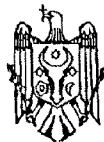




MD/EP 3423496 T2 2020.01.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3423496 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07K 16/28 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0066	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 01/2020, 2020.01.31
(22) Data de depozit: 2017.02.28	
(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17716593.3, 2017.02.28	(80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 27/2019, 2019.07.03
(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3423496, 2019.07.03	(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 02/2019, 2019.02.28
(31) Numărul cererii prioritare: 201662301271 P	
(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.02.29	
(33) Țara cererii prioritare: US	
(71) Solicitant: OSE Immunotherapeutics, FR	
(72) Inventatori: POIRIER Nicolas, FR; MARY Caroline, FR	
(73) Titular: OSE Immunotherapeutics, FR	
(74) Mandatar autorizat: SOKOLOVA Sofia	

(54) Anticorpi neantagoniști direcționați împotriva lanțurilor alfa ale domeniului extracelular al receptorului IL7 și utilizarea acestora în tratamentul cancerului

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la anticorpi umanizați direcționați împotriva domeniului extracelular al lanțului alfa al receptorului pentru interleukina 7 (IL-7), în special receptorul pentru IL-7 uman exprimat în celule umane (numit de asemenea IL-7Ralpha sau IL-7Ra sau CD127) și care nu interferează cu căile semnalelor IL-7 sau TSLP.

Anticorpul conform invenției nu are efect antagonic asupra receptorului IL-7, dar

2
poate încă prezenta activitate citotoxică împotriva celulelor CD127 pozitive. Într-un exemplu de realizare particular, anticorpul nu are efect agonist asupra receptorului IL-7.

Secvențe: 109

Revendicări: 29

Figuri: 7

MD/EP 3423496 T2 2020.01.31

(54) Non-antagonistic antibodies directed against the alpha chain of the IL7 receptor extracellular domain and use thereof in cancer treatment

(57) Abstract:

1

The description concerns humanized antibodies directed against the extracellular domain of the alpha chain of the receptor for interleukin-7 (IL-7), especially against the receptor for human IL-7 expressed on human cells (also designated human IL-7Ralpha or IL-7Ra or CD127) and which do not interfere with the IL-7 or TSLP signaling pathways. The antibodies described do not have an

2

antagonistic effect on the IL-7 receptor, but may still present cytotoxic activity against CD127 positive cells. In a particular embodiment, the antibody does not have an agonist effect on the IL-7 receptor.

Sequences: 109

Claims: 29

Fig.: 7

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Invenția se referă la anticorpii umanizati îndreptați împotriva domeniului extracelular al lanțului alfa al receptorului pentru interleukina 7 (IL-7), în special receptorul pentru IL-7 uman exprimat pe celule umane (de asemenea, desemnat IL-7Ralfa uman sau IL-7Ra sau CD127) și care nu interferează cu căile de semnalizare L-7 sau TSLP.

10 Anticorpii conform invenției nu are efect antagonist asupra receptorului IL-7, dar poate prezenta în continuare activitate citotoxică împotriva celulelor CD127 pozitive. Într-o realizare particulară, anticorpii nu are efect agonist asupra receptorului IL-7.

Invenția furnizează, ca exemplu, un anticorp care recunoaște un epitop uman CD127 cuprinzând secvența din SECV ID NR.: 55 din tabelul 6.

15 În consecință, anticorpii conform invenției sunt adecvați pentru a fi utilizați pentru a trata cancerul în legătură cu proliferarea celulelor pozitive CD127 sau cu o infiltrare a celulelor pozitive CD127 care blochează sistemul imunitar într-o stare tolerantă.

Invenția se referă, de asemenea, la fragmente de anticorpi, în particular fragmente de legare la antigen ale acestor anticorpi sau molecule care cuprind astfel de anticorpi sau astfel de fragmente ca componente pentru prepararea agenților terapeutici, în special agenți imunoterapeutici.

20 Anticorpii conform invenției este definit ca:

Un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia, care cuprinde următoarele CDR-uri:

- VH-CDR1 a cărui secvență de aminoacizi este Effi3-VH3-CDR1 din SECV ID NR.: 14;
 - VH-CDR2 a cărui secvență de aminoacizi este Effi3-VH3-CDR2 din SECV ID NR.: 16;
 - VH-CDR3 a cărui secvență de aminoacizi este Effi3-VH3-CDR3 din SECV ID NR.: 18;
 - 25 • VL-CDR2 a cărui secvență de aminoacizi este Effi3-VL3-CDR2 din SECV ID NR.: 22;
 - VL-CDR3 a cărui secvență de aminoacizi este Effi3-VL3-CDR3 din SECV ID NR.: 24;
- și

- VL-CDR1 a cărui secvență de aminoacizi este Effi3-VL3-CDR1 din SECV ID NR.: 20 sau a cărei secvență de aminoacizi este Effi3-VL4-CDR1 din SECV ID NR.: 26,
- 30 in care anticorpii sau fragmentul de legare la antigen al acestuia se leagă în mod specific la domeniul extracelular al CD127 uman și nu este un antagonist al CD127.

Celelalte variante de realizare ale invenției sunt definite în revendicările anexate.

Semnalizarea IL-7R. Legarea IL-7 la IL-7R declanșează activarea mai multor căi de semnalizare, incluzând kinazele Janus (JAK) -1 și -3, traductorul de semnal și activatorul transcripției 5 (STAT5) și fosfatidilinositol 3-kinaza (PI3-k). STAT1 și STAT3 sunt raportate ca fiind activate, deși nu par să fie căile principale. Activarea căii STAT5 este necesară pentru inducerea proteinei anti-apoptotice Bcl-2 și pentru prevenirea intrării proteinei pro-apoptotice Bax în mitocondrii și astfel pentru supraviețuirea precursorilor celulelor T în dezvoltarea timusului. Activarea căii PI3-k are ca rezultat fosforilarea și retenția citoplasmică a proteinei pro-apoptotice Bad.

40 "Celule pozitive CD127" așa cum s-a utilizat în prezenta invenție desemnează celule care exprimă CD127 la suprafața lor celulară, în particular celule umane care exprimă CD127 uman. În cele mai multe cazuri, celule CD127-pozitive exprimă CD127 într-un complex care formează IL-7R (celule IL-7R-pozitive) și/sau într-un complex care formează TSLPR (celule TSLPR-pozitive).
45 CD127 este exprimat prin diferite celule, inclusiv atât celule T de memorie, cât și în celulele T naive. CD127 este exprimat, în special, de celulele T efectoare (Teff), inclusiv celulele T de repaus și de memorie, și de celulele B imature și este, de asemenea, exprimată de celulele T regulatorii naturale de repaus (Treg natural), deși la niveluri considerabil mai mici. IL-7Rα este esențial pentru promovarea diferențierii timocitelor și a expansiunii clonale a limfocitelor.

50 Importanța căii IL7-CD127 pentru homeostazia celulelor T naive este subliniată de mai multe studii recente care arată că nivelurile de expresie ale IL-7Rα asociat membranei pe celulele T CD4⁺ convenționale corelează cu frecvențele recentului emigrant timic celulele T (RTE)-CD4⁺ la pacienții sănătoși și la pacienții infectați cu HIV, precum și la pacienții cu scleroză multiplă (MS) (Albuquerque și colab., 2007) (Broux și colab., 2010).

55 Proprietățile antagoniste descrise în prezenta invenție pot fi, în particular, antagoniste față de semnalizarea IL-7R indusă de IL-7, în special de IL-7 umană. Un antagonist al semnalizării IL-7R indusă de IL-7 poate fi identificat prin măsurarea inhibării fosforilării STAT5 așa cum este descris în exemple. Fosforilarea indusă de IL7 a STAT5 este un marker al activării IL7R și este de

așteptat ca o interacțiune de anticorpi care antagonizează IL7-IL7R să scadă fosforilarea indusă de IL7 a STAT5.

Limfopoietină Stromală Timică (TSLP) este o citokină celulară epitelială care este activă în limfopoieză și, în particular, este implicată în reglarea dezvoltării celulelor sistemului imunitar, respectiva reglementare având impact în special asupra maturării celulelor menționate. TSLP uman (numărul de acces AF338732) este un factor care exercită polarizarea celulelor dendritice, promovează proliferarea și diferențierea celulelor T și B și care s-a dovedit a juca un rol în bolile pielii și ale plămânilor (He and Geha, 2010).

În consecință, s-a arătat că TSLP se asociază la diferite patologii incluzând boala inflamatorie a căilor respiratorii și dermatita atopică la om și la șoareci (Ying și colab., 2008) (Jariwala și colab., 2011). În plus, s-a arătat că TSLP se asociază reglementării imunității intestinale și a inflamației (Taylor și colab., 2009). Căile de semnalizare TSLP s-au dovedit a fi diferite, la nivel molecular, de semnalizarea indusă de IL-7 (Rochman și colab., 2010).

Intr-o realizare particulară, invenția se referă la utilizarea anticorpilor definiți aici pentru a epuiza subpopulațiile de limfocite sau alte populații celulare care exprimă CD127, în special CD127 uman (incluzând limfocitele T și B normale sau patologice, celulele NK, celulele dendritice și altele tipuri de celule incluzând celule epiteliale) ca rezultat al acțiunii citotoxice a anticorpilor, posibil, dar nu exclusiv, prin ADCC (citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp) și opțional prin CDC (citotoxicitatea dependentă de complement). În consecință, invenția se referă la utilizarea anticorpilor în tratamentul afecțiunilor patologice care implică modificarea răspunsului imun la un pacient uman care conduce la o stare dominantă tolerogenă care implică celule CD127 pozitive, precum și distrugerea celulelor CD127-pozitive maligne, cum ar fi în cancerele hematologice.

Invenția asigură astfel mijloace adecvate pentru a fi utilizate în patologii cum ar fi cele induse de bolile autoimune, respingerea grefei, bolile alergice, bolile respiratorii, infecțiile virale cronice, limfomul, leucemia sau alte boli ale cancerului, inclusiv cele rezultate din tumori solide (de exemplu cancerul de san) aceste patologii sunt asociate cu celule pozitive CD127 (așa cum este descris în Ujiie și colab., *Oncolmunology* 4:6, e1009285; Iunie 2015). Celulele T naive sunt parțial responsabile pentru respingerea acută a organelor și țesuturilor transplantate. Aceste celule pot fi controlate prin medicamente imunosupresoare curențe (inhibitori de calcineurină) și prin anticorpi monoclonali care blochează costimularea (inhibitori de anti-aderență, CD80/86). Celulele T sunt, de asemenea, responsabile pentru respingerea transplantului. Celulele T de memorie se acumulează la om datorită istoricului imunitar dobândit, în special a reacțiilor anterioare împotriva virusurilor. S-a demonstrat că celulele T de memorie pot fi reactivate de aloantigeni ca rezultat al "imunității heterologice", care este reacția încrucișată a apărării antivirale cu aloantigeni (Adams și colab., 2003). Imunitatea imunologică reprezintă o barieră puternică în ceea ce privește inducerea toleranței, deoarece celulele T de memorie, spre deosebire de celulele T naive, sunt programate să activeze rapid, cu o cerință redusă pentru semnalele costimulatorii. Celulele T de memorie pot fi, de asemenea, implicate în respingerea cronică. Pe lângă rolul lor în transplantul de organe și de țesuturi, celulele T naive și de memorie sunt, de asemenea, co-responsabile pentru multe boli autoimune. Acesta este cazul colitei ulcerative (Shinohara și colab., 2011), artritei reumatoide, psoriazisului sau bolii grefă-versus-gazdă.

Mai mult, s-a arătat că mai multe celule maligne prezintă IL-7R. Aceasta este situația în cazul limfomului cutanat Sezary (60% dintre aceștia) sau al leucemiei limfoblastice acute în copilărie, în care aproximativ 15% din cazuri dezvoltă mutație de creștere a funcției în CD127, ceea ce face ca aceste tumori să fie parțial dependente de IL-7 (Shochat și colab., 2011).

Depleția limfocitelor T a fost o abordare imunosupresoare evidentă pentru a contracara respingerea alogrefeelor sau pentru a lupta împotriva autoimunității. Cu toate acestea, epuizarea totală a celulelor T ar putea să nu fie favorabilă pentru inducerea toleranței imunologice.

Direcționarea subpopulațiilor de celule T sau a celulelor T activate (eficiente) selectiv, fără modificarea celulelor Treg, ar putea constitui o abordare pro-tolerogenă (Haudebourg și colab., 2009). CD127 poate fi astfel considerat ca o potențială țintă terapeutică atractivă pentru anticorpii monoclonali (Mabs) care vizează modularea răspunsurilor imune, deoarece astfel de anticorpi monoclonali ar putea avea potențialul de a diminua limfocitele efectoare dar nu regulatorii. S-a presupus, în consecință, că pot prezenta eficacitate în transplant, autoimunitate (Michel și colab., 2008) și malignitate prin antagonizarea accesului IL-7 la IL7-R și limitând astfel funcția și creșterea celulelor T și B.

O terapie cu un anticorp monoclonal împotriva celulelor CD127 + fără a interfera cu căile IL-7 și TSLP ar putea îndeplini acest obiectiv prin eliminarea/neutralizarea celulelor T naive și de memorie în timp ce păstrează celulele Treg sau prin eliminarea celulelor maligne CD127 pozitive.

In acest context, anticorpii monoclonali împotriva IL-7Ra care au proprietăți antagoniste față de IL-7Ra au fost descriși în WO2010/017468 și versiunile lor umanizate în WO2011/094259 cu scopul de a trata boli autoimune cum ar fi scleroza multiplă. Se spune că anticorpii descriși sunt antagoniști pentru legarea IL-7 la receptorul său și activi împotriva expansiunea și supraviețuirea celulelor T_H17 și T_H1 care se presupune că necesită interacțiunea IL-7 cu receptorul lor CD127. In mod similar, anticorpii anti-CD127 au fost raportați în WO2011/104687 sau în WO2013/056984, care sunt considerate a fi utilizate în tratamentul diabetului, lupusului, artritei reumatoide și altor boli autoimune, nu au fost discutate cu privire la posibilele lor efecte asupra interacțiunii lor cu semnalarea indusă de TSLP. Într-o publicație (Racapé și colab., 2009), autorii au analizat interesul receptorului IL-7 alfa ca potențială țintă terapeutică în transplant. După examinarea expresiei IL-7Ralpha pe diferite celule T și celule responsabile cu IL-7, autorii au determinat dacă țintirea celulelor T de memorie care exprimă IL-7Ralpha ar putea prelungi supraviețuirea alogrefei la șoareci și a concluzionat că țintirea IL-7 sau IL-7Ralpha ar avantaja celule Treg de rezervă. Printre perspective, autorii au subliniat faptul că țintirea fie a IL-7 sau a IL-7Ralpha în tratamentul terapeutic ar putea avea consecințe diferite asupra supraviețuirii celulelor care exprima CD127 și ar putea să obțină diferite tipuri de limfopenie. Problema efectelor anticorpilor care ar fi direcționate împotriva IL-7Ralpha depinde de faptul dacă aceștia vor bloca sau vor neutraliza sau dacă anticorpii citotoxici a fost, de asemenea, prezenți din punct de vedere conceptual. Autorii totuși nu au arătat dacă au obținut și au analizat astfel de anticorpi și au exprimat mai degrabă necesitatea unui studiu ulterior pentru a evalua relevanța ipotezei. Având în vedere dezavantajele abordărilor terapeutice disponibile în bolile legate de imunitate și alte afecțiuni care implică IL-7/IL-7Ralpha, cum ar fi diferite tipuri de cancer, inclusiv unele cancer de sân, există încă nevoie de alte medicamente candidat, în special pentru candidați activ cu privire la ținte mai selective în scopul de a controla, de exemplu, modularea activării imune la pacienții umani.

Un astfel de anticorp ar putea fi eficient într-o abordare combinată pentru tratamentul cancerului cu radioterapie de primă linie, chimioterapie, imunoterapie, în special cu inhibitori de punct de control cum ar fi anticorpi anti-CTLA4 sau anti-PDL1 sau anti-Sirpalpa.

Inventatorii îndeplinesc această necesitate în furnizarea de anticorpi care au capacitatea de a recunoaște și elimina celulele T efector în timp ce păstrează celulele T de reglare capabile să inducă toleranță în transplant și care au demonstrat abilitatea de a elimina celulele leucemice CD127 + maligne.

Cererea de brevet internațional WO2013056984 dezvăluie anticorpi îndreptați împotriva domeniului extracelular al lanțului alfa al IL-7-R uman cu o activitate antagonistă și o activitate citotoxică pentru a diminua subpopulațiile limfocitelor sau a altor populații celulare care exprimă CD127. Anticorpul MD707-3 dezvăluit cuprinde lanțurile VH și VL (Secvențele 56 și 57 din Tabelul 6) care au servit la obținerea anticorpului prezent. Anticorpii MD707-3 sunt antagoniști ai IL-7-R și, în particular, inhibă fosforilarea Stat5 indusă de IL-7. Prin contrast, anticorpul umanizat din prezenta invenție, derivat din MD707-3, în mod surprinzător nu este un antagonist IL-7-R, păstrând în același timp o bună legare la domeniul extracelular al CD127 și posibilitatea de a media efectul citotoxic asupra celulelor care exprimă CD127. Mai mult, anticorpul MD707-3 este un antagonist TSLPR, așa cum se arată în Figura 3.b, în timp ce anticorpul umanizat derivat din acesta, denumit Effi3 de aici, nu este.

Inventatorii furnizează mijloace adecvate în acest context, deoarece au obținut anticorpi monoclonali împotriva IL-7Ra și care nu interferează cu calea TSLP contrar ceea ce a fost observat de către inventatorii cu anticorp MD707-3, părinte al anticorpului conform prezentei invenții. MD707-3 a prezentat proprietăți antagoniste TSLP și potențează maturarea celulelor dendritice caracterizate prin exprimarea la suprafața celulară a CD80 și CD86 (datele nu sunt prezentate). Anticorpul conform prezentei invenții constituie noi produse pentru evaluarea beneficiilor terapeutice ale celulelor CD127 + care vizează acțiunea epuizantă și fără antagonizare și nici activarea căii IL-7, nici a căii TSLP.

Invenția se referă astfel la un anticorp sau la un fragment de legare la antigena acestuia care (i) se leagă specific la domeniului extracelular al lanțului alfa al receptorului de IL-7 (denumit CD127), în special al lanțului alfa al receptorului IL-7 exprimat prin celule CD127 pozitive umane și care opțional prezintă activitate citotoxică împotriva celulelor T umane care exprimă CD127 (celule CD127 +) și (ii) nu este un antagonist IL-7-R sau TSLP-R, în special nu este un IL-7 uman sau un antagonist TSLP uman și, în particular, nu inhibă fosforilarea STAT5 indusă de IL-7 și/sau nu inhibă producția de celule stem dendritice umane derivate din sânge stimulată de TSLP (Timus și citochine cu activare reglată, denumi, de asemenea, CCL17) producția de celulele dendritice derivate din sangele uman stimulate de TSLP.

Expresia "*se leagă în mod specific*" sau orice echivalent se referă la capacitatea anticorpului sau a fragmentului de legare la antigen din invenție de a interacționa cu CD127 și de a se lega cu

CD127, de preferință CD127 uman, în timp ce ei nu se leagă sau se leagă cu o afinitate de legare semnificativ mai slabă față de alte molecule, în special la alte proteine. Conjugarea și specificitatea de legare pot fi analizate prin analiza SPR (Rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, Biacore), ELISA sau analiza Western Blot. Într-o realizare particulară, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia sau moleculele himerice cuprinzând respectivul anticorp sau fragmente de legare la antigen ținesc și se leagă la CD127 ca o proteină izolată cu o constantă de disociere (Kd) mai mică decât 5E-10M, în particular mai mică decât 3E-10M.

Deși nu este specificat în fiecare aspect de realizare dezvăluit, proprietățile sau caracteristicile definite ale anticorpilor și fragmentele lor de legare la antigen și proprietățile sau caracteristicile definite ale produselor realizate utilizând acești anticorpi sau fragmente de legare la antigen a acestora sunt definite în special cu privire la moleculele citate atunci când aceste molecule sunt molecule umane (cum ar fi CD127, IL-7, TSLP...).

Invenția furnizează în special două variante ale unui anticorp, denumit Effi3, care cuprind:

- Un domeniu variabil al lanțului greu desemnat Effi3-VH3 sau VH3 sau Effi3-VHvar3 sau VHvar3 (secvența SECV ID Nr.: 2 din Tabelul 6 sau secvența SECV ID Nr.: 8 care include o peptidă semnal), care cuprinde CDRuri desemnate ca VH3-CDR1, VH3-CDR2, VH3-CDR3 sau denumiri echivalente cu prefixele Effi3-VH3, Effi3-VHvar3 sau VHvar3; și
- fie pentru varianta desemnată Effi3-VH3VL3, un domeniu variabil al lanțului ușor desemnat Effi3-VL3 sau VH3 sau Effi3-VLvar3 sau VLvar3 (secvența SECV ID Nr.: 4 din Tabelul 6 sau secvența SECV ID Nr.: 10 care include o peptidă semnal); care cuprinde CDR desemnate ca VL3-CDR1, VL3-CDR2, VL3-CDR3 sau denumiri echivalente cu prefixele Effi3-VL3, Effi3-VLvar3 sau VLvar3;
- sau pentru varianta desemnată Effi3-VH3VL4, un domeniu variabil al lanțului ușor desemnat Effi3-VL4 sau VH3 sau Effi3-VLvar4 sau VLvar4 (secvența SECV ID Nr.: 6 din Tabelul 6 sau secvența SECV ID Nr.: 12 care include o peptidă semnal); care cuprinde CDR desemnate ca VL4-CDR1, VL4-CDR2, VL4-CDR3 sau denumiri echivalente cu prefixele Effi3-VL4, Effi3-VLvar4 sau VLvar4.

Deoarece VL-CDR2 și VL-CDR3 sunt identice pentru lanțurile ușoare VL3 și VL4, ele sunt desemnate, în mod indiferent, VL3-CDR2, VL4-CDR2 sau VL3/4-CDR2 și VL3-CDR3, VL4-CDR3 sau respectiv VL3/4-CDR3.

Anticorpul Effi3 este furnizat în special cu domeniile constante IgG1m E333A (secvența din SECV ID NR.: 28) și CLKappa (secvența din SECV ID NR.: 34) pentru lanțurile grele și, respectiv, lanțuri ușoare. Anticorpul conform invenției este umanizat. În consecință, în plus față de substituțiile din secvențele CDR descrise aici, anticorpii invenției sunt modificați în resturile cadru ale secvențelor lor VH și/sau VL prin substituția resturilor de aminoacizi, relativ la anticorpul MD707-3 de șobolan, în particular, astfel de resturi sunt modificate pentru a se potrivi mai strans cu anticorpii umani care se găsesc în mod natural. Umanizarea poate fi efectuată prin reuniformizarea sau prin grefarea CDR conform tehnicilor cunoscute. Exemple de substituții sunt descrise în secțiunea Exemple. Reuniformizarea este realizată în special prin substituirea resturilor de rozătoare cu resturile de aminoacizi umani. Substituția este realizată într-un mod care să mențină structura cadru a anticorpului original și, de asemenea, prezentarea CDRurilor, permițând astfel interacțiunile cadrelor și CDR-urilor în anticorpul reuniformizat să păstreze conformația nativă a suprafeței care vine în contact cu antigenul astfel încât să rețină afinitatea de legare a antigenului.

Următoarele substituții în cadrul CDR-urilor au fost introduse în anticorpul prezent, relativ la anticorpul MD707-3 de șobolan (a cărui secvență este dezvăluită ca SECV. ID. Nr.: 56 pentru lanțul greu și SECV. ID Nr.: 57 pentru lanțul ușor, asigurând astfel referința pentru pozițiile din resturile de aminoacid substituite): S30T în VH-CDR1 și E64D în VH-CDR2, aceste două substituții definind CDR-urile Effi3-VH3; L59R în VL-CDR2 și A60D în VL-CDR2, aceste două substituții definind CDR-urile Effi3-VL3. În plus față de substituțiile lanțurilor Effi3-VL3, CDR-urile lanțului Effi4-VL4 au o substituție suplimentară S28D în VL-CDR1.

