно сохраняются, тогда как последовательности переменных и константных областей, отличные от человеческих, могут быть заменены человеческими или другими аминокислотами.

[0165] Также антитела необязательно можно гуманизировать, изменять их поверхность, конструировать, или антитела человека можно конструировать с сохранением высокой аффинности к антигену, представляющему собой CCR9, и других предпочтительных биологических свойств. Для достижения данной цели гуманизированные (или человеческие) или сконструированные антитела к CCR9 и антитела с измененной поверхностью можно получать необязательно посредством способа на основе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных и сконструированных продуктов с применением трехмерных моделей исходных, сконструированных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов являются общедоступными и известны специалистам в данной области техники. Доступны компьютерные программы, в которых иллюстрируются и отображаются возможные трехмерные конформационные структуры выбранных кандидатных последовательностей иммуноглобулинов. Рассмотрение этих изображений позволяет проанализировать вероятную роль остатков в функционировании кандидатной последовательности иммуноглобулина, т. е. проанализировать остатки, которые влияют на способность кандидатного иммуноглобулина связывать свой антиген, такой как CCR9. Таким образом, остатки FW можно выбирать из консенсусной и импортированной последовательностей и комбинировать их таким образом, чтобы обеспечить требуемые

характеристики антитела, такие как повышенная аффинность в отношении антигена-мишени(антигенов-мишеней).

[0166] Гуманизацию, изменение поверхности или конструирование антител к CCR9 или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению можно выполнять с применением любого известного способа, такого как без ограничения способы, описанные в Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993); патентах США №№ 5639641, 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539, 4816567, 7557189, 7538195 и 7342110; международных заявках №№ PCT/US98/16280, PCT/US96/18978, PCT/US91/09630, PCT/US91/05939, PCT/US94/01234, PCT/GB89/01334, PCT/GB91/01134, PCT/GB92/01755, публикациях международных патентных заявок №№ WO 90/14443, WO 90/14424, WO 90/14430 и публикации европейской патентной заявки № EP 229246, каждая из которых во всей своей полноте включена в данный документ посредством ссылки, включая упоминаемые в них литературные источники.

[0167] Гуманизированные антитела к CCR9 и их антигенсвязывающие фрагменты также можно получать в организмах трансгенных мышей, в которых содержатся локусы иммуноглобулинов человека, которые способны после иммунизации обеспечивать выработку полного репертуара антител человека в отсутствие выработки эндогенных иммуноглобулинов. Этот подход описан в патентах США №№ 5545807, 5545806, 5569825, 5625126, 5633425 и 5661016.

[0168] В некоторых вариантах осуществления предусмотрен фрагмент (например, фрагмент антитела) антитела (например, антитела к CCR9). Известны различные методики получения фрагментов антител. Традиционно данные фрагменты получают посредством протеолитического расщепления интактных антител, как описано, например, в Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Meth. 24:107-117 (1993) и Brennan et al., Science 229:81 (1985). В некоторых вариантах осуществления фрагменты антител к CCR9 получают рекомбинантным путем. Все Fab-, Fv- и scFv-фрагменты антител могут экспрессироваться и секретироваться *E. coli* или другими клетками-хозяевами, что таким образом обеспечивает получение больших количеств данных фрагментов. Такие фрагменты антител к CCR9 также можно выделять из рассмотренных выше фаговых библиотек антител. Фрагменты антител к CCR9 также могут представлять собой линейные антитела,

описанные в патенте США № 5641870. Другие методики получения фрагментов антител будут очевидны практикующему специалисту.

[0169] В соответствии с настоящим изобретением методики можно адаптировать для получения одноцепочечных антител, специфических в отношении CCR9. См., например, патент США № 4946778. Кроме того, способы можно адаптировать для конструирования экспрессионных библиотек Fab для обеспечения быстрой и эффективной идентификации моноклональных Fab-фрагментов с требуемой специфичностью в отношении CCR9 или их производных, фрагментов, аналогов или гомологов. См., например, Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989). С помощью методик, известных из уровня техники, можно получать фрагменты антител, включая без ограничения: F(ab')₂-фрагмент, получаемый посредством расщепления молекулы антитела пепсином; Fab-фрагмент, получаемый посредством восстановления дисульфидных мостиков F(ab')₂-фрагмента, Fab-фрагмент, получаемый посредством обработки молекулы антитела папаином и восстановителем, или Fv-фрагменты.

[0170] Модифицированная связывающая молекула (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе) может содержать связывающую область любого типа, которая обеспечивает ассоциацию связывающей молекулы с CCR9. В связи с этим область связывания может представлять собой переменную область, которая может содержаться в организме млекопитающего любого типа, у которого могут быть индуцированы гуморальный ответ и выработка иммуноглобулинов к требуемому антигену, или может быть получена из него. Так, переменная область антитела к CCR9 или его антигенсвязывающего фрагмента может происходить, например, от человека, мыши, примата, отличного от человека (например, яванских макаков, макаков и т. п.), или представителя семейства волчьих. В некоторых вариантах осуществления как переменные, так и константные области модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента являются человеческими. В некоторых вариантах осуществления переменные области совместимого антитела (обычно полученные из источника, отличного от человека) можно конструировать или специфически оптимизировать с целью улучшения свойств связывания или снижения иммуногенности молекулы. В связи с этим переменные области, применимые в настоящем изобретении, можно гуманизировать или иным образом изменять посредством включения импортируемых аминокислотных последовательностей.

[0171] В некоторых вариантах осуществления переменные домены как тяжелых, так и легких цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента изменяют посредством по меньшей мере частичной замены одной или нескольких CDR и/или

посредством частичной замены каркасной области и изменения последовательности. Хотя CDR могут быть получены из антитела того же класса или даже подкласса, что и антитело, из которого получены каркасные области, предусматривается, что CDR будут получены из антитела другого класса и в определенных вариантах осуществления из антитела от другого вида. Для передачи антигенсвязывающей способности одного переменного домена другому замена всех CDR полными CDR из донорной переменной области не является необходимой. Напротив, необходимым является только перенос тех остатков, которые являются необходимыми для поддержания активности антигенсвязывающего сайта. С учетом пояснений, изложенных в патентах США №№ 5585089, 5693761 и 5693762, получение функционального антитела со сниженной иммуногенностью посредством проведения стандартных экспериментов будет находиться вполне в пределах компетенции специалистов в данной области техники.

[0172] Без учета изменений в переменной области специалистам в данной области техники будет понятно, что модифицированные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут предусматривать антитело (например, полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), в котором по меньшей мере часть одного или нескольких доменов константной области была подвергнута делеции или иным образом изменена с получением требуемых биохимических характеристик, таких как повышенная эффекторная функция, включая улучшенную способность индуцировать ADCC по сравнению с антителом с примерно такой же иммуногенностью, содержащим нативную или неизмененную константную область. В некоторых вариантах осуществления константная область модифицированного антитела будет содержать константную область человека. Модификации константной области, совместимые с этим изобретением, включают добавления, делеции или замены одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких доменах. То есть раскрытое в данном документе модифицированное антитело может предусматривать изменения или модификации одного или нескольких из трех константных доменов тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) и/или константного домена легкой цепи (CL). В некоторых вариантах осуществления предусмотрена модифицированная константная область, в которой частично или полностью удалены один или несколько доменов. В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело будет содержать конструкции с подвергнутым делеции доменом или варианты, где был удален весь CH2-домен (Δ CH2-конструкции). В некоторых вариантах осуществления исключенный домен константной области может быть замещен коротким аминокислотным спейсером (например, из 10 остатков), что обеспечивает некоторую гибкость молекулы, которую обычно придает отсутствующая константная область.

[0173] Для определения процента идентичности можно использовать любой из разнообразных способов выравнивания последовательностей, в том числе без ограничения глобальные способы, локальные способы и гибридные способы, такие как, например, способы с сегментным подходом. Протоколы для определения процента идентичности являются стандартными процедурами в пределах компетенции специалиста в данной области техники. Глобальные способы позволяют выравнивать последовательности от начала до конца молекулы и определять наилучшее выравнивание посредством суммирования баллов за отдельные пары остатков и посредством применения штрафов за гэпы. К неограничивающим способам относятся, например, CLUSTAL W, см., например, Julie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) *Nucleic Acids Research* 4673-4680 (1994), и итеративное уточнение, см., например, Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) *J. Mol. Biol.* 823-838 (1996). Локальные способы позволяют выравнивать последовательности посредством идентификации одного или нескольких консервативных мотивов, общих для всех вводимых последовательностей. К неограничивающим способам относятся, например, Match-box, см., например, Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) *CABIOS* 501-509 (1992); генерация выборки по схеме Гиббса, см., например, C. E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) *Science* 208-214 (1993); Align-M, см., например, Ivo Van Waile et al., Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) *Bioinformatics*:1428-1435 (2004).

[0174] Таким образом, процент идентичности последовательностей определяется традиционными способами. См., например, Altschul et al., *Bull. Math. Bio.* 48: 603-16, 1986, и Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-19, 1992. Вкратце, две аминокислотные последовательности выравнивают для оптимизации баллов выравнивания с применением штрафа за открытие гэпа, составляющего 10, штрафа за удлинение гэпа, составляющего 1, и матрицы замен "blosum 62" из публикации Henikoff и Henikoff (там же), как показано ниже (аминокислоты обозначаются стандартными однобуквенными кодами).

[0175] "Процент идентичности последовательностей" между двумя или более последовательностями нуклеиновой кислоты или аминокислотными последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей. Таким образом, % идентичности можно рассчитать как количество

идентичных нуклеотидов/аминокислот, деленное на общее количество нуклеотидов/аминокислот, умноженное на 100. При расчетах % идентичности последовательностей также можно учитывать количество гэпов и длину каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимизации выравнивания двух или более последовательностей. Сравнения последовательностей и определение процента идентичности между двумя или более последовательностями можно проводить с применением специализированных математических алгоритмов, таких как BLAST, которые будут знакомы специалисту в данной области техники.

[0176] Настоящее изобретение дополнительно охватывает варианты и эквиваленты, которые по сути гомологичны связывающей молекуле по настоящему изобретению (например, антителу, такому как мышиное, химерное, гуманизированное или человеческое антитело, или их антигенсвязывающим фрагментам). Они могут характеризоваться, например, наличием мутаций, обеспечивающих консервативные замены, т. е. замены одной или нескольких аминокислот на сходные аминокислоты. Например, консервативная замена относится к замене аминокислоты на другую из того же общего класса, как, например, одной кислой аминокислоты на другую кислую аминокислоту, одной основной аминокислоты на другую основную аминокислоту или одной нейтральной аминокислоты на другую нейтральную аминокислоту. Из уровня техники широко известно, что подразумевается под консервативной заменой аминокислоты.

[0177] По сути гомологичные полипептиды характеризуются наличием одной или нескольких аминокислотных замен, делеций или добавлений. Такие изменения предпочтительно носят незначительный характер, то есть представляют собой консервативные аминокислотные замены (см. ниже) и другие замены, которые не оказывают значительного влияния на фолдинг или активность полипептида; небольшие делеции, обычно от одной до приблизительно 30 аминокислот, и небольшие удлинения на аминоконце или карбоксильном конце, такие как аминоконцевой остаток метионина, небольшой линкерный пептид до приблизительно 20-25 остатков или аффинная метка.

Таблица 2. Консервативные аминокислотные замены

Основные	Аргинин, лизин, гистидин
Кислые	Глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота
Полярные	Глутамин, аспарагин
Гидрофобные	Лейцин, изолейцин, валин
Ароматические	Фенилаланин, триптофан, тирозин

Малые	Глицин, аланин, серин, треонин, метионин
-------	--

[0178] В дополнение к 20 стандартным аминокислотам аминокислотные остатки связывающих молекул по настоящему изобретению могут быть заменены нестандартными аминокислотами (такими как 4-гидроксипролин, 6-N-метиллизин, 2-аминоизомасляная кислота, изовалин и α -метилсерин). Аминокислотные остатки полипептида могут быть заменены ограниченным числом неконсервативных аминокислот, аминокислот, которые не кодируются генетическим кодом, и неприродных аминокислот. Связывающие молекулы по настоящему изобретению также могут содержать не встречающиеся в природе аминокислотные остатки.

[0179] Не встречающиеся в природе аминокислоты включают без ограничения транс-3-метилпролин, 2,4-метанопронин, цис-4-гидроксипролин, транс-4-гидроксипролин, N-метилглицин, алло-треонин, метилтреонин, гидроксиэтилцистеин, гидроксиэтилгомоцистеин, нитроглутамин, гомоглутамин, пипеколиновую кислоту, трет-лейцин, норвалин, 2-азафенилаланин, 3-азафенилаланин, 4-азафенилаланин и 4-фторфенилаланин. Из уровня техники известны несколько способов включения не встречающихся в природе аминокислотных остатков в белки. Например, можно применять систему *in vitro*, в которой подавляются нонсенс-мутации с применением химически аминоацилированных супрессорных тРНК. Способы синтеза аминокислот и аминоацилирования тРНК известны из уровня техники. Транскрипцию и трансляцию плазмид, содержащих нонсенс-мутации, осуществляют в бесклеточной системе, содержащей экстракт *E. coli* S30, и коммерчески доступные ферменты, и другие реагенты. Белки очищают посредством хроматографии. См., например, Robertson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722, 1991; Ellman et al., *Methods Enzymol.* 202:301, 1991; Chung et al., *Science* 259:806-9, 1993 и Chung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10145-9, 1993). Во втором способе трансляцию осуществляют в ооцитах представителей рода *Xenopus* посредством микроинъекции мутированной мРНК и химически аминоацилированных супрессорных тРНК (Turcatti et al., *J. Biol. Chem.* 271:19991-8, 1996). В третьем способе клетки *E. coli* культивируют в отсутствие природной аминокислоты, которую предполагается заменить (например, фенилаланин) и в присутствии требуемой(требуемых) не встречающейся(встречающейся) в природе аминокислоты(аминокислот) (например, 2-азафенилаланина, 3-азафенилаланина, 4-азафенилаланина или 4-фторфенилаланина). Не встречающаяся в природе аминокислота включается в полипептид вместо ее природного эквивалента. См. Koide et al., *Biochem.* 33:7470-6, 1994. Встречающиеся в природе аминокислотные остатки можно преобразовывать в не встречающиеся в природе

соединения посредством химической модификации *in vitro*. Химическая модификация может быть скомбинирована с сайт-направленным мутагенезом для дополнительного расширения диапазона замещений (Wynn and Richards, *Protein Sci.* 2:395-403, 1993).

[0180] Аминокислотные остатки связывающих молекул по настоящему изобретению могут быть заменены ограниченным числом неконсервативных аминокислот, аминокислот, которые не кодируются в генетическом коде, не встречающихся в природе аминокислот и неприродных аминокислот.

[0181] Незаменимые аминокислоты в связывающих молекулах по настоящему изобретению можно идентифицировать согласно процедурам, известным из уровня техники, таким как сайт-направленный мутагенез или мутагенез на основе аланинового сканирования (Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-5, 1989). Сайты биологического взаимодействия также могут быть определены посредством физического анализа структуры, как определено посредством таких методик, как ядерный магнитный резонанс, кристаллография, электронная дифракция или фотоаффинное мечение, в сочетании с мутацией аминокислот предполагаемого сайта контакта. См., например, de Vos et al., *Science* 255:306-12, 1992; Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59-64, 1992. Индивидуальный состав незаменимых аминокислот также может быть установлен на основе анализа показателей гомологии с родственными компонентами (например, транслокационными или протеазными компонентами) связывающих молекул по настоящему изобретению.

[0182] Различные аминокислотные замены могут быть осуществлены и протестированы с применением известных способов мутагенеза и скрининга, таких как способы, раскрытые в Reidhaar-Olson and Sauer (*Science* 241:53-7, 1988) или Bowie and Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-6, 1989). Вкратце, данные авторы раскрывают способы одновременной рандомизации двух или более положений в полипептиде, отбора функционального полипептида и последующего секвенирования подвергнутых мутагенезу полипептидов с определением спектра допустимых замен в каждом положении. К другим способам, которые можно использовать, относятся фаговый дисплей (например, Lowman et al., *Biochem.* 30:10832-7, 1991; Ladner et al., патент США № 5223409; Huse, публикация WIPO WO 92/06204) и область-направленный мутагенез (Derbyshire et al., *Gene* 46:145, 1986; Ner et al., *DNA* 7:127, 1988).

5.2 Композиции

[0183] Также в данном документе предусмотрены композиции, содержащие связывающую молекулу по настоящему изобретению. Композиция может содержать

любую связывающую молекулу, описанную в данном документе. Композиция может содержать более чем одну связывающую молекулу, описанную в данном документе.

[0184] В другом аспекте предусмотрена композиция, содержащая связывающую молекулу, которая связывается с CCR9, где указанная связывающая молекула способна (i) ингибировать связывание CCL25 с CCR9 и (ii) опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении клетки, экспрессирующей CCR9, с которой она связывается.

[0185] Композиция, описанная в данном документе, может представлять собой фармацевтическую композицию, как, например, композиция, содержащая связывающую молекулу по настоящему изобретению и дополнительно содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, которая не препятствует эффективному проявлению биологической активности активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будут вводить композицию. Такая композиция может быть стерильной и может содержать фармацевтически приемлемый носитель, такой как физиологический солевой раствор. Подходящие фармацевтические композиции могут содержать одно или несколько из буфера (например, ацетатного, фосфатного или цитратного буфера), поверхностно-активного вещества (например, полисорбата), стабилизатора (например, альбумина человека), консерванта (например, бензилового спирта) и стимулятора абсорбции для повышения биодоступности и/или других традиционных солюбилизующих или диспергирующих средств.

[0186] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать фармацевтически приемлемый, нетоксичный, стерильный носитель, такой как физиологический солевой раствор, нетоксичные буферы, консерванты и т. п. Подходящие составы для применения в терапевтических способах, раскрытых в данном документе, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012).

[0187] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержаться в одном или нескольких составах, выбранных из капсулы, таблетки, водной суспензии, раствора, назального аэрозоля или их комбинации.

[0188] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит более чем один тип связывающей молекулы по настоящему изобретению. Например, фармацевтическая композиция может содержать два или больше типов, выбранных из антитела, антигенсвязывающего фрагмента, или их комбинации.

[0189] Термин "фармацевтически эффективное количество" связывающей молекулы означает количество, достаточное для достижения эффективного связывания с мишенью и для достижения благоприятного эффекта, например облегчения симптомов заболевания или состояния или выявления вещества или клетки.

[0190] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), необязательно стабилизирующее средство (например, альбумин человека) и т. п.

[0191] Соответственно, связывающая молекула по настоящему изобретению связываются с молекулой CCR9 с достаточной аффинностью, чтобы связывающая молекула в виде терапевтического средства или диагностического реагента являлась применимой для нацеливания на CCR9.

5.3 Терапевтические способы

[0192] Настоящее изобретение также относится к использованию связывающих молекул и композиций по настоящему изобретению в терапевтических способах. В настоящем изобретении предусмотрена связывающая молекула по настоящему изобретению для применения в таких терапевтических способах, например связывающая молекула по настоящему изобретению для применения в способе лечения организма человека или животного с помощью терапии. Если терапевтические способы и виды применения описаны в данном документе со ссылкой на связывающую молекулу по настоящему изобретению, также охватываются такие же способы и виды применения, в которых связывающая молекула присутствует в композиции, такой как фармацевтическая композиция, такая как фармацевтическая композиция, описанная в данном документе.

[0193] Таким образом, настоящее изобретение охватывает определенную выше связывающую молекулу и определенную выше фармацевтическую композицию для применения в способе лечения CCR9-опосредованного заболевания или состояния.

[0194] В одном аспекте предусмотрена связывающая молекула по настоящему изобретению для применения в лечении CCR9-опосредованного заболевания или состояния. Также предусмотрена композиция по настоящему изобретению, например фармацевтическая композиция по настоящему изобретению для применения в лечении CCR9-опосредованного заболевания или состояния. Дополнительно предусмотрено применение связывающей молекулы по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного препарата для лечения CCR9-опосредованного заболевания или состояния.

[0195] В другом аспекте предусмотрен способ лечения CCR9-опосредованного заболевания или состояния у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества связывающей молекулы по настоящему изобретению.

[0196] В одном аспекте предусмотрена связывающая молекула для применения в лечении CCR9-опосредованного заболевания или состояния у субъекта, где указанная связывающая молекула способна (i) ингибировать связывание CCL25 с CCR9 и (ii) опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении клетки, экспрессирующей CCR9, с которой она связывается.

[0197] В одном аспекте предусмотрен способ лечения CCR9-опосредованного заболевания или состояния у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества связывающей молекулы, которая связывается с CCR9, где указанная связывающая молекула способна (i) ингибировать связывание CCL25 с CCR9 и (ii) опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении клетки, экспрессирующей CCR9, с которой она связывается.

[0198] В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов лечения CCR9-опосредованное заболевание или состояние, которое лечат, представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

[0199] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула способна обеспечивать истощение по клеткам, экспрессирующим CCR9, у субъекта, например, в кишечнике субъекта. Не ограничиваясь теорией, это может быть связано со способностью связывающей молекулы обеспечивать предупреждение миграции клетки, экспрессирующей CCR9, от периферии в кишечник субъекта и/или связано со способностью связывающей молекулы индуцировать гибель клетки, экспрессирующей CCR9, с которой она связывается.

[0200] Таким образом, в одном аспекте предусмотрен способ обеспечения истощения по клеткам, экспрессирующим CCR9, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества связывающей молекулы по настоящему изобретению.

[0201] В некоторых вариантах осуществления полипептид CCR9 содержится в пределах полипептидной последовательности CCR9 или ее фрагмента.

[0202] "Полипептид CCR9" может предусматривать полноразмерную полипептидную последовательность CCR9, или может предусматривать фрагмент CCR9 от полноразмерной полипептидной последовательности CCR9 любой длины (например, содержащий полипептидную последовательность, составляющую 5%, 15%, 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 85% или 95% от полноразмерной полипептидной последовательности

CCR9), которые содержат эпитоп, который может связываться (например, быть связанным) связывающей молекулой по настоящему изобретению.

[0203] Связывающая молекула может преимущественно использоваться в способах выявления эпитопа CCR9 и ассоциированных способах диагностики.

[0204] Используемые в данном документе термины "лечить" или "лечение" охватывают терапевтические меры, с помощью которых обеспечивают излечение, замедляют течение, облегчают симптомы и/или останавливают прогрессирование диагностированного патологического состояния или нарушения. Таким образом, нуждающиеся в лечении включают тех, которые уже имеют нарушение. Предпочтительно используемые в данном документе термины "лечить" или "лечение" означают корректирующее лечение. Термины "лечить" или "лечение" охватывают лечение воспалительного заболевания кишечника и лечение его симптомов и заболеваний/нарушений, связанных с ним. В некоторых вариантах осуществления термины "лечить" или "лечение" относятся к симптому IBD, такому как воспаление в кишечнике, боль в области живота, диарея, кровь в стуле. В некоторых вариантах осуществления субъект успешно "проходит лечение" CCR9-опосредованного заболевания или нарушения (например, воспалительного заболевания кишечника) в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, если у пациента наблюдается, например, полное, частичное или временное облегчение или устранение симптомов, ассоциированных с CCR9-опосредованным заболеванием или нарушением (например, воспалительным заболеванием кишечника). Термины "лечить" или "лечение" также включают профилактическое лечение, например, для предупреждения начала заболевания, например, для предупреждения возникновения IBD.

[0205] Термин "предупреждать" относится к профилактическим или превентивным мерам, с помощью которых предупреждают и/или замедляют развитие целевого патологического состояния или нарушения. Таким образом, нуждающиеся в предупреждении включают тех, которые предрасположены к наличию данного нарушения или восприимчивы к нему. В некоторых вариантах осуществления предупреждение заболевания или нарушения (например, воспалительного заболевания кишечника) в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, осуществляется успешно, если у пациента, например, временно или постоянно обнаруживается меньшее количество или меньшая степень тяжести симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением, или более позднее начало проявления симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением, по сравнению с пациентом, не подвергавшимся воздействию способов по настоящему изобретению.

[0206] Термины "субъект", "индивидуум" и "пациент" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения субъекта-млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления "субъект" представляет собой человека, домашних животных, сельскохозяйственных животных, используемых в спорте животных и животных в зоопарке, например людей, приматов, отличных от человека, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот и т. д. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой яванского макака (*Macaca fascicularis*). В предпочтительных вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В способах по настоящему изобретению у субъекта ранее могло быть не диагностировано наличие воспалительного заболевания кишечника. В качестве альтернативы у субъекта ранее могло быть диагностировано наличие воспалительного заболевания кишечника. Субъект также может быть субъектом, у которого проявляются факторы риска развития заболевания, или субъектом, у которого не проявляются симптомы воспалительного заболевания кишечника. Субъект также может быть субъектом, который страдает воспалительным заболеванием кишечника или подвержен риску его развития. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способ в соответствии с настоящим изобретением может применяться для подтверждения наличия воспалительного заболевания кишечника у субъекта. Например, у субъекта ранее могло быть диагностировано воспалительное заболевание кишечника с помощью альтернативных способов. В некоторых вариантах осуществления субъекту ранее вводили терапевтическое средство против воспалительного заболевания кишечника.

[0207] В некоторых вариантах осуществления способы лечения по настоящему изобретению предусматривают одну или несколько стадий введения, выбранных из перорального, внутривенного, внутриартериального, внутрибрюшинного, внутримышечного, подкожного, ректального или вагинального, ингаляционного, местного или их комбинации.

[0208] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула доставляется непосредственно в место расположения вредной клеточной популяции (например, с обеспечением таким образом повышения уровня воздействия терапевтического средства на пораженную заболеванием ткань). В некоторых вариантах осуществления введение осуществляется непосредственно в дыхательные пути, например, путем ингаляции или интраназального введения.

[0209] В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона, такую как болезнь Крона подвздошной кишки или тонкого и толстого кишечника. В некоторых вариантах осуществления

воспалительное заболевание кишечника представляет собой язвенный колит.

5.4 Способы выявления

[0210] В дополнительном аспекте предусмотрены способы выявления присутствия или отсутствия полипептида CCR9. В таких способах можно использовать связывающую молекулу по настоящему изобретению.

[0211] В некоторых вариантах осуществления способ выявления присутствия или отсутствия полипептида CCR9 включает:

- a) приведение образца в контакт со связывающей молекулой по настоящему изобретению с получением комплекса связывающая молекула-антиген;
- b) выявление присутствия или отсутствия указанного комплекса связывающая молекула-антиген;
- c) при этом присутствие комплекса связывающая молекула-антиген подтверждает присутствие полипептида CCR9.

[0212] В некоторых вариантах осуществления любую из вышеперечисленных стадий (i)-(iii) проводят *ex vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления все из вышеперечисленных стадий (i)-(iii) проводят *ex vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления любую из вышеперечисленных стадий (i)-(iii) проводят *in vivo*.

[0213] Связывающая молекула может представлять собой любую связывающую молекулу, описанную в данном документе, например, связывающую молекулу, содержащую набор из шести CDR, как проиллюстрировано для любого антитела на **фигуре 3**, или **фигуре 4**, или в **таблице 4**, или связывающую молекулу, содержащую VH и VL, как проиллюстрировано для любого антитела на **фигуре 3** или **фигуре 4**, или связывающую молекулу из **таблицы 3**.

[0214] В некоторых вариантах осуществления способы выявления, описанные в данном документе, проводят *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления способы выявления, описанные в данном документе, проводят *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления способы выявления, описанные в данном документе, проводят на образце от субъекта, таком как образец, который ранее был получен от субъекта. Способы выявления могут включать или не включать стадию получения образца от субъекта. Соответственно, "образец" представляет собой образец, полученный от субъекта (например, биоптат), из линии клеток, культуры ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих CCR9. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой биоптат, полученный от субъекта. Указанный биоптат может быть получен из кишечника субъекта, страдающего воспалительным заболеванием кишечника, или из кишечника субъекта, подверженного риску развития воспалительного заболевания

кишечника. Образец может представлять собой образец, выделенный от субъекта.

[0215] Настоящее изобретение охватывает соответствующее применение связывающей молекулы по настоящему изобретению для выявления полипептида CCR9 (например, эпитопа полипептида CCR9).

[0216] В некоторых вариантах осуществления присутствие комплекса связывающая молекула-антиген является признаком наличия воспалительного заболевания кишечника, а отсутствие комплекса связывающая молекула-антиген является признаком отсутствия воспалительного заболевания кишечника.

[0217] В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника, включающее клетку, экспрессирующую полипептид CCR9 (например, эпитоп полипептида CCR9).

[0218] Таким образом, настоящее изобретение охватывает применение связывающей молекулы по настоящему изобретению в способах диагностики у субъекта воспалительного заболевания кишечника, предпочтительно где указанное воспалительное заболевание кишечника предусматривает наличие клетки, экспрессирующей CCR9.

[0219] В некоторых вариантах осуществления способ выявления или способ диагностики может включать измерение уровня экспрессии CCR9 в образце, полученном от субъекта, и сравнение измеренного уровня экспрессии CCR9 с эталонным уровнем CCR9, где повышение измеренного уровня экспрессии CCR9 по сравнению с эталонным уровнем CCR9 является признаком наличия воспалительного заболевания кишечника. В некоторых вариантах осуществления указанный эталонный уровень CCR9 представляет собой уровень экспрессии CCR9 в образце от пациента без IBD (например, нормальном) того же типа, как, например, того же типа ткани.

[0220] Термин "комплекс связывающая молекула-антиген" означает комплекс (например, макромолекулярный комплекс), содержащий антиген, который связан с его соответствующей связывающей молекулой, например CCR9, который связан со связывающей молекулой по настоящему изобретению. Термин "комплекс связывающая молекула-антиген" может применяться синонимически с терминами "комплекс связанный CCR9-связывающая молекула" и "связывающая молекула, связанная с CCR9".

[0221] Комплекс связывающая молекула-антиген можно выявить любыми способами, известными специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула мечена выявляемой меткой. Указанная метка может представлять собой эпифлуоресцентную метку.

[0222] В некоторых вариантах осуществления комплекс связывающая молекула-антиген выявляют посредством вторичного (например, выявляемого) антитела, которое

связывает связывающую молекулу и/или комплекс связывающая молекула-антиген.

[0223] Соответственно, указанное вторичное антитело содержит средство выявления, такое как идентификационная метка/метка, для способствования выявлению. Указанные средства выявления предпочтительно конъюгированы с вторичным антителом. Примеры подходящих меток включают выявляемые метки, такие как радиоактивные метки или флуоресцентные или красящие молекулы, ферментативные маркеры или хромогенные маркеры – например красители, которые обеспечивают видимое изменение цвета при связывании выявляемого антитела с антигеном. В качестве примера метка может представлять собой флуоресцеин-изотиоцианат (FITC), R-фикоэритрин, Alexa 532, CY3 или дигоксигенин. Метка может представлять собой репортерную молекулу, которая выявляется непосредственно, как, например, путем выявления ее флуоресцентного сигнала или путем проявления метки на фотографической или рентгеновской пленке. В качестве альтернативы метка не выявляется непосредственно, но может быть выявлена, например, в двухфазной системе. Примером непрямого обнаружения метки является связывание антитела с меткой.

[0224] В некоторых вариантах осуществления указанное вторичное антитело содержит флуоресцентную метку, и комплекс связывающая молекула-антиген выявляется по флуоресценции, испускаемой комплексом связывающая молекула-антиген-вторичное антитело. "Комплекс связывающая молекула-антиген-вторичное антитело" означает комплекс, содержащий антиген (например, CCR9), который связался со связывающей молекулой, где указанный комплекс дополнительно связался вторичным антителом, которое связывает указанную связывающую молекулу и/или комплекс связывающая молекула-антиген.

[0225] Соответственно, комплекс связывающая молекула-антиген выявляется, если сигнал (например, флуоресценция), испускаемый от выявляемой метки, является большим, чем сигнал, выявляемый в контроле, не содержащем связывающую молекулу (например, не содержащем связывающую молекулу, которая связывает CCR9). Указанный контроль в качестве альтернативы может содержать CCR9, но образец не применяется в отношении указанного контроля.

[0226] В другом аспекте предусмотрена вторая связывающая молекула, которая связывается с CCR9, где указанная вторая связывающая молекула не конкурирует за связывание с CCR9 с первой связывающей молекулой.

[0227] Первая связывающая молекула может представлять собой любую связывающую молекулу, раскрытую в данном документе, которая связывается с CCR9. Подходящая первая связывающая молекула может представлять собой связывающую

молекулу, проиллюстрированную на **фигуре 4**. Подходящая первая связывающая молекула может представлять собой связывающую молекулу, содержащую VH и VL любой связывающей молекулы, проиллюстрированной в **таблице 3**, или содержащую набор из шести CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3) любой связывающей молекулы, проиллюстрированной в **таблице 4**. Подходящая первая связывающая молекула может представлять собой связывающую молекулу, которая

- a) содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую набор CDR из HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую набор CDR из LCDR1, LCDR2 и LCDR3, антитела, показанного на **фигуре 4**;
- b) содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL) антитела, показанного на **фигуре 4**;
- c) содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 51 и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 55, где (i) каждый из X_1 и X_2 из последовательности под SEQ ID NO: 55 представляет собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 76); или (ii) X_1 из последовательности под SEQ ID NO: 55 представляет собой P или S, и X_2 из последовательности под SEQ ID NO: 55 представляет собой R, T или G (SEQ ID NO: 77); или
- d) содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 51 и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 52, 53 или 54; или
- e) содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 56 и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 57.

[0228] Преимущественно настоящее изобретение охватывает применение второй связывающей молекулы (которая не конкурирует за связывание с первой связывающей молекулой) для определения численности клеток, экспрессирующих CCR9, в образце, который был приведен в контакт с первой связывающей молекулой.

[0229] Таким образом, предусмотрен способ оценки степени истощения по клеткам, экспрессирующим CCR9, с помощью первой связывающей молекулы, при этом способ включает:

- a) приведение указанной первой связывающей молекулы в контакт с популяцией клеток, где популяция клеток содержит клетки, экспрессирующие CCR9, и иммунные эффекторные клетки, в условиях, подходящих для обеспечения

проявления антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности эффекторными клетками;

- b) приведение указанной популяции клеток в контакт со второй связывающей молекулой, которая связывается с CCR9 и которая не конкурирует за связывание с CCR9 с первой связывающей молекулой из стадии (i);
- c) выявление клеток, экспрессирующих CCR9, в популяции клеток, которые связаны второй связывающей молекулой из (ii);
- d) сравнение количества клеток, экспрессирующих CCR9, выявленных на стадии (iii), с количеством клеток, экспрессирующих CCR9, в исходной популяции клеток, используемой на стадии (i), и определение таким образом количества клеток, экспрессирующих CCR9, которые были подвергнуты истощению на стадии (i).

[0230] В некоторых вариантах осуществления вторая связывающая молекула содержит последовательности VH и VL, проиллюстрированные в **таблице 6**, или набор из шести CDR, проиллюстрированный в **таблице 6**. Например, первая связывающая молекула может содержать VH и VL любой связывающей молекулы, проиллюстрированной в **таблице 3**, или содержать набор из шести CDR любой связывающей молекулы, проиллюстрированной в **таблице 4**, и вторая связывающая молекула может содержать последовательности VH и VL, проиллюстрированные в **таблице 6**, или набор из шести CDR, проиллюстрированный в **таблице 6**.

[0231] В некоторых вариантах осуществления вторая связывающая молекула представляет собой связывающую молекулу, описанную в данном документе, которая связывается с CCR9 и которая содержит:

- a) HCDR1 под SEQ ID NO: 44 или ее функциональный вариант;
- b) HCDR2 под SEQ ID NO: 45 или ее функциональный вариант;
- c) HCDR3 под SEQ ID NO: 46 или ее функциональный вариант;
- d) LCDR1 под SEQ ID NO: 47 или ее функциональный вариант;
LCDR2 под SEQ ID NO: 5 или ее функциональный вариант; и
- e) LCDR3 под SEQ ID NO: 48 или ее функциональный вариант, где функциональный вариант определен в данном документе.

[0232] В некоторых вариантах осуществления вторая связывающая молекула представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с CCR9 и которая содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую набор CDR из HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую набор CDR из LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где аминокислотная последовательность VH-области содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 44, HCDR2 под SEQ ID NO: 45, и HCDR3 под SEQ ID NO: 46, и

где аминокислотная последовательность VL-области содержит LCDR1 под SEQ ID NO: 47, LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 48.

[0233] В некоторых вариантах осуществления вторая связывающая молекула представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с CCR9 и которая содержит:

- а) VH-область, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 72, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней; и
- б) VL-область, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 73, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

5.5 Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева

[0234] В другом аспекте предусмотрен полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую связывающую молекулу по настоящему изобретению.

[0235] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой выделенный полинуклеотид.

[0236] В некоторых вариантах осуществления, где связывающая молекула содержит более одной полипептидной цепи (например, где связывающая молекула представляет собой молекулу иммуноглобулина или ее фрагмент, содержащий по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь), полинуклеотид кодирует одну, некоторые или все полипептидные цепи связывающей молекулы. Например, полинуклеотид может кодировать полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует VH-область связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует VL-область связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует VH-область и VL-область связывающей молекулы.

[0237] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно кодирует лидерную последовательность (например, которая функционирует в качестве секреторной последовательности для регуляции транспорта полипептида из клетки).

[0238] Варианты описанного выше полинуклеотида охватываются настоящим изобретением. Варианты полинуклеотидов могут предусматривать наличие изменений в кодирующих областях, не кодирующих областях или как в тех, так и в других. В некоторых вариантах осуществления вариант полинуклеотида предусматривает наличие изменения,

которое обеспечивает получение "молчащих" замен, добавлений или делеций, но не приводит к изменению свойств или видов активности кодируемого полипептида. В некоторых вариантах осуществления вариант полинуклеотида получен в результате "молчащей" замены, обусловленной вырожденностью генетического кода. Вариант полинуклеотида может быть получен по ряду причин, например, для оптимизации экспрессии кодона для конкретного хозяина (изменение кодонов в мРНК человека на предпочтительные для бактериального хозяина, такого как *E. coli*).

[0239] В другом аспекте предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотид по настоящему изобретению, функционально связанный с промотором, или содержащий полинуклеотид, кодирующий VH-область связывающей молекулы по настоящему изобретению, и полинуклеотид, кодирующий VL-область связывающей молекулы по настоящему изобретению, где указанные полинуклеотиды функционально ассоциированы с одним или несколькими промотором(ами). Используемый в данном документе термин "промотор" означает любую последовательность нуклеиновой кислоты, которая регулирует экспрессию полинуклеотидной последовательности путем управления транскрипцией полинуклеотидной последовательности. Используемые в данном документе термины "функционально ассоциированный" и "функционально связанный" означают, что промотор находится в правильном функциональном положении и/или ориентации по отношению к полинуклеотидной последовательности, которую он регулирует, для обеспечения контроля инициации транскрипции и/или экспрессии этой последовательности. В некоторых вариантах осуществления последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие VH-область и VL-область, функционально ассоциированы с одним и тем же промотором. В некоторых вариантах осуществления каждая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая VH-область и VL-область, функционально ассоциирована с отдельным промотором. В некоторых вариантах осуществления отдельные промоторы представляют собой промоторы одного и того же типа. В некоторых вариантах осуществления отдельные промоторы представляют собой промоторы разных типов.

[0240] Примеры векторов включают вирусные векторы, векторы экспрессии на основе "голой" ДНК или РНК, плазмиды, космиды или фаговые векторы, векторы экспрессии на основе ДНК или РНК, ассоциированные с катионными конденсирующими средствами, векторы экспрессии на основе ДНК или РНК, инкапсулированные в липосомы, и определенные эукариотические клетки, такие как клетки-продуценты. Сразу после сборки в вектор полинуклеотид по настоящему изобретению может быть функционально связан с промотором, подходящим для экспрессии полипептида в требуемом хозяине.

[0241] Вектор может содержать дополнительную(дополнительные) последовательность(последовательности) нуклеиновой кислоты(нуклеиновых кислот), которая(которые) контролирует(контролируют) экспрессию полинуклеотида. Например, вектор может содержать одну или несколько последовательностей энхансера и репрессора. Используемый в данном документе термин "энхансер" означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая связывает один или несколько белков с обеспечением усиления активации транскрипции полинуклеотида. Используемый в данном документе термин "репрессор" означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая связывает один или несколько белков с обеспечением снижения активации транскрипции полинуклеотида.

[0242] Другой аспект, предусмотренный в данном документе, представляет собой клетку-хозяина, содержащую полинуклеотид по настоящему изобретению или полинуклеотид, раскрытый в данном документе, или клетку-хозяина, содержащую вектор по настоящему изобретению или вектор, раскрытый в данном документе, где клетка-хозяин способна продуцировать полипептид, кодируемый полинуклеотидом или вектором.

[0243] Другой аспект, предусмотренный в данном документе, представляет собой способ получения связывающей молекулы по настоящему изобретению, включающий экспрессию полинуклеотида или вектора по настоящему изобретению в клетке-хозяине. Например, в некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина в условиях, подходящих для продуцирования связывающей молекулы по настоящему изобретению, кодируемой полинуклеотидом или вектором, присутствующим в клетке-хозяине.

[0244] Подходящие клетки-хозяева для экспрессии связывающей молекулы по настоящему изобретению включают клетки прокариотов, дрожжей, насекомых или высших эукариотов (предпочтительно, где полинуклеотид находится под контролем подходящих промоторов). Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например *E. coli* или палочковидные бактерии. Клетки высших эукариотов предусматривают стабильные линии клеток, происходящие от млекопитающих, описанные в данном документе. Можно также использовать бесклеточные системы трансляции. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку, которая не фукозилирует Fc-область связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку, которая экспрессирует фермент, который отклоняет путь получения фукозы в сторону получения GDP-D-рамнозы.

5.6 Аффукозилирование

[0245] Эффекторную функцию антитела можно модифицировать посредством

создания антител с измененными профилями гликозилирования. Например, можно получить антитело, которое характеризуется измененным типом гликозилирования, как, например, афукозилированное/гипофукозилированное антитело, характеризующееся сниженным количеством фукозильных остатков, или антитело, характеризующееся повышенным содержанием структур с GlcNac в точках ветвления. Было продемонстрировано, что такие измененные профили гликозилирования повышают способность антител к ADCC. Такие модификации углеводов можно осуществлять, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным аппаратом гликозилирования. Клетки с измененным аппаратом гликозилирования были описаны в данной области техники, и их можно применять в качестве клеток-хозяев, в которых можно экспрессировать рекомбинантные антитела по настоящему изобретению, чтобы, таким образом, получать антитело с измененным профилем гликозилирования. Например, в EP 1176195 описана линия клеток с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, таким образом, что для антител, экспрессированных в такой линии клеток, характерно гипофукозилирование. В публикации PCT WO 03/035835 описан вариант линии клеток CHO, клетки Lec13, со сниженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (см. также [5]). В публикации PCT WO 99/54342 описаны линии клеток, сконструированные с обеспечением экспрессии гликозилтрансфераз, модифицирующих гликопротеины (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), таким образом, что антитела, экспрессируемые в сконструированных линиях клеток, характеризуются повышенным содержанием структур с GlcNac в точках ветвления, что приводит к повышенной активности антител в отношении ADCC (см. также [6]). В WO 2011/035884 A1 описаны способы получения молекул, не содержащих фукозу в составе их гликозилированных фрагментов. В WO 2011/035884 A1, в частности, описаны клетки для продуцирования молекул, где клетки содержат по меньшей мере один фермент, использующий GDP-6-дезоксид-лихсо-4-гексулозу в качестве субстрата, где фермент превращает субстрат в GDP-D-рамнозу, GDP-D-перозамин, GDP-дезоксид-D-талозу, GDP-6-дезоксид-D-альтрозу или GDP-4-кетид-3,6-дидезоксид-D-маннозу.

5.7 Наборы и дополнительные анализы

[0246] В одном аспекте предусмотрен набор, содержащий связывающую молекулу по настоящему изобретению. Дополнительно охватывается применение указанного набора в способах по настоящему изобретению.

[0247] В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит

выделенный (например, очищенный) антиген или клетку, экспрессирующую антиген. Например, набор может дополнительно содержать выделенный (например, очищенный) CCR9 или клетку, экспрессирующую CCR9. В некоторых вариантах осуществления набор содержит один или несколько контейнеров. В некоторых вариантах осуществления набор содержит все компоненты, необходимые и/или достаточные для проведения анализа для выявления, описанного в данном документе, в том числе все контрольные образцы, указания для проведения анализов и любое необходимое программное обеспечение для анализа и представления результатов.

[0248] Связывающую молекулу по настоящему изобретению можно применять в анализах для иммуноспецифического связывания в любом способе, известном в данной области техники. Иммунологические анализы, которые можно применять, включают без ограничения системы конкурентного и неконкурентного анализа с использованием таких методик, как вестерн-блот, RIA, ELISA, ELISPOT, иммунологические "сэндвич"-анализы, анализы на основе иммунопреципитации, реакции преципитации, реакции диффузионной преципитации в геле, анализы на основе иммунодиффузии, анализы на основе агглютинации, анализы на основе фиксации комплемента, иммунорадиометрические анализы, флуоресцентные иммунологические анализы и иммунологические анализы с белком А.

[0249] Связывающую молекулу по настоящему изобретению можно применять в гистологических исследованиях, например в иммунофлуоресцентной, иммуноэлектронной микроскопии, или анализах, отличных от иммунологических, например, для выявления CCR9 или его консервативных вариантов или пептидных фрагментов *in situ*. Выявление *in situ* можно выполнять путем взятия у пациента гистологического образца и применения в отношении него меченой связывающей молекулы по настоящему изобретению, например, применения путем нанесения поверх биологического образца меченой связывающей молекулы. Благодаря применению такой процедуры можно определить не только присутствие CCR9 или его консервативных вариантов или пептидных фрагментов, но также их распределение в исследуемой ткани. Используя настоящее изобретение, специалисты средней квалификации в данной области техники без труда поймут, что любой из широкого спектра гистологических способов (таких как процедуры окрашивания) можно модифицировать для того, чтобы добиться такого выявления *in situ*.