În variante de realizare preferate, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprinde sau constă din:

- un lanț greu cu CDR-urile lanțului greu VH3 dezvăluit aici ca secvență de SECV ID NR.: 2 din Tabelul 6, în special cu VH3-CDR1, VH3-CDR2 și VH3-CDR3 având secvențele din SECV ID NR.: 14, 16 și respectiv 18, în Tabelul 6; și
- un lanț ușor cu CDR-urile lanțului ușor VL3 sau a lanțului ușor VL4 dezvăluit aici ca secvențe de SECV. ID. Nr.: 4 și respectiv 6, în special cu VL3-CDR1, VL3-CDR2 și VL3-CDR3 având secvențele din SECV ID NR.: 20, 22 și respectiv 24 sau cu VL4-CDR1, VL3-CDR2 și VL3-CDR3 având secvențele din SECV ID NR.: 26, 22 și, respectiv, 24.

Intr-o realizare particulară, anticorpus sau fragmentul de legare la antigen are în plus substituția V101T și/sau V102T în VH-CDR3 (CDR3 al lanțului greu).

5 Intr-o altă formă de realizare, anticorpus sau fragmentul de legare la antigen nu are în plus nici o substituție la pozițiile V101 și/sau V102 în VH-CDR3 (CDR3 al lanțului greu) sau nu are substituție V101 sau V102.

10 Intr-o realizare particulară a invenției, anticorpus umanizat este caracterizat prin prezența în lanțurile lor VH și/sau VL a uneia sau mai multora dintre următoarele substituții suplimentare de resturi de aminoacizi în pozițiile identificate în legătură cu număratoarea Kabat în regiunile cadru ale lanțurilor, în ceea ce privește secvențele VH și VL MD707-3 (restul indicat rezultă din substituție, restul original de șobolan al MD707-3 este prezentat, de exemplu, în Tabelele 1 la 4 din exemple):

15 • în secvența VH: în poziția 3 un rest Q, în poziția 15 un rest G, în poziția 16 un rest G, în poziția 21 un rest T, în poziția 80 un rest T, în poziția 87 un rest S, în poziția 91 un rest E, în poziția 95 un rest T, în poziția 118 un rest L și/sau

• în secvența VL: în poziția 7 un rest S, în poziția 9 un rest S, în poziția 11 un rest L, în poziția 12 un rest P, în poziția 18 un rest P, în poziția 47 un rest Q, în poziția 50 un rest K, în poziția 68 un rest S, în poziția 73 un rest G, în poziția 82 un rest R, în poziția 85 un rest A, în poziția 90 un rest T.

20 În variante particulare în care anticorpus conform invenției are substituția S28D în VL-CDR1 (adică are VL-CDR1 din VL4, cu secvența din SECV ID NR.: 26), anticorpus are cel puțin substituția cadru E73G dezvoltată mai sus.

25 În variante de realizare preferate în mod particular, anticorpus din invenție are toate substituțiile de rest cadru prezentate mai sus în lanțul greu. În variante de realizare preferate în mod particular, anticorpus din invenție are toate substituțiile de resturi cadru dezvoltate mai sus în lanț ușor sau toate substituțiile de resturi cadru dezvoltate mai sus, dar pentru G în poziția 73, care este conservată ca un rest E. Într-o realizare particulară, anticorpus sau fragmentul său de antigen are un VL3-CDR1 cu secvența din SECV ID NR.: 20 și are în poziția 73 un rest E păstrat.

30 În realizările preferate în mod particular, anticorpus conform invenției are (sau fragmentul de legare la antigen cuprinde):

- un lanț greu cu secvența de VH3, adică secvența din SECV ID NR.: 2; și
- un lanț ușor cu secvența VL3 (secvența din SECV ID NR.: 4) sau a VL4 (secvența SECV ID Nr.: 6).

35 Aceste caracteristici legate de așa-numitele "poziții umanizate" pot fi combinate cu oricare sau cu toate variantele de realizare ale definiției anticorpilor conform invenției.

Intr-o realizare particulară a invenției, anticorpii din invenție sau fragmentele lor de legare la antigen îndreptate împotriva moleculei CD127 prezente în receptorul IL-7 au în plus proprietatea de a fi citotoxice împotriva celulelor umane, în special a celulelor T umane care exprimă respectivul receptor și într-o realizare preferată împotriva celulelor T tumorale.

40 Intr-o realizare particulară a invenției, anticorpii sau fragmentele de legare la antigen ale acestora țintesc și leagă același lanț alfa IL7-R atunci când este combinat cu receptorul TSLP (cunoscut și ca CCRF2, număr de acces AF338733) ca receptor pentru TSLP (Reche PA și colab., 2001).

45 Un "fragment de legare la antigen" a unui anticorp al invenției este o parte a anticorpului, adică o moleculă care corespunde unei porțiuni din structura anticorpului conform invenției care prezintă capacitatea de legare la antigen pentru lanțul alfa al receptorului IL-7 pentru IL-7 uman, eventual în forma sa nativă; un astfel de fragment prezintă în mod special aceeași sau substanțial aceeași specificitate de legare la antigen pentru antigenul menționat, comparativ cu specificitatea de legare la antigen a anticorpului cu patru lanțuri corespunzătoare. În mod

50 avantajos, fragmentele care leagă antigenul au o afinitate de legare similară cu cea a anticorpilor cu 4 lanțuri corespunzătoare. Totuși, fragmentul de legare la antigen care are o afinitate redusă de legare la antigen față de anticorpii cu 4 lanțuri corespunzătoare este, de asemenea, cuprins în cadrul invenției. Capacitatea de legare la antigen poate fi determinată prin măsurarea afinității anticorpului și a fragmentului considerat. Aceste fragmente de legare la antigen pot fi, de

55 asemenea, desemnate ca fragmente funcționale ale anticorpilor. Fragmentele de legare a fragmentelor de anticorpi sunt fragmente care cuprind domeniile lor hipervariabile desemnate CDRuri (regiuni de determinare complementară) sau părți ale acestora care cuprind locul de recunoaștere al antigenului, adică IL-7Ra al IL-7 uman, definind astfel specificitatea recunoașterii antigenului. Fiecare lanț ușor și greu (respectiv VL și VH) al unei imunoglobuline cu patru lanțuri

are trei CDR-uri, denumite VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3 și VH-CDR1, VH-CDR2, respectiv VH-CDR3.

5 Astfel, invenția se referă la fragmente de anticorpi conform invenției, care cuprind sau constau în toate CDR-urile dintre VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3 și VH-CDR1, VH-CDR2 și VH-CDR3 ale VL3 sau VL4 și VH3, respectiv.

10 Persoana de specialitate va fi capabilă să determine locația diferitelor regiuni/domenii ale anticorpilor prin referire la definițiile standard prezentate în acest sens, incluzând un sistem de numerotare de referință (Martin, 2001) Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual, ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg]] sau prin referire la sistemul de numerotare al lui Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1987) sau prin aplicarea algoritmului IMGT "colier de perle" (<http://www.imgt.org/IMGTindex/Colliers.html>). În acest sens, pentru definirea secvențelor invenției, se remarcă faptul că delimitarea regiunilor/domeniilor poate varia de la un sistem de referință la altul. În consecință, regiunile/domeniile definite în prezenta invenție cuprind secvențe care prezintă variații în lungime de +/- 10%, iar localizarea secvențelor în cauză în secvența de lungime completă a anticorpilor poate varia cu +/- 10%.

15 Intr-o realizare particulară a invenției, anticorpus umanizat sau fragmentul său de legare la antigen are secvențele CDR definite aici (adică secvențele CDR ale VH3 și ale VL3 sau VL4, eventual cu substituția suplimentară V101T și/sau V102T în VH-CDR3) și cuprinde în regiunile sale cadru, la pozițiile determinate în conformitate cu numărătoarea Kabat, unul sau mai multe dintre următoarele resturi de aminoacizi:

• în secvența VH: în poziția 3 un rest Q, în poziția 15 un rest G, în poziția 16 un rest G, în poziția 21 un rest T, în poziția 80 un rest T, în poziția 87 un rest S, în poziția 91 un rest E, în poziția 95 un rest T, în poziția 118 un rest L,

25 • în secvența VL: în poziția 7 un rest S, în poziția 9 un rest S, în poziția 11 un rest L, în poziția 12 un rest P, în poziția 18 un rest P, în poziția 47 un rest Q, în poziția 50 un rest K, în poziția 68 un rest S, în poziția 73 un rest G sau un rest E, în special un rest E, în poziția 82 un rest R, în poziția 85 un rest A, în poziția 90 un rest T.

30 Poziția resturilor menționate mai sus în fragmentele cadru ale anticorpului sau fragmentului său de legare la antigen poate fi, de asemenea, preluată din secvențele domeniilor variabile ale MD707 ale lanțurilor grele și ușoare așa cum se prezintă în SECV ID NR.: 56 (VH) și SECV ID NR.: 57 (VL).

35 Intr-o altă variantă de realizare, anticorpus umanizat sau fragmentul de legare la antigen a acestuia are secvențele CDR definite aici (adică secvențele CDR ale VH3 și ale VL3 sau VL4) și cuprinde în continuare în regiunile fragmentului său cadru, în pozițiile determinate conform numerotării Kabat, unul sau mai multe dintre următoarele resturi de aminoacizi, în special toate acestea:

40 • în secvența VH: în poziția 3 un rest Q, în poziția 15 un rest G, în poziția 16 un rest G, în poziția 21 un rest T, în poziția 80 un rest T, în poziția 87 un rest S, în poziția 91 un rest E, în poziția 95 un rest T, în poziția 118 un rest L,

• în secvența VL: în poziția 7 un rest S, în poziția 9 un rest S, în poziția 11 un rest L, în poziția 12 un rest P, în poziția 18 un rest P, în poziția 47 un rest Q, în poziția 50 un rest K, în poziția 68 un rest S, în poziția 73 un rest G sau un rest E, în special un rest E, în poziția 82 un rest R, în poziția 85 un rest A, în poziția 90 un rest T.

45 În variante particulare în care anticorpus umanizat sau fragmentul său de legare la antigen cuprinde un rest D din poziția 28 (în VL-CDR1, ca în VL4-CDR1), respectivul anticorp sau fragment cuprinde un rest G la poziția 73 (în resturile fragmentului cadru VL).

50 În variante particulare în care anticorpus umanizat sau fragmentul său de legare la antigen cuprinde un rest S la poziția 28 (în VL-CDR1, ca în VL3-CDR1), respectivul anticorp sau fragment cuprinde un rest E din poziția 73 (în resturile fragmentului cadru VL).

55 În variante de realizare preferate, anticorpus sau fragmentul de legare la antigen a acestuia are toate resturile indicate mai sus la poziția cadru indicată în lanțul său greu. În variante de realizare preferate, anticorpus sau fragmentul său de legare la antigen are toate resturile indicate la poziția cadru indicată în lanțul său ușor sau are toate resturile indicate la poziția cadru indicată, dar pentru poziția 73 în lanțul său ușor unde se găsește un rest E.

60 Pe baza structurii imunoglobulinelor cu patru lanțuri, fragmentele de legare la antigen pot fi astfel definite prin comparație cu secvențele de anticorpi din bazele de date disponibile și din stadiul tehnicii (Martin, 2001) și în special prin compararea localizării domeniilor funcționale în aceste secvențe, observând că pozițiile domeniului cadru și al domeniilor constante sunt bine definite

pentru diferite clase de anticorpi, în special pentru IgG, în special pentru IgG de mamifere. O astfel de comparație implică și date referitoare la structurile tridimensionale ale anticorpilor.

Pentru exemplul ilustrativ al exemplelor de realizare specifice ale invenției, fragmentele de legare la antigen ale unui anticorp care conțin domeniile variabile cuprinzând CDR ai respectivului anticorp cuprinde Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ care sunt bine definite cu referință la Kabat (NIH 1987), Martin ACR și colab., și de asemenea Roitt I. și colab. (Fundamental and Applied Immunology MEDSI/McGraw-Hill). Fragmentele Fv constau din domeniile VL și VH ale unui anticorp asociate împreună prin interacțiuni hidrofobe; în fragmentele dsFv, heterodimerul VH:VL este stabilizat printr-o legătură disulfidică; în fragmentele scFv, domeniile VL și VH sunt conectate unul cu celălalt printr-un linker peptidic flexibil, formând astfel o proteină cu lanț unic. Fragmentele Fab sunt fragmente monomerice obținute prin digestia cu papaină a unui anticorp; ele cuprind întregul lanț L și un fragment VH-CH1 al lanțului H legat împreună printr-o legătură disulfidică. Fragmentul F(ab')₂ poate fi produs prin digestia cu pepsină a unui anticorp aflat sub balamaua disulfură; acesta cuprinde două fragmente Fab' și, în plus, o porțiune a regiunii balama a moleculei de imunoglobulină. Fragmentele Fab' sunt obținute din fragmentele F(ab')₂ prin tăierea unei legături disulfidice în regiunea balamalei. Fragmentele F(ab')₂ sunt divalente, adică ele cuprind două situsuri de legare a antigenului, cum ar fi molecula imunoglobulinei native; pe de altă parte, Fv (un dimer VHVL constituind porțiunea variabilă a Fab), fragmentele dsFv, scFv, Fab și Fab' sunt monovalente, adică cuprind un singur situs de legare la antigen (Chan and Carter, 2010).

În consecință, invenția se referă la fragmente de legare la antigen care cuprind secvențele care sunt descrise aici și care sunt fragmente monovalente sau divalente în ceea ce privește recunoașterea antigenului și sunt următoarele:

- fragmentul Fv constând din lanțurile VL și VH asociate împreună prin interacțiuni hidrofobe;
- fragmentul dsFv în care heterodimerul VH:VL este stabilizat printr-o legătură disulfidică;
- fragmentul scFv în care lanțurile VL și VH sunt conectate unul cu altul printr-un linker peptidic flexibil, formând astfel o proteină cu lanț unic;
- Fragmentul Fab care este un fragment monomer cuprinzând întregul lanț L și un fragment VH-CH1 al lanțului H legat împreună printr-o legătură disulfidică;
- Fragment Fab;
- Fragmentul F(ab')₂ care cuprinde două fragmente Fab' și, suplimentar, o porțiune a regiunii balamale a unui anticorp.

Aceste fragmente bazice de legare la antigen ale invenției pot fi combinate împreună pentru a obține fragmente multivalente de legare la antigen, cum ar fi diacorpi, triacorpi sau tetracorpi. Aceste fragmente multivalente de legare la antigen sunt, de asemenea, parte a prezentei invenții.

Mai multe cercetări pentru a dezvolta anticorpi terapeutici au condus la proiectarea regiunilor Fc pentru a optimiza proprietățile anticorpilor care să permită generarea de molecule care să fie mai potrivite pentru activitatea farmacologică necesară acestora (Strohl, 2009). Regiunea Fc a unui anticorp mediază funcțiile de înjumătățire serică și funcția efectoare, cum ar fi citotoxicitatea dependentă de complement (CDC), citotoxicitatea celulară dependentă de anticorpi (ADCC) și fagocitoza celulară dependentă de anticorpi (ADCP). Mai multe mutații localizate la interfața dintre domeniile CH2 și CH3, cum ar fi T250Q/M428L (Hinton și colab., 2004) și M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F (Vaccaro și colab., 2005) au arătat o creștere a afinității de legare la FcRn și timpul de înjumătățire al IgG1 in vivo. Cu toate acestea, nu există întotdeauna o legătură directă între legarea crescută a FcRn și timpul de înjumătățire îmbunătățit (Datta-Mannan și colab., 2007). O abordare pentru îmbunătățirea eficacității unui anticorp terapeutic este creșterea stării sale serice, permițând astfel niveluri mai mari de circulație, administrare mai puțin frecventă și doze reduse. Proiectarea regiunilor Fc poate fi dorită fie pentru a reduce fie pentru a mări funcția efectoare a anticorpului. Pentru anticorpi care vizează molecule de suprafață celulară, în special acelea pe celule imune, este necesară abrogarea funcțiilor efectoare. În schimb, pentru anticorpii destinați utilizării oncologice, creșterea funcțiilor efectoare poate îmbunătăți activitatea terapeutică. Cele patru izotipuri IgG umane leagă receptorii Fcγ activi (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa), receptorul inhibitor FcγRIIb și prima componentă a complementului (C1q) cu afinități diferite, dând funcții efectoare foarte diferite (Bruhns și colab., 2009). Legarea IgG la FcγR sau C1q depinde de resturile situate în regiunea balamalei și domeniul CH2. Două regiuni ale domeniului CH2 sunt critice pentru legarea FcγR și C1q și au secvențe unice în IgG2 și IgG4 (Armor și colab.,

1999) (Shields și colab., 2001) (Idusogie și colab., 2000) (Steurer și colab., (1995) (Lazar și colab., 2006) (Ryan și colab., 2007) (Richards și colab., 2008) (Labrijn și colab., 2009).

In variante de realizare particulare, anticorpii conform invenției are următoarele domenii constante:

- 5 pentru lanțul greu, domeniul constant IgG1m-E333A (secvența SECV ID Nr.: 28 din Tabelul 6) sau domeniile IgG4m-S228P (secvența din SECV ID NR.: 30) sau IgG2b (secvența SECV ID Nr.: 32);
 10 pentru lanțul ușor, domeniul constant CLkappa (secvența SECV ID Nr.: 34) sau domeniul CLlambda (secvența din SECV ID NR.: 36).

10

Anticorpii conform invenției, în special anticorpii umanizati, poate fi un anticorp monoclonal. Celulele umane care exprimă CD127 ca lanț al receptorului IL-7, care sunt ținta anticorpilor conform invenției și fragmente ale acestora, sunt în principal limfocite T și mai precis sunt subpopulații ale limfocitelor T efectoare, incluzând celule T naive și de memorie, dar nu sunt celulele T reglatoare, în special în cazul în care nu sunt Treg naturale de repaus. Celulele T de memorie sunt generate ca rezultat al provocării antigenului și definite în principal prin caracteristicile lor funcționale, incluzând capacitatea de a fi supus revocării proliferării la reactivarea și diferențierea în celulele efectoare secundare și de memorie.

15

Conform unei variante de realizare a invenției, anticorpii și fragmentele de legare la antigen ale acestora, având "*activitate citotoxică împotriva celulelor T*" sau proprietăți citotoxice (anticorpi citotoxici) dau naștere la epuizarea populației de celule T efectoare prin omorârea acestor celule și, în consecință, reducerea numărului acestor celule atunci când sunt administrate. Dimpotrivă, acești anticorpi nu modifică subpopulația celulelor T regulate sau nu o modifică într-o măsură semnificativă, permițând celulelor Treg să-și îndeplinească funcția.

20

Conform unei realizări particulare a invenției, anticorpii citotoxici prezintă citotoxicitate celulară dependentă de anticorpi (ADCC). Potențialul ADCC de anticorp a fost considerat pozitiv când citotoxicitatea specifică a fost superioară cu 5%.

25

In variante de realizare particulare, anticorpii conform invenției cuprinde un lanț greu cu domeniul constant al IgG1 uman, cu mutația E333A, adică secvența SECV ID Nr.: 28 (în Tabelul 6). În variante de realizare particulare, anticorpii conform invenției cuprinde un lanț ușor cu domeniul constant CLkappa al IgG1 uman, cu secvența SECV ID Nr.: 34.

30

In variante de realizare particulare, anticorpii conform invenției are un lanț greu dezvăluit aici ca Effi3_VH3_IgG1m (E333A) cu secvența din SECV ID NR.: 42. În anumite variante de realizare, anticorpii conform invenției are un lanț ușor descris aici ca Effi3_VL3_CIKappa cu secvența SECV ID Nr.: 50 sau are un lanț ușor descris aici ca Effi3_VL4_Clkappa, cu secvența SECV ID Nr.: 48.

35

Proprietățile ADCC pot fi evaluate într-o analiză ADCC, cum ar fi testul descris în exemple. Când anticorpii conform invenției este un anticorp de șobolan, celulele efectoare utilizate în analiza ADCC sunt celulele LAK (killer activate de limfocine) de șobolan. Atunci când anticorpii sunt umanizați, analiza ADCC poate fi efectuată pe celule NK umane.

40

Conform unei alte variante de realizare, un anticorp sau un fragment de legare la antigen acestuia în cadrul invenției nu este un antagonist al IL7 și/sau nu este un antagonist al TSLPR. Un "*Antagonist al IL-7R*" înseamnă că anticorpii sau fragmentele lor de legare la antigen conform invenției, care ținesc IL-7Ralpha, au efectul de a împiedica accesibilitatea receptorului IL-7 exprimat pe celule CD127, în special celulele T efectoare umane, în special celulele T de memorie umane, pentru partenerul său de legare IL-7, în special IL-7 uman, în timp ce anticorpii sau fragmentele în sine nu declanșează semnalizarea de către receptorul IL7-R. Aceeași definiție se aplică în mod similar "*antagoniștilor TSLPR*", care se leagă de TSLPR, împiedică legarea ligandului și nu declanșează el însuși semnalizarea. Conform unei realizări particulare a invenției, un anticorp sau un fragment de legare la antigen a acestuia în cadrul invenției nu este un "antagonist al CD127" ceea ce înseamnă că acesta nu este nici un antagonist al IL-7, nici un antagonist al TSLP. În acest sens, antagonismul față de IL-7 și TSLP poate fi definit ca o combinație a oricăror exemple de realizare furnizate în continuare ca exemple de realizare particulare pentru definirea faptului că nu este un antagonist al IL-7R sau nu este un antagonist al TSLP. Ca un rezultat al faptului că nu este un antagonist al receptorului IL-7, contrar anticorpilor din stadiul tehnicii, anticorpii conform invenției sau fragmentul său funcțional nu conduce la limfopenie puternică datorită prevenirii generării de celule T-timice dependente de IL-7. Un test pentru măsurarea proprietăților antagoniste ale anticorpilor sau a fragmentelor funcționale ale acestora din invenție este descris în exemple. În variante de realizare particulare, anticorpii sau fragmentul de legare la antigen conform invenției este un antagonist al CD127. În realizările particulare, anticorpii sau fragmentul de legare la antigen conform invenției este un antagonist al

45

50

55

60

IL7-R. In variante de realizare particulare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen conform invenției este un antagonist al TSLPR.

In variante de realizare particulare, anticorpul și fragmentele de legare la antigen ale acestuia nu reduc producerea de TARC a celulelor dendritice stimulate cu TSLP atunci cand sunt administrate.

5 În realizările particulare, producerea de TARC în celulele dendritice stimulate cu TSLP, în particular în condițiile descrise în secțiunea Exemple, este redusă cu nu mai mult de 20%, de preferință nu mai mult de 10% și chiar mai preferabil nu mai mult de 5% în prezența anticorpilor la o concentrație de 5 $\mu\text{g/ml}$ sau mai mult (sau în prezența unei concentrații echivalente de fragment de legare a antigenului) și/sau este redusă cu nu mai mult de 80%, de preferință nu mai mult de 50%, mai preferabil nu mai mult decăt 25% și chiar mai preferabil nu mai mult de 10% în prezența anticorpilor la concentrații de 25 $\mu\text{g/ml}$ sau mai mult (sau în prezența unei concentrații echivalente de fragment care leagă antigenul).

10 In variante de realizare particulare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen a acestuia nu inhibă semnalizarea STAT-5 a IL7-R indusă de IL-7. În realizările particulare, fosforilarea STAT-5 în celulele stimulate cu IL-7, în special în condițiile descrise în secțiunea Exemple, este redusă cu nu mai mult de 30%, de preferință cu nu mai mult de 25% și chiar mai preferabil cu nu mai mult de 20 % în prezența anticorpilor la o concentrație de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ sau mai mult și preferabil la o concentrație de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ sau mai mult (sau în prezența unei concentrații echivalente de fragment de legare la antigen) și/sau este redusă prin mai mult de 50%, de preferință nu mai mult de 35% și
20 chiar mai preferabil cu nu mai mult de 20% în prezența anticorpilor la o concentrație de 1 $\mu\text{g/ml}$ sau mai mult (sau în prezența unei concentrații echivalente de legare la antigen fragment) și/sau este redus cu nu mai mult de 90%, preferabil nu mai mult de 70%, mai preferabil nu mai mult de 50% și chiar mai preferabil cu nu mai mult de 20% în prezența anticorpilor la o concentrație de 5 $\mu\text{g/ml}$ sau mai mult și de preferință la o concentrație de 10 $\mu\text{g/ml}$ sau mai mult (sau în prezența unei concentrații echivalente de fragment de legare la antigen).

25 Anticorpul împotriva domeniului extracelular al receptorului IL7 (sau TSLPR), și în special a CD127, pot acționa ca agoniști ai IL7-R (sau TSLPR), adică pot concura cu legarea ligandului, în timp ce legarea lor poate duce la activarea tuturor sau a unei părți din căile de semnalizare a IL7-R (sau TSLPR) în absența ligandului și/sau la creșterea activării în prezența ligandului. În variante de realizare particulare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen conform invenției nu este un agonist al CD127. In variante de realizare particulare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen conform invenției nu este un agonist al IL7-R. In variante de realizare particulare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al invenției nu este un agonist al TSLPR. Într-o realizare particulară, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al invenției nu este nici un
35 agonist al căii IL-7, nici un agonist al căii TSLPR.

In variante de realizare particulare, anticorpul și fragmentele de legare la antigen a acestuia nu cresc producția TARC a celulelor dendritice stimulate cu TSLP atunci cand sunt administrate. În realizări particulare, producerea TARC în celule dendritice stimulate cu TSLP, în particular în condițiile descrise în secțiunea Exemple, este crescută cu nu mai mult de 60% și mai preferabil cu
40 nu mai mult de 50% în prezența anticorpilor la o concentrație de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ sau mai mult, de preferință la o concentrație de 1 $\mu\text{g/ml}$ sau mai mult și mai preferabil în prezența a 25 $\mu\text{g/ml}$ sau mai mult (sau în prezența unei concentrații echivalente a fragmentului care leagă antigenul). În variante de realizare particulare, anticorpul și fragmentul de legare la antigen conform invenției nu induc producția de TARC în celule în absența TSLP, în special producția de TARC în prezența concentrațiilor de anticorp sau fragment de legare la antigen de mai sus și în absența TSLP este de
45 35% sau mai puțin, de preferință 20% sau mai puțin și mai preferat 10% sau mai puțin, în prezența TSLP și în absența anticorpului sau fragmentului care leagă antigenul.

In variante de realizare particulare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen a acestuia nu crește semnalul STAT-5 al IL7-R indus de IL-7. În realizările particulare, fosforilarea STAT-5 în celulele stimulate cu IL-7, în special în condițiile descrise în secțiunea Exemple, este mărită cu nu
50 mai mult de 20%, de preferință cu nu mai mult de 10% și chiar mai preferabil cu nu mai mult de 5 % în prezența anticorpilor la o concentrație de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ sau mai mult, de preferință la o concentrație de 1 $\mu\text{g/ml}$ sau mai mult și chiar mai preferabil la o concentrație de 10 $\mu\text{g/ml}$ sau mai mult (sau în prezența unui anticorp concentrație echivalentă a fragmentului de legare la antigen).

55 În exemple de realizare particulare, fosforilarea STAT-5 în absența IL-7 și în prezența anticorpului sau fragmentului de legare la antigen la concentrațiile de mai sus este de 20% sau mai puțin, de preferință 10% sau mai puțin și chiar mai preferabil 5% sau mai puțin din fosforilarea menționată în prezența IL-7 și în prezența anticorpului (sau a fragmentului de legare la antigen).

60 Anticorpul din stadiul tehnicii care au atât proprietăți citotoxice cât și antagoniste pentru celulele CD127 pozitive care permit efectele cumulative ale acestor proprietăți în ceea ce privește epuizarea celulelor T efectoare, în special a celulelor T de memorie în special, permițând astfel o

epuizare mai puternică (epuizarea din bazin a celulelor CD127+) și reducerea corespunzătoare a numărului de celule T țintă. Anticorpul conform invenției induce o epuizare mai mică a celulelor T CD127 care nu induc limfopenie care ar putea fi un efect advers în anumite circumstanțe.

5 Invenția furnizează, de asemenea, polinucleotide care codifică anticorpii (și fragmentele) din invenție. Astfel de polinucleotide sunt dezvăluite în special în Tabelul 6. Acestea pot fi furnizate ca polinucleotide izolate. Persoana de specialitate va realiza că, datorită degenerării codului genetic, secvențele de polinucleotide distincte de acestea, dezvăluite în mod explicit, pot codifica aceleași secvențe de aminoacizi; astfel de secvențe de polinucleotide sunt incluse, de asemenea, în prezenta invenție.

10 Intr-o realizare particulară, polinucleotida cuprinde secvențele din SECV ID NR.: 13, 15, 17, 19, 21 și 23 sau secvențele din SECV ID NR.: 13, 15, 17, 25, 21 și 23, în special cuprinzând secvențele SECV ID NR.: 1 și 3 sau secvențele din SECV ID NR.: 1 și 5, în special cuprinzând secvențele din SECV ID NR.: 41 și 47 sau secvențele din SECV ID NR.: 41 și 49.

15 Intr-o realizare particulară, invenția se referă la un vector care cuprinde polinucleotida din invenție. Vectorul poate fi o plasmidă adecvată pentru transfecția celulară sau poate fi un vector adecvat pentru transducția celulară, cum ar fi un vector viral.

20 Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen a acestuia poate fi obținut, în special, prin sinteza ADN. Este posibil să se sintetizeze cADN-ul anticorpului dorit și să se cloneze cADN-ul respectiv într-un vector adecvat. Sinteza, clonarea și exprimarea unui anticorp (sau a unui fragment de legare a antigenului) pot fi realizate conform metodelor obișnuite în domeniu și ușor accesibile persoanelor de specialitate.

25 Un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia conform invenției este format în special, în mod avantajos, împotriva unei molecule care este CD127 exprimată de celule T umane, eventual format de la o imunizare sub forma unei polipeptide native sau a unei molecule recombinante. De preferință, anticorpul este format împotriva unei polipeptide care constă din sau cuprinde epitopul cu secvența ESGYAQNGLDEAELDDYSFSCYSQLE (SECV ID Nr.: 55 din Tabelul 6).

30 Imunizarea poate fi efectuată în conformitate cu protocolul descris în exemplele de mai jos: Fc CD127 himera recombinantă (10975-H03H Sino Biological, Beijing, China) a fost utilizată pentru a imuniza șobolani, cum ar fi șobolani din specia LOU/C IgkIA disponibil la Universitatea din Louvain, Belgia). Hibridomul a fost obținut prin fuziunea celulelor mononucleare de splină cu imunocitomul IR983F de șobolan LOU, o linie celulară ne-secretoare și rezistentă la azaguanină, conform unei proceduri descrise anterior (Chassoux și colab., Immunology 1988 65 623-628). Hibridomul a fost mai întâi testată în funcție de capacitatea anticorpilor monoclonali secretați de a se lega de molecula CD127 recombinantă (CD127 Fc himeră; 10975-H03H, Sino Biological, Beijing, China). Hibridomul a fost apoi testat pentru capacitatea anticorpilor monoclonali de a se lega de CD127 exprimată de celulele T umane.

35 "*Celulele hibridoma*" în conformitate cu invenția, sunt celulele generate prin fuziunea celulelor producătoare de anticorpi (limfocite B) de la un animal imunizat anterior cu un imunogen selectat și un partener de fuziune care sunt celule de mielom care permit să asigure imortalitate celulei de fuziune rezultate. Celulele de mielom și celulele producătoare de anticorpi (celulele B cum ar fi splenocitele) pot fi de aceeași origine și sunt celule eucariote, în special celule de mamifere ale aceluiași animal. Ele pot fi de origine diferită, dând astfel naștere unui heterohibridom. Celulele de mielom cum ar fi imunocitomul IR983F de șobolan LOU, o linie celulară care nu secretă și care rezistă la azaguanină sunt alese între celulele care nu produc imunoglobuline pentru a permite hibridomului preparat să secrete numai anticorpi monoclonali cu specificitatea dorită. Alte celule adecvate pentru promovarea ADCC, cum ar fi cele descrise în paginile următoare pentru prepararea anticorpilor prin expresie în celule recombinante, pot fi utilizate în locul imunocitomului de șobolan. Astfel de celule sunt, în mod avantajos, celule care au o capacitate scăzută sau fără fucozilare. Prepararea hibridomului adecvat pentru realizarea invenției se realizează conform tehnicilor convenționale. Aplicările sunt descrise în detaliu în exemplele prezentei cereri, ale căror caracteristici dezvăluite pot fi adaptate la alte celule utilizate ca parteneri de fuziune. Un hibridom particular dezvăluit în prezenta invenție este MD707-3 depus la nr. I-4532 la 28 septembrie 2011 la CNCM (National Collection of Cultures of Microorganisms, Paris, Franța) în conformitate cu prevederile Tratatului de la Budapesta.

50 Hibridomul menționat permite producerea unui anticorp de șobolan desemnat MD707-3 care a fost modificat conform invenției pentru a furniza anticorpi umanizați Effi3.

60 Fragmentele de legare la antigen ale anticorpului pot fi obținute pornind de la anticorp, în special prin utilizarea digestiei enzimatică conform unor tehnici bine cunoscute incluzând digestia cu papaină sau pepsină sau folosind orice tehnică de clivaj adecvată. Acestea pot fi exprimate în mod alternativ în celule gazdă modificate prin recombinare cu secvențe de acid nucleic care

codifică secvența de aminoacizi a numitelor fragmente sau pot fi sintetizate, în special sintetizate chimic. În consecință, anticorpul conform invenției, incluzând anticorpul modificat, și fragmentele de legare la antigen ale anticorpilor pot fi, de asemenea, preparați prin tehnici clasice de inginerie genetică, cum ar fi cele descrise de Sambrook și colab. [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989) și versiuni actualizate].

În conformitate cu invenția, "legarea" la proteina IL-7Ra se referă la o interacțiune tip antigen-anticorp și cuprinde proprietățile de "legare specifică" a anticorpilor sau a fragmentelor care leagă antigenul, care legătura specifică înseamnă că anticorpul sau fragmentele care leagă antigenul se leagă la proteina IL-7Ra și în plus nu se leagă sau se leagă cu o afinitate semnificativ mai slabă față de alte proteine (de exemplu, receptorul citokinic γ -lanț uzual). Specificitatea de legare și legarea pot fi analizate în conformitate cu testele descrise în exemple și în particular pot fi analizate prin analiză ELISA sau Western Blot.

Invenția se referă în consecință la versiunile de polipeptide VH și VL așa cum s-a descris mai sus, care cuprind sau nu peptida semnal. Peptida semnal poate fi necesară în timpul preparării polipeptidelor în celule.

Deoarece cea mai semnificativă proprietate a unui anticorp terapeutic este activitatea, este important ca substituțiile propuse în timpul reuniformizării și de-imunizării să nu afecteze afinitatea sau stabilitatea anticorpului. O mare cantitate de informații a fost colectată în ultimii 20 de ani în ceea ce privește umanizarea și grefarea CDR-urilor (Jones și colab., 1986)(Ewert și colab., 2003), proprietățile biofizice ale anticorpilor (Ewert și colab., 2003), conformația buclelor CDR (Chothia și Lesk, 1987) (Al-Lazikani și colab., 1997) (North și colab., 2011) și pentru fragmentul cadru (Vargas-Madrado și Paz-García, 2003) (Honegger și colab., 2009), care împreună cu progresele în modelarea proteinelor (Desmet și colab., 2002) (Almagro și colab., 2014) face posibilă umanizarea și de-imunizarea predictivă a anticorpilor cu afinitate și stabilitate de legare reținută. Cu toate acestea, în general rămâne necesar să se testeze pentru proprietățile dorite ale unui anticorp cu o secvență modificată. Testele pentru caracteristicile anticorpului (sau a fragmentului care leagă antigenul) sunt descrise aici, în special în secțiunea Exemple.

Secvențele specifice descrise aici, de exemplu Effi3_VH3VL3 și Effi3_VH3VL4, sunt umanizate într-o mare măsură și umanizarea ulterioară nu ar fi considerată, în general, necesară, în timp ce inversarea unor substituții pentru a restabili resturile originale de șobolan nu ar fi, în general, considerate avantajoasă cel puțin dacă se caută un anticorp umanizat, în special pentru administrarea la om. În variante de realizare particulare, anticorpul este umanizat și/sau de-imunizat. În variante de realizare particulare, anticorpul sau fragmentul care leagă antigenul este adecvat pentru administrare la oameni și, în particular, nu induce o reacție imunitară adversă la oameni datorită prezenței secvențelor non-umane sau nu induce o astfel de reacție la un nivel clinic inacceptabil.

Persoana de specialitate ar fi conștientă că, dacă s-ar căuta o îmbunătățire a unei caracteristici prin substituții în domeniul variantei față de secvențele descrise în Tabelul 6, numai un număr limitat de substituții ar fi de așteptat să ofere o astfel de îmbunătățire păstrând în același timp alte caracteristici (fie sau nu, substituțiile menționate au efectul de a restabili aminoacizii originali ai secvenței MD707-3 a șobolanului). Un număr mic de variante ar trebui, prin urmare, să fie testate și să poată fi testate cu ușurință utilizând metodele din prezenta invenție și metodele cunoscute din domeniul extracelular al CD127, opțional competiția cu IL-7 și/sau TLSP, efectul antagonist asupra CD127, IL7-R și/sau TSLPR, opțional efectul agonist față de acești receptori, efectul asupra fosforilării STAT-5 și/sau producției TARC și în mod opțional citotoxic, în special mediată ADCC. Astfel de variante de secvențe sunt cuprinse în prezenta invenție și cuprind în special:

- variante care au secvențele CDR ale VH3 și VL3 sau VL4 și în care substituțiile relative la secvențele menționate sunt limitate la resturile cadru, în special în care mai puțin de 20% (sau mai puțin de 25 de resturi), de preferință mai puțin de 10% (sau mai puțin de 12 resturi), mai preferabil mai puțin de 5% (sau mai puțin de 6 resturi) și chiar mai preferabil 3, 2 sau 1 rest(ri) de fragment(e) cadru este(sunt) substituite în raport cu secvențele menționate;

- variante care nu au substituții V101T sau V102T și în special variante care nu au substituții V101 și V102

în care variantele preferate au fie un rest S la poziția 28 în VL-CDR1 (adică are VL-CDR1 al VL3, cu secvența din SECV ID NR.: 20) și un rest E la poziția 73 în secvențele fragmentului cadru VL (ca în VL3 cu secvența SECV. ID. Nr.: 4) sau un rest D la poziția 28 în VL-CDR1 (adică are VL-CDR1 din VL4, cu secvența din SECV ID NR.: 26) și un rest G la poziția 73 în secvențele fragmentului cadru VL ca în VL4 cu secvența SECV ID Nr.: 6).

Invenția se referă, de asemenea, la o moleculă himerică cuprinzând un anticorp sau un fragment al acestuia așa cum este definit aici, în care molecula himerică menționată este:

- o moleculă complexă având o multitudine de domenii funcționale care asigură colectiv funcții de recunoaștere, legare, ancorare, semnalizare la respectiva moleculă, în special un receptor de antigen himeric (CAR) cuprinzând în asociere într-o moleculă recombinantă, în special într-o proteină de fuziune, (i) un ectodomeniu care este un fragment scFv al respectivului anticorp sau fragment de legare la antigen așa cum este definit aici, (ii) un domeniu transmembrantar pentru ancorarea într-o membrană celulară și (iii) un endodomeniu care cuprinde cel puțin un domeniu de semnalizare intracelular.
- 10 Intr-o realizare particulară, molecula himerică este o moleculă CAR care cuprinde cel puțin 2, în mod avantajos, cel puțin 3 domenii de semnalizare în care domeniile de semnalizare permit în mod colectiv cel puțin una dintre următoarele proprietăți:
 - inițierea activării celulelor T, cum ar fi furnizată de domeniul citoplasmatic CD3z
 - citotoxicitate mediată de celulă T,
 - 15 • amplificarea semnalului de activare a celulei T sau costimularea semnalului menționat, cum ar fi furnizată de elementele costimulatoare derivate de la receptori cum ar fi 4-1BB, CD28 sau ICOS sau OX40.

20 Invenția se referă, de asemenea, la o celulă cuprinzând un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia așa cum este descris aici sau cuprinzând o moleculă himerică așa cum este definită aici, în care anticorpul sau fragmentul de legare la antigen a acestuia este expus ca ectodomeniu la suprafața celulei. Celula poate fi, în mod avantajos, o celulă T, cum ar fi o celulă T autologă a unui pacient sau o celulă T alogenă.

25 Domeniul de semnalizare cuprins în molecula himerică poate fi derivat în mod avantajos din CD3z sau din lanțul Y al receptorului Fc.

Invenția se referă, de asemenea, la utilizarea acestor molecule himerice, cum ar fi moleculele de CAR, pentru a ținti celulele T CD127+, în special celulele T CD127+ tumorale.

Invenția se referă de asemenea la o metodă sau preparare a receptorului antigenic himeric (CAR) care cuprinde etapele de:

- 30 a. furnizarea unei polinucleotide care codifică un anticorp sau un fragment de legare la antigen a acestuia, în particular un fragment scFv,
- b. recombinarea numitei polinucleotide de la punctul a) la capătul său C-terminal cu polinucleotide care codifică un domeniu transmembrantar de la capătul N- la C-terminal și cel puțin unul, în special două domenii de semnalizare intracelulare adecvate pentru a furniza semnal(e) de stimulare
- 35 la o celulă, în particular la o celulă T, mai precis la o celulă T umană.
- c. exprimarea moleculei recombinante obținută în b) într-o celulă, în special într-o celulă T, mai particular într-o celulă T umană,
- d. selectarea receptorului de antigen himeric produs pentru proprietățile sale după contactarea acestuia cu o celulă care exprimă CD127 uman.

40

Invenția se referă, de asemenea, la o metodă de fabricare a unui anticorp al invenției cuprinzând etapele de imunizare a unui animal non-uman, în special a unui mamifer non-uman, împotriva unei polipeptide având secvența din SECV ID NR.: 55 și în special colectarea serului rezultat din respectivul animal non-uman imunizat pentru a obține anticorpi îndreptați împotriva numitei polipeptide.

45

Intr-o realizare particulară a metodei de fabricare a unui anticorp conform invenției, pot fi efectuate etape suplimentare pentru a evalua proprietățile anticorpilor preparați. Etapele pot cuprinde, în special, următoarele aspecte de realizare independent una de cealaltă:

- a. testarea (de exemplu, conform unei metode descrise în exemplele din secțiunile intitulate
- 50 "Testul de legare IL7R prin citofluorometrie" și "recunoașterea rCD127 a mAb anti-h-CD127 evaluat prin ELISA") capacitatea unui anticorp sau a unui fragment de-anticorp de legare la antigen care se leagă la domeniul extracelular al CD127, în special la polipeptida care cuprinde sau constă din epitop cu secvența SECV ID Nr.: 55,
- b. testarea (de exemplu, conform unei metode descrise în exemplele din secțiunea intitulată "Testul de activitate Phospho Stat5") efectul unui anticorp sau al unui fragment de legare la antigen a unui astfel de anticorp asupra căii de semnalizare a IL-7,
- 55 c. testarea (de exemplu, conform unei metode descrise în exemplele din secțiunea intitulată "Test de secreție TARC"), efectul unui anticorp sau al unui fragment de legare la antigen a unui astfel de anticorp pe calea de semnalizare TSLP,

d. testarea (de exemplu, conform unei metode descrise în exemplele din secțiunea intitulată "Cytotoxicitatea celulară dependentă de anticorp") activității citotoxice, în special activitatea ADCC a unui anticorp sau a unui fragment de legare la antigen a unui astfel de anticorp;

5 Metoda de fabricare a unui anticorp sau a fragmentului său de legare la antigen conform invenției poate cuprinde suplimentar etapa următoare, care selectează un anticorp sau un fragment de legare la antigen a unui astfel de anticorp care se leagă în mod specific la domeniul extracelular al CD127 care prezintă cel puțin una dintre următoarele proprietăți:

- nu este un antagonist al CD127 și nu inhibă fosforilarea indusă de IL-7 a STAT5 în celulele care exprimă IL7-R și/sau,
- 10 • nu inhibă secreția stimulată de TSLP de TARC în celulele care exprimă TSLP-R și/sau,
- nu este un agonist al CD127 și/sau,
- nu crește fosforilarea indusă de IL-7 a STAT5 în celulele care exprimă IL7-R și/sau,
- nu crește secreția stimulată de TSLP a TARC în celulele care exprimă TSLP-R.

O realizare particulară a metodei oferă un anticorp sau un fragment de legare la antigen a acestuia care se leagă în mod specific la domeniul extracelular al CD127 și nu este un antagonist al CD127 și nu inhibă fosforilarea indusă de IL-7 a STAT5 în celulele care exprimă IL7-R și nu inhibă secreția stimulată de TSLP a TARC în celulele care exprimă TSLP-R și nu este un agonist al CD127 și/sau nu crește fosforilarea indusă de IL-7 a STAT5 în celulele care exprimă IL7-R și nu mărește stimularea secreției de TSLP de către TARC în celulele care exprimă TSLP-R.

20 Un alt obiect al invenției este o compoziție farmaceutică care cuprinde un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia sau o moleculă himerică, conform invenției, cu un vehicul farmaceutic, în care respectiva compoziție farmaceutică cuprinde în mod opțional un ingredient activ diferit.

Invenția se referă, de asemenea, la o compoziție cuprinzând ca ingredient activ un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia sau o moleculă himerică sau o celulă sau o polinucleotidă conform definițiilor furnizate aici sau o compoziție farmaceutică într-o formulare adecvată pentru supraviețuirea și expansiunea celulelor pozitive CG127 umane de control, în special celulele efectoare CD127 pozitive umane, în special supraviețuirea sau expansiunea celulelor T de memorie CD127+, în special celulele T de memorie care sunt ambele celule CD127 + și CD8 + sau care sunt ambele celule CD127+ și CD4+, atunci când sunt administrate unui pacient uman.

O compoziție conform invenției poate cuprinde suplimentar un compus suplimentar având un efect imunomodulator terapeutic, în special asupra celulelor implicate în alergie sau autoimunitate. Pentru scopuri ilustrative, imunomodulatorii de interes sunt alți anticorpi monoclonali care vizează celule T, cum ar fi anticorpi anti-CD3, anti-ICOS sau anti-CD28 sau proteine recombinante sau anticorpi care vizează celule accesorii cum ar fi anticorpi CTLA4Ig sau anti-CD40.

Conform unei alte variante de realizare, o compoziție conform invenției poate cuprinde în plus agenți imunoterapeutici utili în contextul invenției, sunt selectați din grupul constând din vaccinuri terapeutice (vaccinuri ADN, ARN sau peptide), agenți de blocare sau activatori ai punctelor de verificare imună sau imunoconjugăți cum ar fi conjugăți anticorp-medicament.

40 Agenții imuno-terapeutici care pot lua vaccinuri împotriva cancerului de la fenomene biologice interesante la agenți terapeutici eficienți includ: factorii de creștere ai celulelor T pentru a crește numărul și repertoriul celulelor T naive, factorii de creștere pentru a crește numărul celulelor dendritice (DCs), antagoniști și activatori de DC-uri și alte celule care prezintă antigen (APC), adjuvanți pentru a permite și pentru a amplifica vaccinurile împotriva cancerului, agonști pentru a activa și stimula celulele T, inhibitori ai blocării punctului de control al celulelor T, factori de creștere ai celulelor T pentru a a spori creșterea și supraviețuirea celulelor T imune, agenți de inhibare, de blocare sau de neutralizare a celulelor canceroase și citokine imunosupresoare derivate din celulele imune.

50 Sunt cunoscute în domeniu ținte și agenți de blocarea a punctelor de verificare imună. În contextul prezentei invenții, exemple de ținte, în special agenți de blocare sau activatori ai punctelor de control imun care ar putea fi utile sunt anti-PDL1, anti-PD1, anti-CTLA4, anti-CD137, anti-Her2, anti-EGFR, anti-CD20, anti-CD19, anti-CD52, anti-CD-137, anti-CD2, anti-CD28, anti-CD40, HVEM, BTLA, CD160, TIGIT, TIM-1/3, LAG-3, 2B4 și OX40.