**Таблица 3. Аминокислотная последовательность VH- и VL-областей
иллюстративных связывающих молекул по настоящему изобретению**

Связывающая молекула		Аминокислотная последовательность VL/VH	SEQ ID
AB243LO032 6	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMH WVRQAPGQGLEWIGVIYPGNSDTRYNQKFKGRVTIT RDTASTAYMELSSLRSED AVYYCTRDYYSNYVYY YAMDYWGQGTTVTVSS	51
	VL	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHPNRNTYL HWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGQGTKLEIK	52
AB243LO033 1	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMH WVRQAPGQGLEWIGVIYPGNSDTRYNQKFKGRVTIT RDTASTAYMELSSLRSED AVYYCTRDYYSNYVYY YAMDYWGQGTTVTVSS	51
	VL	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNTNTYL HWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGQGTKLEIK	53
AB1020243- fgl	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMH WVRQAPGQGLEWIGVIYPGNSDTRYNQKFKGRVTIT RDTASTAYMELSSLRSED AVYYCTRDYYSNYVYY YAMDYWGQGTTVTVSS	51
	VL	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNGNTYL HWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGQGTKLEIK	54
AB1020243	VH	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYTFTSYWMH WVKQRPGQGLEWIGVIYPGNSDTRYNQKFKGKAKLT AVTSATTAYMELSSLTNEDSAVYYCTRDYYSNYVYY YAMDYWGQGTSVTVSS	56
	VL	DVVMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY LHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVFFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIK	57
AB1020011	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSRKLSCAASGFTFRDYGMHW VRQAPERGLEWVAYINSGSSAIYYADTVKGRFTISR DNTKNTLFLQMTSLRSED TAMYCARAGTAYWGQGT LTVSA	58

Связывающая молекула		Аминокислотная последовательность VL/VH	SEQ ID
	VL	DVVMQTQTPLTSLSVTFGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYL NWLLQRPQGQSPKRLIYQVSRLD SGVPDRFTGSGSGTD FTLKIIRVEAEDLG VYYCWQGSHPRTFGGGGTKLEIK	59
AB1020229	VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMYW VRQAPGKGLEWVARIRSKSSNFATYYADSVKDRFTIS RDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVR GGSDYWGQGTTTLTVSS	60
	VL	DVVMQTQTPLSLSVTIGQPASISCKSCQCLLYSDGKTYL NWLQRPQGQSPKRLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETD FTLKISRVEAEDLG VYFCLQGTYYPYTFGSGGTKLEIK	61
AB1020227	VH	EVQLVESGGRLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMYW IRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRGGGFDYW GQGTTTLTVSS	62
	VL	DVVMQTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYL NWLQRPQGQSPKRLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETD FTLKISRVEAEDLG VYYCLQGTYYPFTFGTGTKLEIK	63
AB1020234	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSW VRQTPEKRLEWVATISDGGSYTYYPD NVKGRFTISRDN NAKNNLYLQMSHLKSEDTAMYYCAR DPRYYFDYWQGTTTLTVSS	64
	VL	DVVMQTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY LHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDLG VYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIK	65
AB1020264	VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMH WVKQRPGRGLEWIGRIDPNSGGTKYNEKFKSKATLT VDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGGLVYYFDY WGQGTTTLTVSS	66
	VL	DVVMQTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY LYWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFS GVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDLG VYFCFQGTHVPHTFGSGGTKLEIK	67

Связывающая молекула		Аминокислотная последовательность VL/VH	SEQ ID
AB1020283	VH	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCLVASGFSFSNYWMN WVRQSPEKGLEWVAQIRLKSDNYATHYAESVKGRFT ISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTERPF SYWGQ GTLVTVSA	68
	VL	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYL EWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELK	69
AB1020310	VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMH WVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKYNEKFKGKATLT SDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAR NGGRGYAMDYWGQGTSTVTVSS	70
	VL	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYL EWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIK	71
AB1020069	VH	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCLVASGFTFSNYWMN WVRQSPEKGLEWVAQIRLKSDNYATHYAESVKGRFT ISKDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTE RPFAYWGQGTSLVTVSS	74
	VL	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYL EWYLQKPGQSPKLLIYKVS KRLSGVPDRFSGSGSGTE FTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELK	75

Таблица 4. Аминокислотная последовательность CDR иллюстративных связывающих молекул

Связывающая молекула	CDR	Аминокислотная последовательность	SEQ ID	CDR	Аминокислотная последовательность	SEQ ID
AB243LO0 326	HCD	SYWMH	1	LCD	RSSQSLVHPNR	20
	R1			R1	NTYLH	
	HCD	VIYPGNSDTRYNQ	2	LCD	KVSNRFS	5
	R2	KFKG		R2		

Связываю щая молекула	CDR	Аминокислотная последовательность	SEQ ID	CDR	Аминокислотная последовательность	SEQ ID
	HCD R3	DYYSNYVYYYAM DY	3	LCD R3	SQSTHVPWT	6
AB243LOO 331	HCD R1	SYWMH	1	LCD R1	RSSQSLVHSNT NTYLH	21
	HCD R2	VIYPGNSDTRYNQ KFKG	2	LCD R2	KVSNRFS	5
	HCD R3	DYYSNYVYYYAM DY	3	LCD R3	SQSTHVPWT	6
AB1020243 -fgl	HCD R1	SYWMH	1	LCD R1	RSSQSLVHSNG NTYLH	22
	HCD R2	VIYPGNSDTRYNQ KFKG	2	LCD R2	KVSNRFS	5
	HCD R3	DYYSNYVYYYAM DY	3	LCD R3	SQSTHVPWT	6
AB1020243	HCD R1	SYWMH	1	LCD R1	RSSQSLVHSNG NTYLH	21
	HCD R2	VIYPGNSDTRYNQ KFKG	2	LCD R2	KVSNRFS	5
	HCD R3	DYYSNYVYYYAM DY	3	LCD R3	SQSTHVPWT	6
AB1020011	HCD R1	DYGMH	7	LCD R1	KSSQSLLDS DG KTYLN	10
	HCD R2	YINSGSSAIYYADT VKG	8	LCD R2	QVSR LDS	11
	HCD R3	AGTAY	9	LCD R3	WQGSHFPRT	12
AB102229	HCD R1	TYAMY	13	LCD R1	KSCQCLLYSDG KTYLN	16
	HCD R2	RIRSKSSNFATYYA DSVKD	14	LCD R2	QVSKLDP	17

Связываю щая молекула	CDR	Аминокислотная последовательность	SEQ ID	CDR	Аминокислотная последовательность	SEQ ID
	HCD R3	GGSDY	15	LCD R3	LQGTYYPYT	18
AB1020227	HCD R1	TYAMY	13	LCD R1	KSSQSLLYSDG KTYLN	25
	HCD R2	RIRSKSNNYATYY ADSVKD	23	LCD R2	QVSKLDP	17
	HCD R3	GGGFDY	24	LCD R3	LQGTYYPFT	26
AB1020234	HCD R1	SYAMS	27	LCD R1	RSSQSLVHSNG NTYLH	22
	HCD R2	TISDGGSYTYYPD VKG	28	LCD R2	KVSNRFS	5
	HCD R3	DPRYYFDY	29	LCD R3	SQSTHVPWT	6
AB1020264	HCD R1	SYWMH	1	LCD R1	RSSQSLVHSNG NTYLY	32
	HCD R2	RIDPNSGGTKYNEK FKS	30	LCD R2	RVSNRFS	33
	HCD R3	GGLVYYFDY	31	LCD R3	FQGTHVPHT	34
AB1020283	HCD R1	NYWMN	35	LCD R1	RSSQSIVHSNG NTYLE	38
	HCD R2	QIRLKSDNYATHY AESVKG	36	LCD R2	KVSNRFS	5
	HCD R3	RPFSY	37	LCD R3	FQGSHVPLT	39
AB1020310	HCD R1	SYVMH	40	LCD R1	RSSQSIVHSNG NTYLE	38
	HCD R2	YINPYNDGTKYNE KFKG	41	LCD R2	KVSNRFS	5

Связываю- щая молекула	CDR	Аминокислотная последовательность	SEQ ID	CDR	Аминокислотная последовательность	SEQ ID
	HCD R3	NGGRGYAMD	42	LCD R3	FQGSHVPPT	43
AB1020069	HCD R1	NYWMN	35	LCD R1	RSSQSIVHSNG NTYLE	38
	HCD R2	QIRLKSDNYATHY AESVKG	36	LCD R2	KVSKRLS	50
	HCD R3	RPFAY	49	LCD R3	FQGSHVPL	39

5.8 ПРИМЕР 1 - Экспрессия CCR9 в различных клетках и тканях

[0250] Клетки выделяли из различных тканей у человека и из яванского макака. Долю клеток из заданной ткани и/или заданного типа клеток, которые экспрессировали CCR9, определяли с применением проточной цитометрии.

[0251] Как проиллюстрировано на **фигуре 1А**, клетки, экспрессирующие как CCR9, так и CD4, обнаружили в ободочной кишке, подвздошной кишке и тимусе в ткани как человека, так и яванского макака, и также обнаружили в брыжеечном лимфатическом узле в ткани яванского макака. В отличие от этого, в крови CCR9+ CD4+ клетки присутствовали только на низком уровне. Также было обнаружено, что мРНК CCR9 экспрессировалась совместно с CD3+ клетками подвздошной кишки яванского макака (данные не показаны).

[0252] Экспрессию CCR9 оценивали в ткани человека. Самую большую долю клеток, экспрессирующих CCR9, обнаружили среди CD4+ Т-клеток тимуса (76% клеток, экспрессирующих CCR9), при этом высокие уровни также наблюдаются среди CD4+ Т-клеток (47% клеток, экспрессирующих CCR9) и CD8+ Т-клеток (37% клеток, экспрессирующих CCR9) подвздошной кишки пациентов с IBD. Некоторый уровень экспрессии CCR9 также наблюдался в клетках ободочной кишки пациентов с IBD, которые представляли собой CD4+ Т-клетки (9% клеток, экспрессирующих CCR9) или CD8+ Т-клетки (12% клеток, экспрессирующих CCR9), при этом среди CD4+ и CD8+ Т-клеток в крови пациентов с IBD присутствовало только небольшое число клеток, экспрессирующих CCR9 (< 5%). Экспрессию CCR9 наблюдали в 28% В-клеток в крови, при этом она была на более низком уровне (11% и 16% соответственно) среди В-клеток в ободочной кишке и подвздошной кишке. Только очень небольшое число моноцитов, дендритных клеток (DC) и плазмцитоподобных дендритных клеток (pDC) экспрессировали CCR9 (< 5%).

[0253] На **фигуре 1В** показана процентная доля В-клеток, экспрессирующих CCR9,

в подвздошной кишке (левый график) и ободочной кишке (правый график) у здоровых людей и пациентов с IBD. Для каждого типа В-клеток (необученная В-клетка, В-клетка памяти, плазматическая клетка) результаты у здоровых субъектов представлены слева, а результаты для пациентов с IBD представлены справа. Было обнаружено, что при IBD происходило снижение числа В-клеток, экспрессирующих CCR9, при этом самое большое снижение наблюдалось среди В-клеток памяти. Высказывается гипотеза, что это может быть обусловлено высоким уровнем экспрессии лиганда CCR9, запускающего интернализацию рецепторов при IBD.

[0254] На **фигуре 1С** показана процентная доля эффекторных Т-клеток и регуляторных Т-клеток, которые экспрессируют CCR9, из ободочной кишки или подвздошной кишки здоровых субъектов или от пациентов с IBD. Для каждого указанного типа ткани % эффекторных Т-клеток, экспрессирующих CCR9, показан слева, а % Treg, экспрессирующих CCR9, показан справа. Было обнаружено, что ни в одном типе ткани не отмечено явное различие в соотношении эффекторные Т-клетки/Treg между здоровыми людьми и пациентами с IBD.

5.9 ПРИМЕР 2 – Ассоциация CCR9 с экспрессией провоспалительных цитокинов

[0255] Совместную экспрессию провоспалительных цитокинов IFN- γ , IL-4 и IL-17 оценивали в CD4⁺ CCR9⁺ и CD4⁺ CCR9⁻ клетках человека с применением проточной цитометрии. Клетки выделяли из ободочной кишки или подвздошной кишки человека и обрабатывали РМА/иономицином и брефелдином А (ингибитором транспорта белков) в течение 4 часов для стимуляции продуцирования цитокинов. CD4⁺ Т-клетки идентифицировали путем гейтирования по одиночным живым клеткам, которые являлись CD45⁺, CD3⁺ и CD8⁻. Было обнаружено, что CD4⁺ CCR9⁺ клетки экспрессируют более высокие уровни провоспалительных цитокинов, чем CD4⁺ CCR9⁻ клетки (**фигура 2А**). Различие в уровнях между CD4⁺ CCR9⁻ клетками и CD4⁺ CCR9⁺ клетками было самым большим для экспрессии IL-17 (увеличение в диапазоне от двукратного до шестикратного), хотя в случае как IL-4, так и IFN- γ среднее различие оставалось примерно двух-трехкратным (**фигура 2В**).

5.10 ПРИМЕР 3 - Получение антител к CCR9

[0256] Антитела к CCR9 получали с применением технологии гибридомы после иммунизации мышей CD1 поочередно линиями клеток НЕК, сверхэкспрессирующими CCR9 человека и CCR9 мыши. Использовали три группы мышей. В случае с группой 1 мышей иммунизировали поочередно клетками CHO и НЕК, сверхэкспрессирующими hCCR9; мышей в группе 2 иммунизировали поочередно клетками НЕК, сверхэкспрессирующими hCCR9, и клетками НЕК, сверхэкспрессирующими mCCR9;

мышей в группе 3 иммунизировали клетками НЕК, сверхэкспрессирующими mCCR9. Линии рекомбинантных клеток вводили из расчета 1×10^7 клеток/100 мкл, разведенных в PBS, эмульгированных с равными объемами полного адьюванта Фрейнда, и вводили инъекцией мышам в два участка, по 100 мкл на участок. Для следующих трех инъекций клетки эмульгировали в неполном адьюванте Фрейнда, и инъекции проводили, как указано выше. Последнюю бустер-инъекцию выполняли в день 24 путем введения внутрибрюшинной инъекцией 200 мкл клеток в PBS.

[0257] Образцы крови из хвостовой вены получали от мышей перед иммунизацией, в день 13 после первой иммунизации и в день 20 после второй иммунизации. Титры IgG к CCR9 человека, CCR9 мыши и исходным клеткам НЕК и CHO определяли с помощью ELISA сыворотки крови. Животных с самыми высокими антигенспецифическими титрами использовали далее для получения гибридомы.

5.10.1 Оценка иммунного ответа мышей на hCCR9 и mCCR9

[0258] Титры IgG к hCCR9 и mCCR9 в сыворотке крови отдельных мышей определяли с помощью ELISA. Линиями клеток НЕК и CHO с hCCR9 и mCCR9, описанными выше, наряду с исходными клетками НЕК и CHO покрывали 96-луночные титрационные микропланшеты с поли-D-лизином из расчета 40000 клеток/лунка и культивировали на протяжении ночи при 37°C в инкубаторе с CO₂. После инкубации на протяжении ночи надосадочную жидкость удаляли, и клетки фиксировали в течение 5 мин в 3,7% растворе формальдегида/PBS при к. т. Все последующие инкубации проводили при комнатной температуре. После удаления раствора формальдегида лунки затем блокировали путем добавления блокирующего буфера на основе 3% Marvel/PBS. Спустя 1 ч блокирующий буфер удаляли, лунки снова промывали с помощью PBS, и добавляли образцы сыворотки крови в виде серии разведений (50 мкл на лунку, начиная с разведения 1:200). После инкубации в течение 1 ч лунки трижды промывали с помощью PBS, дополненного 0,05% (об./об.) Tween 20. Затем в лунки добавляли меченное европием антитело к IgG мыши с концентрацией 1:500 в буфере для анализа Delfia (Perkin Elmer) из расчета 50 мкл на лунку. После дополнительной 1-часовой инкубации и пяти промывок, проводимых, как описано выше, в лунки добавляли усиливающий раствор (Perkin Elmer) из расчета 50 мкл на лунку, планшеты инкубировали при к. т. в течение 10 мин на орбитальном шейкере. Затем планшеты прочитывали с применением многоканального планшет-ридера PerkinElmer EnVision 2103.

[0259] На график наносили кривые титрования сыворотки крови для hCCR9, mCCR9, а также исходных клеток НЕК и CHO, и рассчитывали соответствующую площадь под кривыми (AUC).

5.10.2 Выделение моноклональных IgG мыши

[0260] Через четыре дня после последней бустер-инъекции лимфатические узлы асептически собирали, и клетки выделяли путем механического разрушения и подсчитывали. Эти клетки смешивали с клетками миеломы SP2/0 и подвергали слиянию с применением устройства для электрослияния. Полученные продукты слияния смешивали с полутвердой средой на основе метилцеллюлозы и высевали на планшеты OmniTray. Полутвердая среда содержала CloneMatrix и DMEM, дополненную 20% FCS, 10% BM Condimed H1, 1 mM пирувата натрия и добавкой среды OPI, 2% гипоксантином/азасерином и конъюгированным с FITC антителом козы к IgG мыши. Клетки в полутвердой среде культивировали в течение 13 дней при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. Во время этого периода инкубации из одиночных гибридомных клеток-предшественников образуются клональные колонии. Эти колонии секретируют IgG, который улавливается в непосредственной близости от колонии конъюгированным с FITC антителом к IgG, присутствующим в полутвердой среде. Происходящее в результате образование иммунных комплексов можно наблюдать вокруг клетки в виде флуоресцентного "ореола" при визуализации с помощью сортировщика колоний ClonePix FL (Molecular Devices). Затем эти окруженные ореолом колонии отсортировывали в 96-луночные титрационные микропланшеты.

[0261] После 3-5 дней культивирования образцы надосадочной жидкости отсортированных колоний собирали и подвергали скринингу в отношении связывания CCR9.

5.10.3 Секвенирование ДНК и очистка IgG мыши

[0262] Матричную РНК (мРНК) экстрагировали из гибридомных клеток с применением магнитных частиц с олигонуклеотидами (dT) и подвергали обратной транскрипции в кДНК. ПЦР-амплификацию проводили с применением поли-С и праймеров для константной области, VH или VL, специфичных для всех подклассов IgG мыши.

5.10.4 Процедуры очистки IgG мыши

[0263] Клетки размножали в 24-луночных планшетах и выращивали в бессывороточной среде HL-1, дополненной HyperZero и глутамином. Спустя 10 дней образцы надосадочной жидкости переносили в 96-луночные планшеты Masterblock, и IgG мыши всех подклассов (IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3) очищали из образцов надосадочной жидкости разросшейся культуры клеток на смоле ProPlus (Phynexus) с применением MiniTrack от Perkin Elmer. Захваченные IgG мыши элюировали с помощью 75 мкл 100 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 3,0, затем нейтрализовали равным объемом 200 mM HEPES, pH 8,0. Очищенные IgG количественно определяли с использованием показаний оптической плотности при 280 нм в 384-луночном планшете UV-Star.

5.10.5 Изменение формата IgG мыши

[0264] Гибридомные клоны IgG мыши подвергали изменению формата на молекулярном уровне с получением конструкций, экспрессирующих VH- и VL-домены мыши и соответствующие константные домены IgG мыши для каждой гибридомы, по сути согласно описанному в Persic *et al* 1997 [7] со следующими модификациями. Фрагмент OriP включали в векторы экспрессии для облегчения использования в клетках СНО для транзientной трансфекции и для обеспечения возможности эписомной репликации. VH-домен клонировали в соответствующий вектор, содержащий константные домены тяжелой цепи мыши и регуляторные элементы, для экспрессии целой тяжелой цепи IgG1 в клетках млекопитающих. Подобным образом VL-домен клонировали в вектор для экспрессии соответствующих константных доменов легкой цепи (лямбда или каппа) мыши, который содержал регуляторные элементы, для экспрессии целой легкой цепи IgG в клетках млекопитающих. Для получения IgG клетки млекопитающих СНО в виде суспензии транзientно трансфицировали векторами с тяжелой и легкой цепью IgG. IgG экспрессировались и секретировались в среду. Собранный материал фильтровали перед очисткой, затем IgG очищали с применением хроматографии с белком А. Образцы надосадочной жидкости культуры загружали в колонку соответствующего размера с белком А Ceramic (Pall 20078-036) и промывали с помощью 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 250 mM NaCl. Связанный IgG элюировали из колонки с применением 0,1 М цитрата натрия (pH 3,0) и нейтрализовали добавлением Tris-HCl (pH 9,0). В элюированном материале осуществляли замену буфера на PBS с применением колонок Nap10 (GE Life Sciences, 17-0854-02), и концентрацию IgG определяли спектрофотометрически с использованием коэффициента экстинкции на основе аминокислотной последовательности IgG [8]. Очищенный IgG анализировали в отношении чистоты с применением SDS-PAGE. Очищенные IgG подвергали скринингу в отношении связывания с CCR9 человека на клетках НЕК.

[0265] На **фигуре 3** показаны аминокислотные последовательности в последовательностях вариабельной области тяжелой цепи (**фигура 3А**) и вариабельной области легкой цепи (**фигура 3В**) для девяти уникальных хитов, идентифицированных в этом скрининге. кДНК для AB1020243, например, получали из клона ZY10OI-A02, и определяли последовательность для VH- и VL-доменов. FW = каркасная область. Подчеркнуты местоположения CDR, на которые указывает отнесение по Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Последовательности VH и VL гуманизированного AB1020243 (AB1020243-fgl) проиллюстрированы на **фигуре 4**, где они выровнены с исходными химерными последовательностями.

[0266] Чтобы дополнительно улучшить активность и эффективность AB1020243, проводили направленный сканирующий мутагенез CDR Н- и L-цепей. CDR подвергали мутации посредством сайт-направленного мутагенеза векторов экспрессии для клеток млекопитающих с помощью смесей кодонов с нуклеотидами, смещенными к низкому уровню избыточности (NNC), разработанных для увеличения до максимума численности альтернативных аминокислот (aa) и в то же время исключения нежелательных аминокислот (Met, Trp) из библиотеки. Получали 566 вариантов CDR и создавали CDR-оптимизированные версии гуманизированного AB1020243. Библиотеку скрининга экспрессировали в клетках CHO из 24-луночных планшетов с глубокими лунками перед очисткой вариантов с помощью белка А. После идентификации улучшенных вариантов проводили рекомбинацию внутри и между CDR посредством сайт-направленного мутагенеза, чтобы скомбинировать благоприятные варианты в конечные лидерные антитела-кандидаты в виде афукозилированного huIgG1. Последовательности VH и VL для CDR-оптимизированных антител AB243LO0331 и AB243LO0326 проиллюстрированы на **фигуре 4**, где они выровнены с исходными последовательностями из AB1020243 и с гуманизированной формой AB1020243. Остатки LCDR1, которые были модифицированы, показаны жирным начертанием, подчеркнутым текстом.

5.11 ПРИМЕР 4 - Оценка связывания CCR9 и активности

5.11.1 Связывание с клетками

[0267] Связывание антител с клетками, экспрессирующими CCR9, оценивали с применением клеток НЕК, сверхэкспрессирующих CCR9А человека, или с применением клеток Molt4. Линия клеток Molt4 получена из Т-клеток человека и, как известно, экспрессирует CCR9 [9]. Тестируемые антитела разводили до концентрации, составляющей 10 мкг/мл в PBS, дополненном 1% фетальной бычьей сывороткой. Антитела титровали одновременно с применением титрований с трехкратным разведением по 8 точкам в 96-луночном планшете, и клетки окрашивали при 4°C в течение 20 мин. Клетки промывали и окрашивали конъюгированным с РЕ вторичным антителом козы к IgG мыши или человека с концентрацией 2,5 мкг/мл в стерильном PBS + 1% сыворотка FBS при 4°C в течение 20 минут.