55 Invenția se referă, în consecință,

- un anticorp sau un fragment de legare la antigen a acestuia, o moleculă himerică, o celulă sau o polinucleotidă, așa cum s-a definit aici
- cel puțin un alt agent terapeutic selectat din grupul de agenți chimioterapeutici, agenți radioterapeutici, agenți chirurgicali, agenți imunoterapeutici, probiotice și antibiotice,

in care ingredientele active menționate sunt formulate pentru terapie separată, simultană sau combinată, în special pentru utilizare combinată sau secvențială.

Invenția se referă la un exemplu de realizare a unui produs combinat care este adecvat pentru administrarea la un pacient uman care are nevoie de acesta și care conține ca ingrediente activi: (i) un anticorp sau un fragment de legare la antigen a acestuia, o moleculă himerică, o polinucleotidă definită aici și (ii) un agent imunoterapeutic suplimentar, în particular un agent imunoterapeutic care implică celule T, cum ar fi o celulă T care poartă o moleculă CAR așa cum este definită aici sau o moleculă CAR care țintește un receptor de celule sau un antigen cum ar fi CD19, CD20, CD52 sau Her2. Intr-o realizare particulară, anticorpii utilizați sunt anticorpi IgG1 și sunt utilizați ca un agent citotoxic.

Invenția se referă, de asemenea, la un anticorp sau la un fragment de legare la antigen al acestuia sau la o moleculă himerică sau la o celulă sau la o polinucleotidă așa cum este definită sau ilustrată aici, pentru utilizare ca ingredient activ într-o schemă terapeutică combinată sau suplimentară la un pacient care are nevoie de aceasta.

Un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia sau o moleculă himerică sau o celulă sau o polinucleotidă conform invenției, o compoziție farmaceutică sau o compoziție așa cum s-a definit aici sunt propuse în special pentru utilizare la un pacient uman pentru tratarea afecțiunilor patologice influențate de răspunsuri imune, în special prin răspunsurile celulelor T de memorie. În consecință, inventatorii au propus ca anticorpul sau fragmentul său de legare la antigen, molecula himerică conform invenției, compoziția farmaceutică sau compoziția așa cum s-a definit aici să fie utilizată pentru tratamentul bolilor autoimune sau alergice, în particular afecțiuni ale pielii alergice, tulburări intestinale sau pentru transplant respirație sau pentru tratamentul leucemiei cum ar fi leucemia limfoblastică acută (de exemplu T-ALL) sau limfomul cum ar fi limfomul Hodgkin sau tratamentul unei boli de cancer cum ar fi cancerul de san asociat celulelor CD127+, cancerul renal, cancerul vezicii urinare, cancerul pancreatic sau pentru tratamentul unui limfom cutanat de celulă T, cum ar fi limfomul Sezary sau pentru tratamentul leucemiei limfoblastoide acute cu mutație-de sporire a căii IL7-R/TSLP, mezoteliom.

Având în vedere activitatea lor particulară în țintirea celulelor pozitive CD127 și activitatea citotoxică, anticorpii invenției sau fragmentele lor de legare la antigen sunt adecvați, în mod special, pentru utilizarea în tratarea bolilor respiratorii cum ar fi astmul, fibroza chistică, tusea eozinofilă, bronșita, sarcoidoza, fibroza pulmonară, rinita, sinuzita, infecții cronice virale cum ar fi infecțiile datorate virusului HIV, virusul papilomului, virusul hepatitei, bolile alergice precum rinosinuzita alergică sau alergie, conjunctivita alergică, dermatita atopică, alergiile alimentare, limfomul sau leucemia (de exemplu, pre-B ALL) și boli autoimune care implică un răspuns de tip Th2 dăunător, cum ar fi lupusul, psoriazisul, sindromul sjögren, colita ulcerativă, diabetul de tip 1 de poliartrita reumatoidă.

Compoziția sau mijloacele terapeutice combinate conform invenției sunt, de asemenea, adecvate pentru utilizare în tratamentul unui pacient care prezintă o boală care implică celula CD127+, cum ar fi cele menționate mai sus. În particular, compoziția sau mijloacele terapeutice combinate conform invenției sunt adecvate pentru tratamentul unui pacient care prezintă un cancer cu celule tumorale pozitive CD127, în particular un cancer în care celula CD127+ constituie un marker al prognosticului slab, cum ar fi cancerul pulmonar sau mezoteliom.

Prin "tratament" sau "tratament terapeutic"; se înțelege că etapele de administrare efectuate duc la îmbunătățirea condiției clinice a unui animal sau a unui pacient uman care are nevoie de acesta, care suferă de tulburări asociate cu căile IL-7 și TSLP, adică implicând proliferarea sau acumularea a celulelor pozitive CD127 sau diferențierea/maturarea/proliferarea celulelor ca răspuns la TSLP. Un astfel de tratament vizează îmbunătățirea stării clinice a pacientului uman sau animal prin eliminarea sau ameliorarea simptomelor asociate cu tulburarea(rile) legate de prezența acestor celule, adică; care implică proliferarea și/sau acumularea celulelor pozitive CD127 sau diferențierea/maturarea/proliferarea celulelor ca răspuns la TSLP și/sau într-o formă de realizare preferată, tratamentul conform invenției permite restabilirea sănătății.

Invenția se referă, de asemenea, la utilizarea unui anticorp anti-CD127 sau a unui fragment de legare la antigen al acestuia, așa cum este definit aici, într-un test de diagnosticare, în special într-un test de diagnosticare pentru medicina personalizată, mai precis într-un test de diagnosticare insoțitor.

Invenția se referă, de asemenea, la o metodă de diagnosticare *in vitro* sau *ex vivo*, în special o metodă de diagnosticare adecvată pentru utilizare în medicina personalizată, în special într-un diagnostic insoțitor, în care un anticorp anti-CD127 din invenție sau un fragment de legare la antigen a acestuia este utilizat pentru detectarea celulelor CD127+ într-o probă obținută anterior de la un subiect și opțional pentru cuantificarea expresiei CD127.

Intr-o realizare particulară, invenția se referă, de asemenea, la utilizarea unui anticorp anti-CD127 din invenție sau a unui fragment de legare la antigen a acestuia în fabricarea unui medicament adecvat pentru utilizare într-un test de diagnostic, în special pentru utilizare în medicina personalizată sau într-un test de diagnosticare insoțitor.

5 Intr-un alt aspect al invenției, un anticorp anti-CD127 din invenție sau un fragment de legare la antigen a acestuia este utilizat într-o metodă de determinarea *in vitro* sau *ex vivo* a prezenței celulelor CD127 + într-o probă obținută anterior de la un subiect.

10 Intr-o realizare particulară, această metodă cuprinde determinarea expresiei *in vitro* și/sau nivelul de exprimare a CD127, într-o probă biologică a respectivului subiect folosind anticorpul CD127 anti-uman sau fragmentul său de legare la antigen conform invenției.

Intr-o altă formă de realizare, această metodă cuprinde determinarea prezenței CD127 ca biomarker care este predictivă pentru răspunsul unui subiect la un tratament, în special un răspuns al unui subiect diagnosticat cu un cancer în care metoda menționată cuprinde:

- determinarea nivelului de expresie al CD127 într-o probă tumorală a unui subiect, în particular cu anticorpul anti-CD127 sau fragmentul său de legare la antigen conform invenției și
 - compararea nivelului de expresiei a CD127 cu o valoare reprezentativă pentru un nivel de expresie al CD127 într-o populație de subiecți care nu răspunde,
- în care un nivel de exprimare mai ridicat al CD127 în proba tumorală a subiectului este indicativ pentru un subiect care va răspunde la tratament.
- 20 Determinarea nivelului de expresie conform metodei poate cuprinde cuantificarea moleculei CD127 pe celulele probei.

Legenda figurilor:

Scurtă descriere a desenelor

25

Figura 1 Efectul de legare Effi3 la CD127 prin Facs și ELISA. A. Afișează procentul de celule pozitive CD127 peste un răspuns al dozei de colorare Effi3. B. Activitatea de legare Effi3. A. Analiza activității de legare, anticorpii anti-CD127 au fost testați pe Sandwich ELISA: MD707-3 (linia de start), varianta Effi3 VH3VL3 (linia triunghiului) și varianta Effi3 VH3VL4 (linia pătrată).

Figura 2 Analiza de stabilitate prin ELISA în timp la temperatură diferită: figura prezintă absorbanta anticorpului Effi3 de la DO la 28 și stocată la RT (linia cu triunghi), 4°C (linia cu pătrată), 37°C (linia încrucișată), -80°C (linia de stare) sau dezghețată de 3 ori la -80°C (linia bară).

Figura 3 Efectul legării Effi3 pe CD127 după stimularea IL7 sau TSLP. A. Inhibarea limfocitelor T pSTAT5 + induse de IL-7 în doza de răspuns la mAb MD707-3 (pătrate negre), fără efect al mAb Effi3 (pătrate goale) asupra P-STAT5 dependentă de IL7. B. Efectul producției TARC induse de TSLP de anticorpi anti-CD127 umani. Cuantificarea prin ELISA a producției TARC în supernatantul celulelor dendritice CD1C + din sânge uman a fost cultivată timp de 24 de ore cu 15 ng/ml TSLP și diferite concentrații de anticorpi anti-CD127 anti-umani: anticorpul MD707-3, Effi3 sau anti-TSLP ca un control pozitiv al inhibiției.

Figura 4 Studiu de citotoxicitate al variantelor Effi3, clone umanizate ale MD707-3, la concentrații diferite și diferite raporturi între Effector și celulele țintă. Citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp (ADCC) după incubarea cu celule NK umană ca celule efectoare (E) ale Effi3 H3L3 și Effi3 H3L4 pe linii celulare(T-ALL) de leucemie limfoblastică acută de celule T LAL-T DND41 (CD127 +) marcat 51Cr la un raport diferit: (E:T = 30:1; 10:1 și 3:1). Procentul de citotoxicitate specifică a fost determinat prin eliberarea de 51Cr.

Figura 5 Secvența de aminoacizi CD127 umană: aminoacizii înnegriți reprezintă secvența de epitop liniar recunoscută de anticorpul Effi3.

Figura 6 Secvența de aminoacizi (aa) a lui Effi3 VH3 cu izotip IgG1m: aa în gri: peptidă semnal, aa cu caractere aldine și italice: CDR1, CDR2 și CDR3; aa subliniate: regiunea constantă IgG1m; aa înalte înnegrite: aa umanizat.

Figura 7 Aminoacid (secvența aa a Effi3 VL4 cu regiune constantă aa CLkappa: în gri: peptidă semnal, aa cu caractere aldine și italice: CDR1, CDR2 și CDR3, aa subliniate: regiunea constantă CLkappa;

Exemple/Materiale și metode/Rezultate

UMANIZARE

Clona MD707-3 a fost umanizată prin de-imunizare și metode *in Silicon* de reuniformizare descrise mai sus.

- 5 Anticorpul MD707-3 constă din lanțul ușor (Secvența SECV ID Nr.: 57 din Tabelul 6) și lanțul greu (secvența SECV ID Nr.: 56 din Tabelul 6). Analiza conținutului domeniului MD707-3 a arătat că este un Fv, probabil dintr-un anticorp IgG1 cu lungime întreagă. Domeniile variabile au fost izolate și adnotate cu definițiile și numerotarea CDR Kabat. S-au generat alinieri de secvențe care au comparat domeniile variabile MD707-3 cu linii germinale umane. Pe baza identității generale de secvenței, a pozițiilor de interfață potrivite și a pozițiilor canonice CDR clasificate în mod similar, a fost identificată o familie de germeni pentru fiecare lanț. MD707-3 a fost găsită a fi
- 10 similar cu linia germinativă a lanțului ușor KK2-A3 și greu VH3-3-73. Au fost construite modelele structurale ale secvențelor parentale și de-imunizate.

Tabelul 1 Resturi de reuniformizare

Lanț	Regiune	Substituție	Descriere
L	FR1	A7S	Substituția conservativă a Alaninei cu Serină determină poziția în linie cu cea mai apropiată linie geminală umană.
L	FR1	L9S	Reuniformizarea proeminențelor Leucină la Serină. Cu toate că Leucina se găsește la această poziție, aceasta este un rest hidrofobic complet expus care poate fi substituit
L	FR1	V11L	Substituția Valinei cu Leucină la poziție 11 este partea unei reuniformizări și remodelări mai mari a FR1, care include pozițiile 12 și 18. Cele trei substituții vor modifica suprafața la compararea acestora cu cea mai apropiată linie germinală umană. Reuniformizarea Valinei la Leucină în legătură cu Serina la Prolină la poziția 12.
L	FR1	S12P	Reuniformizarea Serinei la Prolină în legătură cu Valina la Leucină la poziția 11.
L	FR1	S18P	Reuniformizarea Serinei la Prolină
L	L2	L59R	Atât Leucina cât și Arginina este menținută la poziție. Oricum, cea mai asemănătoare linie germinală umană are Arginină. Deoarece poziția se află în CDR L2 și chiar în cazul în care acesta nu este implicat în legarea Leucinei, a fost reținut în primul lanț de reuniformizare. Arginina a fost evaluată în al doilea lanț de reuniformizare.
L	FR3	R68S	Reuniformizarea proeminențelor străine de Arginină la Serină
L	FR3	K82R	Substituția conservative ale Lizinei la Arginină determină poziția în linia cu cea mai apropiată linie germinală umană
L	FR3	T85A	Substituția conservative ale Treoninei la Alanină determină poziția în linia cu cea mai apropiată linie germinală umană
H	FR1	H3Q	Histidina este rest străin, reuniformizarea Glutaminei.
H	FR1	K15G	Reuniformizarea proeminențelor străine de Acid glutamic la Glicină. Substituție în legătură cu Lizina la poziția 16 pentru încărcarea neutralității
H	FR1	E16G	Reuniformizarea proeminențelor străine de Acid glutamic la Glicină. Substituție în legătură cu Lizina la poziția 15 pentru încărcarea neutralității
H	H2	E64D	Substituția conservativă a Acidului Glutamic la Aspartic determinând poziția în linia cu cea mai apropiată linie germinativă umană
H	FR3	M80T	Reuniformizarea a expus hidrofob Metionina la Treonină
H	FR3	N87S	Reuniformizare Asparagină la Serină+
H	FR3	D91E	Substituția conservativă a Acidului Aspartic la Glutamic determinând poziția în linia cu cea mai apropiată linie germinativă umană
H	FR3	M95V	Reuniformizarea suprafeței a expus Metionina la Treonină. Treonina este, de asemenea, găsită frecvent la poziție. Oricum, cea mai apropiată linie germinativă umană conține Valină.
H	FR4	M11L	Reuniformizarea a expus hidrofob Metionina la Leucină. Poziția trebuie fie Leucină sau Metionină și Leucina nu poate fi oxidată.
Reuniformizarea substituțiilor au fost modelate pe baza acestui context specific și poate avea efecte diferite dacă se realizează în alte contexte de secvență.			

Lanț	Regiune	Substituție	Descriere
L	L1	S28D	Substituția la Acid Aspartic îndepărtează complet doi epitopi eterogeni. Această substituție CDR este realizată datorită eficienței sale în reducerea imunogenității presupuse. Poziția este exteriorul interfeței de legare. Introducerea unei încărcări aici va înlocui pierderea încărcării spațiale cele mai apropiate la poziția 73, L.E73G.
L	FR2	K47Q	Substituția de de-imunizare a Lizinei la glutamină care îndepărtează legătura pentru alotipii 8 HLA-DRB1. Substituția asigură menținerea neutralității încărcării când este realizată substituția Q50K.
L	FR2	Q50K	Substituția de de-imunizare a Glutaminei la Lizină nu este cea eficientă în reducerea imunogenității presupuse dar aduce domeniul în linie cu setul de reziduuri așteptat în grupul de încărcare în jumătatea domeniului inferior VK. Introducerea de încărcare este compensată printr-o substituție de reuniformizare la poziția 47.
L	L2	A60D	Poziția 60 este partea inferioară a buclei, departe de interfața de legare. Acidul aspartic este acceptat la poziție și este eficientă la reducerea imunogenității.
L	FR3	E73G	Poziția 73 este, în mod uzual, glicină, la anticorpii umani și este aproape de CDRuri. Acidul glutamic trebuie să fie îndepărtat atât din motive de reuniformizare cât și din motive de de-imunizare. Oricum, datorită apropierii de CDR-uri, substituția este realizată numai împreună cu re-introducerea unei încărcări la poziția 28 cea mai apropiată spațial. Substituția îndepărtează 4 epitopi eterogeni.
L	FR3	V90T	Substituția de de-imunizare a solventului la Valină pentru Treonină. Substituțiile îndepărtează legătura la alotipii 7HLA-DRB1
H	FR3	S21T	Substituția de de-imunizare în FR1 care îndepărtează legătura la alotipii 9 HLA-DRB1.
H	FR!	S30T	Poziția este aproape de interfața de legare. Oricum, dându-se locația și direcția trebuie să fie evaluată orientarea substituției de de-imunizare conservativă a Serinei la Treonină. Substituția îndepărtează legătura la alotipii 4HLA-DRB1 care includ alotipii DRB1*03:01 obișnuiți.
H	FR3	M95T	Substituția Metioninei la Treonină este mult mai eficientă în reducerea imunogenității în comparație cu Valina, îndepărtând legătura la un alotip 19 HLA-DRB1.
H	H3	V101T	Substituția la poziția 101 și 102 sunt menite pentru îndepărtarea unui grup de epitopi din care fac parte FR3 și H3. Substituțiile sunt eficiente la reducerea imunogenității presupuse, împreună cu îndepărtarea legăturii pentru alotipurile 26 HLA-DRB1. Analiza structurală cu atenție a indicat ca substituția la Treonină cu lanțul său similar secundar ramificat, poate fi tolerat.
H	H3	V102T	Substituția de de-imunizare eficientă care poate fi tolerată
Substituțiile de de-imunizare au fost desemnate pe baza secvenței de reuniformizare și pot avea un efect diferit se realizează în alte contexte de secvență.			

Au fost propuse patru lanțuri ușoare reuniformizate/de-imunizate și patru lanțuri grele reuniformizate/de-imunizate. Au fost proiectate 15 variante și au fost recomandate să fie exprimate și caracterizate in vitro.

Tabelul 3. Poziții conservate în interfața VH/VL

Domeniu	Poziții
VL	34, 36, 38, 43, 44, 46, 87, 88, 91, 96, 98
VH	35v*, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95 100-100k**, 101, 103
Toate pozițiile sunt în conformitate cu numerotarea Kabat	
*Numerotarea poziției la un capăt N-terminal la poziția 36 este dependentă de lungimea CDR H1	
** Numerotarea poziției la un capăt N-terminal la poziția 36 este dependentă de lungimea CDR H1	
***Numerotarea poziției la un capăt N-terminal la poziția 101 diferă prin lungimea CDR H3	

Tabelul 3. Poziția de determinare a clasei canonice CDR

CDR	Resturi cheie
L1	2, 25, 27b, 27c, 28, 33, 71
L2	34
L3	90, 94, 95, 97
H1	24, 26, 29, 35**, 94
H2	54, 55, 71
Toate pozițiile sunt în conformitate cu numerotarea Kabat	
*Numerotarea poziției la un capăt N-terminal la poziția 36 este dependentă de lungimea CDR H1	

5 Nucleotide și secvențe de aminoacizi ale Mabs CD127 anti-umane

Regiunile VH și VL ale clonei Effi3 au fost secvențiate folosind tehnologia PCR RACE. Pe scurt, ARN-ul total a fost extras, transcris invers și cADN-ul rezultat a fost poli-adenilat la capătul 3' al moleculelor folosind dATP și enzima terminală a transferazei. A fost efectuată o primă reacție PCR cu ciclu de 35 de cicluri folosind un primer de ancorare oligodT și enzima Herculease (Stratagene). A doua secvență PCR de 35 de cicluri a fost realizată utilizând primeri de ancorare PCR în serie. Produsul PCR rezultat a fost ulterior clonat cu TA *E coli* și după selectarea pe ampicilină, coloniile rezultate au fost analizate prin profilare cu enzime de restricție și cADN inserate secvențializate.

15 Variantele Effi3 umanizate au fost clonate în plasmide pFuse-CHiG sau pFuse-CLiG

Clonarea secvențelor de mutație umanizată de VH Effi3 în plasmida de expresie pFuseCHiG-hG1e4

Plasmida de expresie pFuseCHiG-hG1e4 (Invivogen) conține un domeniu constant CH1 + balama + CH2 + CH3 a IgG1 umană, care a fost modificată pentru a îmbunătăți efectul citotoxic ADCC și CDC. Pentru început, s-au sintetizat numai secvențe Genscript ale varietăților MD707 umanizate MD707 WT, VH3 și VH4 (cele mai umanizate), introduse în vectorul de clonare (pUC57) cu extremitățile EcoRV 5' și 3' și adăugarea secvenței Kozak (GCCACC) înainte de ATG, trimise la noi (4 μg liofilizat) și resuspendate în 20 μl H2O. Fiecare plasmidă a fost digerată cu enzima de restricție EcoRV pentru a extrage inserția VH (400 bp).

O inserție purificată a fost ligată în plasmida de expresie, plasmidă de expresie pFuseCHiG-hG1e4 deschisă în EcoRV și defosforilată. Clonele pozitive, care au inserat fragmente de VH în orientarea corectă înainte de domeniile constante umane, au fost amplificate și purificate prin Midiprep-fără endotoxine (Macherey-Nagel) pentru etapa de transfecție.

30

Clonarea secvențelor de mutație umanizată a Effi3 VL în plasmida de expresie pFuseCLiG-hk

Plasmida de expresie pFuseCLiG-hk (Invivogen) conține domeniul constant CLkappa al IgG1 umane. Pentru început, numai secvențele de variate VLwt, VL3 și VL4 umanizate s-au sintetizat prin Genscript, inserate în vectorul de clonare (pUC57) cu extremități BsiWI 5' și 3' și adăugarea secvenței Kozak (GCCACC) înainte de ATG, trimis nouă (4 μg liofilizat) și resuspendate în 20 μl H2O. Fiecare plasmidă a fost digerată cu enzimă de restricție BsiWI pentru a extrage inserția VL (400 bp). O inserție purificată a fost ligată în plasmida de expresie, plasmidă de expresie pFuse CLiG-hk deschisă în BsiWI și defosforilată. Clonele pozitive, care au inserat fragmente VL în orientarea corectă înainte de domeniile constante umane, au fost amplificate și purificate prin Midiprep-fără endotoxine (Macherey-Nagel) pentru etapa de transfecție.

40

Co-transfecția variantelor umanizate Effi3 (VH3 sau VH4 și VL3 sau VL4) în celulele de mamifere

Cu o zi înainte de transfecție: COS au fost însemănțate la 100 000 celule/godeu în placă P12 cu mediu completat (DMEM SVF10% (Hyclone) + PS 1% + Glu 1%) și incubate la 37°C, 5% CO₂.

- 5 In ziua transfecției: celulele COS trebuie să aibă o confluență de 50-90%. Acestea au fost spălate cu PBS și ținute cu 500 μl în mediu finalizat. 0,8 μg varianta VH + 0,4 μg varianta VL a fost amestecată în 200 μl mediu OptiMEM și s-a adăugat 1 μl de Plus Reagent (Invitrogen) (incubare 15 min la temperatura camerei). S-au adăugat 3,5 μl de lipofectamină LTX (Invitrogen) + 100 μl în amestec și s-au incubat 25 de minute la temperatura camerei. Intregul amestec a fost depus picătură cu picătură pe celule COS și incubat 48h la 37°C, 5% CO₂. După 48 ore, supernatanții au
- 10 fost recoltați și centrifugați (1500 rpm 10 min 4°C). Pentru ELISA sandwich, anticorpul IgG anti-uman IgG (specific Fc) a fost acoperit la 1,2 μg/ml pe placa P96 și s-au adăugat diluții de supernatant pentru a măsura concentrația în funcție de intervalul standard. După incubare și spălare, s-au adăugat și s-au descoperit prin metode convenționale lanțuri ușoare anti-umane de șoarece (specific kappa) plus anticorp anti-șoarece marcat cu peroxidază. Pentru analiza ELISA de
- 15 activitate, recombinantul hCD127 (Sino Biologicals, Beijing, China, referința 10975-H08H) a fost imobilizat pe plastic la 1 μg/ml și s-au adăugat diluții de supernatant pentru a măsura legarea. După incubare și spălare, s-au adăugat și s-au descoperit prin metode convenționale lanțuri ușoare anti-umane de șoarece (specific kappa) plus anticorp anti-șoarece marcat cu peroxidază. Ca un control pozitiv pentru transfecție, un godeu a fost transfectat cu GFP-pcDNA3.1 (1 μg/μl) cu 1 μg
- 20 ADN. Înainte de recoltarea tuturor supernatanților, a fost efectuat un control vizual cu microscop fluorescent al acestui godeu GFP pentru a verifica pozitivitatea. În mod clasic, am obținut aproximativ între 10% dintre celulele transfectate cu celule COS și 25% cu celule CHO. Au fost efectuate două experimente pe celule COS, iar ultima pe celule CHO (fără Reactivul Plus).

25 **Caracterizarea variantelor Effi3 secretate în supernatantul transfecției cu variante umanizate**

- În fiecare supernatant de co-transfecție, concentrația de MD707-3 secretat (VH + VL) a fost măsurată prin testul ELISA sandwich (anticorp anti-hFc/anticorp anti-hkappa), în funcție de standardul uman hIgG. Legarea pe CD127 a MD707-3 în fiecare co-transfecție a fost determinată prin analiza ELISA de activitate (anticorp recombinant CD127Fc/anti-kappa) în comparație cu
- 30 activitatea standardului himeric MD707-3 purificat. Controlul negativ cu plasmidele VH sau VL singur nu a avut activitate anti-CD127.

- Rezultatele au arătat (datele nu sunt prezentate), pentru lanțurile ușoare, VLvar3 și VLvar4 nu au determinat modificarea activității de legare în comparație cu VLwt. Cu toate acestea, pentru lanțurile grele, VHvar4 (cel mai umanizat) a modificat legarea Effi7h de proteina
- 35 CD127, deoarece activitatea ED50 a fost foarte puțin bună cu acest lanț decât cu celălalt lanț VHvar3 sau VHwt. VHvar3 nu modifică legarea la receptor.

- În cele din urmă, combinația celor mai umanizate (VHvar4 + VLvar4) și-a pierdut complet activitatea de legare. Cu toate acestea, secvența cea mai umanizată care și-a menținut activitatea de legare este VHvar3 + VLvar3.

- 40 Cele două variante reținute Effi3, cu cele mai umanizate secvențe care și-au menținut activitatea de legare, au fost:

- Secvența VHvar3 + VLvar3 din SECV ID NR.: 2 și secvența din SECV ID NR.: 4 (sau, cu secvențele semnal, secvențele din SECV ID NR. Nr. 8 și 10). Acest anticorp este desemnat aici ca VH3VL3
- 45 • Secvența VHvar3 + VLvar4 a SECV. ID. Nr.: 2 și secvența din SECV ID NR.: 6 (sau, cu secvențele semnal, secvențele din SECV. ID. Nr.: 8 și 12). Acest anticorp este desemnat aici ca VH3VL4

Testul de legare IL7R prin citofluorometrie

- 50 Pentru a măsura legarea anti-IL7R la PBMC uman, anticorpul a fost incubat cu PBMC uman timp de 30 de minute la 4°C și spălat înainte de colorarea timp de 30 de minute la 4°C cu anti-CD3 marcat cu APC (clona HIT3a, BD Bioscience, ref 555342) plus anti-CD127 marcat cu PE (clona hIL7R-M21, BD Bioscience, ref 557938), care nu reacționează încrucișat cu anticorpul Effi7. Probele au fost analizate și realizate pe celule CD3 + pe citofluorometrul BD LSRII.

55

Recunoașterea rCD127 a mAb anti-h-CD127 evaluată prin ELISA

- Activitatea de legare a anticorpului antiHCD127 a fost evaluată prin ELISA (analiză imunisorbantă legată de enzimă). Pentru testul ELISA, hCD127 recombinant (Sino Biologicals, Beijing, China, referința 10975-H08H) a fost imobilizat pe plastic la 1 μg/ml și s-au adăugat
- 60

anticorpi purificați pentru măsurarea legării. După incubare și spălare, s-a adăugat un lanț kappa anti-șobolan cu șobolan (AbdSerotec) marcat cu peroxidază și s-a arătat prin metode convenționale.

- 5 După cum se arată în Figura 1B, activitatea de legare măsurată prin ELISA a anticorpului Effi3 este ridicată, cu un ED50 = 4ng/mL pentru anticorpii Effi3 H3L4 și Effi3 H3L3 anti-hCD127 și un ED50 de 3,4 ng/ml pentru anticorpurile himerice MD707-3.

Analiza de stabilitate

- 10 Anticorpurile Effi3 umanizate (clona VH3VL4) au fost incubate la 4°C, 37°C, la -80°C sau la temperatura camerei timp de 28 zile. Activitatea de legare a fost testată prin testul ELISA, hCD127 recombinant (Sino Biologicals, Beijing, China, referința 10975-H08H) a fost imobilizat pe plastic la 1 μg/ml și s-au adăugat diluții de supernatant pentru măsurarea legării. După incubare și spălare, s-au adăugat și s-au prezentat prin metode convenționale lanțuri ușoare anti-umane de șoarece (specifica kappa) plus anticorpi de măgar anti-șoarece marcat cu peroxidază. S-a crescut doza de Mab adăugată pentru măsurarea legării. După incubare și spălare, s-a adăugat un lanț kappa anti-șobolan de șoarece (AbdSerotec) marcat cu peroxidază și s-a prezentat prin metode convenționale.

Rezultatele din Figura 1 B. arată că Effi3 purificat este stabil în timp și după temperaturi diferite de depozitare.

20 Evaluarea activității Phospho Stat5

- Celulele monocitare din sânge periferic (PBMC) recoltate prin gradient Ficoll de la voluntari sănătoși au fost incubate în medii fără ser cu diferite concentrații de anticorpi de interes timp de 15 minute la temperatura camerei, înainte de incubarea cu 0,1 sau 5 ng/ml de IL-7 (rhIL-7; AbD Serotec ref PHP046) timp de 15 minute la 37°C. PBMC netratate cu rhIL-7 au fost analizate ca semnal de fond, în timp ce celulele tratate cu IL-7 fără anticorp au fost stabilite drept control negativ. PBMC au fost apoi răcite rapid și spălate cu tampon FACS pentru a opri reacția. Celulele au fost apoi incubate timp de 15 minute cu soluție rece Cytfix/Cytoperm (BD Bioscience, ref 554722), spălate de două ori cu tampon Perm/Wash (Bd Bioscience) și colorate cu un anticorp FITC anti-uman CD3 (Bd Bioscience ref 557694) pentru 30 de minute pe gheață. PBMC au fost apoi spălate de două ori cu tampon Perm/Wash și permeabilizate în BD Perm Buffer III (Bd Bioscience, ref 558050) timp de 30 de minute. Celulele au fost apoi spălate de două ori în tampon FACS (și/sau PBS cu BSA 1% și azidă 0,1%) și incubate timp de 30 minute la temperatura camerei cu anticorp anti-uman pSTAT5 Alexa 647 (BD Bioscience, ref 612599). Probele au fost analizate pe instrumentul BD CANTO II FACS. Așa cum este prezentat în Figura 3 A, anticorpurile Effi3 (variantele VH3VL4) derivate din anticorpurile MD707-3, nu mai au activitatea inhibitoare a fosforilării STAT5 în comparație cu anticorpurile mamă MD707-3.

Analiza secreției de TARC

- 40 Celulele dendritice mieloide (DC) au fost izolate cu kitul de izolare a celulelor dendritice CD1c (BDCA-1) + (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germania) din sângele voluntarilor sănătoși (Etablissement Français du Sang, Nantes, Franța). Celulele dendritice mieloide au fost cultivate în RPMI conținând 10% ser fetal de vițel, 1% piruvat, 1% Hepes, 1% L-glutamină și 1% penicilină-streptomycină. Celulele au fost însemănțate la 5.104 celule/godeu în plăci plate cu 96 de godeuri, în prezența TSLP (15 ng/ml), LPS (1 μg/ml) sau a mediului de cultură singur și adăugarea de diferiți anticorpi CD127 umani (MD707-3, Effi3-VH3VL4) sau anticorp anti-TSLP la diferite concentrații. La 24 de ore de cultură, supernatanții au fost colectați și analizați pentru producerea de TARC prin analiza ELISA (sisteme de cercetare și dezvoltare, Minneapolis, USA).

- 45 Inhibarea producției induse de TSLP de TARC a fost evaluată prin măsurarea producției menționate, așa cum s-a descris mai sus, în absența anticorpului sau în prezența MD707-3 sau Effi3 sau a anticorpului anti-TSLPR comercial (R & Dsystems ref. AF981) la 0,2, 1, 5 sau 25 μg/ml. Așa cum s-a arătat în 3 B, Effi3 nu mai inhibă producția TARC indusă de TSLP în comparație cu anticorpurile sale inițiale MD707-3 și anticorpurile anti-TSLP de control pozitiv.

Citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp (ADCC)

- 55 ADCC a MAD CD177 anti-uman ADCC se referă la legarea unui anticorp la un epitop exprimat pe celule țintă și la recrutarea ulterioară dependentă de Fc a celulelor imunitare efectoare care exprimă receptori Fc (în esență celule NK și limfocite activate), rezultând omorârea de celule țintă, în principal prin mecanisme bazate pe graniom/perforină.

Pentru utilizarea anticorpului în forma sa inițială (șobolan), celulele efectoare au fost celulele Limfocite Killer Activate (LAK) generate de celulele splenice cultivate cu 1000 UI/ml de IL-2 (Roche, Basel, Elveția) (Corning Glass Works, Corning, NY).

- Atunci când anticorpul a fost umanizat, celulele efectoare au fost celule NK umane primare proaspete izolate din celule mononucleare din sângele periferic prin selecție negativă folosind bile magnetice (kit de izolare NK, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germania) utilizând un instrument de sortare a celulelor AutoMACS. Celulele NK au fost incubate peste noapte la 37°C, 5% CO₂, în mediu RPMI 1640 Medium (Life Technologies, Carlsbad, California), completat cu 10% FBS (Life Technologies), 100 UI/ml penicilină (Life Technologies), 0,1 mg/ml streptomycină (Life Technologies), 2 mm L-glutamină, (Life Technologies) și 150 UI/ml de IL-2 uman (Roche, Basel, Elveția).

- Celulele țintă au fost marcate cu 100 μCi (3,7 MBq) de ⁵¹Cr (PerkinElmer) timp de 1 oră la 37°C și spălat de trei ori cu mediu de cultură. Celulele țintă au fost incubate cu anticorpi diluați sau cu excipient (mediu de cultură) timp de 15 minute la temperatura camerei și 10 000 de celule au fost plasate într-o placă cu fund U cu 96 de godeuri. Celulele T efectoare s-au adăugat la raportul E:T (efectoare:țintă) indicat (volum final: 200 μl) timp de 4 ore de incubare la 37°C. Un total de 25 μl din supernatant a fost apoi recoltat și numărat într-un contor gamma (Packard Instrument). Procentul de citotoxicitate specifică a fost determinat prin eliberarea de ⁵¹Cr.

- Rezultatele prezentate în Figura 4 arată că anticorpul Effi3 H3L4 și H3L3 au indus ADCC, în mod dependent de doză.

Profilarea anticorpilor utilizând microserii de peptide

- Peptida Technologies PepStar™, microseriile de peptide cuprind peptide sintetice purificate derivate din antigene sau alte surse care sunt imobilizate chemoselectiv și covalent pe o suprafață de sticlă. O porțiune optimizată a linkerului hidrofil este inserată între suprafața sticlei și secvența de peptidă derivată din antigen pentru a evita falsul negativ cauzat de obstacole sterice. Din motive tehnice, toate peptidele conțin o glicină C-terminală. Experimentele de profilare a probelor au fost realizate pe o bibliotecă de peptide compusă din 52 de peptide. Lista completă a peptidelor este prezentată mai jos:

Tabelul 5. Lista peptidelor utilizate în testele cu microserii peptidice

Nb	Secvență	Nb	Secvență	Nb	Secvență
58	ESGYAQNGDLEDAEL	76	FIETKKFLLIGKSNI	94	HDVAYRQEKDENKWT
59	AQNGDLEDAELDDYS	77	KKFLLIGKSNICVKV	95	YRQEKDENKWTHVNL
60	DLEDAELDDYSFSCY	78	LIGKSNICVKVGEKS	96	KDENKWTHVNLSSSTK
61	AELDDYSFSCYSQLE	79	SNICVKVGEKSLTCK	97	KWTHVNLSSSTKLTL
62	DYSFSCYSQLEVNGS	80	VKVGEKSLTCKKIDL	98	VNLSSSTKLTLQKRL
63	SCYSQLEVNGSQHSL	81	EKSLTCKKIDLTIV	99	STKLTLQKRLQPA
64	QLEVNGSQHSLTCAF	82	TCKKIDLTIVKPEA	100	TLLQKRLQPAAMYEI
65	NGSQHSLTCAFEDPD	83	IDLTIVKPEAPFDL	101	RKLQPAAMYEIKVRS
66	HSLTCAFEDPDVNTT	84	TIVKPEAPFDLSVIY	102	PAAMYEIKVRSIPDH
67	CAFEDPDVNTTNLEF	85	PEAPFDLSVIYREGA	103	YEIKVRSIPDHYFKG
68	DPDVNTTNLEFEICG	86	FDLSVIYREGANDFV	104	VRSIPDHYFKGFWSE
69	NTTNLEFEICGALVE	87	VIYREGANDFVVTFN	105	PDHYFKGFWSEWSPS
70	LEFEICGALVEVKCL	88	EGANDFVVTFNTHL	106	FKGFWSEWSPSYFR
71	ICGALVEVKCLNFRK	89	DFVVTFNTHLQKKY	107	WSEWSPSYFRTPEI
72	LVEVKCLNFRKLQEI	90	TFNTHLQKKYVKVL	108	SPSYFRTPEINNSS
73	KCLNFRKLQEIYFIE	91	SHLQKKYVKVLMHDV	109	YFRTPEINNSSGEMD
74	FRKLQEIYFIETKKF	92	KKYVKVLMHDVAYRQ		

Nb	Secvență	Nb	Secvență	Nb	Secvență
75	QEIFYIETKKFLLIG	93	KVLMHVDVAYRQEKDE		

- Un total de 9 probe au fost incubate pe secțiuni de microserii folosind un format Multigodeu. Pentru anticorpul N13B2 și celelalte probe s-au aplicat 4 concentrații diferite (10, 1, 0,1 și 0,01 μg/ml). O incubare de control negativ (numai anticorp secundar) a fost efectuată în paralel. Proteinele IgG umană și de șoarece au fost co-imobilizate alături de fiecare set de peptide pentru a servi drept controale de testare. Toate incubările au fost efectuate în paralel folosind două diapozitive. Două peptide-mini-serii pe fiecare diapozitiv au fost folosite ca o incubare de control prin aplicarea anticorpului de detecție marcat cu fluorescență singur pentru a evalua legarea fals pozitivă la peptide. După spălarea și uscarea diapozitivelor au fost scanate cu un laser scanner de înaltă rezoluție la 635 nm pentru a obține imagini de intensități fluorescente. Imaginile au fost cuantificate pentru a obține o valoare medie a pixelilor pentru fiecare peptidă. Anticorp secundar anti-șobolan IgG (JIR 212-175-082) marcat cu Cy5 la 1 μg/ml. Tamponare și soluții de tampon utilizat a fost TBS-tampon care include 0,05% Tween20 (JPT) și tampon de testare T20 (Pierce, SuperBlock TBS T20, # 37536). Achiziția și analiza au fost efectuate utilizând microseriile peptidice (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Germania, lot # 2668, camera de incubare Multi-godeu, Axon Genepix Scanner 4200AL, software de recunoaștere spot GenePix și Microsoft Excel.

- Rezultatul prezentat în Figura 5 prezintă secvența epitopului liniar care este recunoscut de anticorpul Effi3 pe CD127.
- Următorul tabel (Tabelul 6) prezintă secvența descrisă aici. "Nb" reprezintă SECV ID Nr.: din fiecare secvență; "Tip" dezvăluie natura secvenței, fie ADN sau secvența de aminoacizi (PRT) și "len" reprezintă lungimea secvenței.

MD/EP 3423496 T2 2020.01.31

25

Nb	Nume	Tip	Secvență	Len
1	Effi3 VHvar3	DNA	GCTGTGCAGCTGGTCAATCTGGGGGGGGCTGCTCCAGCCCGCGGGTCTCTGAAAATCACTTGCGCCGCTAGTGGGTT CACCTTTTACAAACGCAGCCATGTACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGAAAGGGCTCGGAGTGGGTGGCAGGATCAGAACAA AAGGCTAACAACTACGCAACTTACTATGCCGACTCAGTGAAGGGCAGGTTACCATAGCCGCGACGATAGCAATCCAA CAGTCTACTGTCAGATGGACTCTGTGAAGACAGAAAGATACTGCCACCTACTATTGTATTGTGGTCGTGCTACTACTACAC GGGATTACTTTGACTATTGGGGACAGGGAGTCTGGTGACAGTAGTTCA	369
2	Effi3 VHvar3_aa	PRT	AVQLVESGGGLVQPGLSLKITCAASGFTFTNAAAMYVVRQAPGKLEWVARIRTKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKSTV YLQMDSVKTEDATYYCIVVLTTRDYFDYWGQGLVTVSS	123
3	Effi3 VLvar3	DNA	GACATCGTCTGACTCAGTCCCCCTCTCCCTGCCAGTGACACCTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTCCAG TCACTGCTGACTGTCAAGGGAATTACCAGCCTGTACTGGTTCCTGCAGAAAGCCCGCCAGTCCCTAAACTGCTGATCTAT CGGATGTCTAACAGAGACAGTGGGGTGCCTGATAGGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGAAACCGACTTTACACTGAAAATTT CTCGCGTGGAGGCTGAAGATGTCGGAACCTACTATTGCGCACAGTTTCTGGAATACCTCACACTTTGCGGGCAGGCAC AAGCTGGAGCTGAAGCGT	339
4	Effi3 VLvar3_aa	PRT	DIVLTQSPSSLPVTPGEPASISCRSSQLLTVKGITSLYWFLLQKPGQSPKLLIYRMSNRDSGVPDRFSGSGSETDFTLKISRVEAED VGTYYCAQFLEYPHTFGAGTKLELKR	113
5	Effi3-VLvar4	DNA	GACATCGTCTGACACAGAGTCCCTCTCCCTGCCAGTGACACCTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTCCCA GGACCTGCTGACTGTCAAGGGCATTACCTCACTGCTGTTCTCTGCAGAAAGCCCGCCAGAGCCCTAACTGCTGATCT ATCGGATGTCTAACAGAGACAGTGGAGTGCCTGATAGGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGAAACCGACTTTACACTGAAAAT TTCTCGCGTGGAGGCTGAAGATGTCGCGACCTACTATTGCGCACAGTTTCTGGAGTATCCCCACACCTTTGGAGCAGGCAC TAAGCTGGAGCTGAAGCGT	339
6	Effi3-VLvar4_aa	PRT	DIVLTQSPSSLPVTPGEPASISCRSSQLLTVKGITSLYWFLLQKPGQSPKLLIYRMSNRDSGVPDRFSGSGSETDFTLKISRVEAE DVGTYCAQFLEYPHTFGAGTKLELKR	113
7	Effi3 VHvar3 (+ peptidă semnal)	DNA	ATGCTGCTCCTGCACTGGGTCTGGTACCCTCTGTTTCAAGGGGTCCATTGTGCTGTGCAGCTGGTCAATCTGGGGGG GGGCTGGTCCAGCCCGCGGGTCTCTGAAAATCACTTGCGCCGCTAGTGGGTTACCTTTACAAACGCAGCCATGTACTG GGTCCGACAGGCTCCTGGAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCAGCGATCAGAACAAAGGCTAACAACTACGCAACTTACTAT GCCGACTCAGTGAAGGGCAGGTTACCATTAAGCCGACGATAGCAAAATCCACAGTCTACCTGCAGATGGACTCTGTGA AGACAGAAGATACTGCCACCTACTATTGTATTGTGGTCTGCTGACTACTACACGGGATTACTTTGACTATTGGGACAG GGAGTCTGGTGACAGTAGTTCA	423
8	Effi3 VHvar3_aa (+ peptidă semnal)	PRT	MLVLQWV/LVTALFQGVHCAVQLVESGGGLVQPGLSLKITCAASGFTFTNAAAMYVVRQAPGKLEWVARIRTKANNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKSTVYLQMDSVKTEDATYYCIVVLTTRDYFDYWGQGLVTVSS	141
9	Effi3 VLvar3 (+ peptidă semnal)	DNA	ATGAAGTTTCTGCTCAGTTTCTGGGCTGATTGTGCTGTGTATTCTTGGCGCTACCGGAGACATCGTCTGACTCAGTCCC CCTCTTCCCTGCCAGTGACACCTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTCCAGTCACTGCTGACTGTCAAGGGA ATTACCAGCCTGACTGGTTCCTGCAGAAAGCCCGGCCAGTCCCTAAACTGCTGATCTATCGGATGTCTAACAGAGACAG TGGGGTGCCTGATAGGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGAAACCGACTTTACACTGAAAATTTCTCGCGTGGAGGCTGAAGATG TCGGAACCTACTATTGCGCACAGTTTCTGGAATACCTCACACTTTGCGGGCAGGCACTAAGCTGGAGCTGAAGCGT	399
10	Effi3 VLvar3_aa (+ peptidă semnal)	PRT	MKFPAQFLGLIVLPIGATGDIVLTQSPSSLPVTPGEPASISCRSSQLLTVKGITSLYWFLLQKPGQSPKLLIYRMSNRDSGVPDR FSGSGSETDFTLKISRVEAEDVGTYYCAQFLEYPHTFGAGTKLELKR	133
11	Effi3-VLvar4 (+ peptidă semnal)	DNA	ATGAAGTTTCTGCTCAGTTTCTGGGCTGATTGTCTCTGTGCACTTCTGGGGCAACCGCGACATCGTCTGACACAGAGT CCCTCTCCCTGCCAGTGACACCTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTCCAGGACCTGCTGACTGTCAAGGG CATTACCTCACTGACTGGTTCCTGCAGAAAGCCCGGCCAGAGCCCTAACTGCTGATCTATCGGATGTCTAACAGAGACA GTGGAGTGCCCGATAGGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGAAACCGACTTTACACTGAAAATTTCTCGCGTGGAGGCTGAAGAT GTGCGCACCTACTATTGCGCACAGTTTCTGGAGTATCCCCACACCTTTGGAGCAGGCACTAAGCTGGAGCTGAAGCGT	399

Nb	Nume	Tip	Secvență
12	Effi3-VLvar4_aa (+ peptidă semnal)	PRT	MKFPAQFLGLIVLCIPGATGDIVLTQSPSSLPVTPGEPASISCRSSQDLLTVKGITSLYWV FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGTYYCAQFLEYPHFTGAGTKLEIKR
13	Effi3 VHvar3_CDR1	DNA	TTCACCTTTACAAACGCAGCCATGTAC
14	Effi3VHvar3_CDR1-aa	PRT	FTFTNAAMY
15	Effi3VHvar3_CDR2	DNA	CGGATCAGAACAAAGGCTAACAACACTACG AGTGAAGGGC
16	Effi3 VHvar3_CDR2-aa	PRT	RIRTKANNYATYYADSVKG
17	Effi3 VHvar3_CDR3	DNA	GTCGTGCTGACTACTACACGGGATTACTT
18	Effi3 VHvar3_CDR3-aa	PRT	VVLTTTRDYFDY
19	Effi3 VLvar3_CDR1	DNA	CGAAGCTCCCAGTCACTGCTGACTGTCAA
20	Effi3 VLvar3-CDR1_aa	PRT	RSSQSLLTVKGITSLY
21	Effi3 VLvar3/4_CDR2	DNA	CGGATGTCTAACAGAGACAGT
22	Effi3VLvar3/4_CDR2aa	PRT	RMSNRDS
23	Effi3 VLvar3/4_CDR3	DNA	GCACAGTTTCTGGAATACCCTCACACT
24	Effi3 VLvar3/4_CDR3aa	PRT	AQFLEYPHT
25	Effi3-VLvar4_CDR1	DNA	CGAAGCTCCCAGGACCTGCTGACTGTCAA
26	Effi3-VLvar4_CDR1_aa	PRT	RSSQDLLTVKGITSLY
27	IgG1m (E333A)	DNA	GCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGACACCTCT CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACTCAGGCGCC CGGCTGCTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG CATATGCCACCGTGCCAGCACTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTCT TCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGAGCTGAGCCACGAA TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAG AGCGTCTCACCCTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA CCCCATCGCGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA AGCAATGGGCGAGCCGGAACAATAAGACCAAGCCTCCCGTGTGGACTCCG GCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG TACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