[0268] На **фигуре 5А** показано, что по меньшей мере AB1020243, AB1020229 и AB1020011 связывались с клетками Molt4. Связывание с клетками Molt4 сравнивали со связыванием с клетками Jurkat, которые не экспрессируют CCR9 человека. Как проиллюстрировано на **фигуре 5В**, связывание с клетками Molt4 было аналогично тому, что наблюдали на **фигуре 5А**, при этом значительного связывания с клетками Jurkat не выявили.

[0269] Антитело AB1020243 (гибридомный mIgG) также тестировали в отношении связывания с разными формами CCR9. Вкратце, тестируемое антитело разводили до концентрации, составляющей 60 мкг/мл, в буфере для анализа, содержащем сбалансированный солевой раствор Хэнкса (Sigma HB264) вместе с 0,1% бычьим сывороточным альбумином (Sigma A9576). Антитело титровали в двух повторностях с применением титрований с однократным разведением по 24 точкам в 384-луночном черном несвязывающем микропланшете с прозрачным дном (Corning[®], NBS[™] 3655), так что конечный объем тестируемого антитела составлял 10 мкл на лунку. Вторичное детекторное антитело к IgG (H+L) человека, меченное Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch; 209-665-082), получали в соответствии с инструкциями производителя и разводили 1:1000 в буфере для анализа, как описано выше. Вторичное детекторное антитело распределяли в планшет для анализа, содержащий тестируемые антитела, с применением диспенсера Multidrop (Thermo Scientific) в объеме, составляющем 10 мкл на лунку.

[0270] Трансфицированные линии клеток НЕК, сверхэкспрессирующие CCR9, или нетрансфицированные исходные контрольные клетки суспендировали в буфере для анализа при концентрации, составляющей 1×10^6 клеток на мл, и 10 мкл клеток распределяли в планшет для анализа, содержащий тестируемое антитело и вторичное антитело, с применением диспенсера Multidrop (Thermo Scientific). Планшеты для анализа инкубировали на протяжении ночи при 4°C и прочитывали на Mirroball[®] (флуоресцентный цитометр с лазерным сканированием; TTP-Labtech) с использованием возбуждения при 488 нм и испускания с использованием канала FL4 (667-685 нм). Данные наносили на график в GraphPad Prism версии 8.0.0 для Windows (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США) и выражали в виде зависимости количества импульсов флуоресценции (FL4) от Log (мг/мл антитела). Как проиллюстрировано на **фигуре 6**, показано хорошее связывание AB1020243 с обеими формами CCR9 человека (CCR9A и CCR9B) и с CCR9 яванского макака. Показано небольшое связывание с CCR9 мыши или крысы или его отсутствие.

5.11.2 Биологический анализ ADCC in vitro

[0271] Активность и эффекторную функцию антител оценивали с применением анализа активации NK-клеток следующим образом. Все анализы активности проводили при соотношении эффекторов (клетки NK-92MI, экспрессирующие CD16a под управлением NFAT) и мишеней (Molt4; клетки НЕК, сверхэкспрессирующие CCR9, или клетки Jurkat), составляющем 5:1. Линия эффекторных клеток NK-92 в естественном состоянии не экспрессирует рецептор FcγRIIIa (CD16). Использовали модифицированную форму NK-92, которая сверхэкспрессирует высокоаффинный (ha) рецептор FcγRIIIa CD16

V158, характеризующийся повышенным связыванием с Fc-доменами (Boissel et al Proceedings of the 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2016 Apr 16-20; New Orleans, LA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2016;76(14 Suppl):Abstract 2302). Этот рецептор позволяет NK-клеткам перекрестно связываться с клетками-мишенями посредством антитела, которое связалось с клетками-мишенями. Используемые клетки NK-92 также экспрессируют репортер NFAT-люцифераза, который может применяться в качестве косвенного показателя эффекторной функции. Связывание антитела, связанного с мишенью, с NK-клеткой индуцирует активацию транскрипционного фактора NFAT, который запускает ген люциферазного репортера. Сигнал люминесценции является пропорциональным активности ADCC.

[0272] Как клетки-мишени, так и эффекторные клетки получали в среде для анализа, содержащей улучшенную RPMI (Gibco™; 12633) с 10% FBS со сверхнизким содержанием IgG (Gibco™; 16250-078). Клетки-мишени ресуспендировали при концентрации 8×10^5 клеток на мл, а эффекторные клетки ресуспендировали при концентрации 8×10^6 клеток на мл. Тестируемые антитела разводили до концентрации, составляющей 60 мкг/мл, и проводили титрования с 4-кратным разведением по 12 точкам в двух повторностях на 384-луночном полипропиленовом микропланшете (Greiner Bio-One International; 781280).

[0273] Клетки-мишени распределяли в 384-луночные белые планшеты с прозрачным дном, обработанные для культивирования тканей (Corning® 3560), с применением диспенсера Multidrop (Thermo Scientific) в объеме, составляющем 12,5 мкл на лунку. Затем тестируемые антитела (6,25 мкл на лунку) добавляли в планшеты, содержащие клетки-мишени, с применением автоматизированной платформы для дозирования жидкостей Bravo (Agilent). Клетки-мишени и антитела предварительно инкубировали в течение 30 минут при 37°C в инкубаторе с O₂/CO₂. Затем добавляли эффекторные клетки с применением диспенсера Multidrop (Thermo Scientific) в объеме, составляющем 6,25 мкл на лунку. Планшеты для анализа, содержащие клетки-мишени, эффекторные клетки и антитела, инкубировали в течение дополнительных 5 часов при 37°C в инкубаторе с O₂/CO₂.

[0274] В конце периода инкубации получали реагент для выявления люциферазы в соответствии с инструкциями производителя (система для люциферазного анализа Steady-Glo®; Promega E2520), и по 25 мкл распределяли в каждую лунку с применением ручного пипетирования. Планшеты для анализа покрывали фольгой и оставляли для прохождения лизиса в течение 20 минут при комнатной температуре на шейкере для планшетов. Планшеты для анализа прочитывали на многорежимном планшет-ридере EnVision® 2105 (Perkin Elmer) с применением режима сверхчувствительной люминесценции. Данные

анализировали в GraphPad Prism версии 8.0.0 для Windows (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США) с использованием четырехпараметрического логистического уравнения зависимости ответа от $\log$ (агониста). Данные выражали в виде зависимости ответа (числа импульсов в секунду) от $\log$ (молярной) концентрации антитела.

[0275] На **фигуре 7** показана активация NK-клеток с помощью (афукозилированных) антител, когда они связаны с клетками MOLT4/НЕК. Афукозилированные формы антител получали из двойной кассеты экспрессии, в которой экспрессия тяжелой цепи IgG проходила совместно с экспрессией фермента RMD для получения афукозилированного белка в клетках CHO. Активность афукозилированного антитела AB1020243, когда оно было связано с клетками НЕК, экспрессирующими CCR9A человека, была измерена как составляющая 0,5 нМ. Активность гуманизированного афукозилированного антитела AB1020243, когда оно было связано с клетками Molt4, была измерена как составляющая 0,8 нМ.

5.11.3 Анализ уничтожения PBMC

[0276] Антитела подвергали серийному титрованию (с 10-кратным разведением) при начальной концентрации, составляющей 10 мкг/мл, по 8 точкам. Антитела добавляли к 1×10^6 мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека в 96-луночном планшете с и-образным дном и инкубировали на протяжении ночи. На следующий день процентную долю оставшихся CD4 T-клеток, экспрессирующих CCR9, определяли с помощью проточной цитометрии с применением неконкурирующего антитела к CCR9. Последовательности VH/VL и CDR неконкурирующего антитела показаны в **таблице 5** и **таблице 6**. Как проиллюстрировано на **фигуре 8**, все из антител AB1020243, AB1020229 и AB1020011 демонстрировали уничтожение CCR9+ PBMC. EC50 ($n = 4$) для афукозилированного AB1020243 была измерена как составляющая 2,6 нМ.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности областей VH и VL неконкурирующего антитела к CCR9

Связываю щая молекула		Аминокислотная последовательность VL/VH	SEQ ID
AB102010 5	VH	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFNKYWMN WVRQSPEKGLEWVWVQIKLKSDNYATHYAESVKGRF AISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTLRPFTYW GQGTSLTVSA	72
	VL	DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIHSNGNTYL EWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGT	73

Связывающая молекула		Аминокислотная последовательность VL/VH	SEQ ID
		DFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKLE IK	

Таблица 6. Аминокислотные последовательности CDR неконкурирующего антитела к CCR9

Связывающая молекула	CDR	Аминокислотная последовательность	SEQ ID	CDR	Аминокислотная последовательность	SEQ ID
AB1020105	HCD R1	KYWMN	44	LCD R1	RSSQSIHSNGN TYLE	47
	HCD R2	QIKLKSDNYATH YAESVKG	45	LCD R2	KVSNRFS	5
	HCD R3	RPFTY	46	LCD R3	FQGSHVPWT	48

Таблица 7. Аминокислотные последовательности константной области тяжелой и легкой цепей

Константная область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID
Тяжелая цепь	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFNCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	78
Легкая цепь	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEEKHKV YACEVTHQGLSPVTKSFN	79

	RGEC	
--	------	--

5.12 ПРИМЕР 5 - Свойства гуманизированного AB1020243

[0277] Гуманизированное AB1020243 получали, как описано в примере 3. Во всех экспериментах, описанных далее в данном документе, гуманизированное AB1020243 было представлено в афукозилированной форме, полученной из двойной кассеты экспрессии, в которой экспрессия тяжелой цепи IgG проходила совместно с экспрессией GDP-6-дезоксид-ликсо-4-гексулозоредуктазы (RMD) для получения афукозилированного белка в клетках СНО.

5.12.1 Перекрестная реактивность гуманизированного AB1020243 с CCR9

[0278] Связывание исходного антитела AB1020243 (химерного) сравнивали со связыванием гуманизированной версии на основе способов, описанных в примере 4.

[0279] Как проиллюстрировано на **фигуре 9**, гуманизированное антитело ("человеческое") сохраняло связывание, аналогичное исходному AB1020243 ("химерному"), с CCR9 яванского макака и клетками НЕК, экспрессирующими CCR9В человека (**фигура 9А** и **фигура 9В**). Не наблюдали значительного связывания с исходной линией клеток НЕК JI, которые не экспрессируют CCR9 (**фигура 9G**). Даже при более высоких концентрациях гуманизированное AB1020243 демонстрировало отсутствие значительного нецелевого связывания с CXCR1 (**фигура 9C**), CXCR2 (**фигура 9D**), CCR5 (**фигура 9E**) или CCR8 (**фигура 9F**).

5.12.2 Гуманизированное AB1020243 сохраняет высокую активность

[0280] Гуманизация AB1020243 неожиданно привела к отсутствию значительного изменения активности в анализе активации НК-клеток (**фигура 10**). Химерные и гуманизированные формы афукозилированного AB1020243 приводили к одинаковой степени активации линии клеток НК-92, описанной выше, с применением клеток MOLT4. Это отличается от эталонного афукозилированного антитела IgG1 мыши к CCR9 (3C3, ATCC HB-12653), для которого наблюдали большое снижение активности после гуманизации. Аналогичным образом, гуманизация не приводила к изменению активности афукозилированного AB1020243, связанного с клетками НЕК, сверхэкспрессирующими CCR9А яванского макака.

[0281] Также было обнаружено, что кинетические свойства афукозилированного антитела AB1020243 не изменялись значительно при гуманизации. Измерения на живых CCR9+ клетках выполняли с применением флуоресцентно меченных антител с помощью технологии LigandTracer. Вкратце, значения аффинности на клетке измеряли на приборе LigandTracer (Ridgeview Instruments) с применением детектора флуоресценции при 633 нм при комнатной температуре (~22°C). IgG в формате IgG1 человека специфично метили

флуорофором малеимидом DyLight 650 по сконструированному остатку цистеина в CH₂-области IgG. Меченый IgG добавляли на круглый планшет с Nunclon D с предварительно прикрепленными отдельными пятнами исходных клеток CHO K1 (контроль) и клеток CHO K1, экспрессирующих CCR9. Профили флуоресценции при связывании и диссоциации IgG измеряли на приборе и затем анализировали с помощью модели аппроксимации бивалентного (1:2) типа в программном обеспечении TraceDrawer (Ridgeview Instruments). Скорость диссоциации (k_d) афукозилированного AB1020243 была измерена как составляющая $3,85 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$, и она оставалась сходной после гуманизации, будучи измеренной как составляющая $4,3 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$. Это соответствует тому, что после гуманизации не наблюдается снижение активности (**фигура 10B**).

5.12.3 Способность конкурировать с CCL25

[0282] Гуманизированное AB1020243 тестировали в отношении его способности конкурировать с CCL25 в анализе HTRF IP-One Gq (Cis-Bio; 62IPAPЕВ). Анализ IP-One представляет собой конкурентный иммуноанализ, в котором применяется меченное криптом тербия Mab к IP1 и d2-меченный IP1. IP1 представляет собой последующий метаболит каскада IP, и он накапливается в клетках после активации рецептора Gq и является стабильным в присутствии LiCl. LiCl добавляют в буфер для стимуляции клеток, что вызывает накопление IP1 после активации рецепторов.

[0283] У тестируемых антител осуществляли замену буфера на буфер IP-One (раствор Кребса-Рингера + LiCl), и их подвергали серийному разведению от чистого вещества в буфере IP-One с применением серии разведений "один плюс один" по 16 точкам (в трех повторностях) в 384-луночном полипропиленовом микропланшете (Greiner Bio-One International; 781280), и 3,5 мл каждого антитела добавляли в белые 384-луночные мелкие планшеты (Costar; 4513) с применением автоматизированной платформы для дозирования жидкостей Bravo (Agilent). Клетки MOLT4 собирали и ресуспендировали в буфере для анализа IP-One до $5,4 \times 10^6$ клеток/мл, и 7,5 мкл клеток распределяли в планшеты, содержащие антитело, с применением диспенсера Multidrop (Thermo Scientific), так что конечная концентрация клеток составляла 40000 клеток/лунка. Антитела предварительно инкубировали с клетками в течение 30 минут. Рекомбинантный белок CCL25/TECK человека (R&D Systems; 9046-TK) восстанавливали до 200 нМ в соответствии с инструкциями производителя, и 3,5 мкл распределяли в планшеты, содержащие антитело и клетки, с применением диспенсера Multidrop (Thermo Scientific), так что конечная концентрация в анализе составляла 50 нМ. Планшеты для анализа инкубировали при 37°C в течение 90 минут перед проведением обработки в соответствии с протоколом HTRF IP-One с применением реагентов, предоставленных с набором. На **фигуре 11** показано, что

гуманизированное AB1020243 и CDR-оптимизированные антитела 234LO0331 и 243LO0326 сохраняют способности конкурировать с CCL25, сходные с таковыми у исходного химерного антитела AB1020243. Следовательно, антитела по настоящему изобретению отличаются от ранее описанных антител мыши к CCR9 92R и 91R, которые, например, не ингибируют миграцию CCR9+ клеток MOLT-4, индуцированную CCL25, и только частично конкурируют с CCL25 за связывание с клетками MOLT-4 [4].

5.13 ПРИМЕР 6 - Свойства CDR-оптимизированных антител

[0284] CDR-оптимизированные формы гуманизированного AB1020243 получали, как указано в примере 3. Во всех экспериментах, описанных в данном документе, CDR-оптимизированные антитела были представлены в афукозилированной форме. CDR-оптимизированные антитела форматировали для снижения риска дезамидирования Asn в LCDR1.

5.13.1 Связывание CCR9

[0285] CDR-оптимизированное AB1020243 тестировали в отношении его способности связываться с различными формами CCR9 и с различными типами клеток на основе способов, описанных в примере 4. Как проиллюстрировано на **фигуре 12**, 243LO0326 и исходное антитело AB1020243 демонстрировали сходное связывание с обоими из изоформ CCR9A и CCR9B человека и с CCR9A яванского макака. Оба из 243LO0326 и 243LO0331 не демонстрировали значительного связывания с любым из CCR9 мыши или крысы даже при высоких концентрациях (данные не показаны). 243LO0326 и исходное антитело AB1020243 также не демонстрировали какое-либо нецелевое связывание с рецептором CCR5, CCR8, CXCR1 или CXCR2.

5.13.2 Аффинность

[0286] Как показано на **фигуре 13А**, 243LO0326 оставалось связанным с мембраной на протяжении более длительного периода времени, при этом большинство антител оставалось на клеточной поверхности через 5 часов при 37°C. Для сравнения, количество исходного антитела AB1020243, связанного с клеточной поверхностью, значительно падало за первый час. Аффинность (K_D) была измерена с применением LigandTracer как составляющая 0,09 нМ для 243LO0326 и 3,4 нМ для AB1020243. Вкратце, значения аффинности на клетке измеряли на приборе LigandTracer (Ridgeview Instruments) с применением детектора флуоресценции при 633 нм при комнатной температуре (~22°C). IgG в формате IgG1 человека специфично метили флуорофором малеимидом DyLight 650 по сконструированному остатку цистеина в CH2-области IgG. Меченый IgG добавляли на круглый планшет с Nunclon D с предварительно прикрепленными отдельными пятнами исходных клеток CHO K1 (контроль) и клеток CHO K1, экспрессирующих CCR9. Профили

флуоресценции при связывании и диссоциации IgG измеряли на приборе и затем анализировали с помощью модели аппроксимации бивалентного (1:2) типа в программном обеспечении TraceDrawer (Ridgeview Instruments).

[0287] Как показано на **фигуре 13B**, при обработке антителом наблюдали только небольшое снижение уровня рецептора CCR9 на мембране. Для сравнения, обработка с помощью CCL25 индуцировала существенное снижение уровня рецептора CCR9 на мембране. Дополнительно показано, что антитела к CCR9 были способны предотвращать интернализацию, индуцированную CCL25 (**фигура 19**).

5.13.3 Активность

[0288] CDR-оптимизированное AB1020243 тестировали в отношении его способности индуцировать активацию NK-клеток и уничтожение РВМС, как описано в примере 4. На **фигуре 14A** показаны эффекты антител в анализе активации NK-клеток. Было обнаружено, что 243LO0326 было более активным, чем исходное антитело AB1020243. На **фигуре 14B** показано уничтожение РВМС под действием 243LO0326 и под действием исходного антитела AB1020243. 243LO0326 демонстрировало улучшенную активность с EC50, составляющей 4 пМ, по сравнению с EC50, составляющей 200 пМ, для AB1020243. На **фигуре 14C** показано, что 243LO0346 характеризуется аналогичной способностью индуцировать уничтожение CD4⁺ CCR9⁺ РВМС как человека, так и яванского макака, при этом измеренная EC50 составляла 4-5 пМ при использовании РВМС человека, и EC50 составляла 30 пМ при использовании РВМС яванского макака.

5.13.4 Афукозилирование

[0289] Афукозилирование антител к CCR9 приводит к усилению уничтожения клеток, как показал анализ активации NK-клеток для ADCC (**фигура 15A**). Влияние уровня фукозилирования на активность антитела (243LO0326) оценивали в исследовании с постепенным повышением степени фукозилирования с применением биологического анализа ADCC in vitro (см. раздел 5.11.2). Активность ADCC у антитела сохранялась по сравнению со 100% афукозилированными молекулами вплоть до приблизительно 10% фукозилирования. Приемлемая активность сохранялась при фукозилировании, составляющем вплоть до 50% (**фигура 15B**).

Таблица 8. Активность ADCC у фукозилированных молекул по сравнению с афукозилированными – исследование с постепенным повышением

Образец ¹	% RP (95% CI) ²

Тох (SP21-051)	102% (83- 125%)
~ 5% фукозилирование	103% (88- 121%)
~ 10% фукозилирование	102% (86- 121%)
~ 20% фукозилирование	75% (62- 91%)
~ 50% фукозилирование	50% (42- 59%)
~ 100% фукозилирование	NR ³

¹ Примерные уровни фукозилирования, уровни фукозилирования

$Tox = 0,8\%$

² % RP (относительной активности) представляет собой объединенное значение из двух независимых проведенных анализа

³ NR = не подлежит регистрации – образец не соответствует критериям пригодности из-за серьезной потери активности

5.14 ПРИМЕР 7 – Эффекты *in vitro* и *in vivo*

5.14.1 Истощение по CCR9+ клеткам под действием антитела у яванских макаков

[0290] Обезьянам вводили внутривенной инъекцией однократную дозу антитела изотипического контроля и 10 мг/кг 243LO0326. Процентную долю CCR9+ CD4+ Т-клеток памяти оценивали в крови в различные моменты времени. На **фигуре 16А** показано, что наблюдалось снижение уровня CCR9+ клеток, присутствующих в крови, в день 15, при этом 10 мг/кг 243LO0326 полностью устраняют CCR9+ клетки в этот момент времени. В частности, при высоких и низких дозах (10 мг/кг) 243LO0326 приводило к истощению по CCR9+ Т-клеткам в периферической крови (**фигура 16В**), подвздошной кишке (**фигура 16С**) и слизистой оболочке (**фигура 16D**). Истощение по CCR9+ Т-клеткам было тканеспецифическим и клеточноспецифическим (**фигура 17**). 243LO0326 приводило к селективному истощению по CCR9+ лимфоцитам кишечника с относительным сбережением популяций за пределами кишечника, при этом не оказывало влияния на Т-

клетки тимуса.

5.14.2 Модель эксплантата кишечника

[0291] Образцы размером 6 мм, полученные путем щипковой биопсии из слизистого слоя кишечника, отбирали у здоровых субъектов-людей и субъектов-людей с воспалительным заболеванием кишечника, как описано в Vadstrup *et al.* [10]. Ткань эксплантата культивировали в присутствии или в отсутствие 243LO0326 в течение 12-84 часов. Оценивали процентную долю CCR9+ клеток вместе с ключевыми медиаторами воспаления: IL-6, GM-CSF и IL-22. На **фигуре 18** показано, что обработка антителом приводила к истощению по CCR9+ CD4+ клеткам (**фигура 18A**) и снижению уровней медиаторов воспаления (**фигура 18B - фигура 18D**) в каждом из протестированных эксплантатов. Ткань эксплантата от одного из здоровых субъектов также демонстрировала высокие уровни IL-6, GM-CSF и IL-22, которые снижались при обработке антителом к CCR9.

5.15 ПРИМЕР 7 – Антитела к CCR9 блокируют интернализацию CCR9, индуцированную CCL25

[0292] Данные ИНС неожиданно позволяют предположить, что в воспаленной подвздошной кишке при болезни Крона наблюдается количественно более низкая экспрессия CCR9. *Ex vivo* CCR9 интернализируется после активации под действием CCL25, который экспрессируется на более высоких уровнях в воспаленной подвздошной кишке при болезни Крона. Это позволяет предположить, что в воспаленном кишечнике CCR9 на патогенных Т-клетках интернализируется после активации под действием CCL25. Клетки, которые экспрессируют CCR9 в подвздошной кишке при болезни Крона, тем не менее, демонстрируют провоспалительный фенотип и фенотип резидентных клеток памяти.

[0293] В анализе для выявления интернализации CCR9 CDR-оптимизированное афукозилированное антитело 243LO0326 было способно предотвращать интернализацию, индуцированную CCL25, при концентрации 2 нМ (**фигура 19**). Интернализацию, индуцированную CCL25, оценивали с помощью FACS. Преимущество заключается в том, что блокирование интернализации, индуцированной CCL25, предотвращает реутилизацию рецепторов. Таким образом, антитела по настоящему изобретению преимущественно индуцируют ADCC, блокируют лигирование с помощью CCL25 рецептора CCR9 и предотвращают реутилизацию рецептора CCR9, индуцированную CCL25, на Т-клетках, экспрессирующих CCR9.