Nb	Nume	Tip	Secvență
28	IgG1m (E333A) _aa	PRT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQ NHKPSN TKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAKTISKAKGQPR CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
29	IgG4m (S228P)	DNA	GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTC CCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCC CGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC TACACCTGCAACGTAGATCACAAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGAGTTT CACCATGCCAGCACCTGAGTTCTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCGCCCA CCCGGACCCCTGAGGTGACGTGCGTGGTGGTGGAGTGGAGCCAGGAAGACCCCGA TGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTTCAACAG ACCGTCTGCAACGAGTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTTCA AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCTC CCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGCTCC TGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA
30	IgG4m (S228P) _aa	PRT	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQ DHKPSN TKVDKRVEKYGPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPR KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
31	IgG2b	DNA	GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTC CCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCT CAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC ACACCTGCAACGTAGATCACAAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGACAGTTG ACCGTGGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAC GACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGT GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCAGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACG TTGTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AACCATCTCCAAACCAAGGGCAGCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGCTCC GAACCAAGGTGACCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCC CCGGAGAACAACTACAAGACCAAGCCTCCCATGCTGGACTCCGACGCTCTCTT CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA
32	IgG2b_aa	PRT	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQ VDHKPSN TKVDKTVKCCVCCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPR KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
33	CLkappa	DNA	ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT TGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT TGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGAC ACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAA TAG
34	CLkappa_aa	PRT	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVKDNLQSGNSQESVTE YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Nb	Nume	Tip	Secvență
35	CLlambda	DNA	GGTCAGCCCAAGGCTGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCTCTGAGGAGCT GTGTCCTCAAGTGACTTCTACCCGGGAGCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGAT GAGACCACACACCTCCAAACAAGCAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATC AAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG TCATAG
36	CLlambda_aa	PRT	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTF SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
37	HumanFc_IgG1 (UniprotP01857)	PRT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTV HNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
38	HumanFc_IgG4 (UniprotP01861)	PRT	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ DHKPSNTKVDKKVEPKSCDPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTVV AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKISKAKGQPR KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
39	CD127 umană aa	PRT	MTILGTTFGMVFSLLQVVSFSGESGYAQNGDLEDAELDDYFSQYSLQEVNQSQHSLTCA FRKLQEIYFIETKKFLIGKSNICVKVGEKSLTCKKIDLTIVKPEAPFDLSVIYREGANDF EKDENKWTHTVNLSTKLTLQRLQPAAMYIEIKVRSIPDHYKGFVSEWSPSYFRTPE IACVWKKRIKPIVWPSLPDHHKLTLEHLCKKPRKNLNVSFNPEFLDCCQIHRVDDIQAF DVQSPNCPSEDVITPESEFGRDSSLTCLAGNVSAADAPHSRSSRLDREGSGKNPSHYV NPVAGGQPILTSLGSNQEEAYVTMSFYQNG
40	uman CD127_21-239 aa	PRT	ESGYAQNGDLEDAELDDYFSQYSLQEVNQSQHSLTCAFEFDPDVNTTNLEFEICGALV KCLNFRKLQEIYFIETKKFLIGKSNICVKVGEKSLTCKKIDLTIVKPEAPFDLSVIYR EGANDFVVTFTNTSHLQKKYVKVLMHDAVYRQEKDENKWTHTVNLSTKLTLQRLQ YEIKVRSIPDHYKGFVSEWSPSYFRTPEINNSSGEMD
41	Effi3_VH3_IgG1m (E333A)	DNA	ATGCTGGTCTGCAAGTGGGTCTGCTGTCACCGCTCTGTTTCAGGGGGTCCATTGTGCT GGGCTGGTCCAGCCCGCGGGTCTCTGAAATCACTTGCGCGCTAGTGGGTTCAG GGTCCGACAGGCTCTGGAAGGGCTGAGTGGGTGGCACGGATCAGAACAA GCCGACTCAGTGAAGGGCAGGTTCACCATAGCCGCGACGATAGCAAAATCCACAG AGACAGAAGATACTGCCACCTACTATTGTATTGGTCTGTGCTGACTACTACAGG GGAGTGCTGGTGACAGTGAGTTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCT TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTG CTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGTGTCTCAGTCTCAGGACTCTACTC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCA AGCCCAATCTTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAATC TTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATG AGACCTGAGGTCAAGTTCACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCC GTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACAGGACTGGC AAGGTCTCCAAAGAGCCCTCCAGCCCATCCGCGAAACCTCTCCAAAGCA GTGTACACCTGCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTACAGCTGA CAGCGACATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA CGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGACAAGAGCAGGTGGCAG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACTACACGACAGAGAGCCCTCTCTCTCCG

Nb	Nume	Tip	Secvență
42	Effi3_VH3_IgG1m (E333A) _aa	PRT	MLVLQWVVLVTALFQGVHCAVQLVESGGGLVQPGGSLKITCAASGFTFTNAAMYWV ADSVKGRFTISRDDSKSTVYLQMDSVKTEDTATYYCIVVVLITTRDYFDYWGGVLT ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI HTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMITKNQ NNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMIHEALHNHYTQKSLSLSP
43	Effi 3_VH3_IgG4 (S228P)	DNA	ATGCTGGTCTGCAGTGGGTCTGTGTCACCGCTCTGTTTCAGGGGGTCCATTGTGCT GGGCTGGTCCAGCCCGCGGGTCTCTGAAAATCACTTGCCTGCTAGTGGGTTCAC GGTCCGACAGGCTCTGGAAGGGCTGGAGTGGGTGGCACGGATCAGAACA GCCGACTCAGTGAAGGGCAGGTTACCATTAAGCCGACGATAGCAAATCCACAG AGACAGAAGATACTGCCACCTACTATTGTATTGTGGTCGTGCTGACTACTACAGG GGAGTGTGTGTGACAGTGAAGTTCAGCTAGCACAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTC CGAGAGCACAGCCCGCTGGGTGCTGCTGCAAGGACTACTTCCCGAACCAGTGA CTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTCTGCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCC TCCAGCAGCTTGGGACGACGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCA GAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCCACCATGCCAGCAGCTGAGTTCCTGGGGG AAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGT AGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA GCACGTACCGTGTGTGACGCTCTCACCCTCTGCACAGGACTGGCTGAACGG CAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAG CTGCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGG TCGCCGTGGAGTGGGAGCAATGGGACGCGGAGAACAACTACAAGACCCACGC CTTCTCTCTACAGCAGGCTAACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAAT AGGCTCTGCACAACCACTACACAGAAAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA
44	Effi3_VH3_IgG4 (S228P) _aa	PRT	MLVLQWVVLVTALFQGVHCAVQLVESGGGLVQPGGSLKITCAASGFTFTNAAMYWV ADSVKGRFTISRDDSKSTVYLQMDSVKTEDTATYYCIVVVLITTRDYFDYWGGVLT ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDPEVQFNWYVDGVE LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMITKNQVSL YKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMIHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Nb	Nume	Tip	Secvență
45	Effi3_VH3_IgG2b	DNA	ATGCTGGTCTCTGAGTGGGTCCTGGTCACCGCTCTGTTTCAGGGGGTCCATTGTGCT GGGCTGGTCCAGCCCGCGGGTCTCTGAAATCACTTGCGCCGCTAGTGGGTTCAC GGTCCGACAGGCTCTCGAAAGGGCTTGAGTGGGTGGCACGGATCAGAACAA GCCGACTCAGTGAAGGGCAGGTTACCCATTAGCCGCGACGATAGCAAATCCACAG AGACAGAAGATACTGCCACCTACTATTGTATTGTGGTCTGCTGACTACTACACGG GGAGTGTGGTGACAGTGAGTTCAGCTAGCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCT CGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTG CTGACCAAGCGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTCAGTCTCTCAGGACTCTACTC TCCAGCAACTTCGGCACCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCA AGCGCAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCT CCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGAG CCAGTTCAACTGGTACGTGGAGCGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCA GTTCCGTGTGGTACGCTCTCACCGTTGTGCACAGGACTGGCTGAACGGCAAG AAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGCCCG CCCATCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGCTGGTCAAA GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCGGAGAACTACAAGACACGCTCCCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTT CTGCACAACCACTACAGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA
46	Effi3_VH3_IgG2b_aa	PRT	MLVLQWVLTALFQGVHCAVQLVESGGGLVQPGSLKITCAASGFTFTNAAMYVWV ADSVKGRFTISRDDSKSTVYLQMDSVKTEDATYYCIVVLTTRDYFDYWGQGLVLT ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFQTQYV PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT YKTTTPMILDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
47	Effi3_VL4_CLkappa	DNA	ATGAAGTTCCCTGCTCAGTTCTCTGGGGCTGATTGTCTGTGCATTCTGGGGCAAC CCCTCTCCCTGCCAGTGACACCTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTCC CATTACCTCACTGTACTGGTTCTGCAGAAAGCCCGGGCAGAGCCCTAAACTGCTGA GTGGAGTGCCCGATAGGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGGAACCGACTTTACACTGA GTCCGGCACCTACTATTGCGCACAGTTTCTGGAGTATCCCCACACCTTGGAGCAGG GGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCC TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACGCT ACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG G
48	Effi3_VL4_CLkappa_aa	PRT	MKFPAQFLGLIVLCIPGATGDIVLTQSPSSLPVTPGEPASISCRSSQDILLTVKGITSLYVWV FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGTYYCAQFLEYPHTFGAGTKLELKRITVAAPSVFIFPPS QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSK
49	Effi3_VL3_CLkappa	DNA	ATGAAGTTTCTGCTCAGTTTCTGGGGCTGATTGTGCTGTGTATTCTGGCGCTACCG CCTCTTCCCTGCCAGTGACACCTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTCC ATTACAGCCTGTACTGTTCTGCAGAAAGCCCGGCCAGTCCCTAAACTGCTGAT TGGGGTGCCCGATAGGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGAAACCGACTTTACACTGA TCGGAACCTACTATTGCGCACAGTTTCTGGAATACCTCTACACTTTCGGGGCAGGCA GTGGCTGCACCATCTGTCTTCTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCA CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACGCT ACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG G

Nb	Nume	Tip	Secvență
50	Effi3_VL3_CLkappa_aa	PRT	MKFP AQFLGLIVLCIPGATGDIVLTQSPSSLPVTPGEPASISCRSSQSLITVKGITSLYWFL FSGSGSETDFTLKISRVEAEDVGTYYCAQFLEYPHFTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSD QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
51	Effi3_VL4_Cllambda	DNA	ATGAAGTTCCCTGCTCAGTTCTGGGGCTGATTGTCTGTGATTCTCGGGCAAC CCCTCTCCCTGCCAGTGACACCTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTC CATTACCTCACTGTACTGGTTCTGCAGAAAGCCGGGCAGAGCCCTAAACTGCTGA GTGGAGTGCCCGATAGGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGGAACCGACTTTACACTGA GTCGGCACCTACTATTGCGCACAGTTCTGGAGTATCCCAACACCTTTGGAGCAGG TCAGCCCAAGGCTGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCTCTGAGGAGCTTCA TCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCTTGGGAAGGCAGATAGCA ACCAACACACCTCCAAACAAAGCAACAACAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGA CCCACAGAAGCTACAGTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGAG AG
52	Effi3_VL4_Cllambda_aa	PRT	MKFP AQFLGLIVLCIPGATGDIVLTQSPSSLPVTPGEPASISCRSSQDILITVKGITSLYWFL FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGTYYCAQFLEYPHFTFGAGTKLELRGQPKAAPSVTLFL VAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTV
53	Effi3_VL3_Cllambda	DNA	ATGAAGTTTCTGCTCAGTTTCTGGGCCTGATTGTGCTGTGTATTCTGGCGCTAC CCTCTTCCCTGCCAGTGACACCTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTCC ATTACCAAGCTGTACTGTTCTGCAGAAAGCCGGCCAGTCCCCTAAACTGCTGAT TGGGGTGCCCGATAGGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGAAACCGACTTTACACTGAA TCGGAACTACTATTGCGCACAGTTTCTGGAATACCTCACACTTTCCGGGGCAGGCA CAGCCCAAGGCTGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCTCTGAGGAGCTTCA CTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCTTGGGAAGGCAGATAGCA ACCAACACACCTCCAAACAAAGCAACAACAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGA CCCACAGAAGCTACAGTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGAG AG
54	Effi3_VL3_Cllambda_aa	PRT	MKFP AQFLGLIVLCIPGATGDIVLTQSPSSLPVTPGEPASISCRSSQSLITVKGITSLYWFL FSGSGSETDFTLKISRVEAEDVGTYYCAQFLEYPHFTFGAGTKLELRGQPKAAPSVTLFL VAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTV
55	Peptida CD127	PRT	ESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLE
56	MD707-3 VH	PRT	AVHILVESGGGLVQPKESLKISCAASGFTFSNAAMYWVRQAPGKLEWVARIRTKAN LQMDNVKTDATAMYYCIVVLTTRDYFDYWGQGVMTVSS
57	MD707-3 VL	PRT	DIVLTQAPLSVSTPGESASISCRSSQSLITVKGITSLYWFLQKPGKSPQLLIYRMSNLAS VGYYCAQFLEYPHFTFGAGTKLELR

Referințe

- Adams, A.B., Pearson, T.C., and Larsen, C.P. (2003). Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance. *Immunol. Rev.* 196, 147-160.
- 5 Albuquerque, A.S., Cortesao, C.S., Foxall, R.B., Soares, R.S., Victorino, R.M.M., and Sousa, A.E. (2007). Rate of increase in circulating IL-7 and loss of IL-7R α expression differ in HIV-1 and HIV-2 infections: two lymphopenic diseases with similar hyperimmune activation but distinct outcomes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 3252-3259.
- 10 AL-Lazikani, B., Lesk, A.M., and Chothia, C. (1997). Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 273, 927-948.
- Almagro, J.C., Teplyakov, A., Luo, J., Sweet, R.W., Kodangattil, S., Hernandez-Guzman, F., and Gilliland, G.L. (2014). Second antibody modeling assessment (AMA-II). *Proteins* 82, 1553-1562.
- Armour, K.L., Clark, M.R., Hadley, A.G., and Williamson, L.M. (1999). Recombinant human IgG molecules lacking Fc γ receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur. J.*
- 15 *Immunol.* 29, 2613-2624.
- Broux, B., Hellings, N., Venken, K., Rummens, J.-L., Hensen, K., Van Wijmeersch, B., and Stinissen, P. (2010). Haplotype 4 of the multiple sclerosis-associated interleukin-7 receptor α gene influences the frequency of recent thymic emigrants. *Genes Immun.* 11, 326-333.
- 20 Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., and Daeron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113, 3716-3725.
- Chan, A.C., and Carter, P.J. (2010). Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 301-316.
- 25 Chothia, C., and Lesk, A.M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196, 901-917.
- Datta-Mannan, A., Witcher, D.R., Tang, Y., Watkins, J., Jiang, W., and Wroblewski, V.J. (2007). Humanized IgG1 variants with differential binding properties to the neonatal Fc receptor: relationship to pharmacokinetics in mice and primates. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 35, 86-94.
- 30 Desmet, J., Spriet, J., and Lasters, I. (2002). Fast and accurate side-chain topology and energy refinement (FASTER) as a new method for protein structure optimization. *Proteins* 48, 31-43.
- Ewert, S., Honegger, A., and Pluckthun, A. (2003). Structure-based improvement of the biophysical properties of immunoglobulin VH domains with a generalizable approach. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 1517-1528.
- 35 Haudebourg, T., Poirier, N., and Vanhove, B. (2009). Depleting T-cell subpopulations in organ transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 22, 509-518.
- Hinton, P.R., Johlfs, M.G., Xiong, J.M., Hanestad, K., Ong, K.C., Bullock, C., Keller, S., Tang, M.T., Tso, J.Y., Vasquez, M., et al. (2004). Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *J. Biol. Chem.* 279, 6213-6216.
- 40 Honegger, A., Malebranche, A.D., Rothlisberger, D., and Pluckthun, A. (2009). The influence of the framework core residues on the biophysical properties of immunoglobulin heavy chain variable domains. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* 22, 121-134.
- Idusogie, E.E., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Wong, P.Y., Ultsch, M., Meng, Y.G., and Mulkerrin, M.G. (2000). Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 164, 4178-4184.
- 45 Jariwala, S.P., Abrams, E., Benson, A., Fodeman, J., and Zheng, T. (2011). The role of thymic stromal lymphopoietin in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 41, 1515-1520.
- Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., and Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-525.
- 50 Labrijn, A.F., Buijsse, A.O., van den Bremer, E.T.J., Verwilligen, A.Y.W., Bleeker, W.K., Thorpe, S.J., Killestein, J., Polman, C.H., Aalberse, R.C., Schuurman, J., et al. (2009). Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nat. Biotechnol.* 27, 767-771.
- 55 Lazar, G.A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J.S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H.S., Eivazi, A., Yoder, S.C., et al. (2006). Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4005-4010.
- Martin, A.C.R. (2001). Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In *Antibody Engineering*, D.R. Kontermann, and D.S. Dubel, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 422-439.
- 60

- Michel, L., Berthelot, L., Pettre, S., Wiertlewski, S., Lefrere, F., Braudeau, C., Brouard, S., Soullillou, J.-P., and Laplaud, D.-A. (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis. *J. Clin. Invest.* 118, 3411-3419.
- 5 North, B., Lehmann, A., and Dunbrack, R.L. (2011). A new clustering of antibody CDR loop conformations. *J. Mol. Biol.* 406, 228-256.
- Racape, M., Vanhove, B., Soullillou, J.-P., and Brouard, S. (2009). Interleukin 7 receptor alpha as a potential therapeutic target in transplantation. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 57, 253-261.
- Richards, J.O., Karki, S., Lazar, G.A., Chen, H., Dang, W., and Desjarlais, J.R. (2008).
10 Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2517-2527.
- Rochman, Y., Kashyap, M., Robinson, G.W., Sakamoto, K., Gomez-Rodriguez, J., Wagner, K.-U., and Leonard, W.J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19455-19460.
- 15 Ryan, M.C., Hering, M., Peckham, D., McDonagh, C.F., Brown, L., Kim, K.M., Meyer, D.L., Zabinski, R.F., Grewal, I.S., and Carter, P.J. (2007). Antibody targeting of B-cell maturation antigen on malignant plasma cells. *Mol. Cancer Ther.* 6, 3009-3018.
- Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., et al. (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIIL, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J. Biol. Chem.* 276, 6591-6604.
- 20 Shinohara, T., Nemoto, Y., Kanai, T., Kameyama, K., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Totsuka, T., Ikuta, K., and Watanabe, M. (2011). Upregulated IL-7 receptor α expression on colitogenic memory CD4+ T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 2623-2632.
- 25 Steurer, W., Nickerson, P.W., Steele, A.W., Steiger, J., Zheng, X.X., and Strom, T.B. (1995). Ex vivo coating of islet cell allografts with murine CTLA4/Fc promotes graft tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 155, 1165-1174.
- 30 Strohl, W.R. (2009). Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 685-691.
- Taylor, B.C., Zaph, C., Troy, A.E., Du, Y., Guild, K.J., Comeau, M.R., and Artis, D. (2009). TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J. Exp. Med.* 206, 655-667.
- 35 Vargas-Madrado, E., and Paz-Garcia, E. (2003). An improved model of association for VH-VL immunoglobulin domains: asymmetries between VH and VL in the packing of some interface residues. *J. Mol. Recognit. JMR* 16, 113-120.
- Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Fang, C., Cousins, D., Zhang, G., Gu, S., Gao, Z., Shamji, B., et al. (2008). Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 2790-2798.
- 40

LISTA DE SECVENȚE

<110> OSE IMMUNOTHERAPEUTICS

<120> Anticorpi non-antagoniști direcționați împotriva lanțului alfa al domeniului extracelular al receptorului IL7 și utilizarea acestuia în tratamentul cancerului.

<130> B11725A/AD/FS

<150> 62/301271

<151> 2016-02-29

<160> 109

<170> Versiunea brevetului 3.5

<210> 1

<211> 369

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3 VHvar3

<400> 1

```

gctgtgcagc tggtcgaatc tggggggggg ctggtccagc cgggcgggtc tctgaaaatc      60
acttgccgct ctagtgggtt cacctttaca aacgcagcca tgtactgggt ccgacaggct      120
cctggaagg gcctggagtg ggtggcagcg atcagaacaa aggctaacaa ctacgcaact      180
tactatgccg actcagtga gggcagggtt accattagcc gcgacgatag caaatccaca      240
gtctacctgc agatggactc tgtgaagaca gaagatactg ccacctacta ttgtattgtg      300
gtcgtgctga ctactacacg ggattacttt gactattggg gacaggaggt gctggtgaca      360
gtgagttca                                     369

```

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3 VHvar3_aa

<400> 2

```

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

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

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ala Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50          55          60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Thr
65          70          75          80

Val Tyr Leu Gln Met Asp Ser Val Lys Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
85          90          95

Tyr Cys Ile Val Val Val Leu Thr Thr Thr Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
100         105         110

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

```

<210> 3

<211> 339

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3 VLvar3

<400> 3
gacatcggtcc tgactcagtc cccctcttcc ctgccagtga cacctggaga gccagcatct 60
atcagttgcc gaagctccca gtcactgctg actgtcaagg gaattaccag cctgtactgg 120
ttctgcaga agcccgcca gtccctaaa ctgctgatct atcgatgtc taacagagac 180
agtggggtgc ccgataggtt ctccagcagc gggccgaaa ccgactttac actgaaaatt 240
tctcgcgtgg aggtgaaga tgcggaacc tactattgag cacagtttct ggaataccct 300
cacactttcg gggcaggcac taagctggag ctgaagcgt 339

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3 VLvar3_aa

<400> 4

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Thr Val
20 25 30

Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Arg

<210> 5

<211> 339

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3-VLvar4

<400> 5

gacatcggtgc tgacacagag tccctcctcc ctgccagtga cacctggaga gccagcatct 60
atcagttgcc gaagctccca ggacctgctg actgtcaagg gcattacctc actgtactgg 120
ttctgcaga agcccgcca gagccctaaa ctgctgatct atcgatgtc taacagagac 180
agtggagtgc ccgataggtt ctccagcagc gggccggaa ccgactttac actgaaaatt 240
tctcgcgtgg aggtgaaga tgcggcacc tactattgag cacagtttct ggagtatccc 300
cacacctttg gagcaggcac taagctggag ctgaagcgt 339

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3-VLvar4_aa

<400> 6

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

Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Asp	Leu	Leu	Thr	Val
			20					25					30		

Lys	Gly	Ile	Thr	Ser	Leu	Tyr	Trp	Phe	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Arg	Asp	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				

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

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Phe
				85					90					95	

Leu	Glu	Tyr	Pro	His	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys
			100					105					110		

Arg

<210> 7

<211> 423

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effh3 VHvar3 (+ peptidă semnal)

<400> 7

atgctgggtcc tgcagtggtg cctgggtcacc gctctgtttc aggggggtcca ttgtgctgtg	60
cagctgggtcg aatctggggg ggggctgggc cagcccggcg ggtctctgaa aatcacttgc	120
gccgctagtg gggtcacctt tacaaacgca gccatgtact ggggtccgaca ggctcctgga	180
aagggcctgg agtgggtggc acggatcaga acaaaggcta acaactacgc aacttactat	240
gccgactcag tgaagggcag gttcaccatt agccgcgacg atagcaaata cacagtctac	300
ctgcagatgg actctgtgaa gacagaagat actgccacct actattgtat tgtggctgtg	360
ctgactacta cacgggatta ctttgactat tggggacagg gaggctggtg gacagtgagt	420
tca	423

<210> 8

<211> 141

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effh3 VHvar3_aa (+ peptidă semnal)

<400> 8

Met Leu Val Leu Gln Trp Val Leu Val Thr Ala Leu Phe Gln Gly Val
 1 5 10 15

His Cys Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Ile Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 35 40 45

Asn Ala Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Val Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ala Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys
 85 90 95

Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asp Ser Val Lys Thr Glu Asp Thr Ala
 100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ile Val Val Val Leu Thr Thr Thr Arg Asp Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 9

<211> 399

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effl3 VLvar3 (+ peptidă semnal)

<400> 9

atgaagtttc ctgctcagtt tctgggcctg attgtgctgt gtattcctgg cgctaccgga 60

gacatcgctcc tgactcagtc cccctcttcc ctgccagtgga cacctggaga gccagcatct 120

atcagttgcc gaagctccca gtcactgctg actgtcaagg gaattaccag cctgtactgg 180

ttcctgcaga agcccggcca gtcccctaaa ctgctgatct atcggatgtc taacagagac 240

agtggggtgc ccgatagggt ctcaggcagc gggtcgaaa ccgactttac actgaaaatt 300

tctcgcgtgg aggctgaaga tgtcggaacc tactattgcg cacagtttct ggaataccct 360

cacactttcg gggcaggcac taagctggag ctgaagcgt 399

<210> 10

<211> 133

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3 VLvar3_aa (+ peptidă semnal)

<400> 10

Met Lys Phe Pro Ala Gln Phe Leu Gly Leu Ile Val Leu Cys Ile Pro
 1 5 10 15

Gly Ala Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro
 20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Thr Val Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Arg Asp
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Leu Lys Arg
 130

<210> 11

<211> 399

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3-VLvar4 (+ peptidă semnal)

<400> 11

atgaagttcc ctgctcagtt cctggggctg attgtcctgt gcattcctgg ggcaaccggc 60

gacatcgtgc tgacacagag tccctcctcc ctgccagtga cacctggaga gccagcatct 120

atcagttgcc gaagctccca ggacctgctg actgtcaagg gcattacctc actgtactgg 180

ttcctgcaga agcccgggca gagccctaaa ctgctgatct atcggatgtc taacagagac 240

agtggagtgc ccgataggtt ctcaggcagc gggtcggaa ccgactttac actgaaaatt 300

tctcgcgtgg aggctgaaga tgtcggcacc tactattgcg cacagtttct ggagtatccc 360

cacacctttg gagcaggcac taagctggag ctgaagcgt 399

<210> 12

<211> 133

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3-VLvar4_aa (+ peptidă semnal)

<400> 12

Met Lys Phe Pro Ala Gln Phe Leu Gly Leu Ile Val Leu Cys Ile Pro
1 5 10 15

Gly Ala Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asp
35 40 45

Leu Leu Thr Val Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Arg Asp
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr
100 105 110

Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Leu Lys Arg
130

<210> 13

<211> 27

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3 VHvar3_CDR1

<400> 13

ttcaccttta caaacgcagc catgtac 27

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3 VHvar3_CDR1-aa

<400> 14

Phe Thr Phe Thr Asn Ala Ala Met Tyr
1 5

<210> 15

<211> 57

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3 VHvar3_CDR2

<400> 15

cggatcagaa caaaggctaa caactacgca acttactatg ccgactcagt gaagggc 57

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3 VHvar3_CDR2-aa

<400> 16

Arg	Ile	Arg	Thr	Lys	Ala	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5					10					15	

Val Lys Gly

<210> 17

<211> 36

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3 VHvar3_CDR3

<400> 17

gtcgtgctga ctactacacg ggattacttt gactat 36

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3 VHvar3_CDR3-aa

<400> 18

Val	Val	Leu	Thr	Thr	Thr	Arg	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1			5						10		

<210> 19

<211> 48

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3 VLvar3_CDR1

<400> 19

cgaagctccc agtcactgct gactgtcaag ggaattacca gcctgtac 48

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3 VLvar3-CDR1_aa

<400> 20

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Lys	Gly	Ile	Thr	Ser	Leu	Tyr
1				5					10					15	

<210> 21

<211> 21

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3 VLvar3/4_CDR2

<400> 21

cggatgtcta acagagacagt 21

```

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<223> Effi3 VLvar3/4_CDR2aa
<400> 22
Arg Met Ser Asn Arg Asp Ser
1          5
<210> 23
<211> 27
<212> ADN
<213> Secvență artificială
<220>
<223> Effi3 VLvar3/4_CDR3
<400> 23
gcacagtttc tggaataccc tcacact 27
<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<223> Effi3 VLvar3/4_CDR3aa
<400> 24
Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro His Thr
1          5
<210> 25
<211> 48
<212> ADN
<213> Secvență artificială
<220>
<223> Effi3-VLvar4_CDR1
<400> 25
cgaagctccc aggacctgct gactgtcaag ggcattacct cactgtac 48
<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<223> Effi3-VLvar4_CDR1_aa
<400> 26
Arg Ser Ser Gln Asp Leu Leu Thr Val Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr
1          5          10          15
<210> 27
<211> 993
<212> ADN
<213> Secvență artificială
<220>
<223> IgG1m (E333A)

```

<400> 27
 gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgcca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtc tctcttccc cccaaaacc aagcacacc tcatgatctc ccggaccct 420
 gagtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgggggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtccctgacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgcgaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag 720
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 840
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 993
 <210> 28
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> IgG1m (E333A) _aa
 <400> 28

MD/EP 3423496 T2 2020.01.31

43

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

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

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 29

<211> 984

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> IgG4m (S228P)

<400> 29

```

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

```

<210> 30

<211> 327

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> IgG4m (S228P) _aa

<400> 30

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	100	105	110	
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	115	120	125	
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	130	135	140	
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	145	150	155	160
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	165	170	175	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	180	185	190	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	195	200	205	
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	210	215	220	
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	225	230	235	240
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	245	250	255	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	260	265	270	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	275	280	285	
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	290	295	300	
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	305	310	315	320
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										325			

<210> 31

<211> 981

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> IgG2b

<400> 31
 gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
 agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
 tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
 aaatgttgtg tcgagtgcc accgtgccc gaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
 ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480
 gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
 gtggtcagcg tcctcacctg tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
 aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaggg 660
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccc gcgacatcgc cgtggagtgg 780
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccatgct ggactccgac 840
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
 tcctgtctc cgggtaaatg a 981
 <210> 32
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> IgG2b_aa
 <400> 32
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

MD/EP 3423496 T2 2020.01.31

48

Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	100	105	110
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	115	120	125
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	130	135	140
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	145	150	155
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	165	170	175
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	180	185	190
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	195	200	205
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	210	215	220
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	225	230	235
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	245	250	255
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	260	265	270
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	275	280	285
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	290	295	300
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	305	310	315
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											325		

<210> 33

<211> 321

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> CLkappa

<400> 33

```

acggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga      60
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg      120
aagggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc      180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa      240
cacaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaagagc      300
ttcaacaggg gagagtgtta g                                          321

```

<210> 34

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> CLkappa_aa

<400> 34

```

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

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

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50          55          60
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65          70          75          80

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

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

```

<210> 35

<211> 321

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> CLlambda

<400> 35
 ggtcagccca aggetgcccc ctcggtcact ctgttcccg cctcctctga ggagcttcaa 60
 gccacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120
 gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag gcgggagtg agaccaccac accctccaaa 180
 caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag 240
 tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
 gccctacag aatgttcata g 321

<210> 36

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> CLambda_aa

<400> 36

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 70 75 80
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 37

<211> 330

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> HumanFc_IgG1 (UniprotP01857)

<400> 37

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165					170					175	

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

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

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 38

<211> 327

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Fc_IgG4 uman (UniprotP01861)

<400> 38

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

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

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50		55		60	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr					
65		70		75	80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys					
		85		90	95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro					
		100		105	110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys					
		115		120	125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val					
		130		135	140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp					
145		150		155	160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe					
		165		170	175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp					
		180		185	190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu					
		195		200	205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg					
		210		215	220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys					
225		230		235	240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp					
		245		250	255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys					
		260		265	270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser					
		275		280	285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser					
		290		295	300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser					
305		310		315	320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys					
		325			

<210> 39
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

<220>

<223> aa CD127 uman

<400> 39

Met	Thr	Ile	Leu	Gly	Thr	Thr	Phe	Gly	Met	Val	Phe	Ser	Leu	Leu	Gln
1				5					10					15	

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

Ala	Glu	Leu	Asp	Asp	Tyr	Ser	Phe	Ser	Cys	Tyr	Ser	Gln	Leu	Glu	Val
		35					40					45			

Asn	Gly	Ser	Gln	His	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Phe	Glu	Asp	Pro	Asp	Val
50						55					60				

Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe	Glu	Ile	Cys	Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Val
65					70					75					80

Lys	Cys	Leu	Asn	Phe	Arg	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Phe	Ile	Glu	Thr
				85					90					95	

Lys	Lys	Phe	Leu	Leu	Ile	Gly	Lys	Ser	Asn	Ile	Cys	Val	Lys	Val	Gly
			100					105					110		

Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Ile	Val	Lys
		115					120						125		

Pro	Glu	Ala	Pro	Phe	Asp	Leu	Ser	Val	Ile	Tyr	Arg	Glu	Gly	Ala	Asn
	130					135					140				

Asp	Phe	Val	Val	Thr	Phe	Asn	Thr	Ser	His	Leu	Gln	Lys	Lys	Tyr	Val
145					150					155					160

Lys	Val	Leu	Met	His	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	Gln	Glu	Lys	Asp	Glu	Asn
				165					170					175	

Lys	Trp	Thr	His	Val	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

180	185	190
Arg Lys Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile 195 200 205		
Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr 210 215 220		
Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro 225 230 235 240		
Ile Leu Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu 245 250 255		
Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val 260 265 270		
Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys 275 280 285		
Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu 290 295 300		
Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val 305 310 315 320		
Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu 325 330 335		
Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu 340 345 350		
Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr 355 360 365		
Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser 370 375 380		
Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val 385 390 395 400		
Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro 405 410 415		
Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala 420 425 430		
Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala 435 440 445		
Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln 450 455		

<210> 40
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

<220>

<223> aa CD127_21-239 uman

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 41

<211> 1416

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3_VH3_IgG1m (E333A)

<400> 41

atgctgggtcc tgcagtggtg cctgggtcacc gctctgtttc aggggggtcca ttgtgctgtg	60
cagctgggtcg aatctggggg ggggctggtc cagcccggcg ggtctctgaa aatcacttgc	120
gccgctagtg ggttcacctt tacaaacgca gccatgtact ggggtccgaca ggctcctgga	180
aagggcctgg agtgggtggc acggatcaga acaaaggcta acaactacgc aacttactat	240
gccgactcag tgaagggcag gttcaccatt agccgcgacg atagcaaatt cacagtctac	300
ctgcagatgg actctgtgaa gacagaagat actgccacct actattgtat tgtgggtcgtg	360
ctgactacta cacgggatta ctttgactat tggggacagg gagtgtgtgt gacagtgagt	420
tcagctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct	480
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg	540
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc	600
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag	660
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaaacacca aggtggacaa gaaagttgag	720
cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg	780
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctccgggacc	840
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	900
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac	960
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcgc gaaaaccatc	1080
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atccggggag	1140
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac	1200
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1380
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga	1416

<210> 42

<211> 471

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3_VH3_IgG1m (E333A) _aa

<400> 42

Met Leu Val Leu Gln Trp Val Leu Val Thr Ala Leu Phe Gln Gly Val
 1 5 10 15

His Cys Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Ile Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 35 40 45

Asn Ala Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Val Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ala Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys
 85 90 95

Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asp Ser Val Lys Thr Glu Asp Thr Ala
 100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ile Val Val Val Leu Thr Thr Thr Arg Asp Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Ala Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470
 <210> 43
 <211> 1407
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3_VH3_IgG4 (S228P)

<400> 43

atgctggtcc tgcagtgggt cctggtcacc gctctgtttc aggggggtcca ttgtgctgtg	60
cagctggtcg aatctggggg ggggctggtc cagcccggcg ggtctctgaa aatcacttgc	120
gccgctagtg ggttcacctt tacaaacgca gccatgtact ggggtccgaca ggctcctgga	180
aagggcctgg agtgggtggc acggatcaga acaaaggcta acaactacgc aacttactat	240
gccgactcag tgaagggcag gttcaccatt agccgcgacg atagcaaata cacagtctac	300
ctgcagatgg actctgtgaa gacagaagat actgccacct actattgtat tgtggtcgtg	360
ctgactacta cacgggatta ctttgactat tggggacagg gagtgtgtgt gacagtgagt	420
tcagctagca ccaaggggccc atcgggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc	480
gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg	540
tcgtggaact caggcggcct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc	600
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag	660
acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag	720
tccaaatatg gtcccccattg cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca	780
gtcttcctgt tcccccaaaa acccaaggac actctcatga tctcccgac ccctgaggtc	840
acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg	900
gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg	960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac	1020
aagtgcagg tctccaacaa aggcctcccg tcctccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	1080
aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc	1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg	1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1260
tccgacggct ccttcttcct ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag	1320
gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacacagaag	1380
agcctctccc tgtctccggg taaatga	1407

<210> 44

<211> 468

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3_VH3_IgG4 (S228P) _aa

<400> 44

Met Leu Val Leu Gln Trp Val Leu Val Thr Ala Leu Phe Gln Gly Val
 1 5 10 15

His Cys Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Ile Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 35 40 45

Asn Ala Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Val Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ala Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys
 85 90 95

Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asp Ser Val Lys Thr Glu Asp Thr Ala
 100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ile Val Val Val Leu Thr Thr Thr Arg Asp Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
 210 215 220
 Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240
 Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
 245 250 255
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285
 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 340 345 350
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 420 425 430
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460
 Ser Pro Gly Lys
 465
 <210> 45
 <211> 1404
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3_VH3_IgG2b

<400> 45

atgctgggtcc tgcagtgggt cctgggtcacc gctctgtttc aggggggtcca ttgtgctgtg	60
cagctgggtcg aatctggggg ggggctggtc cagccccggcg ggtctctgaa aatcacttgc	120
gccgctagtg ggttcacctt tacaacgca gccatgtact gggcccgaca ggctcctgga	180
aagggcctgg agtgggtggc acggatcaga acaaaggcta acaactacgc aacttactat	240
gccgactcag tgaagggcag gttcaccatt agccgcgacg atagcaaatc cacagtctac	300
ctgcagatgg actctgtgaa gacagaagat actgccacct actattgtat tgtggctctg	360
ctgactacta cacgggatta ctttgactat tggggacagg gagtgtgtgt gacagtgtgt	420
tcagctagca ccaagggccc atcgggtctc ccctgggcgc cctgtctccag gagcacctcc	480
gagagcacag cgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg	540
tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc	600
tcaggactct actccctcag cagcgtgtgt accgtgccct ccagcaactt cggcacccag	660
acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttgag	720
cgcaaagtgt gtgtcgagt cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc	780
ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg	840
tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac	900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc	960
cgtgtgggtca gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag	1020
tgcaaggtct ccaacaaaag cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaa	1080
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag	1140
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgcctggag	1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccat gctggactcc	1260
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	1320
aacgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1380
ctctccctgt ctccgggtaa atga	1404

<210> 46

<211> 467

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3_VH3_IgG2b_aa

<400> 46

MD/EP 3423496 T2 2020.01.31

64

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

195	200	205
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys		
210	215	220
Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu		
225	230	235
Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala		
	245	250
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
	260	265
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
	275	280
Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
290	295	300
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe		
305	310	315
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
	325	330
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile		
	340	345
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
	355	360
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
370	375	380
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
385	390	395
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
	405	410
Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
	420	425
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
	435	440
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
450	455	460

Pro Gly Lys

465

<210> 47

<211> 720

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3_VL4_CLkappa

<400> 47

```

atgaagttcc ctgctcagtt cctggggctg attgtcctgt gcattcctgg ggcaaccggc      60
gacatcgtgc tgacacagag tccctcctcc ctgccagtga cacctggaga gccagcatct      120
atcagttgcc gaagctccca ggacctgctg actgtcaagg gcattacctc actgtactgg      180
ttcctgcaga agcccgggca gagccctaaa ctgctgatct atcggatgtc taacagagac      240
agtggagtgc ccgataggtt ctcaggcagc gggtcggaa ccgactttac actgaaaatt      300
tctcgcgtgg aggctgaaga tgtcggcacc tactattgct cacagtttct ggagtatccc      360
cacacctttg gagcaggcac taagctggag ctgaagcgta cgggtggctgc accatctgtc      420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg      480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgcctccaa      540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      600
agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa      660
gtcacccatc agggcctgag ctgccccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag      720

```

<210> 48

<211> 239

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3_VL4_CLkappa_aa

<400> 48

```

Met Lys Phe Pro Ala Gln Phe Leu Gly Leu Ile Val Leu Cys Ile Pro
1           5           10           15

```

```

Gly Ala Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro
20           25           30

```

```

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asp
35           40           45

```

Leu Leu Thr Val Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Arg Asp
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr
100 105 110

Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 49

<211> 720

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3_VL3_Clkappa

<400> 49

atgaagtttc ctgctcagtt tctgggcctg attgtgctgt gtattcctgg cgctaccgga 60

gacatcgtcc tgactcagtc cccctcttcc ctgccagtga cacctggaga gccagcatct 120

atcagttgcc gaagctccca gtcactgctg actgtcaagg gaattaccag cctgtactgg 180

```

ttcctgcaga agcccgcca gtcccctaaa ctgctgatct atcggatgtc taacagagac      240
agtggggtgc ccgatagggt ctcaggcagc ggtccgaaa ccgactttac actgaaaatt      300
tctcgcgtgg aggctgaaga tgtcggaaac tactattgcg cacagtttct ggaataccct      360
cacactttcg gggcaggcac taagctggag ctgaagcgta cggtaggtgc accatctgtc      420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg      480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa      540
tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      600
agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa      660
gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag      720

```

<210> 50

<211> 239

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3_VL3_CLkappa_aa

<400> 50

```

Met Lys Phe Pro Ala Gln Phe Leu Gly Leu Ile Val Leu Cys Ile Pro
1           5           10           15

```

```

Gly Ala Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro
          20           25           30

```

```

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
          35           40           45

```

```

Leu Leu Thr Val Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys
50           55           60

```

```

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Arg Asp
65           70           75           80

```

```

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe
          85           90           95

```

```

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr
          100          105          110

```

```

Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
          115          120          125

```

```

Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

```

130	135	140
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu		
145	150	155 160
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp		
	165	170 175
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp		
	180	185 190
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys		
	195	200 205
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln		
210	215	220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	235

<210> 51
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Effi3_VL4_Cllambda
 <400> 51

atgaagttcc ctgctcagtt cctggggctg attgtcctgt gcattcctgg ggcaaccggc	60
gacatcgtgc tgacacagag tccctcctcc ctgccagtga cacctggaga gccagcatct	120
atcagttgcc gaagctccca ggacctgctg actgtcaagg gcattacctc actgtactgg	180
ttcctgcaga agcccgggca gagccctaaa ctgctgatct atcggatgtc taacagagac	240
agtggagtgc ccgataggtt ctcaggcagc gggtcgggaa ccgactttac actgaaaatt	300
tctcgcgtgg aggctgaaga tgtcggcacc tactattgcg cacagtttct ggagtatccc	360
cacacctttg gagcaggcac taagctggag ctgaagcgtg gtcagcccaa ggctgcccc	420
tcggtcactc tgttcccgcc ctctctgag gagcttcaag ccaacaaggc cactgtgtg	480
tgtctcataa gtgacttcta cccgggagcc gtgacagtgg cctggaaggc agatagcagc	540
cccgtaagg cgggagtga gaccaccaca ccctccaaac aaagcaacaa caagtacgcg	600
gccagcagct atctgagcct gacgcctgag cagtgggaagt cccacagaag ctacagctgc	660
caggtcacgc atgaaggag caccgtggag aagacagtgg cccctacaga atgttcatag	720

<210> 52
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Effi3_VL4_Cllambda_aa
 <400> 52

MD/EP 3423496 T2 2020.01.31

70

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

<210> 53
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Effi3_VL3_Cllambda
 <400> 53

```

atgaagtttc ctgctcagtt tctgggcctg attgtgctgt gtattcctgg cgctaccgga      60
gacatcgtcc tgactcagtc cccctcttcc ctgccagtga cacctggaga gccagcatct      120
atcagttgcc gaagctccca gtcactgctg actgtcaagg gaattaccag cctgtactgg      180
ttcctgcaga agcccggcca gtcccctaaa ctgctgatct atcggatgtc taacagagac      240
agtggggtgc ccgatagggt ctcaggcagc gggtcgaaa ccgactttac actgaaaatt      300
tctcgcgtgg aggctgaaga tgtcggaaac tactattgct cacagtttct ggaataccct      360
cacactttcg gggcaggcac taagctggag ctgaagcgtg gtcagcccaa ggctgcccc      420
tcggtcactc tgttcccgcc ctctctgag gagcttcaag ccaacaaggc cacactggtg      480
tgtctcataa gtgacttcta cccgggagcc gtgacagtgg cctggaaggc agatagcagc      540
cccgtaagg cgggagtgga gaccaccaca ccctccaaac aaagcaacaa caagtacgcg      600
gccagcagct atctgagcct gacgcctgag cagtgggaagt cccacagaag ctacagctgc      660
caggtcacgc atgaaggag caccgtggag aagacagtgg cccctacaga atgttcatag      720

```

<210> 54

<211> 239

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Effi3_VL3_CLlambda_aa

<400> 54

```

Met Lys Phe Pro Ala Gln Phe Leu Gly Leu Ile Val Leu Cys Ile Pro
 1              5              10              15

```

```

Gly Ala Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro
      20              25              30

```

```

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
      35              40              45

```

```

Leu Leu Thr Val Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys
      50              55              60

```

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Arg Asp
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr
100 105 110

Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Leu Lys Arg Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu
130 135 140

Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val
145 150 155 160

Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys
165 170 175

Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser
180 185 190

Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr
195 200 205

Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His
210 215 220

Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 55

<211> 27

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> peptidă CD127

<400> 55

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

Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu
20 25

<210> 56

<211> 123

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> MD707-3 VH

<400> 56

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ala Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Met
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asp Asn Val Lys Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ile Val Val Val Leu Thr Thr Thr Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 57

<211> 113

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> MD707-3 VL

<400> 57

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

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Thr Val
20 25 30

Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Lys Val Glu Thr Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Arg

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT1

<400> 58

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

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT2

<400> 59

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

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT3

<400> 60

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

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT4

<400> 61

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

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT5

<400> 62

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

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT6

<400> 63

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

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT7

<400> 64

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

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT8

<400> 65

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

<210> 66

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT9

<400> 66

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

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT10

<400> 67

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

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT11

<400> 68

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

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT12

<400> 69

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

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT13

<400> 70

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

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT14

<400> 71

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

<210> 72

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT15

<400> 72

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

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT16

<400> 73

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

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT17

<400> 74

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

<210> 75

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT18

<400> 75

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

<210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT19

<400> 76

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

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT20

<400> 77

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

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT21

<400> 78

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

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT22

<400> 79

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

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT23

<400> 80

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

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT24

<400> 81

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

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT25

<400> 82

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

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT26

<400> 83

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

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT27

<400> 84

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

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT28

<400> 85

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

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT29

<400> 86

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

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT30

<400> 87

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

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT31

<400> 88

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

<210> 89

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT32

<400> 89

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

<210> 90

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT33

<400> 90

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

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT34

<400> 91

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

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT35

<400> 92

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

<210> 93

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT36

<400> 93

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

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT37

<400> 94

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

<210> 95

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT38

<400> 95

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

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT39

<400> 96

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

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT40

<400> 97

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

<210> 98

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT41

<400> 98

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

<210> 99

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT42

<400> 99

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

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT43

<400> 100

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

<210> 101

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT44

<400> 101

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

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT45

<400> 102

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

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT46

<400> 103

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

<210> 104

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT47

<400> 104

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

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT48

<400> 105

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

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT49

<400> 106

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

<210> 107

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT50

<400> 107

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

<210> 108

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT51

<400> 108

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

<210> 109

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PEPT52

<400> 109

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

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-2013/056984

(57) Revendicări:

1. Anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia, care cuprinde următoarele CDR-uri:

- VH-CDR1 a cărui secvență de aminoacizi este Effi3-VH3-CDR1 din SECV ID NR.: 14;
- VH-CDR2 a cărui secvență de aminoacizi este Effi3-VH3-CDR2 din SECV ID NR.: 16;
- VH-CDR3 a cărui secvență de aminoacizi este Effi3-VH3-CDR3 din SECV ID NR.: 18;
- VL-CDR2 a cărui secvență de aminoacizi este Effi3-VL3-CDR2 din SECV ID Nr.: 22;
- VL-CDR3 a cărui secvență de aminoacizi este Effi3-VL3-CDR3 din SECV ID NR.: 24; și
- VL-CDR1 a cărui secvență de aminoacizi este Effi3-VL3-CDR1 din SECV ID NR.: 20

sau a cărei secvență de aminoacizi este Effi3-VL4-CDR1 din SECV ID NR.: 26,

în care anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia se leagă în mod specific la domeniul extracelular al CD127 uman și nu este un antagonist al CD127.