5.16 Заключение

[0294] В совокупности эти данные показывают, что лечение антителом к CCR9 является целесообразным вариантом лечения для пациентов с IBD. CCR9+ Т-клетки,

экспрессирующие провоспалительные цитокины, представлены в кишечнике и крови пациентов с воспалительным заболеванием кишечника (**фигура 1** и **фигура 2**). Антитела к CCR9, описанные выше, связывают CCR9 человека на Т клетках, экспрессирующих CCR9 (**фигура 5** и **фигура 6**). Афукозилированные версии этих антител активируют NK-клетки для содействия ADCC (**фигура 7** и **фигура 15**), что приводит к направленному уничтожению клеток (**фигура 8**). Гуманизация одного из клонов антител неожиданно не приводила к снижению аффинности антитела в отношении CCR9 человека по сравнению с химерным исходным антителом (**фигура 9**), обеспечивала поддержание способности активировать NK-клетки (**фигура 10А**) и сохранение способности конкурировать с CCL25 (**фигура 11**).

[0295] Проводили дополнительную CDR-оптимизацию одного из гуманизированных антител. Эти CDR-оптимизированные афукозилированные антитела (243LO0326 и 243LO0331) связывали мембраносвязанный CCR9 в течение более длительного периода времени по сравнению с исходным антителом и характеризовались аффинностью (K_D), составляющей от 0,09 до 3,4 нМ (**фигура 13**). CDR-оптимизированные антитела дополнительно были способны индуцировать активацию NK-клеток и уничтожение РВМС. 243LO0326 было более активным, чем АВ1020243 (**фигура 14**). 243LO0326 дополнительно способно ингибировать интернализацию CCR9, индуцированную CCL25 (**фигура 19**). Обработка с помощью 243LO0326 также приводит к снижению уровня CCR9 Т-клеток в крови (**фигура 16**). Обработка с помощью 243LO0326 ткани эксплантата кишечника от пациентов с IBD приводит к истощению по CCR9+ CD4+ клеткам (**фигура 16А**) и снижению уровней медиаторов воспаления (**фигура 16В - фигура 16D**). Таким образом, 243LO0326 является высокоактивным и специфичным в отношении CCR9. Истощение по клеткам происходит посредством ADCC; однако в отсутствие эффекторных клеток для ADCC, таких как NK-клетки, 243LO0326 также блокирует связывание между CCR9 и его лигандом CCL25.

[0296] С учетом того, что антитела к CCR9, раскрытые в данном документе, способны связывать обе изоформы hCCR9 — CCR9A и CCR9B — и конкурировать с CCL25 за связывание с CCR9, ожидается, что эпитоп расположен в пределах внеклеточного N-конца CCR9B, т. е. аминокислотных положений 1-36 в CCR9B: MADDYGSESTSSMEDYVNFNFTDFYCEKNNVRQFAS (SEQ ID NO: 80), что соответствует аминокислотным положениям 13-48 в CCR9A (**таблица 9, таблица 10, фигура 20**).

Таблица 9. Последовательность эпитопа антитела

	Последовательность	SEQ ID
Перекрывание N-концевых последовательностей CCR9A и CCR9B	MADDYGSESTSSMEDYVNFNFTDFYCEKNNVRQFAS	80

Таблица 10. Последовательность изоформ hCCR9

Изоформа	Последовательность	SEQ ID
CCR9 A	<u>MTPTDFTSPIPN</u> MADDYGSESTSSMEDYVNFNFTDFYCEKNNVRQFA SHFLPPLYWLVFI VGALGNSLVILVYWYCTRVKTM TDMFLLNLAIDLLFLVTL PFWAIA AADQWK FQTFMCK VVNSMYKMNFYSCVLLIMCISVDRYIAIAQAMRAHTWREKRLLYSK MVCFTIWVLAALC IPEILYSQIKEESGIAICTMVYPSDESTKLKSAVLTLKVILGFFLPFV VMA CCYTHIHT LIQAKKSSKHKALKVTITVLT V FVLSQFPYNCILLVQTIDAYAMFISNC AVSTNIDICFQ VTQTIAFFHSCLNPVLYV FVGFRFRRDLVKTLKNLGCISQAQWVSFTR REGSLKLSSMLL ETTSGALSL	81
CCR9 B	<i>MADDYGSESTSSMEDYVNFNFTDFYCEKNNVRQFAS</i> SHFLPPLYWLVF IVGALGNS LVILVYWYCTRVKTM TDMFLLNLAIDLLFLVTL PFWAIAAADQWK F QTFMCKVVNSMYKMNFYS CVLLIMCISVDRYIAIAQAMRAHTWREKRLLYSKMVCFTIWVLAAL CIPEILYSQIKEE SGIAICTMVYPSDESTKLKSAVLTLKVILGFFLPFVVMACCYTHIHTLIQ AKKSSKHKA LKVTITVLT V FVLSQFPYNCILLVQTIDAYAMFISNCAVSTNIDICFQVT QTIAFFHSCL	82

	NPVLYVVFVGERFRRDLVKTLKNLGCISQAQWVSFTRREGSLKLSSMLL ETTSGALSL	
--	--	--

[0297] Раскрытые в данном документе антитела, нацеливающиеся на CCR9, способны как блокировать связывание CCL25 с CCR9, так и приводить к истощению по CCR9⁺ Т-клеткам. При воспалительном аутоиммунном заболевании кишечника ожидается, что антитела, раскрытые в данном документе, как приводят к истощению по патогенным CCR9⁺ Т-клеткам в крови и ткани кишечника, так и блокируют связывание CCL25 с CCR9, при этом патогенные Т-клетки не подвергаются полному истощению. Ожидается, что этот двойной механизм действия обеспечит длительный эффект лечения. Специфичное истощение по CCR9⁺ эффекторным Т-клеткам памяти, тропным к кишечнику, будет индуцировать и поддерживать долговременную ремиссию и приводить к модификации заболевания.

ЛИТЕРАТУРНЫЕ ИСТОЧНИКИ

- [1] M. F. Neurath, *Nat Rev Immunol* **14**, 329 (2014).
- [2] M. Gajendran *et al.*, *Dis Mon* **64**, 20 (2018).
- [3] J. Torres *et al.*, *J Crohns Colitis* **14**, 4 (2020).
- [4] B. Somovilla-Crespo *et al.*, *Frontiers in Immunology* **9**, (2018).
- [5] R. L. Shields *et al.*, *J Biol Chem* **277**, 26733 (2002).
- [6] P. Umaña *et al.*, *Nat Biotechnol* **17**, 176 (1999).
- [7] L. Persic *et al.*, *Gene* **187**, 9 (1997).
- [8] C. N. Pace *et al.*, *Protein Sci* **4**, 2411 (1995).
- [9] J. Minowada, T. Ohnuma, and G. E. Moore, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **49**, 891 (1972).
- [10] K. Vadstrup *et al.*, *PLOS ONE* **11**, e0155335 (2016).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающая молекула, которая связывается с CCR9 и содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую набор CDR из HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую набор CDR из LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где

(a) аминокислотная последовательность VH-области содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 3, и где аминокислотная последовательность VL-области содержит LCDR1 под SEQ ID NO: 4, LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 6;

(b) аминокислотная последовательность VH-области содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 7, HCDR2 под SEQ ID NO: 8 и HCDR3 под SEQ ID NO: 9, и где аминокислотная последовательность VL-области содержит LCDR1 под SEQ ID NO: 10, LCDR2 под SEQ ID NO: 11 и LCDR3 под SEQ ID NO: 12; или

(c) аминокислотная последовательность VH-области содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 13, HCDR2 под SEQ ID NO: 14 и HCDR3 под SEQ ID NO: 15, и где аминокислотная последовательность VL-области содержит LCDR1 под SEQ ID NO: 16, LCDR2 под SEQ ID NO: 17 и LCDR3 под SEQ ID NO: 18;

или где любая одна или несколько из указанных HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат 1, 2 или 3 аминокислотные замены по сравнению с указанными последовательностями.

2. Связывающая молекула по п. 1, где аминокислотная последовательность VH-области содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 1, HCDR2 под SEQ ID NO: 2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 3, и где аминокислотная последовательность VL-области содержит LCDR2 под SEQ ID NO: 5, и LCDR3 под SEQ ID NO: 6, и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей под

- (a) SEQ ID NO: 4;
- (b) SEQ ID NO: 19;
- (c) SEQ ID NO: 20;
- (d) SEQ ID NO: 21 и
- (e) SEQ ID NO: 22.

3. Связывающая молекула по п. 1(a) или п. 2, где

(i) аминокислотная последовательность VH-области содержит последовательность под SEQ ID NO: 51 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней; и аминокислотная последовательность VL-области содержит последовательность под SEQ ID NO: 52 или

(ii) связывающая молекула содержит VH-область и VL-область, определенные в п. 1(c), где аминокислотная последовательность VH-области содержит последовательность под SEQ ID NO: 60 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней; и аминокислотная последовательность VL-области содержит последовательность под SEQ ID NO: 61 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

5. Связывающая молекула по любому из пп. 1-3, где связывающая молекула ингибирует связывание CCL25 с CCR9.

6. Связывающая молекула по любому из пп. 1-5, где связывающая молекула представляет собой антитело к CCR9 или его антигенсвязывающий фрагмент.

7. Связывающая молекула по п. 6, где антитело к CCR9 или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными, химерными или полностью человеческими.

8. Связывающая молекула по п. 6 или п. 7, которая представляет собой

(a) иммуноглобулин IgG или его фрагмент или

(b) иммуноглобулин IgG1 или его фрагмент.

9. Связывающая молекула по любому из пп. 1-8, где указанная связывающая молекула содержит Fc-домен иммуноглобулина или его фрагмент, которые сохраняют способность связываться с одним или несколькими Fc-рецепторами.

10. Связывающая молекула по п. 9, где Fc-домен иммуноглобулина или фрагмент

(a) представляют собой Fc-домен IgG или его фрагмент;

(b) представляют собой Fc-домен IgG человека или его фрагмент;

(c) представляют собой Fc-домен IgG1 человека или его фрагмент;

(d) являются модифицированными по сравнению с соответствующим Fc-доменом дикого типа, при этом указанная модификация приводит к повышенной аффинности к одному или нескольким Fc γ -рецепторам;

(e) являются модифицированными по сравнению с соответствующим Fc-доменом дикого типа, при этом указанная модификация приводит к усиленному ответу в виде антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности; и/или

(f) содержат афукозилированный N-связанный гликан в положении аминокислоты 297.

11. Связывающая молекула по любому из пп. 1-10, где связывающая молекула

(a) является афукозилированной;

(b) является афукозилированной в положении аминокислоты 297 или

(с) присутствует в композиции, содержащей множество копий указанной связывающей молекулы, где по меньшей мере 50%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% копий связывающей молекулы в композиции являются афукозилированными.

12. Связывающая молекула по любому из пп. 1-11, где связывающая молекула
 - (a) связывается с CCR9 человека;
 - (b) связывается с CCR9A человека и CCR9B человека;
 - (c) связывается с CCR9 яванского макака и/или
 - (e) не связывается с CCR5, CCR8, CXCR1 или CXCR2.
13. Связывающая молекула по любому из пп. 1-12, где связывающая молекула
 - (a) способна опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении клетки, экспрессирующей CCR9, с которой она связывается;
 - (b) способна опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении лимфоцита, экспрессирующего CCR9, с которым она связывается;
 - (c) может быть связана с помощью FcγR;
 - (d) может быть связана с помощью FcγRIIIa;
 - (e) способна перекрестно связывать иммунную эффекторную клетку с клеткой, экспрессирующей CCR9;
 - (f) способна перекрестно связывать иммунную эффекторную клетку с клеткой, экспрессирующей CCR9, и активировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность у эффекторной клетки;
 - (g) способна ингибировать индуцированную CCL25 интернализацию рецептора CCR9;
 - (h) способна ингибировать индуцированную CCL25 миграцию Т-клеток, экспрессирующих CCR9, в кишечник,
 - (i) способна перекрестно связывать иммунную эффекторную клетку с клеткой, экспрессирующей CCR9, и активировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность у эффекторной клетки с обеспечением таким образом лизиса клетки, экспрессирующей CCR9; и/или
 - (j) способна обеспечивать истощение по клеткам, экспрессирующим CCR9, в популяции клеток, содержащей клетки, экспрессирующие CCR9, и иммунные эффекторные клетки.
14. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула способна связываться с CCR9 человека со значением аффинности (K_D), составляющим приблизительно 0,1 нМ, необязательно 0,09 нМ.

15. Связывающая молекула, которая связывается с CCR9, где связывающая молекула конкурирует за связывание с CCR9 со связывающей молекулой по любому из пп. 1-14.

16. Связывающая молекула по п. 15, где связывающая молекула

- (a) является афукозилированной;
- (b) является афукозилированной в положении аминокислоты 297 или
- (c) присутствует в композиции, содержащей множество копий указанной связывающей молекулы, где по меньшей мере 50%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% копий связывающей молекулы в композиции являются афукозилированными.

17. Связывающая молекула по п. 15, где Fc-домен иммуноглобулина или фрагмент

- (a) представляют собой Fc-домен IgG или его фрагмент;
- (b) представляют собой Fc-домен IgG человека или его фрагмент;
- (c) представляют собой Fc-домен IgG1 человека или его фрагмент;
- (d) являются модифицированными по сравнению с соответствующим Fc-доменом дикого типа, при этом указанная модификация приводит к повышенной аффинности к одному или нескольким Fcγ-рецепторам;
- (e) являются модифицированными по сравнению с соответствующим Fc-доменом дикого типа, при этом указанная модификация приводит к усиленному ответу в виде антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности; и/или
- (f) содержат афукозилированный N-связанный гликан в положении аминокислоты 297.

18. Связывающая молекула, которая связывается с CCR9, где связывающая молекула не конкурирует за связывание с CCR9 со связывающей молекулой по любому из пп. 1-14.

19. Терапевтическое средство, содержащее антитело к CCR9 в качестве активного ингредиента, где антитело к CCR9 конкурирует с CCL25 за связывание с CCR9 человека.

20. Терапевтическое средство по п. 19, где антитело к CCR9 ингибирует опосредованную CCL25 интернализацию CCR9.

21. Терапевтическое средство по п. 19 или п. 20, где антитело к CCR9 конкурирует с CCL25 за связывание с CCR9A и CCR9B человека.

22. Терапевтическое средство по любому из пп. 19-21, где антитело к CCR9 специфически связывается с эпитопом в CCR9, где эпитоп расположен в пределах последовательности, содержащей последовательность под SEQ ID NO: 80.

23. Терапевтическое средство по любому из пп. 19-21, где антитело к CCR9

- (a) является афукозилированным;
- (b) является афукозилированным в положении аминокислоты 297 или

(с) присутствует в композиции, содержащей множество копий указанной связывающей молекулы, где по меньшей мере 50%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% копий связывающей молекулы в композиции являются афукозилированными.

24. Терапевтическое средство по любому из пп. 19-21, где Fc-домен иммуноглобулина или фрагмент

- (а) представляют собой Fc-домен IgG или его фрагмент;
- (b) представляют собой Fc-домен IgG человека или его фрагмент;
- (с) представляют собой Fc-домен IgG1 человека или его фрагмент;
- (d) являются модифицированными по сравнению с соответствующим Fc-доменом дикого типа, при этом указанная модификация приводит к повышенной аффинности к одному или нескольким Fcγ-рецепторам;
- (е) являются модифицированными по сравнению с соответствующим Fc-доменом дикого типа, при этом указанная модификация приводит к усиленному ответу в виде антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности; и/или
- (f) содержат афукозилированный N-связанный гликан в положении аминокислоты 297.

25. Применение связывающей молекулы по п. 18 для определения численности CCR9+ клеток в образце, который был приведен в контакт со связывающей молекулой по любому из пп. 1-14.

26. Способ оценки степени истощения по клеткам, экспрессирующим CCR9, обеспечиваемой связывающей молекулой по любому из пп. 1-17, при этом способ включает:

- (i) приведение указанной связывающей молекулы в контакт с популяцией клеток, где популяция клеток содержит клетки, экспрессирующие CCR9, и иммунные эффекторные клетки, в условиях, подходящих для обеспечения проявления антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности эффекторными клетками;
- (ii) приведение указанной популяции клеток в контакт со связывающей молекулой, которая связывается с CCR9 и которая не конкурирует за связывание с CCR9 со связывающей молекулой из стадии (i);
- (iii) выявление клеток, экспрессирующих CCR9, в популяции клеток, которые связаны связывающей молекулой из (ii);
- (iv) сравнение количества клеток, экспрессирующих CCR9, выявленных на стадии (iii), с количеством клеток, экспрессирующих CCR9, в исходной популяции клеток, используемой на стадии (i), и определение таким образом количества клеток, экспрессирующих CCR9, которые были подвергнуты истощению на стадии (i).

27. Связывающая молекула по п. 18, применение по п. 24 или способ по п. 25, где указанная связывающая молекула, которая не конкурирует за связывание с CCR9 со связывающей молекулой по любому из пп. 1-17, содержит аминокислотную последовательность VH-области, содержащую HCDR1 под SEQ ID NO: 44, HCDR2 под SEQ ID NO: 45 и HCDR3 под SEQ ID NO: 46, и аминокислотную последовательность VL-области, содержащую LCDR1 под SEQ ID NO: 47, LCDR2 под SEQ ID NO: 5 и LCDR3 под SEQ ID NO: 48.

28. Выделенный полинуклеотид, кодирующий связывающую молекулу по любому из пп. 1-17 или п. 18.

29. Вектор, содержащий:

- (a) полинуклеотид по п. 27, функционально ассоциированный с промотором; или
- (b) полинуклеотид, кодирующий VH-область, определенную в любом из пп. 1-3, и полинуклеотид, кодирующий VL-область, определенную в любом из пп. 1-3, где указанные полинуклеотиды функционально ассоциированы с одним или несколькими промотором(промоторами).

30. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 27 или вектор по п. 28.

31. Способ получения связывающей молекулы по любому из пп. 1-17 или п. 18, включающий обеспечение экспрессии полинуклеотида по п. 27 или вектора по п. 28 в клетке-хозяине.

32. Фармацевтическая композиция, содержащая связывающую молекулу по любому из пп. 1-17 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

33. Фармацевтическая композиция по п. 32 для применения в качестве лекарственного препарата.

34. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества связывающей молекулы по любому из пп. 1-17, терапевтического средства по любому из пп. 19-23 или композиции по п. 32.

35. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества связывающей молекулы, которая связывается с CCR9, где

(a) указанная связывающая молекула способна опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении клетки, экспрессирующей CCR9, с которой она связывается;

(b) связывание связывающей молекулы с CCR9 не индуцирует интернализацию CCR9; и/или

(с) связывающая молекула конкурирует с CC25 за связывание с CCR9, необязательно CCR9 человека, необязательно CCR9A и CCR9B человека.

36. Способ по п. 34 или п. 35, где заболевание представляет собой CCR9-опосредованное заболевание или где заболевание опосредовано клетками, экспрессирующими CCR9.

37. Способ по п. 36, где заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

38. Способ по п. 33, где заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Крона, болезни Крона подвздошной кишки/тонкого и толстого кишечника и язвенного колита.

39. Способ по п. 33, п. 34 или п. 35, где заболевание выбрано из группы, состоящей из Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза, рака предстательной железы, рака молочной железы, меланомы, циркулирующих клеток из солидной опухоли, фиброза печени и острого воспаления печени.

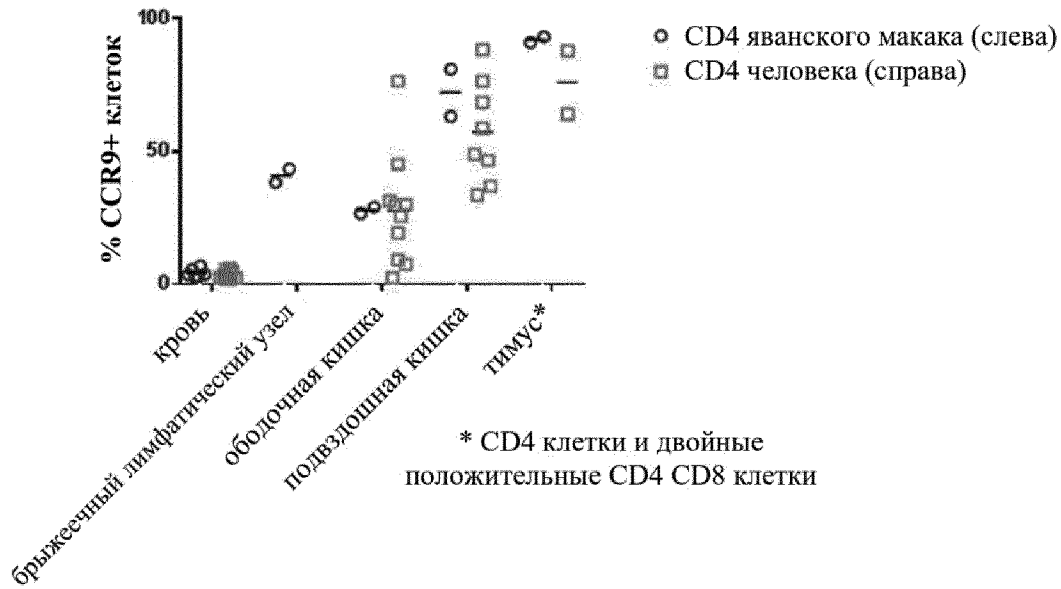
40. Способ выявления присутствия полипептида CCR9 в образце, включающий:

(а) приведение образца в контакт со связывающей молекулой по любому из пп. 1-17 или п. 18 с получением комплекса связывающая молекула-антиген;

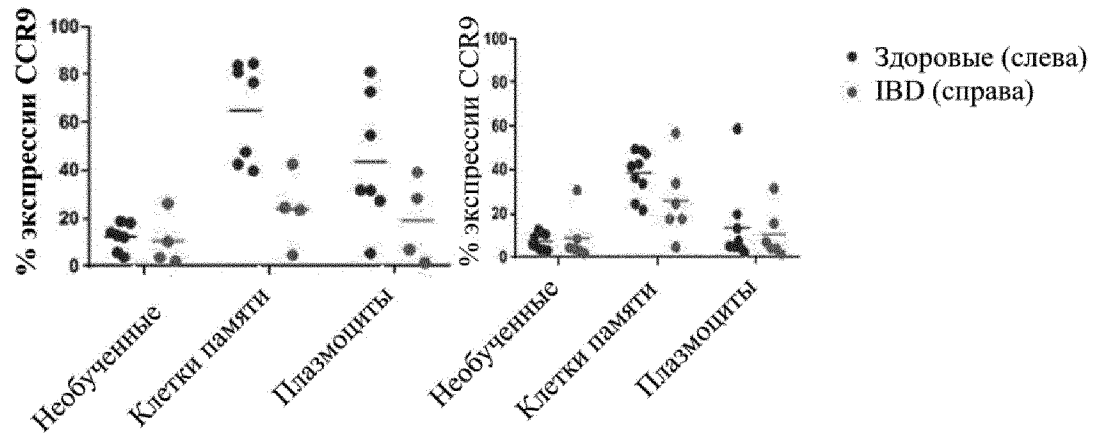
(b) выявление присутствия или отсутствия указанного комплекса связывающая молекула-антиген;

(с) при этом присутствие комплекса связывающая молекула-антиген подтверждает присутствие полипептида CCR9.

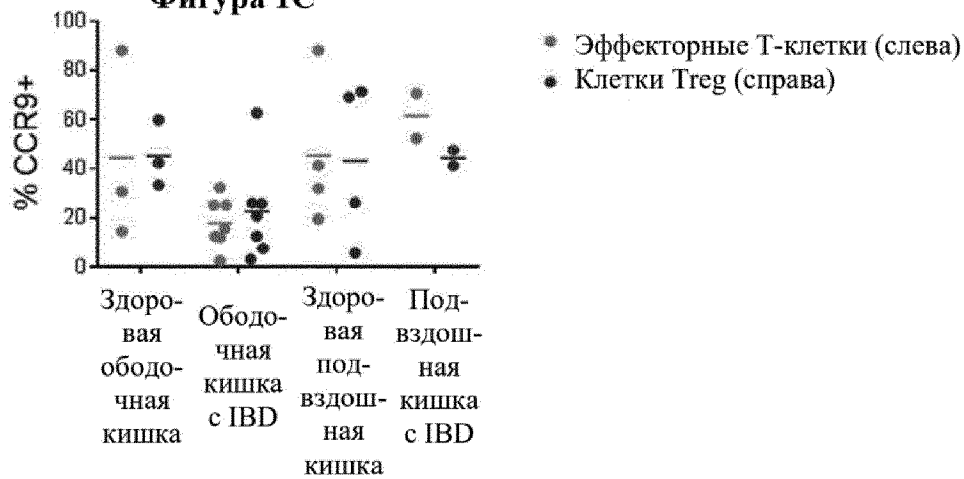
Фигура 1А



Фигура 1В

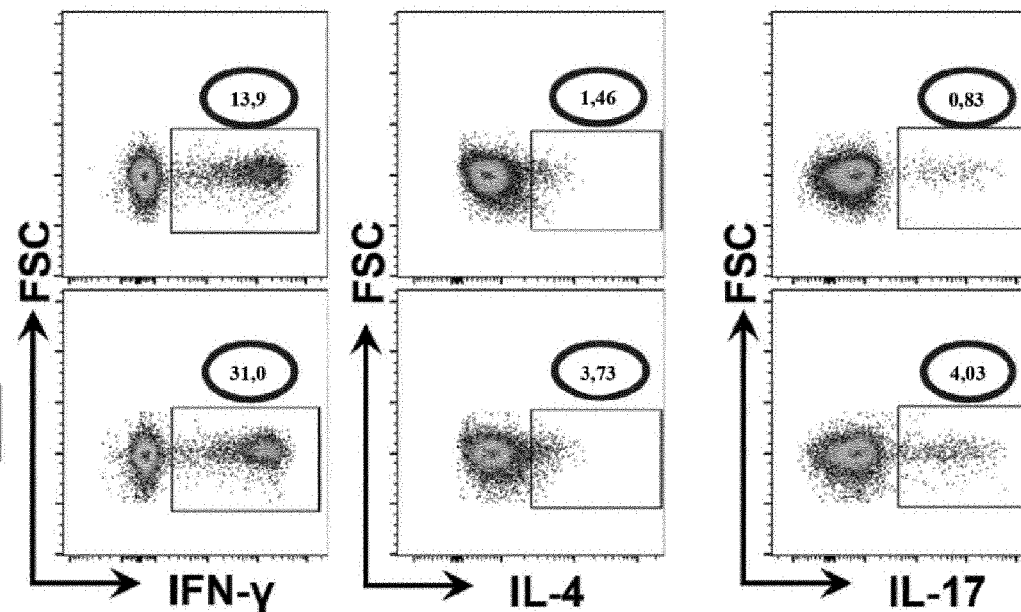
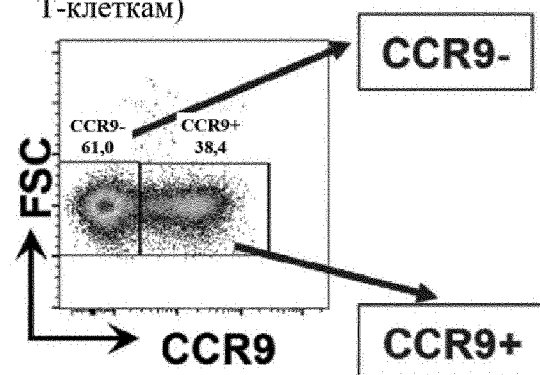


Фигура 1С

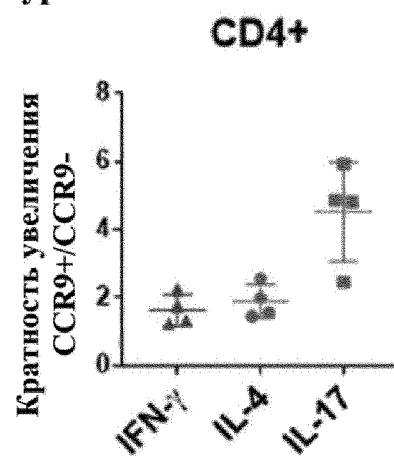


Фигура 2А

Гейтированы по одиночным, живым, CD45+, CD3+ CD8- (CD4 Т-клеткам)



Фигура 2В



Фигура 3А

		FW1	HCDR1	FW2	HCDR2
AB1020011 (SEQ ID NO: 58)		EVQLVESGGGLVKPGGSRKLS	CAASGFTFRDYGMH----	WVRQAPERGLEWVAYINS-----	GSSAIYYADTVKG
AB1020227 (SEQ ID NO: 62)		EVQLVESGGRLVQPKGSLKLS	CAASGFTFNTYAMY----	WIRQAPGKGLEWVARIRSKS---	NNYATYYADSVKD
AB1020229 (SEQ ID NO: 60)		EVQLVESGGGLVQPKGSLKLS	CAASGFTFNTYAMY----	WVRQAPGKGLEWVARIRSKS---	SNFATYYADSVKD
AB1020234 (SEQ ID NO: 64)		EVQLVESGGGLVKPGGSLKLS	CAASGFTFSSYAMS----	WVRQTPEKRLEWVATISD-----	GGSYTYYPDNVKG
AB1020243 (SEQ ID NO: 56)		EVQLQQSGTVLARPGASVKMS	CKASGYTFTSYWMH----	WVKQRPQGQLEWIGVIYP-----	GNSDTRYNQKFKG
AB1020264 (SEQ ID NO: 66)		QVQLQQPGAELVKPGASVKLS	CKASGYTFTSYWMH----	WVKQRPGRGLEWIGRIDP-----	NSGGTKYNEKFKS
AB1020283 (SEQ ID NO: 68)		EVKLEESGGGLVQPGGSMKLS	CVASGFTFSNYWMN----	WVRQSPEKGLEWVAQIRLKS---	DNYATHYAESVKG
AB1020310 (SEQ ID NO: 70)		EVQLQQSGPELVKPGASVKMS	CKASGYTFTSYVMH----	WVKQKPGQGLEWIGYINP-----	YNDGTKYNEKFKG
AB1020105 (SEQ ID NO: 72)		EVKLEESGGGLVQPGGSMKLS	CVASGFTFNKYWMN----	WVRQSPEKGLEWVVQIKLKS---	DNYATHYAESVKG
AB1020069 (SEQ ID NO: 74)		EVKLEESGGGLVQPGGSMKLS	CVASGFTFSNYWMN----	WVRQSPEKGLEWVAQIRLKS---	DNYATHYAESVKG
		FW3	HCDR3	FW4	
AB1020011 (SEQ ID NO: 58)		RFTISRDN	TKNTLFLQMTSL--RSEDTAMY	YCARAGT-----	AYWGQGT
AB1020227 (SEQ ID NO: 62)		RFTISRDDS	QSMLYLQMNNL--KTEDTAMY	YCVRGGGF-----	DYWGQGT
AB1020229 (SEQ ID NO: 60)		RFTISRDDS	QSMLYLQMNNL--KTEDTAMY	YCVRGGG-----	DYWGQGT
AB1020234 (SEQ ID NO: 64)		RFTISRDN	AKNNLYLQMSHL--KSEDTAMY	YCARDPRYYF-----	DYWGQGT
AB1020243 (SEQ ID NO: 56)		KAKLTAVTS	ATTAYMELSSL--TNEDSAVYY	CTRDYYSNVYYYAM-----	DYWGQGT
AB1020264 (SEQ ID NO: 66)		KATLTVDKP	SSTAYMQLSSL--TSEDSAVYY	CARGGLVYYF-----	DYWGQGT
AB1020283 (SEQ ID NO: 68)		RFTISRDDS	KSSSVYLQMNNL--RAEDTGI	YYCTERPF-----	SYWGQGT
AB1020310 (SEQ ID NO: 70)		KATLTS	DKSSSTAYMELSSL--TSEDSAVYY	CARNGGRGYAM-----	DYWGQGT
AB1020105 (SEQ ID NO: 72)		RFAISRDDS	KSSSVYLQMNNL--RAEDTGI	YYCTLRPF-----	TYWGQGT
AB1020069 (SEQ ID NO: 74)		RFTISKDDS	KSSSVYLQMNNL--RAEDTGI	YYCTERPF-----	AYWGQGT

Фигура 3В

		FW1	LCDR1	FW2	LCDR2
AB1020011	(SEQ ID NO: 59)	DVVMTQTPLTSLSVTFGQPASISCKSSQSL LDS---DGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYQV-----SRLDS			
AB1020227	(SEQ ID NO: 63)	DVVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYS---DGKTYLNWLQQRPGQSPKRLMYQV-----SKLDF			
AB1020229	(SEQ ID NO: 61)	DVVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSCQCLLYS---DGKTYLNWLQQRPGQSPKRLMYQV-----SKLDF			
AB1020234	(SEQ ID NO: 65)	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHS---NGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKV-----SNRFS			
AB1020243	(SEQ ID NO: 57)	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHS---NGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKV-----SNRFS			
AB1020264	(SEQ ID NO: 67)	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHS---NGNTYLYWYLQKPGQSPKLLIYRV-----SNRFS			
AB1020283	(SEQ ID NO: 69)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHS---NGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV-----SNRFS			
AB1020310	(SEQ ID NO: 71)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHS---NGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV-----SNRFS			
AB1020105	(SEQ ID NO: 73)	DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIIHS---NGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV-----SNRFS			
AB1020069	(SEQ ID NO: 75)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHS---NGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV-----SKRLS			

		FW3	LCDR3	FW4
AB1020011	(SEQ ID NO: 59)	GVPDRFTGSGSG--TDFTLKIIIRVEAEDLGVIYCWQGSHPF-----RTFGGGTKLEI---K		
AB1020227	(SEQ ID NO: 63)	GIPDRFSGSGSGE--TDFTLKISRVEAEDLGVIYCLQGTYP-----FTFGTGTKLEI---K		
AB1020229	(SEQ ID NO: 61)	GIPDRFSGSGSGE--TDFTLKISRVEAEDLGVIYFCLQGTYP-----YTFGSGTKLEI---K		
AB1020234	(SEQ ID NO: 65)	GVPDRFSGSGSG--TDFTLKISRVEAEDLGVIYFCSQSTHVP-----WTFGGGTKLEI---K		
AB1020243	(SEQ ID NO: 57)	GVPDRFSGSGSG--TDFTLKISRVEAEDLGVIYFCSQSTHVP-----WTFGGGTKLEI---K		
AB1020264	(SEQ ID NO: 67)	GVPDRFSGSGSG--TDFTLKISRVEAEDLGVIYFCFQGTTHVP-----HTFGSGTKLEI---K		
AB1020283	(SEQ ID NO: 69)	GVPDRFSGSGSG--TDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQGSHPF-----LTFGAGTKLEL---K		
AB1020310	(SEQ ID NO: 71)	GVPDRFSGSGSG--TDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQGSHPF-----PTFGGGTKLEI---K		
AB1020105	(SEQ ID NO: 73)	GVPDRFSGSGSG--TDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQGSHPF-----WTFGGGTKLEI---K		
AB1020069	(SEQ ID NO: 75)	GVPDRFSGSGSG--TEFTLKISRVEAEDLGVIYCFQGSHPF-----LTFGAGTKLEL---K		

Фигура 4

VH

	FW1	HCDR1	FW2	HCDR2
AB1020243 (SEQ ID NO: 56)	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYTFTSYWMH----	WVKQRPGQGLEWIGVIYP-----	GNSDTRYNQKFKG	
AB1020243-fg1 (SEQ ID NO: 51)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMH----	WVRQAPGQGLEWIGVIYP-----	GNSDTRYNQKFKG	
AB243LO0331 (SEQ ID NO: 51)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMH----	WVRQAPGQGLEWIGVIYP-----	GNSDTRYNQKFKG	
AB243LO0326 (SEQ ID NO: 51)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMH----	WVRQAPGQGLEWIGVIYP-----	GNSDTRYNQKFKG	

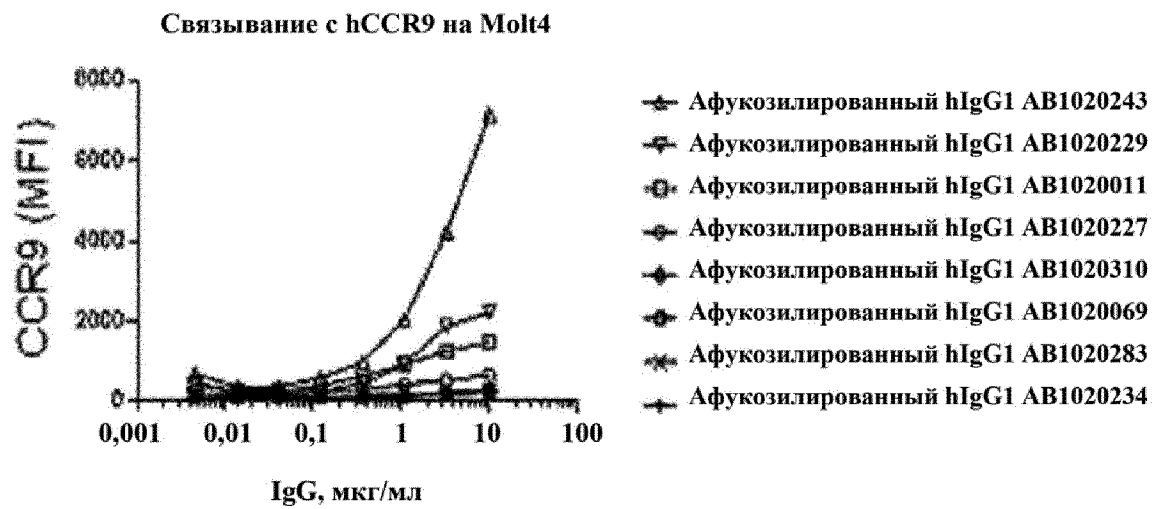
	FW3	HCDR3	FW4
AB1020243 (SEQ ID NO: 56)	KAKLTAVTSATTAYMELSSL--TNEDSAVYYCTRDYYSNYVYYYAM-----	DYWGQGTSTVTVSS	
AB1020243-fg1 (SEQ ID NO: 51)	RVTITRDTSASTAYMELSSL--RSEDТАVYYCTRDYYSNYVYYYAM-----	DYWGQGTТVTVSS	
AB243LO0331 (SEQ ID NO: 51)	RVTITRDTSASTAYMELSSL--RSEDТАVYYCTRDYYSNYVYYYAM-----	DYWGQGTТVTVSS	
AB243LO0326 (SEQ ID NO: 51)	RVTITRDTSASTAYMELSSL--RSEDТАVYYCTRDYYSNYVYYYAM-----	DYWGQGTТVTVSS	

VL

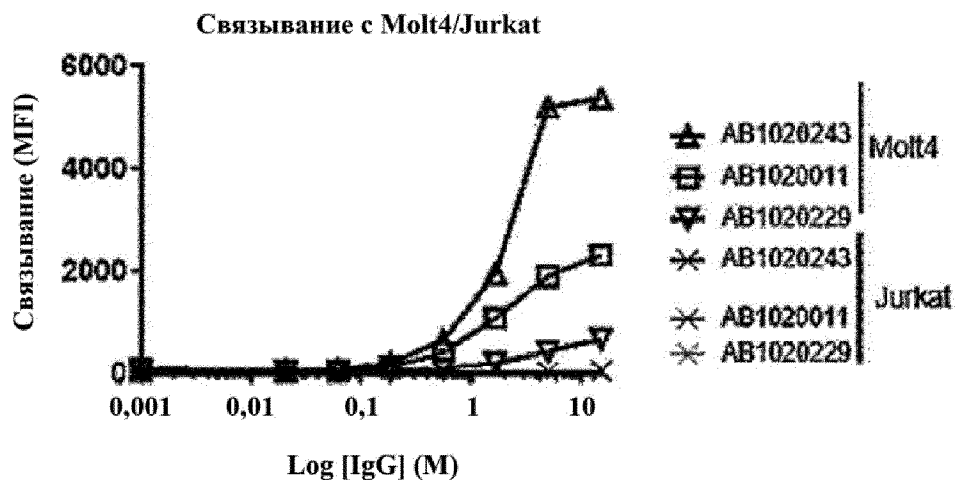
	FW1	LCDR1	FW2	LCDR2
AB1020243 (SEQ ID NO: 57)	DVVMТQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHS---NGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKV-----	SNRFS		
AB1020243-fg1 (SEQ ID NO: 54)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHS---NGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKV-----	SNRFS		
AB243LO0331 (SEQ ID NO: 53)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHS---NTNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKV-----	SNRFS		
AB243LO0326 (SEQ ID NO: 52)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHP---NRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKV-----	SNRFS		

	FW3	LCDR3	FW4
AB1020243 (SEQ ID NO: 57)	GVPDRFSGSGSG--TDFTLKISRVEAEDLGVFFCSQSTHVP-----	WTFGGGTKLEI---K	
AB1020243-fg1 (SEQ ID NO: 54)	GVPDRFSGSGSG--TDFTLKISRVEAEDVGVIYCSQSTHVP-----	WTFGQGTKLEI---K	
AB243LO0331 (SEQ ID NO: 53)	GVPDRFSGSGSG--TDFTLKISRVEAEDVGVIYCSQSTHVP-----	WTFGQGTKLEI---K	
AB243LO0326 (SEQ ID NO: 52)	GVPDRFSGSGSG--TDFTLKISRVEAEDVGVIYCSQSTHVP-----	WTFGQGTKLEI---K	

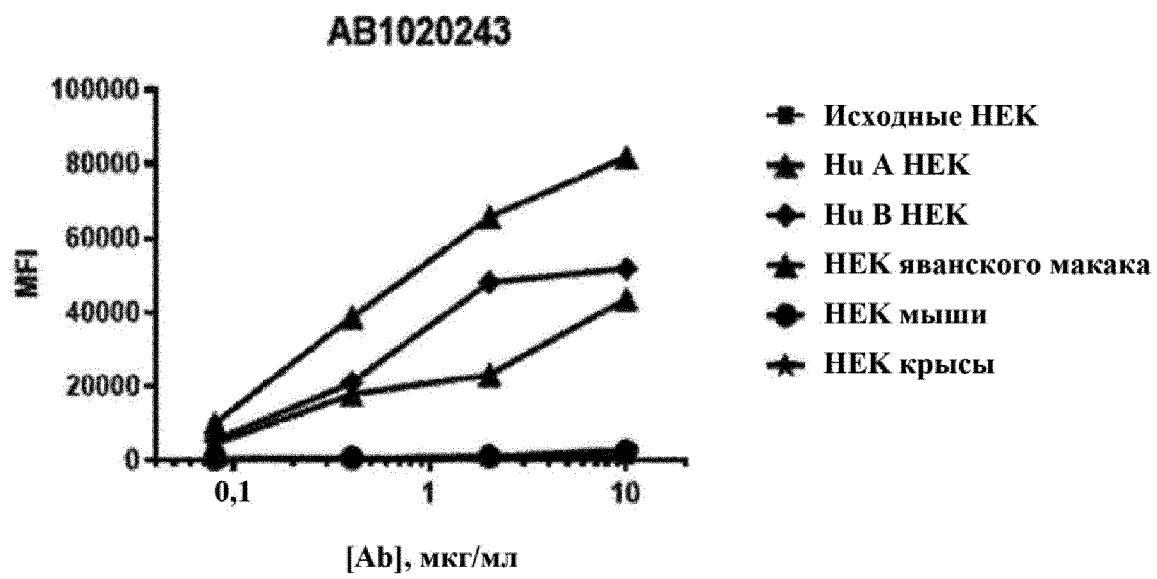
Фигура 5А



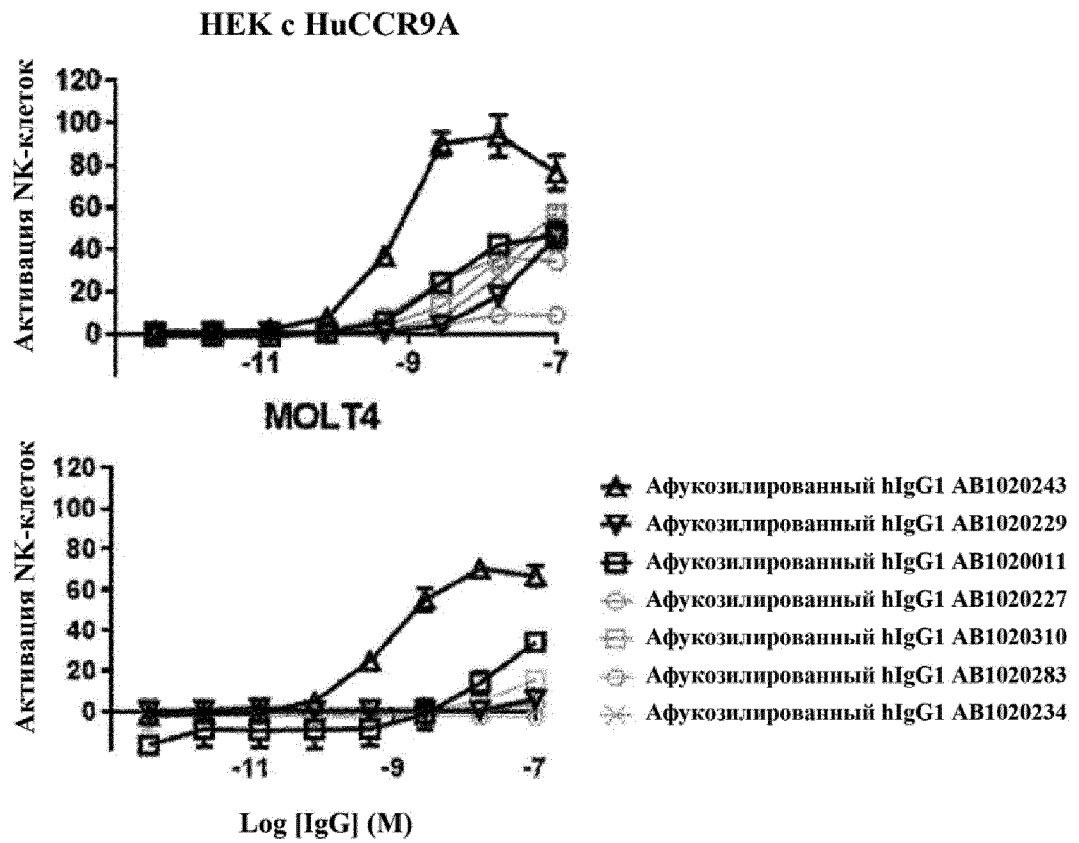
Фигура 5В



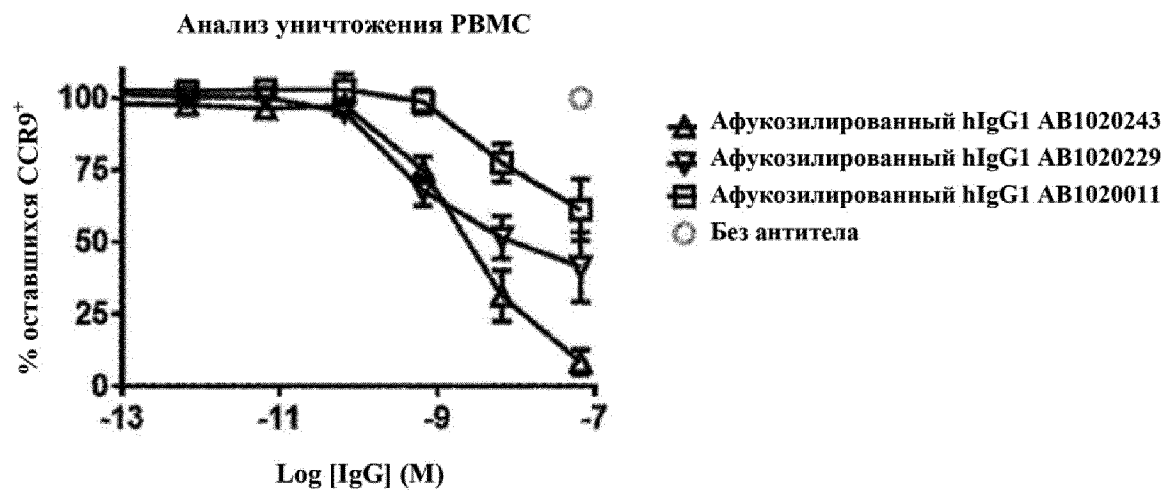
Фигура 6



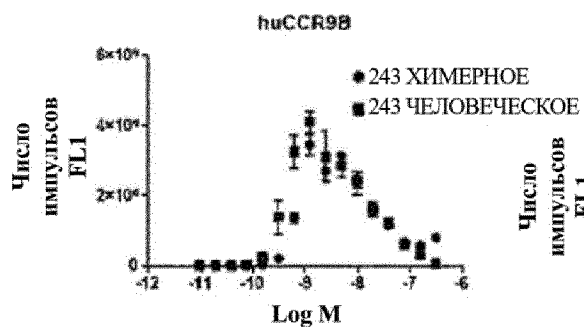
Фигура 7



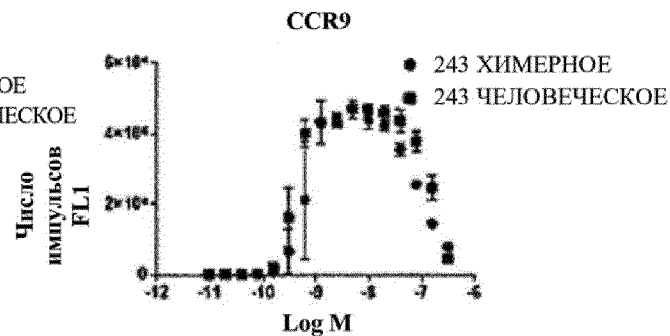
Фигура 8



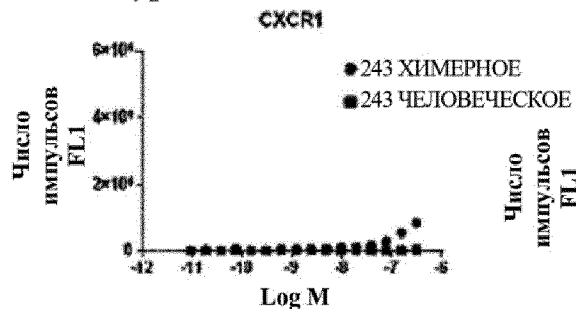
Фигура 9А



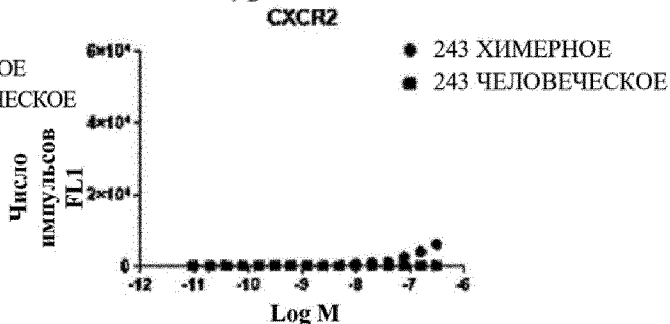
Фигура 9В



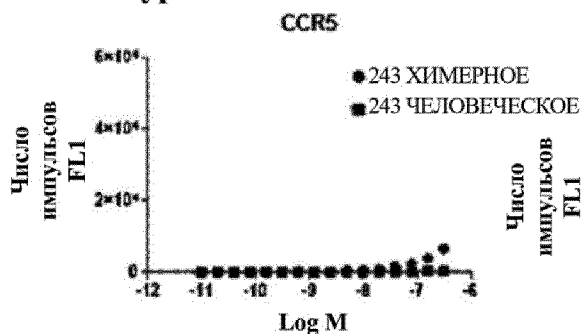
Фигура 9С



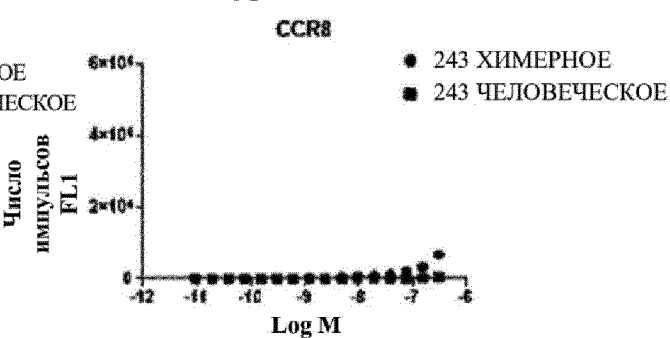
Фигура 9D



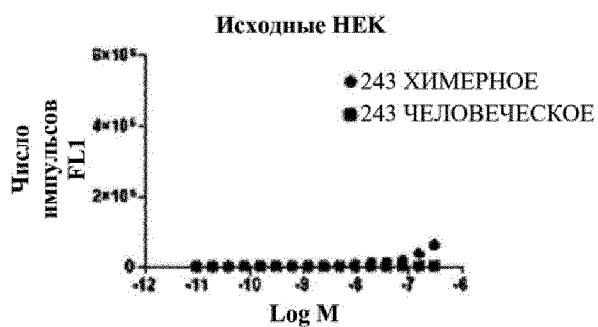
Фигура 9Е



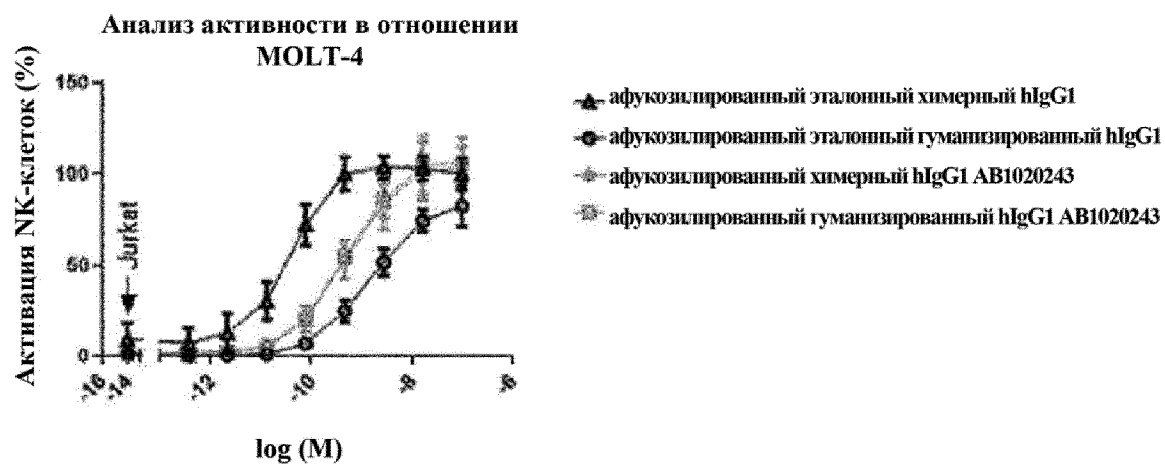
Фигура 9F



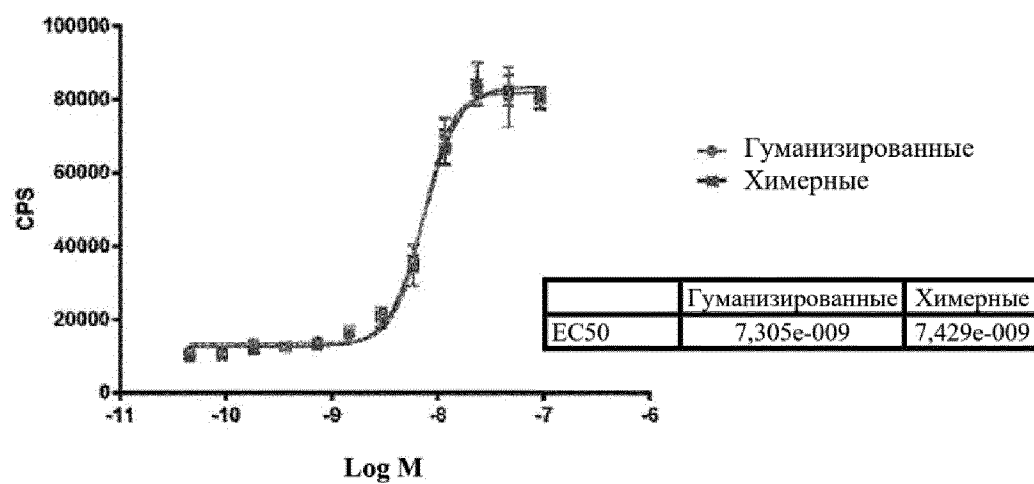
Фигура 9G



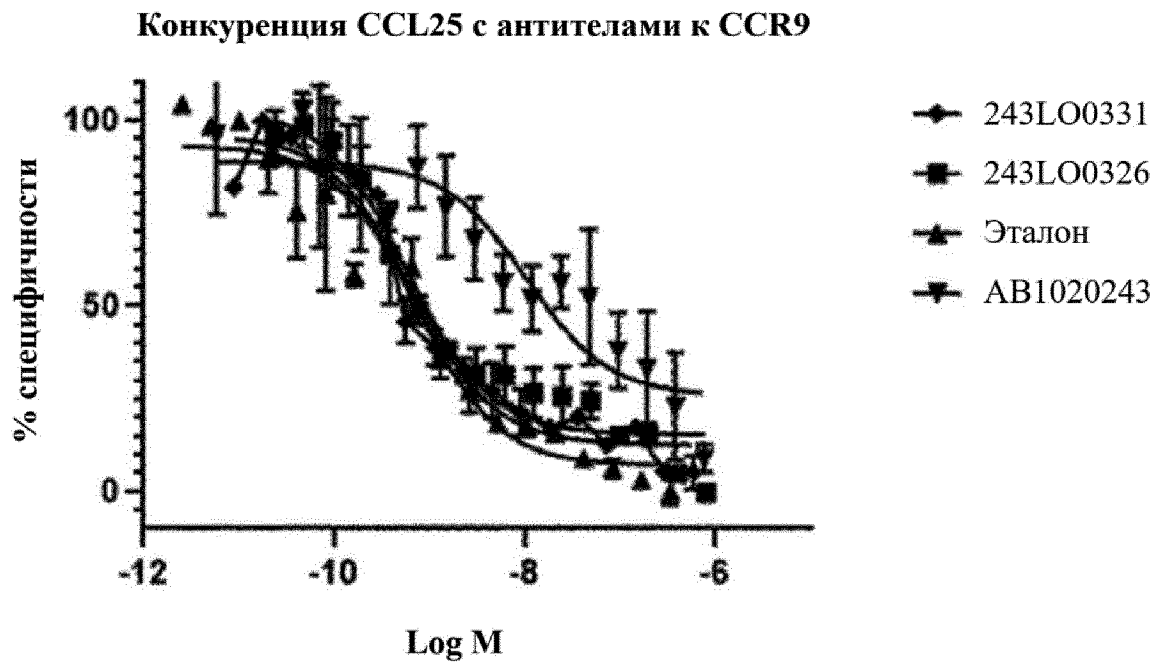
Фигура 10А



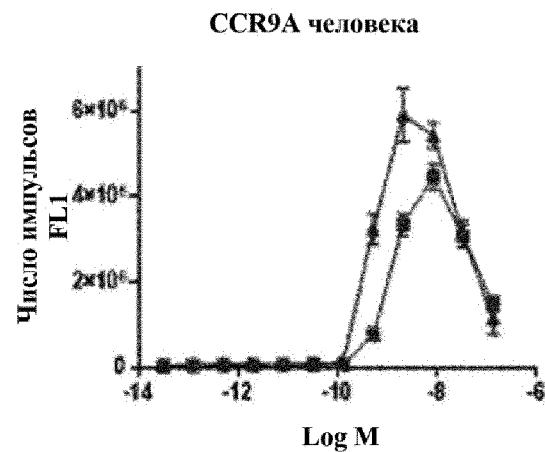
Фигура 10В



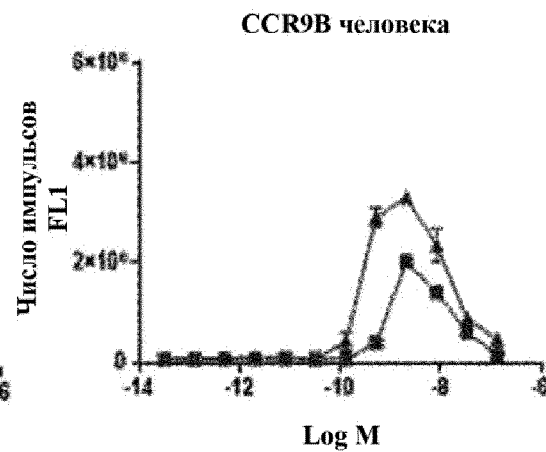
Фигура 11



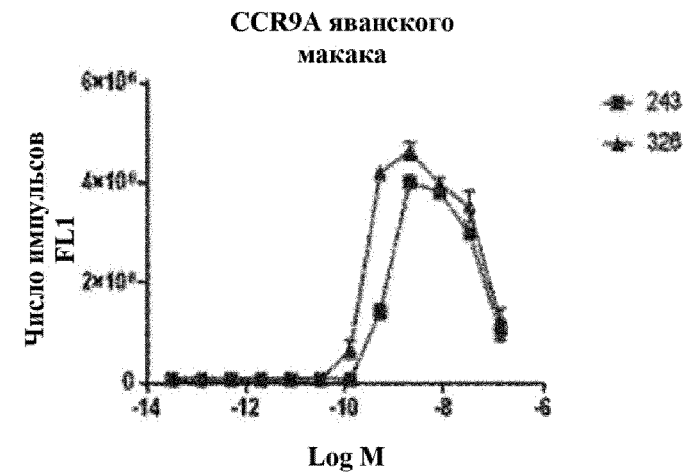
Фигура 12А



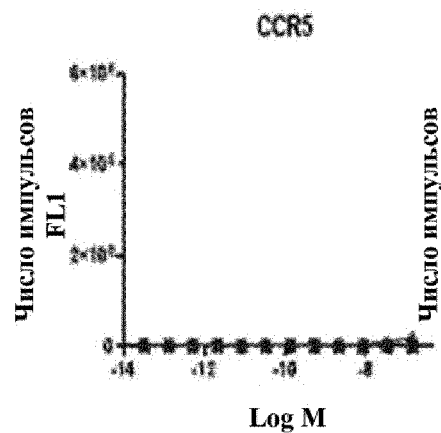
Фигура 12В



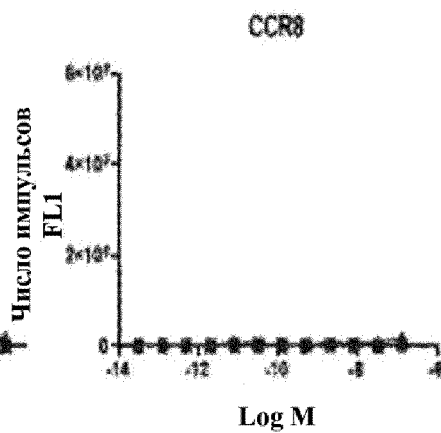
Фигура 12С



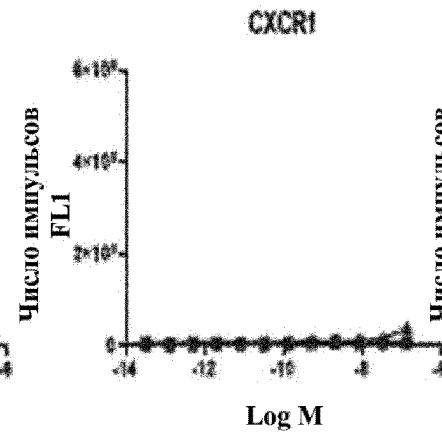
Фигура 12D



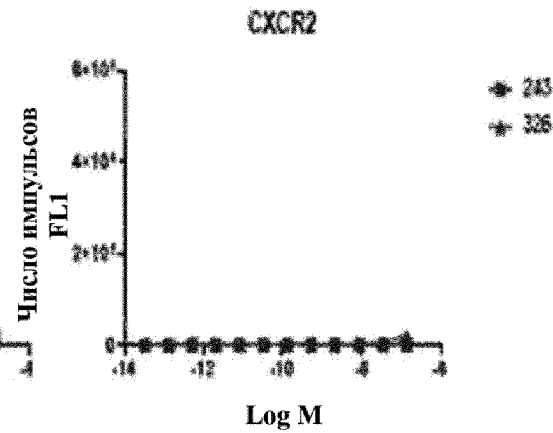
Фигура 12Е



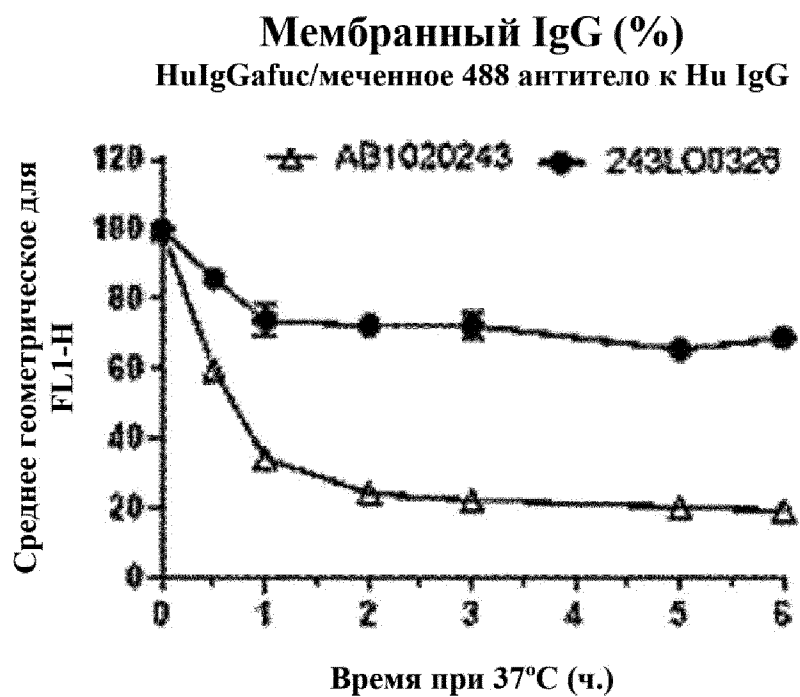
Фигура 12F



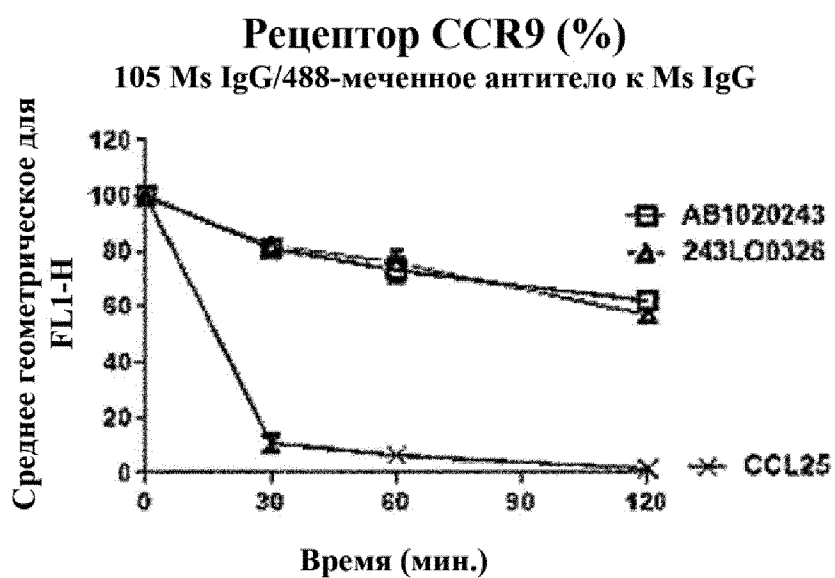
Фигура 12G



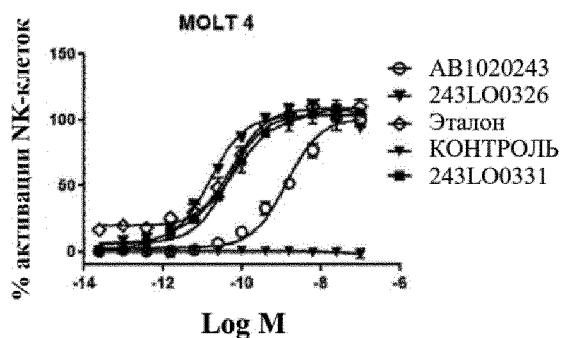
Фигура 13А



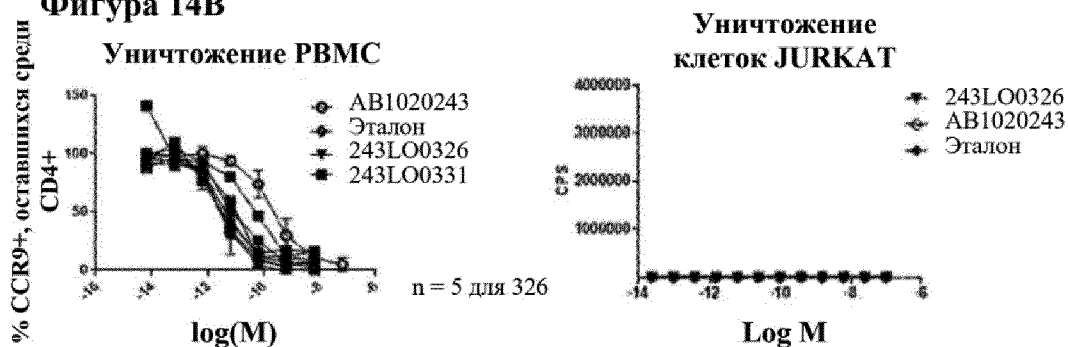
Фигура 13В



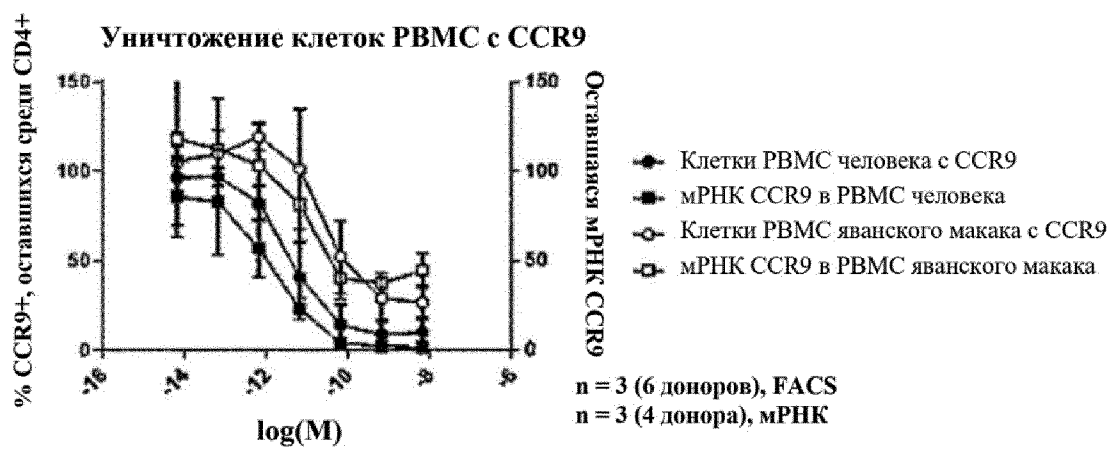
Фигура 14А



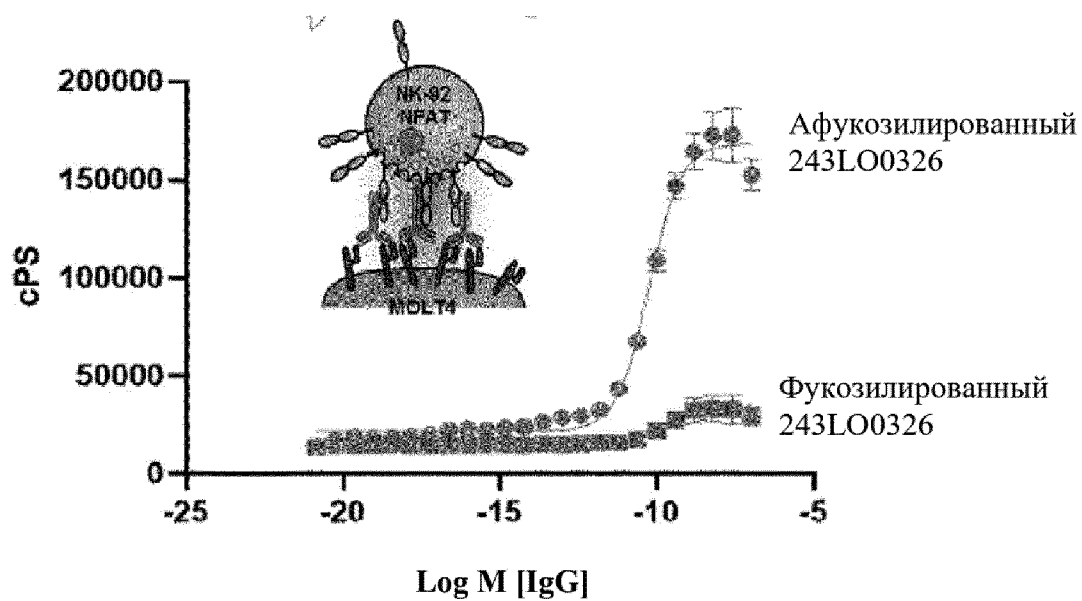
Фигура 14В



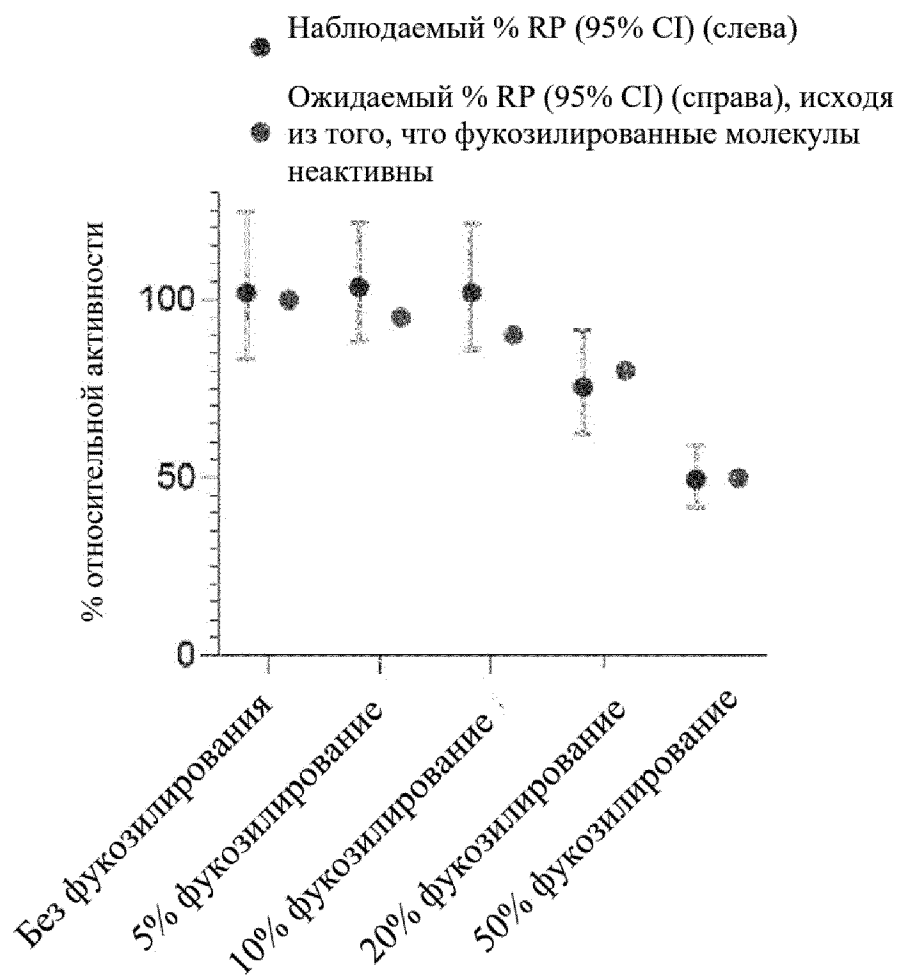
Фигура 14С



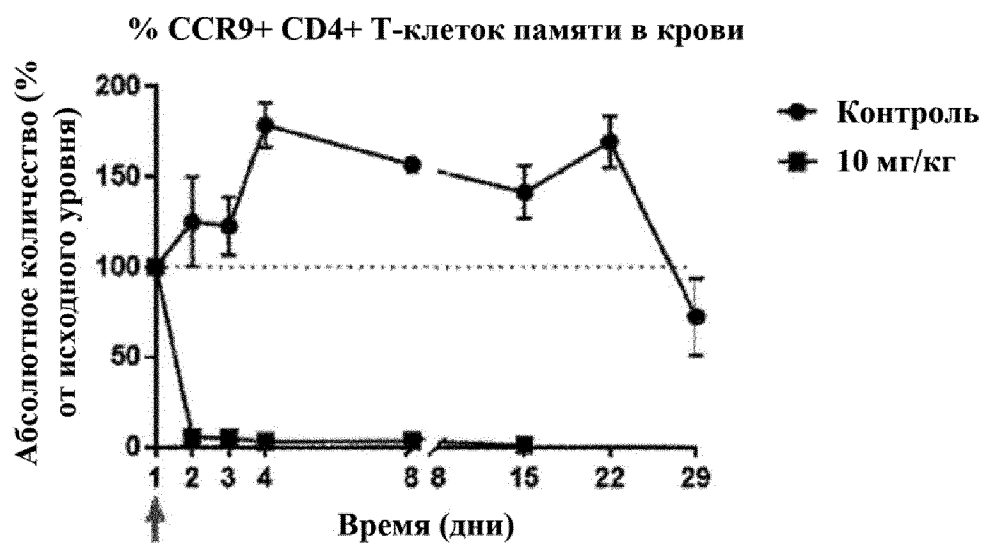
Фигура 15A



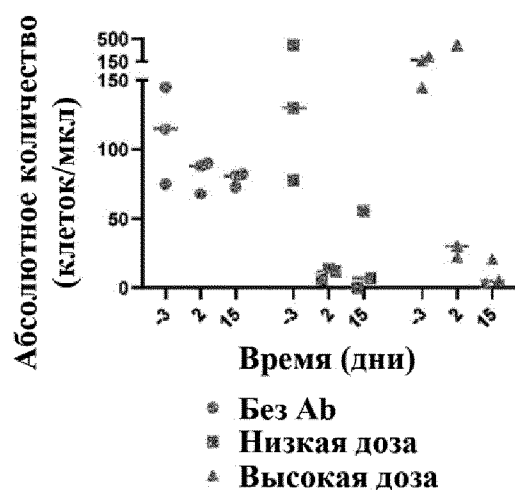
Фигура 15B



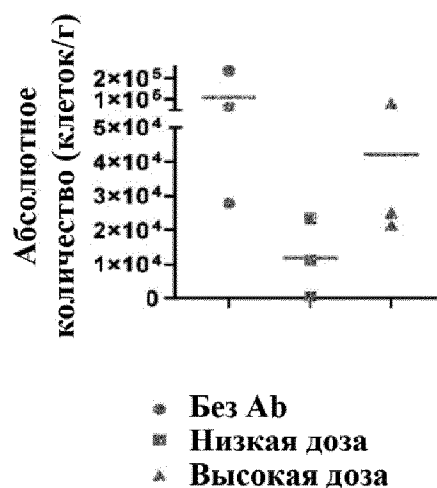
Фигура 16А



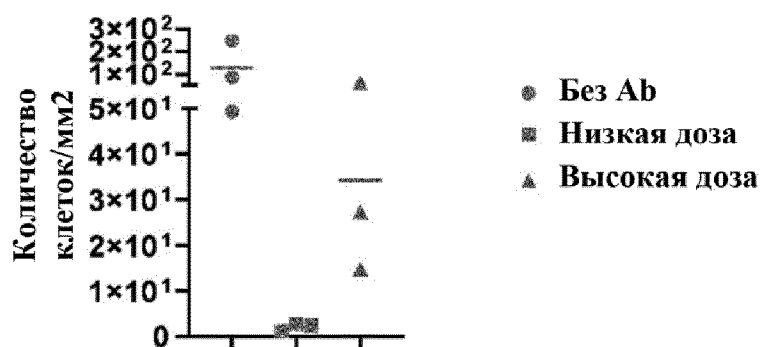
Фигура 16В



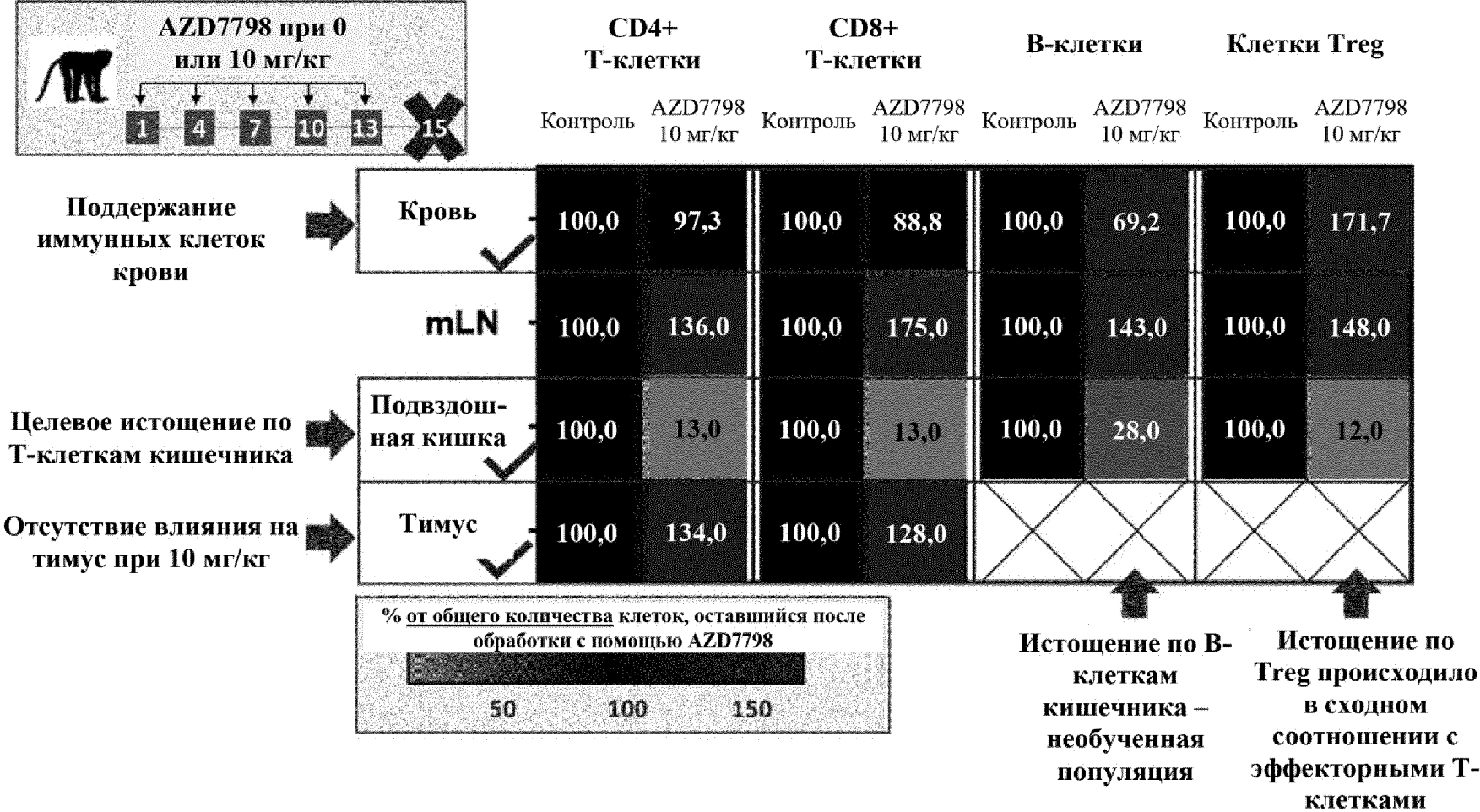
Фигура 16С



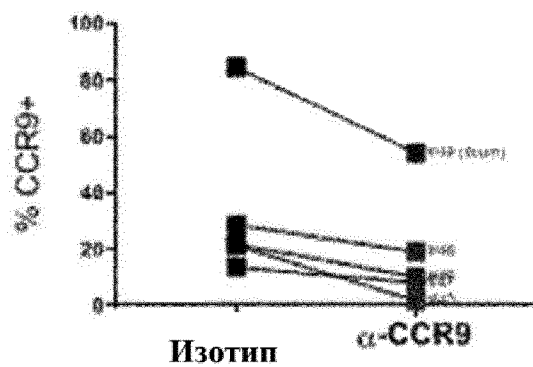
Фигура 16D



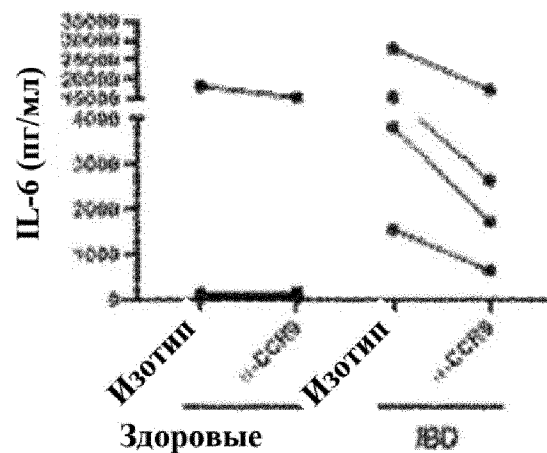
Фигура 17



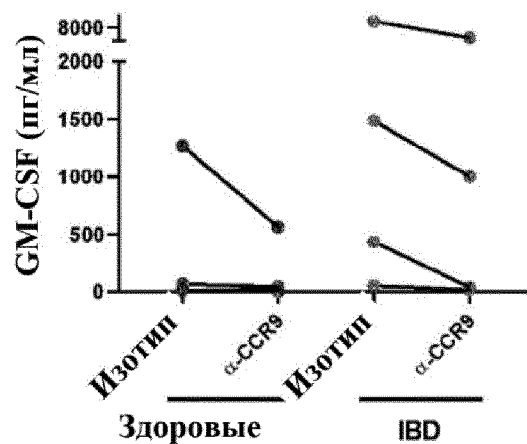
Фигура 18А



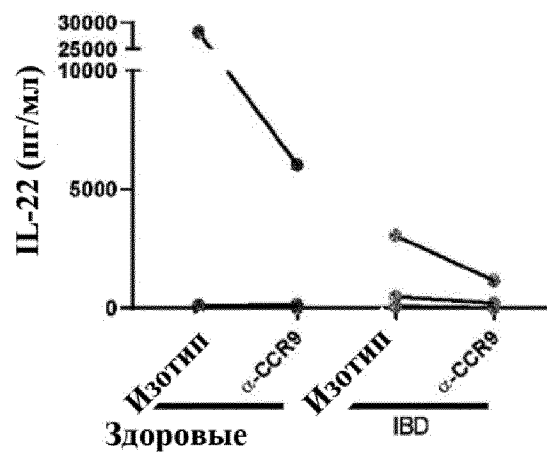
Фигура 18В



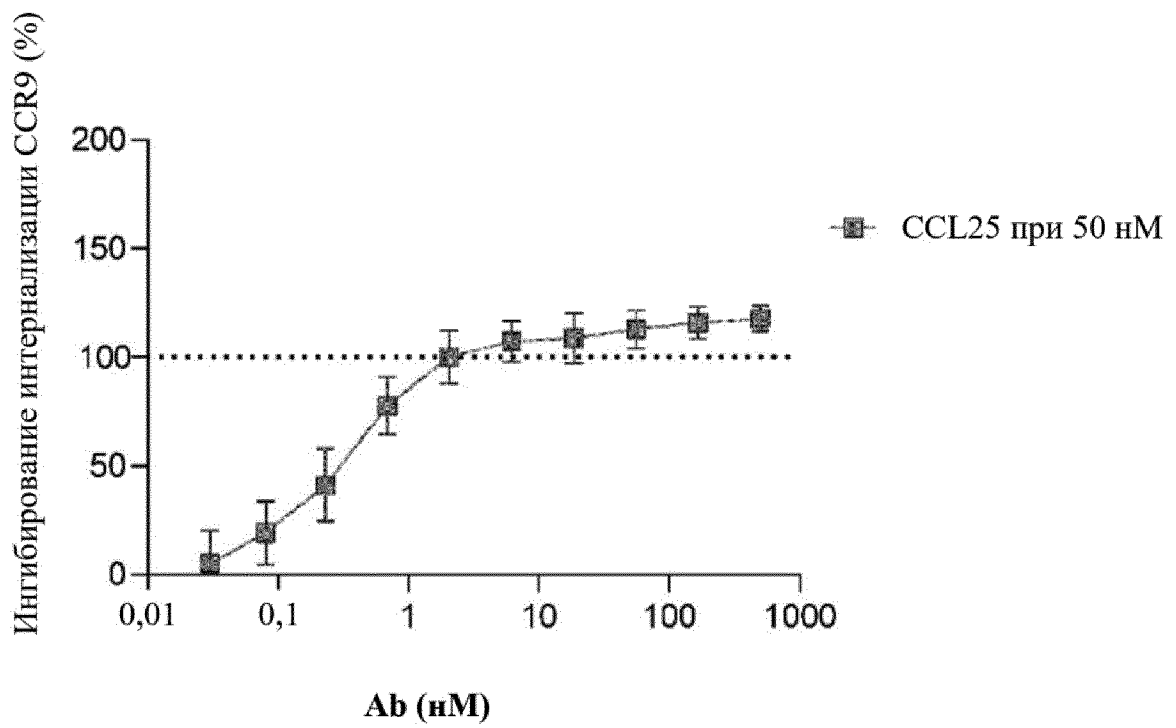
Фигура 18С



Фигура 18D



Фигура 19



Фигура 20

Консенсусная	MTPTDFTSPILNMADDYGSSESTSSMIDYVNFNFTDFYCKKNNVROFASHFLPPAYWLVEIVGALGNSLVLLVWYCTRVK	80
hCCR9B (SEQ ID NO: 82)	-----MADBYGSESTSSMEDYVNFNFTDFYCKKNNVROFASHFLPPYWLVEIVGALGNSLVLLVWYCTRVK	68
hCCR9A (SEQ ID NO: 81)	MTPTDFTSPILNMADDYGSSESTSSMIDYVNFNFTDFYCKKNNVROFASHFLPPYWLVEIVGALGNSLVLLVWYCTRVK	80
Перекрывание N-концов (SEQ ID NO: 80)	-----MADBYGSESTSSMEDYVNFNFTDFYCKKNNVROFAS-----	68
Консенсусная	TMTDMFLINLATAADLLFLVTLPEWALAAADQWKFTFMKVVNSMYKMFYSCVLLIMCTSVDRYIAIAQAMRAHTWREK	160
hCCR9B (SEQ ID NO: 82)	TMTDMFLINLATAADLLFLVTLPEWALAAADQWKFTFMKVVNSMYKMFYSCVLLIMCTSVDRYIAIAQAMRAHTWREK	148
hCCR9A (SEQ ID NO: 81)	TMTDMFLINLATAADLLFLVTLPEWALAAADQWKFTFMKVVNSMYKMFYSCVLLIMCTSVDRYIAIAQAMRAHTWREK	160
Перекрывание N-концов (SEQ ID NO: 80)	-----	148
Консенсусная	RLLYSKMVCFTINVLAAALCIPEILYSQIKESGLAICTMVPSDESTRLKSAVLTLEKVLGFFLPEYVMACCYTIIHIT	240
hCCR9B (SEQ ID NO: 82)	RLLYSKMVCFTINVLAAALCIPEILYSQIKESGLAICTMVPSDESTRLKSAVLTLEKVLGFFLPEYVMACCYTIIHIT	228
hCCR9A (SEQ ID NO: 81)	RLLYSKMVCFTINVLAAALCIPEILYSQIKESGLAICTMVPSDESTRLKSAVLTLEKVLGFFLPEYVMACCYTIIHIT	240
Перекрывание N-концов (SEQ ID NO: 80)	-----	228
Консенсусная	LIQAKKSSKHKALKVTITVLTVFVLSQFPYNCILLVOTIDAYAMFISNCAVSTNIDICFQVPTQTIAFFHSCINPVLVFEV	320
hCCR9B (SEQ ID NO: 82)	LIQAKKSSKHKALKVTITVLTVFVLSQFPYNCILLVOTIDAYAMFISNCAVSTNIDICFQVPTQTIAFFHSCINPVLVFEV	308
hCCR9A (SEQ ID NO: 81)	LIQAKKSSKHKALKVTITVLTVFVLSQFPYNCILLVOTIDAYAMFISNCAVSTNIDICFQVPTQTIAFFHSCINPVLVFEV	320
Перекрывание N-концов (SEQ ID NO: 80)	-----	308
Консенсусная	GERFRRLVKTILKMLGCLISQAQWVSFTIRREGSLKLSMILETTSGALSL	369
hCCR9B (SEQ ID NO: 82)	GERFRRLVKTILKMLGCLISQAQWVSFTIRREGSLKLSMILETTSGALSL	357
hCCR9A (SEQ ID NO: 81)	GERFRRLVKTILKMLGCLISQAQWVSFTIRREGSLKLSMILETTSGALSL	369
Перекрывание N-концов (SEQ ID NO: 80)	-----	36