2. Anticorp sau fragment conform revendicării 1, care are una sau mai multe dintre următoarele caracteristici:

- respectivul anticorp sau fragment nu inhibă fosforilarea indusă de IL-7 umană a STAT5 în celulele care exprimă IL7-R;
- respectivul anticorp sau fragment nu inhibă secreția stimulată de TSLP umană a TARC în celulele care exprimă TSLP-R;
- respectivul anticorp sau fragment nu este un agonist al CD127 uman;
- respectivul anticorp sau fragment nu crește fosforilarea indusă de IL-7 umană a STAT5 în celulele care exprimă IL7-R;
- respectivul anticorp sau fragment nu crește secreția stimulată de TSLP umană a TARC în celulele care exprimă TSLP-R.

3. Anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia conform revendicării 1 sau 2, în care respectivul anticorp sau fragment de legare la antigen a acestuia cuprinde un lanț greu și un lanț ușor în care:

- lanțul greu cuprinde VH-CDR1 din secvența SECV ID Nr.: 14, VH-CDR2 din secvența SECV ID Nr.: 16, VH-CDR3 din secvența SECV ID Nr.: 18 și
- lanțul ușor cuprinde VL-CDR1 din secvența SECV ID Nr.: 20 sau 26, VL-CDR2 din secvența SECV ID Nr.: 22, VL-CDR3 din secvența SECV ID NR.: 24.

4. Anticorp sau fragment de legare la antigen a acestuia conform revendicării 3, în care lanțul greu și/sau lanțul ușor cuprind în fragmentele lor cadru unul sau mai multe din următoarele resturi de aminoacizi și în special toate resturile de aminoacizi care urmează în pozițiile identificate cu referire la numerotarea Kabat:

- în secvența VH: în poziția 3 un rest Q, în poziția 15 un rest G, în poziția 16 un rest G, în poziția 21 un rest T, în poziția 80 un rest T, în poziția 87 un rest S, în poziția 91 un rest E, în poziția 95 un rest T, în poziția 118 un rest L, și/sau
- în secvența VL: în poziția 7 un rest S, în poziția 9 un rest S, în poziția 11 un rest L, în poziția 12 un rest P, în poziția 18 un rest P, în poziția 47 un rest Q, în poziția 50 un rest K, în poziția 68 un rest S, în poziția 73 un rest G sau un rest E, de preferință un rest E, în poziția 82 un rest R, în poziția 85 un rest A, în poziția 90 un rest T.

5. Anticorp sau fragment de legare la antigen a acestuia conform revendicării 3 sau 4 care cuprinde:

- (i) un lanț greu și un lanț ușor în care lanțul ușor cuprinde VL4-CDR1 din SECV ID NR.: 26 și are un rest de aminoacid în poziția 73 care este un rest G sau
- (ii) un lanț greu și un lanț ușor în care lanțul ușor cuprinde VL3-CDR1 din SECV ID NR.: 20 și are un rest de aminoacid în poziția 73 care este un rest E.

6. Anticorp sau fragment de legare la antigen a acestuia conform revendicării 4 în care lanțul greu și/sau lanțul ușor cuprind în fragmentele lor cadru toate următoarele resturi de aminoacizi:

- în secvența VH: în poziția 3 un rest Q, în poziția 15 un rest G, în poziția 16 un rest G, în poziția 21 un rest T, în poziția 80 un rest T, în poziția 87 un rest S, în poziția 91 un rest E, în poziția 95 un rest T, în poziția 118 un rest L, și/sau

- în secvența VL: în poziția 7 un rest S, în poziția 9 un rest S, în poziția 11 un rest L, în poziția 12 un rest P, în poziția 18 un rest P, în poziția 47 un rest Q, în poziția 50 un rest K, în poziția 68 un rest S, în poziția 73 un rest E, în poziția 82 un rest R, în poziția 85 un rest A, în poziția 90 un rest T.

7. Anticorp sau fragment de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 la 4, care cuprinde sau constă din:

- un lanț greu care cuprinde sau constă din secvența de Effi3-VH3 a cărei secvență de aminoacizi este secvența SECV ID Nr.: 2; și

- un lanț ușor cuprinzând sau constând din secvența Effi3-VL3 a cărei secvență de aminoacizi este secvența SECV ID Nr.: 4 sau secvența Effi3-VL4 a cărei secvență de aminoacizi este secvența SECV ID Nr.: 6.

8. Anticorp sau fragment de legare la antigen acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 7, care are activitate citotoxică, în special activitate ADCC, pe celule CD127-pozitive, în special pe celule CD127-pozitive umane și opțional ulterior la legarea respectivului anticorp sau fragment de legare la antigen a acestuia la CD127 recrutează celule imune efectoare care exprimă receptori Fc, respectiva recrutare fiind dependentă de Fc.

9. Fragment de legare la antigen al unui anticorp conform oricăreia dintre revendicările 1 la 8 care este unul din următoarele fragmente:

- fragmentul Fv constă din lanțurile VL și VH asociate împreună prin interacțiuni hidrofobe;

- fragmentul dsFv în care heterodimerul VH:VL este stabilizat printr-o legătură disulfurică;

- fragmentul scFv în care lanțurile VL și VH sunt conectate unul cu celălalt printr-un linker peptidic flexibil, formând astfel o proteină cu lanț unic;

- fragmentul Fab care este un fragment monomer cuprinzând întregul lanț L și un fragment VH-CH1 al lanțului H legat împreună printr-o legătură disulfidică;

- fragment Fab';

- fragmentul F(ab')₂ care cuprinde două fragmente Fab' și, suplimentar, o porțiune a regiunii balama a unui anticorp.

10. Anticorp sau un fragment de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 la 9 care recunoaște o polipeptidă constând din sau cuprinzând epitopul cu secvența SECV ID Nr.: 55 și opțional este crescută față de respectiva polipeptidă.

11. Anticorp conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 10, în care respectivul anticorp este un anticorp monoclonal umanizat, care cuprinde sau constă din:

- un lanț greu cuprinzând regiunea constantă a IgG1m-E333A a cărei secvență de aminoacizi este secvența din SECV ID NR.: 28, în particular un lanț greu de Effi3-VH3-IgG1m-E333A, secvența de aminoacid care este secvența din SECV ID Nr.: 42 și

- un lanț ușor cuprinzând regiunea constantă a CLkappa a cărei secvență de aminoacizi este secvența din SECV ID NR.: 34, în particular un lanț ușor de Effi3-VL3-CLkappa, a cărui secvență de aminoacizi este secvența SECV ID Nr.: 50 sau a Effi3-VL4-CLkappa a cărei secvență de aminoacizi este secvența din SECV ID NR.: 48.

12. Anticorp conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 11, în care respectivul anticorp este un anticorp monoclonal umanizat, care cuprinde sau constă din:

- un lanț greu cuprinzând regiunea constantă a IgG4m-S228P a cărei secvență de aminoacizi este secvența din SECV ID NR.: 30 sau regiunea constantă a IgG2b a cărei secvență de aminoacizi este secvența SECV ID Nr.: 32 și

- un lanț ușor cuprinzând regiunea constantă a CLkappa a cărei secvență de aminoacizi este secvența din SECV ID NR.: 34 sau secvența constantă a CLlambda a cărei secvență de aminoacizi este secvența SECV ID Nr.: 36.

13. Moleculă himerică cuprinzând un anticorp sau un fragment al acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 12, care este o moleculă complexă având o multitudine de domenii funcționale care, în mod colectiv, asigură funcții de recunoaștere, legare, ancorare,

semnalizare la respectiva moleculă, molecula complexă fiind un receptor de antigen himeric (CAR) cuprinzând:

- (i) un ectodomeniu care este un fragment scFv al respectivului anticorp sau fragment de legare la antigen conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 12,
- (ii) un domeniu transmembranar pentru ancorarea într-o membrană celulară;
- (iii) un endodomeniu care cuprinde cel puțin un domeniu de semnalizare intracelular,
- (i), (ii) și (iii) fiind una sau mai multe molecule recombinante asociate, în particular una sau mai multe proteine de fuziune.

14. Receptor antigen himeric conform revendicării 13, care cuprinde cel puțin 2, în mod avantajos cel puțin 3 domenii de semnalizare în care domeniile de semnalizare permit în mod colectiv cel puțin una dintre următoarele proprietăți:

- inițierea activării celulelor T, așa cum este furnizată de domeniul citoplasmatic CD3ζ
- citotoxicitatea mediată de celulă T,
- amplificarea semnalului de activare a celulei T sau costimularea semnalului menționat, cum ar fi furnizat de elemente costimulatorii derivate de la receptori cum ar fi 4-1BB, CD28 sau ICOS sau OX40.

15. Polinucleotidă, în particular polinucleotidă izolată, care codifică un anticorp sau un fragment de legare la antigen conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 12, în particular un vector cuprinzând ca inserție o polinucleotidă care codifică un anticorp sau un fragment de legare la antigen conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 12.

16. Polinucleotidă conform revendicării 15, cuprinzând secvențele din SECV ID NR.: 13, 15, 17, 19, 21 și 23 sau secvențele din SECV ID NR.: 13, 15, 17, 25, 21 și 23, în special cuprinzând secvențele de SECV ID NR.: 1 și 3 sau secvențele din SECV ID NR.: 1 și 5, în special cuprinzând secvențele din SECV ID NR.: 41 și 47 sau secvențele din SECV ID NR.: 41 și 49.

17. Celula cuprinzând un anticorp sau un fragment de legare la antigen conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 12 sau o moleculă himerică conform revendicării 13 sau un receptor antigen himeric conform revendicării 14 sau o polinucleotidă conform revendicării 15 sau 16, în special o celulă T.

18. Metodă de preparare a receptorului antigenic himeric (CAR) care cuprinde etapele de:

- a. furnizarea unei polinucleotide care codifică un anticorp sau un fragment de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 12, în particular un fragment scFv,
- b. recombinarea numitei polinucleotide de la punctul a) la capătul său C-terminal cu polinucleotide care codifică un domeniu transmembranar de la capătul N- la C-terminal și cel puțin unul, în special două domenii de semnalizare intracelulare adecvate pentru a furniza semnalul(ele) de stimulare la o celulă, în particular la o celulă T, mai particular o celulă T umană,
- c. exprimarea moleculei recombinante obținută în b) într-o celulă, în special într-o celulă T, mai precis o celulă T umană,
- d. selectarea receptorului de antigen himeric produs pentru proprietățile sale după contactarea acestuia cu o celulă care exprimă CD127 uman.

19. Compoziție farmaceutică care cuprinde ca ingredient activ un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 12, o moleculă himerică conform revendicării 13, un receptor antigen himeric conform revendicării 14, o celulă conform revendicării 17 sau o polinucleotidă conform revendicării 15 sau 16.

20. Metodă terapeutică combinată, în particular un produs combinat, cuprinzând ca ingrediente activi:

- un anticorp sau un fragment de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 12, o moleculă himerică conform revendicării 13, un receptor antigen himeric conform revendicării 14, o celulă conform revendicării 17 sau o polinucleotidă conform revendicării 15 sau 16 și,
- cel puțin un alt agent terapeutic selectat din grupul de agenți chimioterapeutici, agenți radioterapeutici, agenți chirurgicali, agenți imunoterapeutici, probiotice și antibiotice,
- în care ingredientele active menționate sunt formulate pentru terapie separată, simultană sau combinată, în special pentru utilizare combinată sau secvențială.

21. Mijloace terapeutice combinate conform revendicării 20 care sunt adecvate pentru administrarea la un pacient uman care are nevoie de aceasta și care conține ca ingrediente activi: (i) anticorp sau un fragment de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 12, o moleculă himerică conform revendicării 13, un receptor antigen himeric conform revendicării 14, o celulă conform revendicării 17 sau o polinucleotidă conform revendicării 15 sau 16 și (ii) un agent imunoterapeutic suplimentar, în particular un agent imunoterapeutic care implică celule T, cum ar fi o celulă T care poartă o moleculă CAR definită în revendicarea 13 sau 14 sau o moleculă CAR care țintește un receptor celular sau un antigen cum ar fi CD19, CD20 CD52 sau Her2.

22. Anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 12, o moleculă himerică conform revendicării 13, un receptor de antigen himeric conform revendicării 14, o celulă conform revendicării 17 sau o polinucleotidă conform revendicării 15 sau 16, pentru utilizare ca medicament.

23. Anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 12, o moleculă himerică conform revendicării 13, un receptor antigen himeric conform revendicării 14, o polinucleotidă conform revendicării 15 sau 16, o celulă conform revendicării 17, o compoziție farmaceutică conform revendicării 19 sau mijloace terapeutice combinate conform revendicării 20 sau 21, pentru utilizare în tratamentul cancerului, în special a cancerului asociat cu celula CD127+, în particular a cancerului asociat cu proliferarea celulelor CD127 pozitive și/sau cu o infiltrare a celulelor pozitive CD127.

24. Anticorp sau un fragment de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 12, o moleculă himerică conform revendicării 13, un receptor antigen himeric conform revendicării 14, o polinucleotidă conform revendicării 15 sau 16 sau o celulă conform revendicării 17 pentru utilizare conform revendicării 23 în tratamentul cancerului selectat în grupul de cancer mamar, cancer renal, cancer de vezică, cancer pulmonar, cancer pancreatic sau pentru tratamentul unui limfom cutanat de tip T, cum ar fi limfomul Sezary sau pentru tratamentul leucemiei acute limfoblastoide cu mutație de creștere a căii IL7-R/TSRP și mezoteliom.

25. Metodă de producere a unui anticorp conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 12 cuprinzând imunizarea unui animal non-uman, în special un mamifer non-uman, împotriva unei polipeptide constând din epitopul cu secvența din SECV ID NR.: 55 și în special colectarea serului rezultat din animalul non-uman imunizat menționat pentru a obține anticorpi îndreptați împotriva respectivei polipeptide,

în care metoda cuprinde suplimentar etapa de selectare a unui anticorp care se leagă în mod specific la domeniul extracelular al CD127 și care prezintă cel puțin una dintre următoarele proprietăți:

- nu este un antagonist al CD127 și nu inhibă fosforilarea indusă de IL-7 a STAT5 în celulele care exprimă IL7-R și/sau,
- nu inhibă secreția stimulată de TSLP de TARC în celulele care exprimă TSLP-R și/sau,
- nu crește fosforilarea indusă de IL-7 a STAT5 în celulele care exprimă IL7-R și/sau,
- nu crește secreția stimulată de TSLP a TARC în celulele care exprimă TSLP-R.

26. Metodă conform revendicării 25, în care anticorpul are următoarele proprietăți:

- se leagă în mod specific la domeniul extracelular al CD127 și
- nu este un antagonist al CD127 și
- nu inhibă fosforilarea indusă de IL-7 a STAT5 în celulele care exprimă IL7-R și
- nu inhibă secreția stimulată de TSLP a TARC în celulele care exprimă TSLP-R și
- nu este un agonist al CD127 și,
- nu crește fosforilarea indusă de IL-7 a STAT5 în celulele care exprimă IL7-R și
- nu crește secreția stimulată de TSLP a TARC în celulele care exprimă TSLP-R.

27. Metodă de diagnosticare *in vitro* sau *ex vivo*, în special o metodă de diagnosticare adecvată pentru utilizare în medicina personalizată, în special într-un diagnostic însoțitor, în care un anticorp anti-CD127 sau un fragment de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 12 sau o moleculă himerică conform revendicării 13 sau un receptor antigen himeric conform revendicării 14, este utilizat pentru detectarea celulelor CD127+ într-o probă obținută anterior de la un subiect și opțional pentru cuantificarea expresiei CD127.

28. Utilizarea unui anticorp anti-CD127 sau a unui fragment de legare la antigen acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-12 sau a unei molecule himerice conform revendicării 13 sau a unui receptor antigen himeric conform revendicării 14, pentru fabricarea unui medicament adecvat pentru utilizare într-un test de diagnosticare, în particular pentru utilizarea în medicina personalizată sau într-un test de diagnostic însoțitor.

29. Metodă de determinarea *in vitro* sau *ex vivo* a prezenței celulelor CD127 + într-o probă obținută anterior de la un subiect care cuprinde determinarea prezenței CD127 ca biomarker care este predictivă pentru răspunsul unui subiect la un tratament, în particular un răspuns al unui subiect diagnosticat cu un cancer în care metoda menționată cuprinde:

- determinarea nivelului de exprimare a CD127 într-o probă tumorală a unui subiect folosind anticorp anti-CD127 sau fragment de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 12 sau moleculă himeră conform revendicării 13 sau un receptor antigen himeric conform revendicării 14, și

- compararea nivelului de expresie al CD127 cu o valoare reprezentativă pentru un nivel de expresie al CD127 într-o populație de subiecți care nu răspunde,

în care un nivel de exprimare mai ridicat al CD127 în proba tumorală a subiectului este indicativ pentru un subiect care va răspunde la tratament.

Figura 1

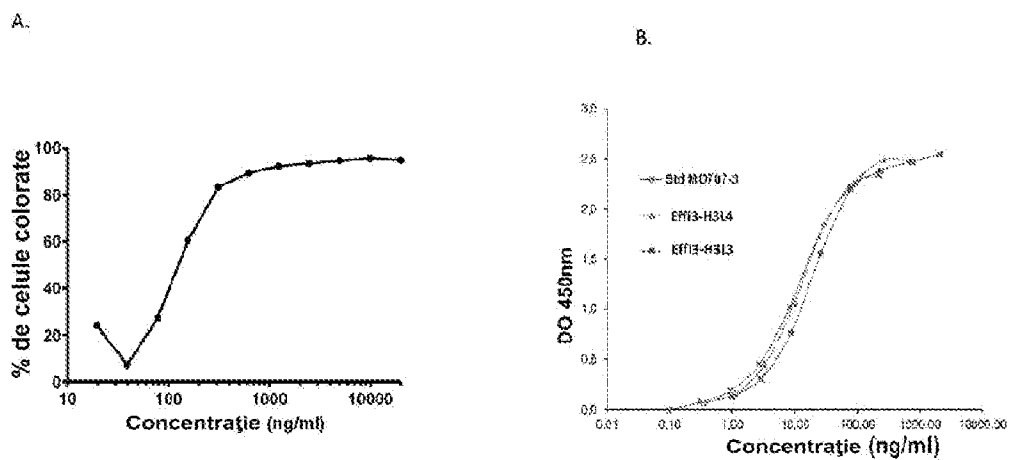


Figura 2

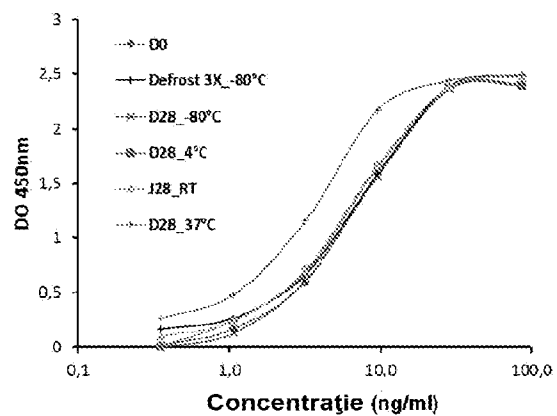


Figura 3

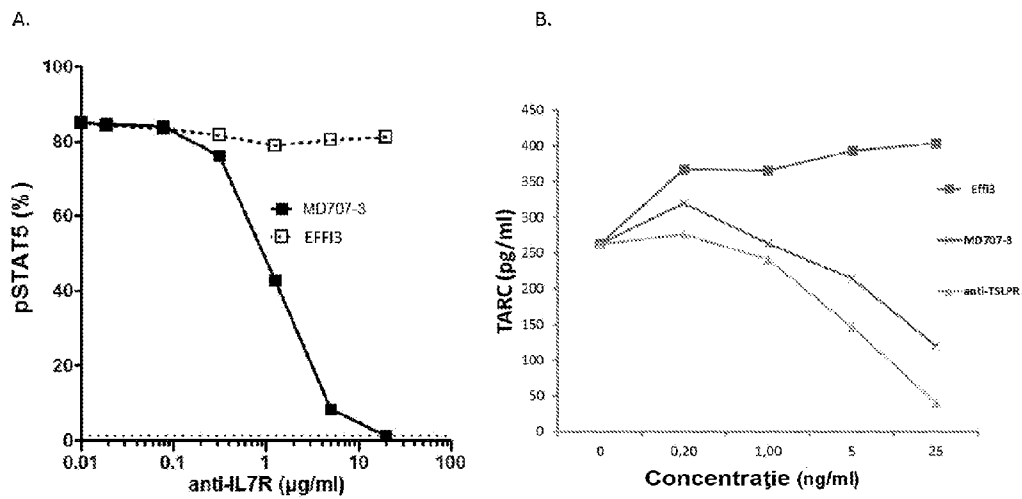


Figura 4

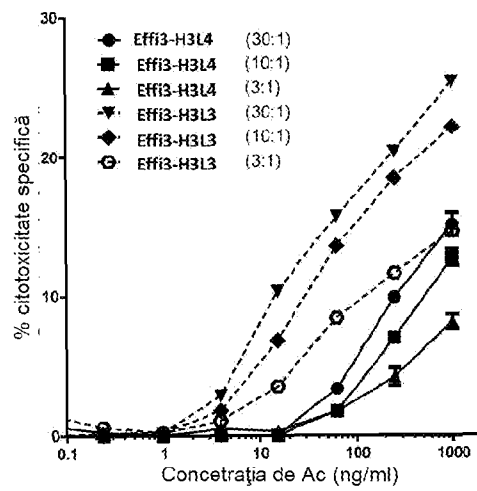


Figura 5

ESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLEVNGSQHSLTCAFEDPDVNTTNLEFE
 ICGALVEVKCLNFRKLQEIYFIETKKFLLIGKSNICVKVGEKSLTCKKIDLTITVKPE
 APFDLSVIYREGANDFVVTFNNTSHLQKKYVKVLMHDVAYRQEKDENKWTHTV
 NLSSTKLTLQRLQPAAMYKVRSDHYFKGFWEWSPSYFRTPEINNSS
 GEMD

Figura 6

MLVLQWVLVTALFQGVHCAVQLVESGGGLVQPGGSLKITCAASGFTTNAAMYWVRQAPGKGLEWVARIIITK
ANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKSTVYLQMDSVKTEDTATYYCIVVLTITTRDYFDYWGQGVLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNATKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAIAPAIKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 7

MKPPAQFLGLVLCIPGATGDIILTCSPSSLPVTPGEPASISCRSSQDLTVKGTSLYWFLOKPGQSPKLLIYRMSN
RDSGVDPDRFSGSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGTYYCAQFLFYPHIFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFDPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKAQDYEKIKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC