

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035351**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.01

(21) Номер заявки
201790293

(22) Дата подачи заявки
2012.03.29

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННЫЕ ПРОТИВ ICOS, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **11305380.5**

(32) **2011.03.31**

(33) **EP**

(43) **2017.10.31**

(62) **201391326; 2012.03.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ИНСЭРМ (ИНСТИТУТ
НАСИОНАЛЬ ДЕ ЛЯ САНТЭ Э
ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ МЕДИКАЛЬ);
ИНСТИТУТ ЖАН ПАОЛИ Э ИРЕН
КАЛМЕТТ; УНИВЕРСИТЕ Д'ЭКС-
МАРСЕЛЬ; УНИВЕРСИТЕ КЛОД
БЕРНАР-ЛИОН 1; СЕНТР ЛЕОН
БЕРАР (FR)**

(72) Изобретатель:

**Фаге Жюльен, Ку Кристоф, Менетрие-
Ку Кристин, Нун Жак, Олив Даниель
(FR)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В. (RU)**

(56) **RU-C2-2203682**

RUTITZKY Laura I. et al. Disruption of the ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway leads to enhanced hepatic immunopathology and increased gamma interferon production by CD4 T cells in murine schistosomiasis. *Infection and Immunity*, July, 2003, Vol. 71, No. 7, p. 4040-4044

MESTURINI Riccardo et al. ICOS cooperates with CD28, IL-2, and IFN-γ and modulates activation of human naive CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2006, 36: 2601-2612

MATSUMOTO Isao et al. Therapeutic effects of antibodies to tumor necrosis factor-α, interleukin-6 and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 immunoglobulin in mice with glucose-6-phosphate isomerase induced arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 2008, 10:R66 (doi:10.1186/ar2437), pp. 1-8

(57) В изобретении предложены антитела, направленные против ICOS (индуцируемый Т-клеточный коstimулятор), и применение указанных антител для лечения заболевания, выбранного из аутоиммунного заболевания, реакции отторжения трансплантата или заболевания "трансплантат против хозяина", а также воспалительного расстройства.

B1**035351****035351****B1**

Область изобретения

Изобретение относится к антителам, направленным против ICOS (индуцируемый Т-клеточный ко-стимулятор), и их применениям.

Предшествующий уровень техники

При некоторых формах рака возникновение иммуносупрессорного Т-клеточного ответа коррелирует с неблагоприятным прогнозом и прогрессом заболевания.

Среди различных клеточных эффекторов, вовлеченных в формирование иммунной толерантности, подгруппа CD4⁺ регуляторных Т лимфоцитов (Treg) специализируется на подавлении других Т-клеток (Tconv), а также функций дендритных клеток. Указанное подавление может коррелировать с плохим уровнем выживаемости пациента, страдающего от рака, в частности от рака молочной железы.

Продemonстрировано, что большие количества IL-10 (интерлейкин 10) и низкие количества IFN γ (интерферон γ), продуцированного CD4⁺ Т-клетками, ассоциируются с уменьшенной цитотоксической способностью CD8⁺ Т-клеток, меньшей пролиферацией Т-клеток и участвует в дифференцировке моноцитов в иммуносупрессорные макрофаги типа M2c, родственные опухоли-ассоциированным макрофагам (TAM).

Авторы изобретения ранее сообщали о том, что CD3⁺CD4⁺ Т-клетки памяти, в состав которых входят большие количества Treg (Ta-Treg), инфильтрировывались в первичные опухоли молочной железы. Инфильтрация в первичную опухоль молочной железы Ta-Treg и плазмодендритных DC (pDC) ассоциируются с неблагоприятным прогнозом и плохим выживанием пациента, страдающего от опухоли молочной железы.

Авторы изобретения также подтвердили, что иммуносупрессорные механизмы, вовлекающие Treg, обнаружены при большинстве форм рака и хронических инфекций. Эти подавляющие механизмы предотвращают эффективный иммунный ответ против рака и хронической вирусной инфекции.

В настоящее время Treg выступает в качестве мишени при формах рака и хронических инфекциях при использовании клеточной терапии, mAb (моноклональные антитела) против CD25 или низких доз химиотерапии. Однако указанные стратегии не позволяют добиться приемлемых результатов.

Кроме того, сообщалось о том, что Treg может играть важную роль в заболеваниях, ассоциированных с чрезмерным иммунным ответом или индуцированных им.

Однако в настоящее время отсутствует доступная и эффективная стратегия для лечения Treg-ассоциированных заболеваний. Таким образом, существует значительная потребность в том, чтобы предложить эффективные терапевтические стратегии, направленные против заболеваний, вовлекающих Treg.

Краткое изложение сущности изобретения

Неожиданно авторы изобретения продемонстрировали, что взаимодействие между ICOS и его лигандом играет центральную роль в активации, пролиферации и подавляющей функции Treg при некоторых формах рака путем взаимодействия с плазмодендритными дендритными клетками (pDC). Тогда авторы изобретения сконцентрировали свои усилия на продуцировании специфических антител, обладающих антагонистическими и агонистическими эффектами.

Антагонистические антитела эффективны для лечения заболевания или состояния, ассоциирующегося с Treg-опосредованным подавлением иммунного ответа. Агонистические антитела эффективны для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с чрезмерным иммунным ответом или индуцированного им.

Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу, направленному против ICOS, выбранному из антител Icos 53-3, Icos 88-2 и Icos 92-17, получаемых, соответственно, из гибридом CNCM I-4176, CNCM I-4177 и CNCM I-4178.

В одном воплощении заявленное антитело имеет следующие 6 CDR:

	Аминокислотная последовательность
H-CDR1	GYSFTSYWIN (SEQ ID NO:23)
H-CDR2	NIYPSDSYTNYNQMFKD (SEQ ID NO:24)
H-CDR3	WNLSYYFDNNYYLDY (SEQ ID NO:25)
L-CDR1	RSSKSLLSHNGNTYLY (SEQ ID NO :26)
L-CDR2	RMSNLAS (SEQ ID NO :27)
L-CDR3	MQHLEYPWT (SEQ ID NO :28)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие указанные 6 CDR, являются следующими:

	Последовательность ДНК
H-CDR1	GGCTACAGTTTCACCAGCTACTGGATAAAC (SEQ ID NO:17)
H-CDR2	AATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAATCAAATGTTCAAGG AC (SEQ ID NO:18)
H-CDR3	TGGAATCTTTCTTATTACTTCGATAATACTACTACTTGGACTAC (SEQ ID NO:19)
L-CDR1	AGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT (SEQ ID NO:20)
L-CDR2	CGGATGTCCAACCTTGCCTCA (SEQ ID NO:21)
L-CDR3	ATGCAACATCTAGAATATCCGTGGACG (SEQ ID NO:22)

Настоящее изобретение также относится к применению указанного антитела для лечения заболевания, выбранного из аутоиммунного заболевания, реакции отторжения трансплантата или заболевания "трансплантат против хозяина".

Настоящее изобретение также относится к применению указанного антитела для лечения воспалительного расстройства.

В одном воплощении указанное воспалительное расстройство выбрано из группы, состоящей из воспалительного расстройства нервной системы, воспалительного заболевания слизистой оболочки, воспалительного заболевания кожи и аутоиммунного артрита.

В еще одном воплощении указанное воспалительное расстройство выбрано из рассеянного склероза, воспалительного заболевания кишечника, астмы или тонзиллита, дерматита, псориаза, контактной гиперчувствительности и ревматоидного артрита.

В контексте настоящего изобретения указанное антитело также может быть названо "антагонистическим антителом".

Подробное описание изобретения

Определения.

Использованные здесь термины "ICOS" или "индуцируемый Т-клеточный костимулятор" относятся к трансмембранному гомодимерному гликопротеину массой от 55 до 60 кДа, который представляет домен типа IgV в своей внеклеточной части и тирозин в мотиве YMFM в своей цитоплазматической части. Показано, что контактирование ICOS со своим лигандом вызывает фосфорилирование тирозина в цитоплазматической части ICOS. Указанное фосфорилирование ответственно за рекрутинг регуляторной субъединицы p85 PI3K, которая активирует сигнальный путь PI3K/AKT.

Также описано, что контактирование ICOS вызывает экспрессию CD40L на клеточной поверхности. Известно, что CD40L обладает важным действием в кооперации между Т лимфоцитами и В лимфоцитами.

Обнаружено, что ICOS экспрессируется вслед за активацией TCR на обычных Т-клетках (подгруппы Tconv CD4⁺, CD8⁺), а также на Treg. Авторы изобретения продемонстрировали, что указанная активация более важна у пациентов, страдающих от меланомы или рака молочной железы.

Использованные здесь термины "ICOSL", "ICOS-L" и "B7-H2" относятся к лиганду ICOS. Указанный лиганд представлен на лимфоидных клетках, таких как В лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки, а также на нелимфоидных клетках, таких как эндотелиальные или эпителиальные клетки. Контактирование ICOS играет важную роль в активации лимфоцитов и вызывает пролиферацию и выживание Т лимфоцитов, в особенности Treg.

Использованный здесь термин "ICOS 1" относится к специфической клеточной линии, экспрессирующей ICOS.

Использованный здесь термин "моноклональное антитело" в своих различных грамматических формах относится к популяции антител, которая содержит только один вид антигенсвязывающего активного центра антитела, способного к иммунной реакции с конкретным эпитопом. Таким образом, моноклональное антитело, как правило, проявляет сродство к тем эпитопам, с которыми оно вступает в иммунную реакцию. Следовательно, моноклональное антитело может содержать молекулу антитела, имеющую множество антигенсвязывающих активных центров антитела, каждый из которых обладает иммуноспецифичностью к различным эпитопам, например биспецифическое моноклональное антитело. Хотя исторически моноклональное антитело продуцируют путем иммортализации клонально чистой секретирующей иммуноглобулины клеточной линии, моноклонально чистая популяция молекул антител также может быть получена способами по настоящему изобретению. Лабораторные способы получения моноклональных антител хорошо известны в области техники (см., например, Harlow et al., 1988). Моноклональные антитела (mAb) могут быть получены путем иммунизации очищенного мутантного TXAS (тромбоксан синтаза) у млекопитающего, например мыши, крысы, человека и похожего млекопитающего. Продуцирующие антитела клетки иммунизированного млекопитающего выделяют и сливают с клетками миеломы или гетеромиеломы клеток с получением гибридных клеток (гибридома). Клетки гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, используют в качестве источника желаемого моноклонального антитела. Этот стандартный способ выращивания гибридомы описан в Kohler and Milstein (1975). Хотя mAb могут быть продуцированы культурой гибридомы, изобретение не ограничивается использованием гибридомы. Также охвачено применение mAb, продуцируемых путем экспрессии нуклеи-

новой кислоты, клонированной из гибридомы по настоящему изобретению. То есть нуклеиновая кислота, экспрессирующая молекулы, секретируемые гибридомой по настоящему изобретению, может быть трансфицирована в другую клеточную линию с получением трансформантов. Трансформант генотипически отличается от исходной гибридомы, но также способен продуцировать молекулы антитела по настоящему изобретению, включая иммунологически активные фрагменты полноразмерной молекулы антитела, соответствующие секретируемому гибридомой. См., например, патент США № 4642334; номера публикации Европейского патента № 0239400, выданного Winter et al. и № 0125023, выданного Cabilly et al. Также охвачен способ продуцирования антитела, не включающий иммунизацию, такой как, например, с использованием технологии фагового дисплея для проверки наивных библиотек (от неиммунизированных животных); см. Barbas et al. (1992), и Waterhouse et al. (1993).

Использованное здесь выражение "антитело против ICOS" относится к моноклональному антителу, направленному против ICOS, предпочтительно полученному с использованием рекомбинантного ICOS-Fc в качестве иммуногена.

Использованное здесь выражение "производное антитела" относится к антителу, которое содержит 6 CDR (гипервариабельный участок) указанного антитела.

Использованное здесь выражение "53.3 mAb" или "Icos 53-3" относится к моноклональному антителу, направленному против ICOS, депонированному в CNCM 2 июля 2009 г. под номером доступа CNCN I-4176. Указанное антитело представляет собой агонист ICOS. Выражение "производное 53.3 mAb" относится к антителу против ICOS, которое содержит 6 CDR из антитела 53.3 mAb.

Использованное здесь выражение "88.2 mAb" или "Icos 88-2" относится к моноклональному антителу, направленному против ICOS, депонированному в CNCM 2 июля 2009 г. под номером доступа CNCN I-4177. Указанное антитело представляет собой агонист ICOS. Авторы изобретения продемонстрировали, что применение указанного антитела в присутствии IL-2 благоприятствует пролиферации Treg и секреции IL-10. Выражение "производное 88.2 mAb" относится к антителу против ICOS, которое содержит 6 CDR из антитела 88.2 mAb.

6 CDR из 88.2 mAb являются такими, как указано в табл. 1 ниже.

Таблица 1

	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
H-CDR1	GGCTACAGTTTCACCAGCTACTGGATAAAC (SEQ ID NO:17)	GYSFTSYWIN (SEQ ID NO:23)
H-CDR2	AATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTA CAATCAAATGTTCAAGGAC (SEQ ID NO:18)	NIYPSDSYTNYNQMFKD (SEQ ID NO:24)
H-CDR3	TGGAATCTTTCTTATTACTTCGATAATAACTA CTACTGGACTAC (SEQ ID NO:19)	WNLSYYFDNNYYLDY (SEQ ID NO:25)
L-CDR1	AGGTCTAGTAAGAGTCTCTGCATAGTAATG GCAACACTTACTTGTAT (SEQ ID NO:20)	RSSKLLHSNGNTYLY (SEQ ID NO:26)
L-CDR2	CGGATGTCCAACCTTGCCTCA (SEQ ID NO:21)	RMSNLAS (SEQ ID NO:27)
L-CDR3	ATGCAACATCTAGAATATCCGTGGACG (SEQ ID NO:22)	MQHLEYPWT (SEQ ID NO:28)

Использованное здесь выражение "92.17 mAb" или "Icos 92-17" относится к моноклональному антителу, направленному против ICOS, депонированному в CNCM 2 июля 2009 г. под номером доступа CNCN I-4178. Указанное антитело представляет собой агонист ICOS. Выражение "производное 92.17 mAb" относится к антителу против ICOS, которое содержит 6 CDR из антитела 92.17 mAb.

Использованное здесь выражение "антитело по изобретению" относится к антителу, направленному против ICOS, способному нейтрализовать контактирование ICOS с Treg путем ингибирования связывания между ICOS и ICOS-L и прекращать пролиферацию Treg, индуцируемую плазматическими дендритными клетками, т.е. антагонистическому антителу; а также

антителу, направленному против ICOS, способному индуцировать продуцирование IL-10 и IFN γ , индуцировать пролиферацию CD4⁺ Т-клеток; уменьшить пролиферацию Tconv и усилить иммуносупрессорную функцию Treg, т.е. агонистическому антителу.

Указанное выражение также охватывает любые производные указанных антител.

Предпочтительно антитела по изобретению выбраны из 53.3 mAb, 88.2 mAb, 92.17 mAb и их производных.

Использованное здесь выражение "агонистическое антитело, направленное против ICOS" относится к антителу, которое способно связываться с ICOS и запускать клеточный ответ, похожий на ответ, индуцируемый природным ICOS. Таким образом, указанное антитело имитирует действие ICOS. Выражение "агонистическое антитело по изобретению" относится к антителам 53.3 mAb, 88.2 mAb, 92.17 mAb и их производным.

Использованные здесь выражения "антиген-представляющая клетка" и "APC" относятся к классу иммунных клеток, способных к интернализации и процессингу антигена, таким образом, что антигенные детерминанты представляются на поверхности клетки в виде ассоциированных с главным комплексом гистосовместимости (МНС) комплексов, способных распознаваться иммунной системой (например, ог-

раниченные МНС классом I цитотоксические Т лимфоциты и/или ограниченные МНС классом II хелперные Т лимфоциты). Два необходимых свойства, которые дают возможность клетке функционировать как APC, представляют собой способность процессировать захваченные путем эндоцитоза антигены и экспрессия продуктов генов МНС. Примеры APC включают в себя дендритные клетки (DC), мононуклеарные фагоциты (например макрофаги), В лимфоциты, клетки Лангерганса кожи и, в случае когда организм является человеком, эндотелиальные клетки.

Использованные здесь выражения "Treg" и "регуляторные Т-клетки" относятся к специфической популяции Т-лимфоцитов, которые обладают способностью значительно подавлять пролиферацию иммунореактивных Т-клеток *in vitro* и подавлять аутоиммунные заболевания. Treg вовлечены в качестве основных клеток, вносящих вклад в окончательное нарушение противоопухолевых иммунных ответов у людей. Например, при раке яичников Treg подавляют опухольспецифические Т-клетки, и большие количества опухольассоциированных Treg ассоциируются с уменьшением продолжительности жизни. Авторы изобретения продемонстрировали, что Treg избирательно подавляет иммунный ответ хозяина и, таким образом, вносит вклад в развитие рака, в особенности рака молочной железы. Treg исходно идентифицировали как клеточную популяцию CD4⁺CD25⁺, но они также характеризуются экспрессией транскрипционного фактора FoxP3 семейства forkhead.

Авторы изобретения продемонстрировали, что Treg пролиферирует *in situ* в раковой ткани пациента и экспрессирует маркеры клеточной поверхности ICOS и CD39 по сравнению с Treg, экстрагированными из крови того же самого пациента.

Термин "Tconv" относится к Т-клеткам, отличающимся от Treg. Таким образом, термин "Tconv" включает Т-клетки, которые функционируют так, чтобы устранить антиген (например, путем продуцирования цитокинов, которые модулируют активацию других клеток, или путем цитотоксической активности). Этот термин включает Т-хелперные клетки (например, клетки Th1 и Th2) и цитотоксические Т-клетки. В этой связи Т-хелперные клетки предпочтительно экспрессируют CD4 и экспрессируют низкие или необнаруживаемые уровни CD25. Клетки CTL предпочтительно экспрессируют CD8 и низкие или необнаруживаемые уровни CD4. Предпочтительно клетки, отличающиеся от Treg, не экспрессируют CD4 и CD25. Предпочтительно клетки, отличающиеся от Treg, не экспрессируют FoxP3.

Использованные здесь выражения "опухольассоциированные регуляторные Т-клетки" и "Ta-Treg" относятся к регуляторным Т-клеткам, ассоциированным с опухолями, например с опухолями молочной железы. Авторы изобретения продемонстрировали, что Ta-Treg действительно представлены в лимфоидных инфильтратах опухолевой ткани молочной железы и оказывают отрицательное влияние на выживание пациента, страдающего от рака молочной железы.

Использованные здесь выражения "плазмоцитоидные дендритные клетки" и "pDC" относятся к клеткам врожденного иммунитета, которые циркулируют в крови и обнаруживаются в периферических лимфоидных органах. Они составляют группу клеток, относящихся к группе мононуклеарных клеток (PBMC) периферической крови.

Использованные здесь выражения "опухольассоциированные плазмоцитоидные дендритные клетки" и "Ta-pDC" относятся к плазмоцитоидным дендритным клеткам, ассоциированным с опухолями, например опухолями молочной железы. Авторы изобретения продемонстрировали, что Ta-pDC способен вызывать пролиферацию Ta-Treg в зависимости от стимуляции ICOS/ICOSL.

Использованные здесь термины "IL-10" и "интерлейкин-10" относятся к человеческому фактору, ингибирующему синтез цитокинов (CSIF), который представляет собой противовоспалительный цитокин. Этот цитокин в основном продуцируется моноцитами и в меньшей степени лимфоцитами. Этот цитокин обладает плеiotропными действиями в иммунорегуляции и воспалении. Он осуществляет отрицательную негативную модуляцию экспрессии цитокинов Th1, антигенов МНС класса II. Он также увеличивает выживание В-клеток, пролиферацию и продуцирование антител. Указанный цитокин может блокировать активность NF-κB и вовлечен в регуляцию сигнального пути JAK-STAT.

Использованные здесь термины "IFNγ" и "интерферон-гамма" относятся к димерному белку с субъединицами из 146 аминокислот каждая. Значимость IFN-γ в иммунной системе частично связана с его способностью непосредственно ингибировать вирусную репликацию, и, что наиболее важно, с его иммуностимулирующим и иммуномодулирующим действием. IFNγ продуцируется преимущественно естественными клетками-киллерами (NK) и естественными клетками-киллерами Т (NKT), составляя часть врожденного иммунного ответа, и CD4 и CD8 цитотоксическими Т лимфоцитами (CTL) - эффекторными Т-клетками после развития антигенспецифического иммунитета.

Использованные здесь термины "лечение" или "процесс лечения" обозначают реверсию, уменьшение интенсивности, подавление развития или предупреждение расстройства или состояния, в отношении которого применяется такой термин, или одного или более чем одного симптома такого расстройства или состояния.

"Терапевтически эффективное количество" означает минимальное количество активного агента, которое необходимо для придания субъекту терапевтического эффекта. Например "терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, которое приводит к уменьшению интенсивности или

иным образом приводит к улучшению патологических симптомов, развития заболевания или физиологических состояний, ассоциирующихся с заболеванием, или которое усиливает устойчивость к расстройству.

Использованный здесь термин "предупреждение" относится к уменьшению интенсивности симптомов заболевания или состояния с момента возникновения у субъекта, которое еще не диагностировано на наличие у субъекта. Использованный здесь термин "субъект" обозначает млекопитающее, такое как грызун, представитель кошачьих, собачьих и примата. Предпочтительно субъект в соответствии с изобретением представляет собой человека.

Термин "рак" включает злокачественные новообразования, поражающие различные системы органов, например легкое, молочную железу, щитовидную железу, лимфоидную ткань, желудочно-кишечный и мочеполовой тракт; а также аденокарциномы, которые включают злокачественные новообразования, такие как большинство форм рака толстой кишки, почечно-клеточная карцинома, рак предстательной железы и/или опухоли семенников, немелкоклеточная карцинома легкого, рак тонкой кишки и рак пищевода.

Следует понимать, что термин "Treg-ассоциированное заболевание" охватывает любое заболевание или расстройство или состояние, при котором модулирование количества и/или активности Treg может обеспечить благоприятное действие. Этот термин охватывает

заболевания и состояния, ассоциирующиеся с опосредованным Treg подавлением иммунного ответа у субъекта,

заболевания и состояния, ассоциирующиеся с чрезмерным иммунным ответом или индуцируемые им.

Использованное здесь выражение "заболевания и состояния, ассоциирующиеся с Treg-опосредованным подавлением иммунного ответа" представляют собой заболевания и состояния, индуцируемые опосредованным Treg подавлением пролиферации иммуномодулирующих клеток, таких как опухоеспецифическая Т-клетка. Как упомянуто ранее, авторы изобретения продемонстрировали, что Treg ассоциируются с плохим диагнозом и уровнем выживания у пациента, страдающего от рака.

Не ограничивающие объем изобретения примеры заболеваний и состояний, ассоциирующихся с Treg-опосредованным подавлением иммунной системы субъекта, представляют собой рак и хронические инфекции.

Использованный здесь термин "заболевания и состояния, ассоциирующиеся с чрезмерным иммунным ответом или индуцируемые им" представляют собой, например, аутоиммунные заболевания, реакции отторжения трансплантата или заболевания "трансплантат против хозяина".

Указанная экспрессия также охватывает воспалительные состояния, такие как воспалительное расстройство нервной системы (например, рассеянный склероз), воспалительное заболевание слизистой оболочки (например, воспалительное заболевание кишечника, астма или тонзиллит), воспалительное заболевание кожи (например, дерматит, псориаз или контактная гиперчувствительность), аутоиммунный артрит (например, ревматоидный артрит).

Использованный здесь термин "иммунный ответ" относится к согласованному действию лимфоцитов, антиген-представляющих клеток, фагоцитирующих клеток, гранулоцитов и растворимых макромолекул, продуцируемых вышеприведенными клетками или печенью (включая антитела, цитокины и комплемент), что приводит в результате к избирательному повреждению, деструкции или устранению из организма субъекта раковых клеток, метастазирующих опухолевых клеток, злокачественной меланомы, инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, или, в случае аутоиммунного или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей субъекта.

Использованный здесь термин "аутоиммунное заболевание" представляет собой заболевание или расстройство, возникающее из собственных тканей индивида и направленное против них.

Агонистические антитела, направленные против ICOS.

Было обнаружено, что контактирование ICOS ассоциировано с иммуносупрессорным Т-клеточным ответом. Было описано, что указанное контактирование уменьшает продуцирование IL-10 и IFN γ и уменьшает CD4⁺ Т-клеточную пролиферацию.

Таким образом, как обнаружено авторами изобретения, агонистическое антитело ICOS обеспечивает противоположное действие и благоприятно для лечения заболеваний, ассоциирующихся с или индуцированных чрезмерным иммунным ответом. Таким образом, изобретение относится к антителу, направленному против ICOS, или его производному, которое индуцирует продуцирование IL-10 и IFN γ , индуцирует пролиферацию CD4⁺ Т-клеток, уменьшает пролиферацию Tconv и усиливает иммуносупрессорную функцию Treg.

Под "индукцией продуцирования IL-10 и IFN γ " подразумевают, что обнаружено значимое увеличение продуцирования IL-10 и IFN γ .

Под "индукцией пролиферации CD4⁺ Т-клеток" подразумевают, что значимое увеличение пролиферации CD4⁺ Т-клеток обнаружено в ткани-мишени, предпочтительно опухолевой ткани, по сравнению с контрольной тканью, предпочтительно неопухолевой тканью, более предпочтительно кровью.

Под "уменьшением пролиферации Tconv" подразумевают, что значимое уменьшение пролиферации Tconv обнаружено в ткани-мишени, предпочтительно опухолевой ткани, по сравнению с контрольной тканью, предпочтительно неопухолевой тканью, более предпочтительно кровью.

Под "увеличением иммуносупрессорной функции Treg" подразумевают, что обнаружено значительное увеличение Treg подавляющей активности.

В одном из воплощений указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.

В одном из воплощений указанное антитело представляет собой химерное антитело.

В одном из воплощений указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

Изобретение также относится к антителу, направленному против ICOS, где указанное антитело выбрано из группы, состоящей из Icos 53-3, Icos 88-2 и Icos 92-17 получаемых, соответственно, из гибридом, депонированных в CNCM 2 июля 2009 г. под номерами доступа CNCM I-4176, CNCM I-4177, CNCM I-4178 и их производным.

Изобретение также относится к антителу, которое содержит 6 CDR антитела, выбранного из группы, состоящей из Icos 53-3, Icos 88-2 и Icos 92-17 получаемых, соответственно, из гибридом, депонированных в CNCM 2 июля 2009 г. под номерами доступа CNCM I-4176, CNCM I-4177, CNCM I-4178.

Изобретение также относится к антителу, которое содержит 6 CDR из табл. 1 выше.

В еще одном воплощении изобретение относится к производному антитела, выбранного из группы антител, состоящей из Icos 53-3, Icos 88-2 и Icos 92-17 получаемых, соответственно, из гибридом, депонированных в CNCM 2 июля 2009 г. под номерами доступа CNCM I-4176, CNCM I-4177, CNCM I-4178.

Терапевтическое применение агонистических антител по изобретению.

Изобретение также относится к агонистическому антителу по изобретению, направленному против ICOS, или его производному для применения в качестве лекарственного средства.

Изобретение также относится к агонистическому антителу по изобретению, направленному против ICOS, или его производному для применения для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с чрезмерным иммунным ответом или индуцированного им.

Изобретение также относится к агонистическому антителу по изобретению, направленному против ICOS, или его производному для применения для лечения аутоиммунного заболевания, реакции отторжения трансплантата или заболевания "трансплантат против хозяина".

В конкретном воплощении указанное аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита (RA), инсулинзависимого сахарного диабета (сахарный диабет 1 типа), рассеянного склероза (MS), болезни Крона, системной красной волчанки (SLE), склеродермии, ксеродерматоза, вульгарной пузырчатки, пемфигоида, болезни Аддисона, анкилозирующего спондилоартрита, апластической анемии, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, цилиакии, дерматомиозита, синдрома Гудпасчера, диффузного токсического зоба, синдрома Гийена-Барре, болезни Хашимото, идиопатической лейкопении, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, мужского бесплодия, смешанного заболевания соединительной ткани, злокачественной миастении, пернициозной анемии, фактогенного увеита, первичного билиарного цирроза печени, первичной микседемы, синдрома Рейтера, синдрома мышечной скованности, тиреотоксикоза, язвенного колита и некротического неинфекционного гранулематоза.

В еще одном воплощении изобретение также относится к агонистическому антителу по изобретению, направленному против ICOS, или его производному для применения для лечения воспалительного расстройства, выбранного из группы, состоящей из воспалительного расстройства нервной системы, такого как рассеянный склероз, воспалительного заболевания слизистой оболочки, такого как воспалительное заболевание кишечника, астмы или тонзиллита, воспалительного заболевания кожи, такого как дерматит, псориаза или контактной гиперчувствительности, и аутоиммунного артрита, такого как ревматоидный артрит.

Изобретение также относится к способу лечения заболевания или состояния, ассоциированного с чрезмерным иммунным ответом или индуцированного им, предпочтительно аутоиммунного заболевания, реакции отторжения трансплантата или заболевания "трансплантат против хозяина" или воспалительного расстройства, где указанный способ включает стадию введения субъекту, нуждающемуся в таком введении, терапевтически эффективного количества агонистического антитела по изобретению направленного против ICOS, или его производного.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело по изобретению.

Еще одно воплощение изобретения относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей одно из антител, выбранных из группы, состоящей из 53.3 mAb, 88.2 mAb, 92.17 mAb и их производных.

В конкретном воплощении изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей домен VH или домен VL одного из антител, выбранных из группы, состоящей из 53.3 mAb, 88.2 mAb, 92.17 mAb и их производных.

Как правило, указанная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу ДНК или РНК, которая может быть включена в любой подходящий вектор, такой как плазида, космида, эписома, искусственная хромосома, фаговый или вирусный вектор.

Термины "вектор", "вектор для клонирования" и "вектор экспрессии" обозначают носитель, при помощи которого последовательность ДНК или РНК (например, чужеродный ген) может быть введена в клетку-хозяин таким образом, чтобы трансформировать хозяина и способствовать экспрессии (например, транскрипции и трансляции) введенной последовательности. Таким образом, еще одна задача изобретения относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту по изобретению. Такие векторы могут содержать регуляторные элементы, такие как промотор, энхансер, терминатор и т.п., для того, чтобы вызвать или направить экспрессию указанного антитела после введения субъекту. Примеры промоторов и энхансеров, используемых в экспрессирующемся векторе для клетки животного включают ранний промотор и энхансер SV40, промотор LTR и энхансер вируса мышиного лейкоза Молони, промотор и энхансер Н цепи иммуноглобулина и т.п.

Может быть использован любой экспрессирующийся вектор для клетки животного, а также может быть встроен и экспрессироваться ген, кодирующий область С человеческого антитела. Примеры подходящих векторов включают pAGE107, pAGE103, pHSG274, pKCR, pSG1 beta d2-4- и т.п. Другие примеры плазмид включают реплицирующиеся плазмиды, содержащие ориджин репликации или интегрирующиеся плазмиды, такие как, например pUC, pcDNA, pBR и т.п. Другие примеры вирусного вектора включают аденовирусные, ретровирусные векторы, векторы на основе вируса герпеса и векторы AAV. Такие рекомбинантные вирусы могут быть получены при помощи способов, известных в области техники, таких как путем трансфекции пакующих клеток или путем временной трансфекции хелперными плазмидами или вирусами. Типичные примеры вирусных пакующих клеток включают клетки PA317, клетки PsiCRIP, клетки GPenv+, клетки 293 и т.д. Подробные протоколы для введения таких дефектных по репликации рекомбинантных вирусов могут быть найдены, например, в WO 95/14785, WO 96/22378, US 5882877, US 6013516, US 4861719, US 5278056 и WO 94/19478.

Еще один объект по настоящему изобретению относится к клетке, трансфицированной, инфицированной или трансформированной нуклеиновой кислотой и/или вектором по изобретению. Термин "трансформация" обозначает введение "чужеродного" (т.е. внешнего или внеклеточного) гена, последовательности ДНК или РНК в клетку хозяина так, чтобы клетка-хозяин экспрессировала введенный ген или последовательность для продуцирования желаемого вещества, как правило белка или фермента, кодируемого введенным геном или последовательностью. Клетка-хозяин, которая получает и экспрессирует введенную ДНК или РНК, является "трансформированной". Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть использованы для продуцирования антитела по изобретению в подходящей системе экспрессии. Термин "система экспрессии" обозначает клетку-хозяин и совместимый вектор в подходящих состояниях, например, для экспрессии белка, кодируемого чужеродной ДНК, которую несет вектор, и которая вводится в клетку-хозяин.

Общие системы экспрессии включают клетки-хозяева *E. coli* и плазмидные векторы, клетки-хозяева насекомых и бакуловирусные векторы и клетки-хозяева млекопитающих и векторы. Другие примеры клеток-хозяев включают без ограничения прокариотические клетки (такие как бактерии) и эукариотические клетки (такие как клетки дрожжей, клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений и т.д.). Конкретные примеры включают *E. coli*, *Kluuyveromyces* или дрожжи *Saccharomyces*, клеточные линии млекопитающих (например, клетки Vero, клетки CHO (яичника китайского хомячка), клетки 3T3, клетки COS и т.д.), а также первичные или сформированные культуры клеток млекопитающих (например, продуцируемые из лимфобластов, фибробластов, эмбриональных клеток, эпителиальных клеток, нервных клеток, адипоцитов и т.д.). Примеры также включают мышинные клетки SP2/0-Ag14 (Американская коллекция типовых культур) CRL1581), мышинные клетки P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL1580), клетки CHO, в которых ген дегидрофолатредуктазы (далее названный как "ген DHFR") является дефектным, клетки крысы YB2/3HLP2.G11.16Ag.20 (ATCC CRL1662, далее названные "клетки YB2/0") и т.п.

Настоящее изобретение также относится к способу продуцирования рекомбинантной клетки-хозяина, экспрессирующей антитело, в соответствии с изобретением, где в указанном способе осуществляют стадии:

- (1) введения *in vitro* или *ex vivo* рекомбинантной нуклеиновой кислоты или вектора, описанного выше, в компетентную клетку-хозяин,
- (2) выращивание *in vitro* или *ex vivo* полученной рекомбинантной клетки-хозяина и
- (3) возможно, отбор клеток, которые экспрессируют и/или секретируют указанное антитело. Такая рекомбинантная клетка-хозяин может быть использована для продуцирования антител по изобретению.

Фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением.

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитело по изобретению.

Таким образом, антитело по изобретению может быть комбинировано с фармацевтически приемлемыми эксципиентами и возможно матрицами с длительным высвобождением, такими как биodeградируемые полимеры, с образованием терапевтических композиций.

"Фармацевтические" или "фармацевтически приемлемые" относится к молекулярным структурам и композициям, которые не вызывают нежелательной, аллергической или иной неблагоприятной реакции

при подходящем введении млекопитающему, в частности человеку. Фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент относится к нетоксичному твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу или вспомогательной композиции любого типа.

Форма фармацевтической композиции, путь введения, доза и схема введения естественным образом зависят от состояния, которое лечат, тяжести заболевания, возраста, массы и пола пациента и т.д.

Фармацевтические композиции по изобретению могут быть приготовлены для местного, перорального, парентерального, интраназального, внутривенного, внутримышечного, подкожного или внутривидеального введения и т.п.

Предпочтительно фармацевтические композиции содержат разбавители, которые являются фармацевтически приемлемыми для композиции, предназначенной для инъекции. Они могут представлять собой, в частности, стерильные физиологические растворы (содержащие моонатрий или динатрий фосфат, хлорид натрия, калия, кальция или магния и т.п. или смеси таких солей), или сухие, в частности лиофилизированные композиции, которые при добавлении, в зависимости от ситуации, стерилизованной воды или физиологического раствора дают возможность для образования инъекционных растворов.

Дозы, используемые для введения, могут быть адаптированы в зависимости от различных параметров, и, в частности, в зависимости от используемого способа введения, соответствующей патологии или в качестве альтернативы от желаемой длительности лечения. Для приготовления фармацевтической композиции эффективное количество антитела может быть растворено или диспергировано в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде. Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии; композиции, включающие кунжутное масло, арахисовое масло или водный пропиленгликоль; и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях форма должна быть стерильной и жидкой до той степени, чтобы существовала возможность ее введения через иглу. Она должна быть стабильной в условиях приготовления и хранения и должна быть защищена против контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

Растворы активных соединений в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей могут быть приготовлены в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также могут быть приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях и в маслах. В обычных состояниях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предупреждения роста микроорганизмов.

Антитело по изобретению может быть приготовлено в композиции в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислоты (образующиеся со свободными аминогруппами белка) и которые образуются с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и т.п. Соли, образующиеся со свободными карбоксильными группами, также могут происходить из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или трехвалентного железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и т.п.

Носитель может также представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и растительные масла.

Подходящая текучесть может поддерживаться, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ.

Предотвращение действия микроорганизмов может быть осуществлено при помощи различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тиомерсала и т.п. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические агенты, например сахара или хлорид натрия.

Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть осуществлена путем применения в композиции агентов, замедляющих поглощение, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъекционные растворы получают путем включения активных соединений в требуемом количестве в подходящем растворителе с различными другими требуемыми ингредиентами, обозначенными выше, с последующей стерилизацией путем фильтрования.

Как правило, дисперсии готовят путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильном разбавителе, который содержит основную диспергирующую среду и требуемые другие ингредиенты из числа обозначенных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительные способы приготовления представляют собой способы вакуумной сушки и лиофилизации, которые позволяют получить порошок активного ингредиента с любым дополнительным желаемым ингредиентом из ранее полученного путем стерильной фильтрации их раствора.

Также рассматривается приготовление более концентрированных или высококонцентрированных растворов для прямой инъекции, где применение DMSO (диметилсульфоксид) в качестве растворителя,

как предполагается, приводит в результате к чрезвычайно быстрому проникновению, доставке высоких концентраций активных агентов в небольшую опухолевую область.

После приготовления растворы вводят таким образом, который совместим с лекарственной композицией, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Композиции легче вводить в составе различных лекарственных форм, таких как тип описанных выше инъектируемых растворов, но также могут быть использованы капсулы для высвобождения лекарства и т.п.

Для парентерального введения, например, в водном растворе последний должен быть подходящим образом забуферен при необходимости, и жидкий разбавитель сначала должен быть приведен к изотоническому состоянию при помощи достаточного количества физиологического раствора или глюкозы.

Эти конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутриперитонеального введения. В этой связи стерильные водные среды, которые могут быть использованы, известны специалистам в данной области техники в свете настоящего описания. Например, одна доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и добавлена к 1000 мл жидкости для гиподермолиза или инъектирована в предполагаемом месте инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, стр. 1035-1038 и 1570-1580). Некоторая вариация в дозе будет возникать в зависимости от состояния субъекта, которого лечат. Лицо, ответственное за введение, в любом случае, определяет подходящую дозу для конкретного субъекта.

Антитела по изобретению могут быть приготовлены с терапевтической смесью таким образом, чтобы содержать от приблизительно 0,0001 до 1,0 мг, или от приблизительно 0,001 до 0,1 мг, или от приблизительно 0,1 до 1,0 или даже приблизительно 10 мг на дозу и т.п. Также может быть введено несколько доз. Дополнительно к соединениям, приготовленным для парентерального введения, такого как внутривенная или внутримышечная инъекция, другие фармацевтически приемлемые формы включают, например, таблетки или другие твердые вещества для перорального введения; капсулы с высвобождением по времени и любую другую форму, используемую в настоящее время.

В некоторых воплощениях рассматривается применение липосом и/или наночастиц для введения антител в клетки-хозяева. Получение и применение липосом и/или наночастиц известно специалистам в данной области техники.

Соединения, как правило, могут заключаться в нанокapsулы стабильным и воспроизводимым путем. Для того чтобы избежать побочных действий вследствие внутриклеточной перегрузки полимером, такие ультрамелкие частицы (размером приблизительно 0,1 мкм), как правило, разрабатываются с использованием полимеров, способных к деградации *in vivo*. Биodeградируемые полиалкилцианоакрилатные наночастицы, которые удовлетворяют этим требованиям, рассматриваются для применения в настоящем изобретении, и такие частицы могут быть легко приготовлены.

Липосомы получают из фосфолипидов, которые диспергированы в водной среде и спонтанно образуют мультислойные концентрические двухслойные везикулы (также названные мультислойными везикулами (MLV)). MLV, как правило, имеют диаметр от 25 нм до 4 мкм. Ультразвуковая обработка MLV приводит к образованию небольших однослойных везикул (SUV), имеющих диаметры в диапазоне от 200 до 500 Å и содержащих водный раствор в ядре. Физические характеристики липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов.

Способ получения антител по изобретению.

Антитела по изобретению могут быть получены при помощи любого способа, известного в области техники, такого как, без ограничения, любой химический, биологический, генетический или ферментативный способ, сам по себе или в комбинации.

Зная желаемую аминокислотную последовательность специалист в данной области техники может быстро получить указанные антитела при помощи стандартных способов получения полипептидов. Например, последние могут быть синтезированы с использованием хорошо известного твердофазного способа, предпочтительно с использованием имеющегося в продаже прибора для пептидного синтеза (такого как прибор, производимый Applied Biosystems, Foster City, California) и в соответствии с указаниями производителя. Альтернативно, антитела по изобретению могут быть синтезированы при помощи методов рекомбинантных ДНК, хорошо известных в области техники. Например, антитела могут быть получены в виде продуктов экспрессии ДНК после включения последовательностей ДНК, кодирующих антитела, в векторы экспрессии, и введения таких векторов подходящим эукариотическим или прокариотическим хозяевам, которые будут экспрессировать желаемые антитела, из которых они позже могут быть выделены с использованием хорошо известных способов.

В частности, изобретение также относится к способу получения антитела по изобретению, который включает стадии:

(1) выращивание трансформированной клетки-хозяина по изобретению в условиях, подходящих для экспрессии указанного антитела; и

(2) выделение экспрессированного антитела.

В еще одном конкретном воплощении способ включает стадии:

(1) выращивание гибридомы, депонированной как CNCM I-4176, CNCM I-4177, CNCM I-4178, в условиях, подходящих для экспрессии антитела; и

(2) выделение экспрессированного антитела.

Антитела по изобретению подходящим образом отделяют от культуральной среды при помощи обычных способов очистки иммуноглобулинов, таких как, например, белок А-сефароза, хроматография на гидроксилapatитах, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

В конкретном воплощении человеческое химерное антитело по настоящему изобретению может быть продуцировано путем получения последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих домены VL и VH, как описано ранее, с конструированием вектора, экспрессирующего человеческое химерное антитело, путем его встраивания в вектор экспрессии для клетки животного, имеющий гены, кодирующие человеческое антитело CH и человеческое антитело CL, и экспрессирующий кодирующую последовательность путем встраивания указанного вектора экспрессии в клетку млекопитающего. В качестве домена CH человеческого химерного антитела может выступать любая область, которая относится к человеческому иммуноглобулину, но подходящими являются иммуноглобулины класса IgG, и также может быть использован любой иммуноглобулин из подклассов, относящихся к классу IgG, такой как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Кроме того, в качестве CL человеческого химерного антитела может выступать любая область, которая относится к Ig, и могут быть использованы Ig класса каппа или класса лямбда. Способы продуцирования химерных антител включают обычные техники рекомбинантной ДНК и генной трансфекции, хорошо известные в области техники (см. патенты US 5202238 и US 5204244).

Гуманизированное антитело по настоящему изобретению может быть продуцировано путем получения последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих домены CDR, как описано ранее, конструирования вектора, экспрессирующего гуманизированное антитело, путем его встраивания в вектор экспрессии для клетки животного, имеющий гены, кодирующие (1) константную область тяжелой цепи, идентичную области человеческого антитела и (2) константную область легкой цепи, идентичную области человеческого антитела, и экспрессии генов путем встраивания указанного вектора экспрессии в клетку животного.

Вектор, экспрессирующий гуманизированное антитело, может иметь тип, в котором ген, кодирующий тяжелую цепь антитела, и ген, кодирующий легкую цепь антитела, присутствуют в отдельных векторах, или тип, в котором оба гена присутствуют в одном и том же векторе (тандемный тип). В отношении легкости конструирования вектора, экспрессирующего гуманизированное антитело, легкости введения в клетки животных и баланса между уровнями экспрессии цепей H и L антитела в клетках животных предпочтителен вектор тандемного типа, экспрессирующий гуманизированное антитело. Примеры вектора тандемного типа, экспрессирующего гуманизированное антитело, включают pKANTEX93 (WO 97/10354), pEE18 и т.п.

Способы получения гуманизированных антител, основанные на обычных техниках рекомбинантной ДНК и генной трансфекции, хорошо известны в области техники. Антитела могут быть гуманизированы с использованием множества способов, известных в области техники, включающих, например, прививание CDR (EP 239,400; РСТ публикация WO 91/09967; патенты США №№ 5225539; 5530101 и 5585089), облицовка или изменение поверхности (EP 592106; EP 519596) и перестановка цепей (патент США № 5565332). Также известна общая техника рекомбинантной ДНК для получения таких антител (см. Европейскую заявку на патент EP 125023 и международную заявку на патент WO 96/02576).

Fab по настоящему изобретению могут быть получены путем обработки антитела, которое специфически взаимодействует с ICOS, протеазой, папаином. Кроме того, Fab могут быть получены путем встраивания ДНК, кодирующей Fab антитела, в вектор для прокариотической экспрессирующей системы, или для эукариотической экспрессирующей системы и введения вектора в прокариотический или эукариотический организм (который является подходящим) для экспрессии Fab.

F(ab')₂ по настоящему изобретению могут быть получены путем обработки антитела, которое специфически взаимодействует с ICOS, протеазой, пепсином.

Также F(ab')₂ могут быть получены путем связывания Fab', описанных ниже, через тиоэфирную связь или дисульфидную связь.

Fab' по настоящему изобретению могут быть получены путем обработки F(ab')₂, которые специфически взаимодействуют с человеческим ICOS, восстановителем, дитиотреитолом. Кроме того, Fab' могут быть получены путем встраивания ДНК, кодирующих фрагмент Fab' антитела, в экспрессирующийся вектор для прокариот, или экспрессирующийся вектор для эукариот, и встраивания вектора в прокариотические или эукариотические организмы (которые являются подходящими) для осуществления его экспрессии.

scFv по настоящему изобретению могут быть продуцированы путем получения кДНК, кодирующих домены VH и VL, как описано ранее, конструирования ДНК, кодирующих scFv, встраивания ДНК в вектор экспрессии для прокариот или в вектор экспрессии для эукариот и затем введения экспрессирующегося вектора в прокариотические или эукариотические организмы (которые являются подходящими) для экспрессии scFv. Для получения гуманизированного фрагмента scFv может быть использован хорошо известный способ, названный прививание CDR, который включает отбор гипервариабельных участков (CDR) из донорного фрагмента scFv, и их прививание на скелет человеческого фрагмента scFv с известной трехмерной структурой (см., например, WO 98/45322; WO 87/02671; US 5859205; US 5585089;

US 4816567; EP 0173494).

Здесь охвачена(ы) модификация(и) аминокислотной(ых) последовательности(ей) описанных здесь антител. Например, улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела может быть желательным. Известно, что когда гуманизированное антитело получают путем простого прививания CDR в VH и VL домены антитела, происходящего от животного, не являющимся человеком, в FR (каркасная область) VH и VL человеческого антитела, антигенсвязывающая активность уменьшается по сравнению с антигенсвязывающей активностью исходного антитела, происходящего из животного, не являющегося человеком. Предполагают, что некоторые аминокислотные остатки VH и VL антитела, отличающегося от человеческого, не только в CDR, но также и в FR, прямо или опосредованно ассоциируются с антигенсвязывающей активностью. Следовательно, замена этих аминокислотных остатков различными аминокислотными остатками, происходящими из FR VH и VL человеческого антитела, может уменьшить связывающую активность.

Для решения этой задачи в антителах, на которые привит человеческий CDR, должна быть сделана попытка идентифицировать среди аминокислотных последовательностей FR VH и VL человеческих антител аминокислотный остаток, который непосредственно ассоциирован со связыванием с антигеном, или который взаимодействует с аминокислотным остатком CDR, или который поддерживает трехмерную структуру антитела и который непосредственно ассоциируется со связыванием с антигеном. Уменьшенная антигенсвязывающая активность может быть увеличена путем замены идентифицированных аминокислот на аминокислотные остатки исходного антитела, происходящего из животного, не являющегося человека.

Модификации и изменения могут быть произведены в структуре антител по настоящему изобретению и в последовательностях ДНК, кодирующих их, и все еще позволяющие получить функциональную молекулу, которая кодирует антитело, обладающее желаемыми характеристиками. При осуществлении изменений в аминокислотных последовательностях можно учитывать гидропатический индекс аминокислот. Важность гидропатического индекса аминокислот в придании белку определенной биологической функции в целом понятна в области техники. Считается, что относительный гидропатический характер аминокислоты вносит вклад во вторичную структуру образующегося в результате белка, который, в свою очередь, определяет взаимодействие белка с другими молекулами, например ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антителами, антигенами и т.п.

Каждой аминокислоте присвоены следующие гидропатические индексы на основе ее гидрофобности и характеристик заряда: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспарат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5).

Еще одно воплощение настоящего изобретения также охватывает функционально-консервативные варианты антител по настоящему изобретению.

"Функционально-консервативные варианты" представляют собой варианты, в которых заданный аминокислотный остаток в белке или ферменте модифицирован без изменения общей конформации и функции полипептида, включая, но не ограничиваясь этим, замену аминокислоты на аминокислоту, обладающую похожими свойствами (такими как, например, полярность, потенциал образования водородной связи, кислотность, основность, гидрофобность, ароматичность и т.п.).

Аминокислоты, отличающиеся от аминокислот, которые указаны как консервативные, могут отличаться в белке таким образом, что процент сходства белковой или аминокислотной последовательности между любыми двумя белками, обладающими похожей функцией, могут варьировать и могут составлять, например, от 70 до 99%, что определяют в соответствии со схемой выравнивания, такой как при помощи кластерного способа, где сходство основано на алгоритме MEGALIGN.

"Функционально-консервативный вариант" также включает полипептид, который имеет по меньшей мере 60% идентичность аминокислотной последовательности, определенную при помощи алгоритмов BLAST или FASTA, предпочтительно по меньшей мере 75% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, еще предпочтительней по меньшей мере 90% идентичность и еще более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность, и который обладает теми же самыми или, по существу, похожими свойствами или функциями, что и нативный или родительский белок, с которым его сравнивают. Две аминокислотные последовательности являются "по существу, гомологичными" или "по существу, похожими", когда больше чем 80%, предпочтительно больше чем 85%, предпочтительно больше чем 90% аминокислотных остатков являются идентичными, или больше чем приблизительно 90%, предпочтительно больше чем 95% являются похожими (функционально идентичными) по всей длине более короткой последовательности. Предпочтительно похожие или гомологичные последовательности являются идентичными при выравнивании с использованием, например, программы наложения GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin) или любого из алгоритмов сравнения последовательностей, таких как BLAST, FASTA и т.д.

Например, некоторые аминокислоты могут быть заменены на другие аминокислоты в структуре белка без заметной утраты активности. Поскольку способность белка к взаимодействию и природа белка

определяют его биологическую функциональную активность, некоторые аминокислотные замены могут быть произведены в белковой последовательности, и, безусловно, в кодирующей его последовательности ДНК, и в то же время будет получен белок, обладающий похожими свойствами. Таким образом, предполагают, что различные изменения могут быть произведены в аминокислотных последовательностях антител по изобретению или соответствующих последовательностях ДНК, которые кодируют указанные антитела без видимой утраты их биологической активности.

В области техники известно, что некоторые аминокислоты могут быть заменены на другие аминокислоты, обладающие похожим гидропатическим(ой) индексом или оценкой, что тем не менее приведет к белку, обладающему похожей биологической активностью, т.е. к биологически функционально эквивалентному белку. Таким образом, как изложено выше, аминокислотные замены в целом основаны на относительном сходстве заместителей боковой цепи аминокислот, например на их гидрофобности, гидрофильности, величине заряда, размере и т.п.

Примеры замещений, которые несут различные из вышеуказанных рассматриваемых характеристик, хорошо известны специалистам в области техники и включают: аргинин и лизин; глутамат и аспарат; серин и треонин; глутамин и аспарагин; и валин, лейцин и изолейцин. Еще один тип аминокислотной модификации антитела по изобретению может быть полезен для изменения исходной картины гликозилирования антитела.

Под "изменением" подразумевают одну или более чем одну углеводную группировку, обнаруженную в антителе, и/или добавление одного или более чем одного сайта гликозилирования, который не представлен в антителе.

Гликозилирование антител, как правило, связано с N-концом. "Связанный с N-концом" относится к присоединению углеводной единицы к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-Х-серин и аспарагин-Х-треонин, где Х представляет собой любую аминокислоту за исключением пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводной группировки к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает сайт потенциального гликозилирования. Добавление сайтов гликозилирования к антителу легко осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более чем одну из вышеописанных трипептидных последовательностей (для сайтов гликозилирования по N-концу). Еще один тип ковалентной модификации включает химически или ферментативно связанные с антителом гликозиды. Эти способы являются предпочтительными, потому что они не требуют получения антител в клетке-хозяине, которая обладает способностями гликозилировать по N- или O-концу. В зависимости от используемой схемы связывания сахар(а) может(гут) быть присоединен(ы) к (а) аргинину и гистидину, (б) свободным карбоксильным группам, (в) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина, (г) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина, (д) ароматическим остаткам, таким как остатки фенилаланина, тирозина или триптофана, или (е) амидной группе глутамина. Такие способы описаны, например, в WO 87/05330.

Удаление любой углеводной группировки, представленной на антителе, может быть осуществлено химически или ферментативно. Химическое дегликозилирование требует воздействия на антитело соединением трифторметансульфоновой кислотой или эквивалентным соединением. Эта обработка в результате приводит к отщеплению большей части или всех сахаров за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамин или N-ацетилгалактозамин), оставляя антитело интактным.

Ферментативное отщепление углеводных группировок на антителах может быть осуществлено путем применения различных эндо- и экзогликозидаз.

Еще один тип ковалентной модификации антитела включает связывание антитела с одним из множества непротеиноподобных полимеров, например полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем или полиоксикалканами таким образом, как изложено в патентах США №№ 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Также может быть желательным модифицировать антитело по изобретению по отношению к его эффекторной функции, например, таким образом, чтобы усилить антигензависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимую цитотоксичность (CDC) антитела. Последнее может быть достигнуто путем введения одной или более чем одной аминокислотной замены в область Fc антитела. Альтернативно или в дополнение в вышеописанному, цистеиновый(е) остаток(ки) может(гут) быть введен(ы) в область Fc, таким образом давая возможность для образования в этой области дисульфидной связи между цепями. Полученное таким образом гомодимерное антитело может обладать улучшенной способностью к интернализации и/или увеличенному комплемент-опосредованному клеточному лизису и/или антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (Caron P.C. et al. J. Exp. Med. 1992 Oct 1; 176(4):1191-5 и Shopes B. J. Immunol. 1992 May 1; 148(9):2918-22).

Способ диагностики.

Настоящее изобретение также относится к способу диагностики повышенного риска рецидива или ранней смерти пациента, страдающего от рака молочной железы. Действительно, как показано в примере 3, присутствие высокого количества ICOS⁺ клеток Treg ассоциировано с меньшей выживаемостью без

прогрессирования заболевания или общей выживаемостью пациентов, страдающих от рака молочной железы.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу диагностики повышенного риска рецидива или ранней смерти пациентов, страдающих от рака молочной железы, при котором осуществляют стадию количественной оценки ICOS положительных (ICOS⁺) клеток Treg в образце указанного пациента.

Если указанное количество является высоким, например больше чем 1,7 клеток ICOS⁺/пята при использовании способа в соответствии с примером 3 и фиг. 9, то существует увеличенный риск рецидива или ранней смерти у указанного пациента, страдающего от рака молочной железы.

Изобретение также относится к способу отбора пациентов, восприимчивых к лечению, при помощи иммунотерапии антителами против ICOS, включающему стадию количественной оценки ICOS положительных клеток Treg в образцах указанных пациентов. При указанной иммунотерапии могут использоваться антитела против ICOS по изобретению.

Указанный образец может быть получен в результате биопсии. Указанная количественная оценка ICOS⁺ клеток Treg может быть осуществлена благодаря антителам против ICOS, в частности благодаря любому из антител, описанных выше.

Лечение в преclinical модели опухоли молочной железы.

Как показано в примере 6, обработка общепризнанной мышинной модели опухоли молочной железы нейтрализующим крысиным антителом-имитатором против мышинного ICOS (17G9, IgG2b) уменьшает прогрессирование опухоли, увеличивает потенциал лечения при помощи нейтрализующих антител против ICOS по изобретению, способствуя регрессии опухоли в подгруппе пациентов, у которых обнаруживается высокий уровень ICOS⁺ клеток Treg в первичной опухоли молочной железы.

Изобретение также проиллюстрировано в свете следующих графических материалов и примеров.

Условные обозначения к графическим материалам.

Фиг. 1- Ta-Treg сильно экспрессирует ICOS, колокализован с Ta-pDC и пролиферирует *in situ*, но не пролиферирует *in vitro*;

A - замороженные срезы опухоли окрашивали при помощи антител против ICOS (ICOS Ab) (зеленые) и Ki67 Ab (коричневые) и вторичных антител против мышинного Ab, конъюгированных с HRP (пероксидаза хрена) и выявляли соответственно при помощи HistoGreen и DAB (диаминобензидин) (увеличение 10× и 40× для помещенного контейнера);

B - экспрессию Ki67 анализировали при помощи многоцветной проточной цитометрии на Treg (CD4⁺CD127⁺CD25^{high}) и Tconv (CD4⁺CD127⁺CD25^{low/-}) в первичной опухоли (Ta-Treg, Ta-Tconv) или в крови (Treg, Tconv);

C - очищенные Treg и Tconv из первичной опухоли или здоровой крови выращивали в 96-луночном планшете с U-образным дном в присутствии 500 МЕ/мл IL-2. Количество клеток оценивали каждые 4 суток путем подсчета;

D-F - замороженные срезы опухоли, окрашенные антителом против CD3 (CD3 Ab) (коричневые) и докрашенные гематоксилином (синие) (10× и 40× во вставленном контейнере) (D); CD3 Ab (зеленые) и BDCA2 (коричневые) (20× и 40× во вставленном контейнере) (E); FoxP3 Ab (коричневые) и BDCA2 (зеленые) (20× и 40× во вставленном контейнере) (F).

Фиг. 2 - блокада ICOS и ICOS-L прекращает секрецию IL-10 во время опосредованной pDC N-клеточной активации, не влияя значительно на сокультуру MoDC/T. Очищенные и активированные R848 pDC или MoDC выращивали вместе с течением 5 суток с аллогенными CD4⁺ T-клетками памяти в присутствии Ctrl Ab, антител против ICOS (314.8) или антител против ICOS-L (MH12). На 5 сутки IL-10 и IFN (количественно определяли при помощи ELISA (иммуоферментный анализ) в супернатантах из сокультуры pDC/T (A) и сокультуры MoDC/T (B).

Фиг. 3 - костимуляция ICOS и CD3 благоприятствует пролиферации Treg и Tconv, а также IL-10, но не секреции IFNγ (интерферона гамма) в присутствии экзогенного IL-2;

на A/B представлены данные по сортированным на FACS (клеточный сортировщик с активацией флуоресценцией) клеткам Treg или Tconv, происходящим из небных миндалин, которые культивировали в течение 5 суток сами по себе или с шариками, покрытыми агонистическими mAb CD3/IgG, CD3/88.2, CD3/CD28 в присутствии IL-2 (n=3). Пролиферацию оценивали при помощи включения [³H]-тимидина (A). Уровни IL-10 и IFNγ измеряли при помощи ELISA в культуральном супернатанте (B);

на C представлены данные по CD4⁺ TaT клеткам, отсортированным из опухоли, которые культивировали в течение 5 суток с шариками, покрытыми antiCD3/IgG; antiCD3/88.2 или antiCD3/antiCD28 в присутствии экзогенного IL-2 (100 МЕ/мл). Концентрации IL-10 и IFNγ в супернатанте количественно определяли при помощи ELISA.

Фиг. 4 - ICOS вовлечен в блокирование секреции индуцированного CD28 IL-2 и впоследствии уменьшает пролиферацию и секрецию IFNγ;

на A представлены меченные CFSE (карбоксифлуоресцеин диацетат сукцинимидильный эфир) CD4⁺ T-клетки памяти, которые культивировали в течение 5 суток с различными шариками сами по себе или в присутствии градуированной концентрации экзогенного rhIL-2 (20 МЕ/мл и 100 МЕ/мл), пролифе-

рацию оценивали при помощи CFSE с разбавлением путем проточной цитометрии;

на В представлены IL-2, которые обнаруживали при помощи ELISA после 5 суток культивирования с различными шариками без экзогенного IL-2;

на фрагменте С представлены CD4⁺ Т-лимфоциты памяти из крови здоровых доноров, которые культивировали в течение 5 суток с различными шариками сами по себе или в присутствии экзогенного IL-2 (100 МЕ/мл). Секретию IL-10 и IFN γ количественно определяли при помощи ELISA.

Фиг. 5 - отсутствие экспрессии ICOS-L на клеточных линиях опухоли молочной железы и лизатах первичной опухоли молочной железы;

А - экспрессию ICOS-L оценивали путем проточной цитометрии в суспензиях эпителиальных клеточных линиях опухоли молочной железы, собранных в PBS-EDTA (физиологический раствор, забуференный фосфатом-этилендиаминтетрауксусная кислота) в отсутствие трипсина для того, чтобы избежать повреждения Ag;

В - экспрессию ICOS-L оценивали в клетках опухоли (CD45- клетки) после выращивания в течение 48 ч в присутствии контрольных Ab (пунктирная линия) или anti ICOS Ab (314.8) (непрерывная линия).

Фиг. 6 - обработка первичных опухолей молочной железы Neu15 имитатором крысиного антитела - мышиного антитела против ICOS (17G9, IgG2b) замедляет рост опухолей.

Фиг. 7

А - количество клеток Treg увеличивается при первичном раке шейки матки;

В - количество клеток Treg ICOS⁺ увеличивается при первичном раке шейки матки.

Фиг. 8 - увеличение ICOS экспрессирующих Treg при неходжкинской лимфоме (NHL),

HD - лимфомма Ходжкина;

FL - фолликулярная лимфома;

DLBCL - диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома;

MCL - лимфома из клеток мантийной зоны;

MZL - лимфома маргинальной зоны.

Фиг. 9 - присутствие ICOS⁺ Treg клеток в первичных опухолях молочной железы оказывает негативное влияние на выживание. 120 залитых в парафин первичных образцов опухоли с 10 годами клинического наблюдения тестировали в отношении их экспрессии ICOS с использованием имеющегося в продаже кроличьего поликлонального Ab против ICOS. Средние количества клеток ICOS⁺ оценивали в шести различных пятнах. Для осуществления статистического анализа использовали медиану в качестве отсечения для получения уравновешенных групп. Представлено влияние экспрессии ICOS в соответствии с присутствием ICOS в первичной опухоли на общее выживание (А) или выживаемость без прогрессирования заболевания (В).

Примеры

Пример 1. Характеристика антител по изобретению.

Материалы и методы.

I. Клеточная биология.

1. Отбор/очистка клеток.

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови.

PBMC (мононуклеарные клетки периферической крови) выделяли в результате трансплантации периферических стволовых клеток здоровых добровольцев (Etablissement Francais du sang, Marseille, France) при помощи градиентноплотной среды Lymphoprep (Abcys). Кровь объемом 2/3 от объема пробирки по каплям добавляли в среду Lymphoprep, занимающую 1/3 от объема пробирки, и центрифугировали в течение 20 мин при 2000 об/мин при 20°C без ускорения таким образом, чтобы не нарушать градиент. После центрифугирования мононуклеарные клетки выделяют и дважды промывают в PBS, содержащим 1% FCS (фетальная телячья сыворотка) + гепарин, в течение 20 мин при 1000 об/мин при 20°C.

Затем клетки использовали незамедлительно или замораживали их при -80°C в концентрации до 50×10⁶ клеток/мл в питательной среде RPMI 1640 с 50% FCS и 10% DMSO (диметилсульфоксид). Через 24 ч клетки переносят в атмосферу азота для сохранения.

Отрицательный отбор CD4.

CD4⁺ Т лимфоциты очищали от PBMC. После оттаивания клетки промывали и разбавляли в 40 мкл буфера для сортировки (PBS 0,5% BSA 2 mM EDTA) до 10×10⁶ клеток. Использовали набор MACS human CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec): добавляют 10 мкл раствора моноклональных антител, конъюгированных с биотином (первичное мечение), и смесь инкубировали в течение 10 мин при перемешивании при 4°C.

Затем клетки приводили в контакт с 20 мкл магнитных шариков, связанных с антителами к биотину (вторичное мечение) в течение 15 мин при перемешивании при 4°C. После промывания буфером для сортировки клетки сортировали на клеточном сортере Automacs (Miltenyi). Затем выделяли отрицательную фракцию, обедненную по CD4⁺ Т-мечеными клетками. Последнее позволяло получить популяцию CD4⁺, чистую приблизительно на 95%.

2. Активация и культура клеток.

Предварительная активация шариками CD3/CD28 и затем стимуляция mAb.

Т-клетки CD4⁺ разбавляли до концентрации 10⁶ клеток/мл средой для культур клеток и тканей RPMI, содержащей 10% FCS, в присутствии шариков CD3/CD28 (Dynabeads, Invitrogen) (1 клетка/1 шарик) и инкубировали в течение 48 ч при 37°C. Клетки затем отделяли от шариков при помощи магнита и Dynal Biotech, оставляли в течение ночи в RPMI, содержащей 10% FCS, в концентрации 10⁶ клеток/мл.

С другой стороны mAb против CD3 (ОКТ3), против ICOS (ICOS 88-2) и контрольные IgG1 mAb (Sigma) наносили на 96-луночный плоскодонный планшет в течение ночи при 4°C. Лунки покрывали 50 нг/мл антитела против CD3, дополненного 20 мкг/мл для других mAb PBS 1×100 мкл/лунку. На следующие сутки планшет промывали PBS, два часа насыщали PBS, содержащим 5% FCS (200 мкл на лунку). Т-клетки CD4⁺ ранее интернализированные CFSE (см. ниже) распределялись в закрытом планшете в концентрации 2105 клеток/200 мкл среды/лунку и инкубировали в течение 72 ч при 37°C. Через 48 ч супернатанты отбирали и через 72 ч клетки собирали для анализа пролиферации путем проточной цитометрии (фиг. 4).

Активация при помощи искусственных APC (антиген-представляющих клеток).

Магнитные шарики (Dynabeads M-450 Ероху, Invitrogen) промывали в натрий-фосфатном буфере 0,1М и затем инкубировали с mAb против CD3 (ОКТ3) в субоптимальной концентрации 1 мг/1×10⁷ шариков, при которой 5% mAb связываются с шариками, и с mAb против CD28 или ICOS (ICOS 88-2 или CD28.2), (2 мкг/1×10⁷ шариков, 10%). Эти искусственные APC инкубировали с mAb с медленным вращением в течение ночи при 4°C. На следующие сутки осуществляли две промывки в PBS 0,1% BSA. Искусственные APC распределялись по одному шарика на клетку в 96-луночных круглодонных планшетах, в лунки которых были внесены по 2×10⁵ лимфоцитов Т CD4⁺/200 мкл на лунку и затем инкубировали в течение 72 ч при 37°C. Т-клетки CD4⁺ ранее интернализировались CFSE. Через 48 ч супернатанты отбирали и через 72 ч клетки собирали для анализа пролиферации путем проточной цитометрии.

3. Клеточная пролиферация.

Пролиферацию лимфоцитов отслеживали при помощи CFSE (карбоксифлуоресцеиндиацетат сукцинимидильный эфир) (Molecular Probes, Invitrogen). CFSE проникает в клетки и не флуоресцирует. После проникновения в клетку эстеразы отщепляют ацетатные группы, которые начинают флуоресцировать, тогда как клетка становится непроницаемой.

Особенность CFSE заключается в том, чтобы распределяться в равной доле в каждой вновь образующейся клетке при каждом делении. Его излучение в зеленом диапазоне дает возможность для одновременного анализа количества, положения и стадии дифференцировки клеток, интенсивности флуоресценции на клетку, пропорциональной концентрации CFSE. Для мечения клеток CFSE клеточную суспензию разводили в охлажденном 1X PBS. Добавляли CFSE: 5 мкМ на 10×10⁶ клеток. Клетки затем помещали в водяную баню при 37°C.

После встряхивания в течение 8-10 мин клетки быстро переносили на лед для остановки реакции. Клетки затем дважды центрифугировали в 2 мл PBS 1X. Наконец клетки собирали в желаемом объеме RPMI с 10% FCS для клеточных культур. Пролиферацию определяли благодаря проточной цитометрии.

II. Проточная цитометрия.

CD4⁺ клетки, разбавленные 30% BSA PBS (фосфатный буфер с 30% бычьим сывороточным альбумином) (50 мкл/лунку), инкубировали в 96-луночном планшете в течение 10 мин при 4°C для насыщения неспецифических сайтов. Затем их инкубировали в течение 30 мин при 4°C в темноте с желаемыми антителами, связанными с флуорохромом.

После двух промываний в PBS 1X, содержащим 1% BSA, 0,02% азид (центрифугирование при 2100 об./мин, 3 мин при 4°C) клетки фиксировали в 200 мкл PBS, содержащего 2% формальдегид, и помещали в проточный цитометр (FACS Canto, BD Biosciences). Результаты анализировали при помощи программного обеспечения FlowJo.

III. ELISA (иммуноферментный анализ).

Культуральные супернатанты CD4⁺ Т-клеток отбирали после 48 ч и хранили при - 20°C для анализа на IL-10, IFN γ и TNF α .

Результаты.

1. Характеристики mAb против ICOS.

Авторы изобретения разработали 5 Ab против ICOS. Их изотип анализировали при помощи ELISA. Для осуществления опосредованного анализа их аффинности в отношении их рецептора mAb тестировали с использованием стабильных трансфектантов, экспрессирующих ICOS. Клетки ICOS.1 инкубировали в присутствии увеличивающейся концентрации mAb против ICOS, меченных зондом, связанным с флуорохромом (PE-GAM: козы анти тела против мышиных-PE), и анализ осуществляли при помощи проточной цитометрии.

Таким образом возможно определять ED50 (эффективная доза), т.е. концентрацию mAb, при которой насыщаются 50% сайтов. mAb с наименьшими ED50 представляют собой антитела, обладающие самой высокой установленной аффинностью.

Затем авторы изобретения тестировали способность mAb против ICOS ингибировать контактирование ICOS L (рекомбинантная форма домена FC человеческого IgG1), который несут клетки ICOS.1.

Авторы изобретения использовали градиент концентрации mAb против ICOS и выявили связывание с ICOSL-Fc благодаря зонду, связанному с флуорохромом (GАН-РЕ: козы антигела против человеческих-РЕ). Анализ осуществляли путем проточной цитометрии. Таким образом, авторы изобретения определили ID50, т.е. дозу, которая ингибирует 50% контактирования ICOSL-Fc на ICOS.

Чем меньше ID50 (средняя ингибирующая доза), тем легче mAb конкурируют с рекомбинантными ICOS Fc.

Таким образом, авторы изобретения выявили, что ICOS R 314-8 и ICOS R 53-3 обладают высокой аффинностью в отношении сайта их связывания ($ED_{50} < 0,5$ мкг/мл) и значимым блокирующим потенциалом ($ID_{50} < 1$ мг/мл).

Таким образом, антитело ICOS R 314-8 выбирали за связывание с флуорохромом Alexa Fluor 647 и использовали в анализе путем проточной цитометрии.

2. mAb против ICOS отличаются по их способности вызывать продукцию IL-10 путем активации $CD4^+$ Т-клеток.

Авторы изобретения тестировали способность mAb действовать в качестве агонистических антител, т.е. способных оказывать то же самое действие, что и природный лиганд ICOS, с использованием функциональных тестов. Исследуемый параметр представлял собой секрецию IL-10, поскольку ICOS вызывает продукцию IL-10 со стороны LT.

Агонистический потенциал mAb против ICOS тестировали на Т-клетках $CD4^+$, которые предварительно активировали при помощи шариков CD3/CD28 в течение 48 ч и распределяли по планшету, покрытому mAb против CD3 для продолжения стимуляции при различных mAb против ICOS.

Культуральные супернатанты затем измеряли в течение 48 ч в отношении IL-10, и секрецию IL-10, вызванную различными mAb против ICOS сравнивали на основе секреции IL-10, вызванной имеющимися в продаже mAb против ICOS (ICOS c) mAb против ICOS 53-3, 88-2 и 92-17 значительно увеличивали секрецию IL-10 у $CD4^+$ и, таким образом, они представляют собой агонистические антитела. В отношении mAb против ICOS 145-1 и 314-8 не обнаружено никакого значимого увеличения продукции IL-10.

Авторы изобретения наконец продемонстрировали, что mAb против ICOS 53-3, 88-2 и 92-17 являются лучшими агонистами по сравнению с имеющимися в продаже антителами против ICOS. Действительно, если предположить, что имеющиеся в продаже mAb ICOS выступают в качестве референсных, то mAb против ICOS 88-2 увеличивают секрецию IL-10 на 61%, mAb против ICOS 92-17 на 20% и mAb против ICOS 53-3 на 14%.

Результаты обобщены в следующей таблице:

mAb	Изотип	[ED] 50 (мкг/ мл)	[ID] 50 (мкг/ мл)	Действие агониста
ICOS 88-2	IgG1- L	1,60	17	+++
ICOS 314-8	IgG1- K	0,06	0,29	-

Пример 2. Применение антагонистического антитела по изобретению и агонистического антитела по изобретению.

Материалы и методы.

Иммуногистохимия.

Замороженные первичные срезы опухоли молочной железы окрашивали при помощи мышиных антител против FOXP3 или антител против Ki67 и выявляли с использованием набора для определения мышиных Ig-антител к пероксидазе (ImmPRESS anti-mouse Ig peroxidase kit) (Abcys, Paris, France) в соответствии с инструкциями производителя и при помощи DAB (диаминобензидина). Затем добавляли второе первичное антитело (мышиное антитело против ICOS (53.3), против CD3, против BDCA2) и выявляли при помощи набора ImmPRESS и Histogreen (Abcys). Специфичность окрашивания оценивали с использованием мышиных изотипных контролей вместо первого или второго первичного антитела.

Очистка мононуклеарных клеток из опухоли молочной железы, небных миндалин и крови здоровых доноров.

Мононуклеарные клетки (MNC) очищали из периферической крови здоровых индивидов, полученной в результате EFS или в результате ферментативного лизиса образцов первичных опухолей молочной железы или небных миндалин при помощи центрифугирования в градиенте плотности фикола.

Фенотипический анализ rDC и подгрупп Т-клеток.

Для расширенного фенотипического анализа rDC идентифицировали среди тотальных MNC, таких как $CD4^+CD123^+$ клетки, применяя связанные с FITC (флуоресцеин изотиоцианат) или PE (фикоэритрин) антитела против CD123 и PE-Cy5 антитела против CD4 и связанных с PE антитела против CD40, CD86 или ICOSL. Т-клетки идентифицировали как $CD3^+CD4^+$ клетки. Treg идентифицировали при помощи

мультицветного фенотипа $CD4^+ CD127^- CD25^{high}$ или по их экспрессии FoxP3 после селекции $CD3^+ CD4^+$ Т-клеток.

Пролиферацию Та-Treg и Та-Tconv или их клеток-партнеров в крови оценивали при помощи мультицветного анализа, дающего возможность для определения характеристик $CD4^+ (CD127^- CD25^{high})$ Treg и $(CD4^+ CD127^+ CD25^{Low/+})$ Tconv, ассоциированных с окрашиванием KI67 Ab.

Анализ путем проточной цитометрии осуществляли на FACScan (BD Biosciences) или на ADP Cyan (Beckman Coulter) и данные анализировали при помощи программного обеспечения Cell Quest Pro (BD Biosciences) или FlowJo (Treestar).

Очистка pDC.

pDC очищали из негативной линии (Lin) обогащенных MNC при помощи сортировки активированных магнитным полем клеток с использованием набора микрошариков CD304/BDCA-4 или негативной элиминации с использованием набора для выделения pDC (Miltenyi Biotec) или сортировки на FACS® (проточный цитометр FACSVantage SE™ DiVa, BD Biosciences) как и клеток $Lin^- CD4^+ CD11c^-$. Чистота регулярно составляла составляла >98%.

Получение in vitro DC из моноцитов (MoDC).

MoDC получали из очищенных моноцитов крови после 7 суток дифференцировки в GM-CSF (колониестимулирующий фактор гранулоцитов-макрофагов) (100 нг/мл) + IL-4 (50 МЕ/мл) (Schering Plough, Kenilworth USA).

Очистка Т-клеток памяти $CD4^+$ и Treg.

Т-клетки памяти $CD4^+$ (чистота >95%) получали из MNC после магнитной элиминации с использованием Ab против CD45RA, как описано (Gobert et al, 2009). Т-клетки $CD4^+ CD25^{high} CD127^-$ Treg и $CD4^+ CD25^- CD127^{low/+}$ обычные Т-клетки подвергали сортировке при помощи FACS® из очищенных Т-клеток памяти $CD4^+$ (чистота >98%).

Для обеспечения пролиферации in vitro очищенные Т-клетки памяти $CD4^+$ окрашивали на 0 сутки CFSE. Жизнеспособные клетки отбирали методом невключения красителя DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид) или с помощью реактива "Live and Dead" в случае клеточной пермеабилзации (200000 и 5000 событий минимум приходилось на общую клеточную популяцию и на очищенные клетки соответственно).

Сокультура клеток DC-Т.

Аллогенные Т-клетки памяти $CD4^+$, Treg или $CD4^+$ Tconv культивировали в концентрации 3×10^4 - 5×10^4 клеток в полной среде с IL-2 (100 МЕ/мл) и высокоочищенными TApDC, pDC здоровых доноров или MoDC, предварительно активированными в течение 24 ч при помощи IL-3, GM-CSF (10 нг/мл) в присутствии R848. Добавление Т-лимфоцитов к предварительно активированным группам DC осуществляли в трех параллелях в 96-луночных круглодонных планшетах в отношении 1:5 (DC/Т-клетки) и выращивали вместе в течение 5 суток. Пролиферацию определяли при помощи разбавления CFSE в экспериментах, в которых анализировали экспрессию FoxP3 или при помощи анализа синтеза ДНК за счет включения 3H -TdR (3H -тимидин).

Влияние на контактирования ICOS/ICOSL определяли путем добавления контрольных Ab, имеющих в продаже (ISA-3), или полученных самостоятельно (314.8) антител против ICOS Ab или против ICOSL (MIN12) в культурах. Для определения секреции цитокинов Т-клеток при помощи ELISA клетки выращивали вместе с pDC или TApDC, и супернатанты, собираемые на 5 сутки, центрифугировали и хранили при -20°C.

Стимуляция Tconv и Treg при помощи искусственных шариков.

Искусственные APC получали, как описано в примере 1. Treg (концентрация 3×10^4) или Tconv (концентрация 1×10^5), сортированные из клеток небных миндалин или Т-клетки Та- $CD4^+$ (1×10^5), выделенные из опухолей, выращивали в течение 5 суток с искусственными шариками в отношении 1:1 (искусственные APC:Т-клетка) в присутствии IL-2 (100 МЕ/мл) в 96-луночных планшетах имеющих U-форму дна и объем 200 мкл. Пролиферацию определяли методом разбавления CFSE или при помощи синтеза ДНК, который анализировали по включению 3H -TdR.

Обнаружение цитокинов в супернатантах культуры Т-клеток при помощи ELISA.

Уровень IL-10, IFN γ и IL-2 в супернатантах культуры количественно определяли на 5 сутки при помощи ELISA с использованием имеющихся в продаже наборов от Bender Medsystems в соответствии с указаниями производителя.

Результат.

Представленные ниже данные предназначены для анализа влияния двух антител против ICOS (т.е. блокирующего MAb 314.8; агонистического MAb 88.2), разработанных авторами изобретения для доказательства

- 1) блокады ICOS антагонистическим 314.8 MAb в качестве нового многообещающего кандидата в лекарство для прерывания иммуносупрессорного ответа, обнаруженного при раке молочной железы; и
- 2) контактирования ICOS с агонистическим 88.2 MAb на $CD4^+$ Т-клетках, которое благоприятствует амплификации Treg, что может представлять интерес в области аутоиммунитета.

Ta-Treg, которые демонстрируют высокий уровень экспрессии ICOS, представлены в лимфоидных агрегатах в первичных опухолях молочной железы и пролиферируют *in situ*.

Авторы изобретения ранее продемонстрировали присутствие ассоциирующихся с опухолью регуляторных Т-клеток (Ta-Treg), экспрессирующих CD25^{high} и FoxP3 в первичных опухолях молочной железы в лимфоидных агрегатах, коррелирующих с неблагоприятным прогнозом и увеличенным риском метастаз (Gobert et al., 2009). Эти Ta-Treg клетки, составляющие от 15 до 25% от общего количества клеток CD4⁺ TaT, в высокой степени активируются, поскольку они экспрессируют ICOS, CD39, GITR и HLA-DR и подавляют пролиферацию TaTconv и секрецию цитокинов (IL-2, IFN γ).

Эти Ta-Treg пролиферируют в первичной опухоли молочной железы *in situ* (Gobert et al., 2009), что продемонстрировано за счет присутствия ICOS⁺ Treg, коэкспрессирующих Ki67 на замороженных срезах опухолей (фиг. 1A), или более высокую долю клеток Ki67⁺ в очищенных Ta-Treg и Treg крови (соответственно 8 и 4%) по сравнению с Ta-Tconv и Tconv (3 и 0,3% соответственно) (фиг. 1B).

В отличие от этих *in vivo* результатов авторы изобретения продемонстрировали, что *in vitro* стимуляция очищенных Ta-Treg при помощи увеличенных шариков (шариков, покрытых агонистическими антителами против CD3 и против CD28) не способна благоприятствовать увеличению количества клеток Ta-Treg в противоположность тому, что обнаружено для очищенных клеток TaTconv или очищенных клеток Treg или Tconv из крови здоровых доноров (фиг. 1C).

Авторы изобретения выдвинули гипотезу о том, что контактирование с ICOS важно для пролиферации и функционирования клеток Ta-Treg.

А) Применение антагонистического антитела по изобретению.

Блокада взаимодействия ICOS/ICOS-L при помощи антагонистического ICOS mAb (314.8).

Ta-Treg взаимодействует *in situ* с Ta-pDC в лимфоидных агрегатах при первичной карциноме молочной железы.

В нескольких исследованиях сообщалось об экспрессии ICOS-L, представляющего собой специфический лиганд ICOS на pDC (Janke et al., 2006). С использованием иммуногистохимии на замороженных срезах опухолей авторы изобретения обнаружили, что Ta-CD3⁺ Т-клетки, представленные в лимфоидных агрегатах, окружающих опухоль, взаимодействуют с Ta-pDC BDCA2⁺ (фиг. 1D и 1E). Двойное окрашивание при помощи FoxP3 и BDCA2 Ab выявило, что Ta-Treg находятся в тесном контакте с Ta-pDC в этих лимфоидных агрегатах, свидетельствуя о том, что это взаимодействие благоприятствует контактированию ICOS с ICOS-L в опухолях (фиг. 1F).

Ta-pDC активируются, но не экспрессируют ICOS-L в качестве возможного следствия взаимодействия ICOS/ICOS-L *in situ*.

После очистки путем дезагрегации из опухоли Ta-pDC демонстрируют активированный фенотип, поскольку они экспрессируют увеличивающиеся уровни CD86 и CD40 по сравнению с кровью здоровых доноров и соответствуют pDC крови пациента. В соответствии с тем, что сообщалось несколькими группами (Ito et al., 2007; Janke et al., 2006), свежeweделенные pDC из крови здоровых доноров экспрессируют низкие уровни ICOS-L, которые являются весьма беспорядочными после воздействия IL-3 или лигирования TLR7/8, что не обнаружено на других подгруппах DC (mDC, MoDC). Интересно то, что в противоположность активированному состоянию (CD86⁺CD40⁺), Ta-pDC лишены экспрессии мембранного ICOS-L. Наоборот, свежeweделенные парные pDC крови пациентов или pDC из крови здоровых доноров экспрессируют ICOS-L. После периода выращивания в течение 24 ч в IL-3 или при лигировании TLR7/8, отсортированные Ta-pDC вновь приобретают сильную экспрессию ICOS-L, демонстрируя их способность модулировать эту экспрессию ICOS-L (данные не представлены). Среди всех CD3⁺ TaT клеток ICOS в существенной степени экспрессируются на Ta-Treg (69,9% MFI: 361) в противоположность TaTconv (23% MFI: 83) или TaCD8⁺ (2% MFI: 50). Эти результаты свидетельствуют о том, что *in situ* взаимодействие ICOS/ICOS-L приводит к понижающей регуляции ICOS-L на мембране Ta-pDC.

Блокада взаимодействия ICOS/ICOS-L при помощи антагонистического MAb против ICOS (314.8) прекращает понижающую регуляцию ICOS-L на pDC.

Для проверки этой гипотезы Т-клетки крови здоровых доноров выращивали с TLR7-активированными pDC, очищенными из небных миндалин. Авторы изобретения обнаружили после периода выращивания в течение 24 ч с увеличенным отношением Т:pDC дозозависимую понижающую регуляцию ICOS-L на pDC. Интересно то, что добавление антагонистического MAb против ICOS (314.8) полностью прекращает эту понижающую регуляцию ICOS-L на pDC, причем этот результат не воспроизводится с использованием имеющегося в продаже антитела против ICOS (ISA-3) (данные не представлены).

Эти результаты демонстрируют взаимодействия Ta-pDC и Ta-Treg посредством ICOS/ICOS-L и свидетельствуют о том, что лигирование ICOS может быть вовлечено в активацию и пролиферацию Ta-Treg.

Совместное выращивание CD4⁺ Т-клеток, а также очищенных Treg с активированными pDC, но не MoDC, вызывает пролиферацию Treg, которая блокируется при помощи 314.8.

Для тестирования способности взаимодействий ICOS/ICOS-L вызывать увеличение количества Treg авторы изобретения выращивали тотальные CD4⁺ Т-клетки памяти с очищенными из крови здоровых

доноров аллогенными активированными TLR7/8 (R848) pDC или mDC. Среди очищенных CD4⁺ Т-клеток 3,5% экспрессировали FoxP3 (данные не представлены). После 5 суток совместного выращивания с pDC доля клеток, экспрессирующих FoxP3^{high}, соответствующих Treg, увеличивается до 12,3%, и добавление 314.8 Ab блокирует на 80% это обогащение клетками FoxP3^{high}. Наоборот, совместное выращивание CD4⁺ Т-клеток с активированными mDC не обладало способностью благоприятствовать отличающейся субпопуляции FoxP3^{high} среди CD4⁺ Т-клеток, и добавление 314.8 не оказывало значимого действия (от 6,3 до 8%).

Похожие результаты получены для CD4⁺ Т-клеток, очищенных из опухоли. Та-Treg Foxp3⁺ составляют 9% от свежечистых CD4⁺ ТаТ-клеток (данные не представлены). Их совместное выращивание с активированными R848 pDC увеличивает долю Та-Treg до 14,5%, тогда как добавление 314.8 приводит к уменьшению доли Та-Treg до 4,5%, ниже исходного уровня.

Отсортированные при помощи FACS очищенные популяции Treg или Tconv, окрашенные CFSE, выращивали с активированными R848 pDC или активированными LPS MoDC для анализа их способности к пролиферации путем проточной цитометрии (разбавление экспрессии CFSE). Во-первых, авторы изобретения обнаружили, что в отсутствие экзогенного IL-2 активированные MoDC не вызвали пролиферацию очищенного Treg, тогда как Tconv сильно пролиферировали. Наоборот, совместное выращивание с активированными pDC способно вызвать сильную пролиферацию очищенных Treg и Tconv.

Добавление MAб против ICOS 314.8 значительно уменьшает пролиферацию Treg и Tconv, когда pDC используют в качестве APC (антигенпрезентирующая клетка), тогда как пролиферация Tconv не изменяется в сокультурах с MoDC. В этом эксперименте блокирование ICOS или ICOS-L при помощи имеющихся в продаже антител (ISA-3 mAb или MIN-12 MAб) не влияет ни на пролиферацию Treg, ни на пролиферацию Tconv в сокультурах pDC/T.

Эти данные демонстрируют то, что MAб против ICOS 314.8 нейтрализует контактирование ICOS с Treg и прекращает их экспансию, вызванную pDC.

Блокирование ICOS и ICOS-L прекращает секрецию IL-10 во время опосредованной pDC Т-клеточной активации, не оказывая существенного влияния на сокультуру MoDC/T 314.8 MAб также уменьшает пролиферацию Tconv в ответ на стимуляцию активированными pDC. Авторы изобретения определили влияние 314.8 на секрецию IFN γ и IL-10 при помощи Elisa во время совместного выращивания Tconv и аллогенных активированных R848 pDC (фиг. 2А) или активированных LPS MoDC (фиг. 2В). В этих условиях секреция IL-10 полностью прекращается за счет 314.8 mAb (217 $\pm$ 31 пг/мл в контроле и 13 $\pm$ 6 пг/мл с 314.8). Тогда как секреция IFN γ слегка уменьшалась при добавлении 314.8 MAб в сокультурах с pDC (32% уменьшение, 507 $\pm$ 53 пг/мл в контроле и 341 $\pm$ 73 пг/мл с 314.8) (фиг. 2А). В сокультурах Tconv/MoDC ингибирование ICOS приводит к слегка увеличенным секрециям IL-10 и IFN γ (фиг. 2В).

Б) Применение агонистического антитела в соответствии с изобретением.

Применение агонистического MAб против ICOS (88.2) для имитации вовлеченности ICOS.

Для того чтобы улучшить понимание функции ICOS на Treg и Tconv, авторы изобретения создали модель искусственной APC, используя шарики, покрытые агонистическими MAб, обеспечивающими сигналинг, опосредованный CD3 (ОКТ3); CD28 (CD28.2) и/или ICOS (88.2, табл. 1) на очищенных Т-клетках.

Вовлеченность ICOS с агонистическим MAб (88.2) на Treg приводила к их пролиферации и их способности секретировать высокие количества IL-10.

Сначала авторы изобретения обнаружили, что Treg здоровых доноров пролиферируют в ответ на шарики, покрытые антителами против CD3/88.2 в присутствии экзогенного IL-2 (фиг. 3А). Как сообщалось ранее (Simpson et al., 2010; Ito et al., 2008), при активации путем вовлеченности TCR и ICOS в присутствии IL-2, обе очищенные субпопуляции Tconv и Treg секретируют высокие количества IL-10 (311 $\pm$ 22 пг/мл и 426 $\pm$ 48 пг/мл соответственно) и низкие уровни IFN γ (205 $\pm$ 8 пг/мл и 381 $\pm$ 12 пг/мл). Этот результат противоречит данным, полученным с использованием шариков, покрытых антителами против CD3/против CD28. В этой модели Tconv секретируют большие количества IFN γ (1213 $\pm$ 72 пг/мл) и низкие уровни IL-10 (69 $\pm$ 58 пг/мл), тогда как Treg секретируют IL-10 и низкие уровни IFN γ (422 $\pm$ 36 пг/мл и 305 $\pm$ 31 пг/мл соответственно) (фиг. 3В).

Похожие эксперименты с Т-клетками, очищенными из опухоли, продемонстрировали, что CD4⁺ ТаТ-клетки продуцируют похожие уровни IL-10 в ответ на ICOS и CD28, тогда как уровни IFN γ являются более слабыми в ответ на вовлеченность ICOS по сравнению с CD28 (фиг. 3С).

Контактирование с ICOS блокирует CD28-вызванные IL-2 и затем уменьшает пролиферацию и секрецию IFN γ .

Хотя CD4⁺ Т-клетки памяти пролиферируют в ответ на стимуляцию антителами против CD3/против CD28 независимо от экзогенного IL-2, никакую пролиферацию не обнаруживают в ответ на стимуляцию антителом против CD3/88.2 (фиг. 4А). Добавление hIL-2 уменьшает указанную пролиферацию в зависимости от дозы. Интересно то, что одновременная вовлеченность ICOS и CD28 в отсутствие IL-2 значительно уменьшает пролиферацию CD4⁺ Т-клеток памяти по сравнению с вовлеченностью только CD28, и она полностью восстанавливается в присутствии 100 МЕ IL-2/мл. Интересно то, что лигирование ICOS через

88.2 mAb прекращает секрецию IL-2, обнаруженную при стимуляции антителами против CD3/против CD28 (фиг. 4B). Взятые вместе, эти факты свидетельствуют в пользу уменьшенной спонтанной секреции IL-2, когда ICOS и CD28 контактируют вместе по сравнению с контактированием только с CD28, что свидетельствует об ингибирующей функции ICOS в отношении CD28-вызванной секреции IL-2.

Кроме того, даже в присутствии экзогенного IL-2, авторы изобретения обнаружили 50% уменьшение продукции IFN γ клетками Tconv, когда ICOS и CD28 иницируются шариками, покрытыми антителами против CD3/против CD28 (фиг. 4C).

Наоборот, хотя секреция IL-10 строго зависит от IL-2, когда клетки активируются при активации ICOS, как описано ранее (Ito 2008, Paulos 2010), добавление сигнала ICOS не влияет на секрецию IL-10, вызванную антителами против CD3/против CD28 (фиг. 4C).

Все вместе эти результаты демонстрируют, что лигирование ICOS уменьшало способность антител против CD3/против CD28 благоприятствовать поляризации Th1 (путем уменьшенной продукции IFN γ), но поддерживало продукцию IL-10, благоприятствующую развитию иммуносупрессорного окружения.

Вовлеченность ICOS через 88.2 MAb увеличивала супрессорную функцию Treg.

Для оценки того что вовлеченность ICOS может ассоциироваться с иммуносупрессорным T-клеточным ответом, авторы изобретения разработали анализы супрессии в отсутствие экзогенного IL-2 для сравнения эффективности шариков, покрытых антителами против CD3/против CD28/IgG и против CD3/против CD28/88.2. Добавление сигнальной молекулы ICOS (88.2) сильно увеличивало подавляющую функцию Treg по сравнению с антителами против CD3/против CD28/IgG1 (51% ингибирование в случае одного Treg для 4 Tconv против CD3/против CD28/88.2 по сравнению с 21% ингибированием с антителами против CD3/против CD28/IgG). Все вместе эти результаты демонстрирует, что вовлеченность ICOS благоприятствует иммуносупрессорному T-клеточному ответу, который может приводить в результате к увеличенной чувствительности Tconv к супрессии или более сильной супрессорной способности Treg.

Пример 3. Анализ прогностического влияния детекции клеток ICOS⁺ Treg в первичных опухолях молочной железы.

120 залитых в парафин образцов первичных опухолей с 10-летним клиническим наблюдением тестировали в отношении их экспрессии ICOS с использованием имеющегося в продаже кроличьего поликлонального Ab против ICOS (Spring Biosciences). Клетки ICOS⁺ количественно определяли в двойном слепом исследовании на 6 различных повторях для каждой опухоли и вычисляли средние значения результатов (данные не представлены). Для осуществления статистического анализа авторы изобретения использовали медиану в качестве порогового значения для получения уравновешенных групп.

В одномерном анализе авторы изобретения продемонстрировали, что присутствие клеток ICOS⁺ (>1,66 клеток ICOS⁺/пятно) коррелирует с высокой степенью злокачественности опухоли ($p=0,007$), экспрессией эстрогенового рецептора опухолевыми клетками ($p=0,018$), люминальными A/B молекулярными подтипами ($p<0,001$) и отсутствием сверхэкспрессии Her2/neu ($p=0,035$).

Исследовали влияние обнаружения клеток ICOS⁺ в первичных опухолях молочной железы на общую выживаемость (OS) или выживаемость без прогрессирования (PFS).

Тогда как 6/59 смертей были обнаружены в группе ICOS⁻, 14/61 пациентов умирали в ICOS⁺, демонстрируя значимое прогностическое влияние ICOS⁺ на OS (p - значение логарифмического рангового критерия = 0,0465) (фиг. 9A). Похожий анализ, проведенный на PFS, продемонстрировал, что клетки ICOS⁺ ассоциировались с ухудшением общей выживаемости, с прогрессированием заболевания у 11/59 в группе ICOS⁻, тогда как у 20/61 пациентов наблюдался прогресс в группе ICOS⁺ ($p=0,0285$) (фиг. 9B).

Пример 4. Подтверждение присутствия in situ взаимодействия pDC с ICOS⁺ Treg в опухолевом окружении.

Совместно ex vivo выращивали лизаты опухолевых клеток в присутствии антител ICOS 314.8 MAb или контрольного Ab в течение 48 ч в присутствии IL-3 (20 нг/мл). В конце периода выращивания экспрессию ICOS-L на pDC обнаруживали только в присутствии антител ICOS 314.8 MAb, и не с контрольным Ab, демонстрируя, что понижающая регуляция ICOS-L на pDC опосредована путем взаимодействия с клетками ICOS⁺ (данные не представлены).

Пример 5. Клетки опухоли эпителия молочной железы из стабилизированной клеточной линии или свежих образцов опухоли не экспрессировали ICOS-L в отличие от клеток меланомы или глиомы даже после выращивания ex vivo с антителом ICOS 314.8.

Линии клеток опухоли эпителия молочной железы собирали в PBS EDTA для того, чтобы избежать ассоциирующейся с трипсином деградации Ag, и клетки окрашивали антителом против ICOS-L для оценки их экспрессии на поверхности клеток путем проточной цитометрии. Ни одна из тестируемых линий клеток не оказалась положительной в отношении ICOS-L (фиг. 5A). Похожие анализы провели на выращиваемых в течение 48 ч лизатах первичной опухоли в присутствии Ab против ICOS (314.8) или контрольного Ab с IL-3 (20 нг/мл) (фиг. 5B).

Пример 6. Влияние суррогатного крысиного Ab против мышинного антитела против ICOS (17G9, IgG2b) на рост опухоли молочной железы в сингенной модели опухоли молочной железы.

Мышиную модель опухоли молочной железы получали для самок мышей FVB на 28-35 сутки после ортотопической инъекции клеточной линии Neu 15. Образующиеся опухоли по-видимому значимо инфильтрировались активированными Ta-pDC, ICOS^{high} TATreg и TATconv в состоянии покоя.

Инъекция антитела 17G9 (50 мкг/мл) интраперитонеально трижды в неделю, начиная с 11 суток после имплантации опухоли, приводила в результате к уменьшению размера опухоли Neu15 в поздние моменты времени по сравнению с инъекцией контрольного Ab (LTF2, IgG2b) ($p=0,053$) (фиг. 6).

Пример 7.

А. Количество клеток Treg увеличивается при первичном раке шейки матки.

Образцы шейки матки получены у пациентов с дисплазией (CIN2/3, $n=18$) или раком ($n=14$). В качестве контроля использовали нормальную ткань шейки матки ($n=11$). Образцы получали при помощи ферментативной и физической диссоциации. После промывания моноклеарные клетки инкубировали с мечеными mAb и Treg, обозначенными как CD127^{low}CD25^{bright}CD4⁺ T-клетки. Отображен процент Treg в подмножестве CD4⁺. Treg увеличивался в образцах рака шейки матки по сравнению с нормальной тканью и дисплазией. Следовательно, это увеличение ассоциируется с развитием рака (фиг. 7A).

Б. Количество клеток Treg ICOS⁺ увеличивается при первичном раке шейки матки.

Образцы шейки матки отбирали у пациентов, страдающих от дисплазии (CIN2/3, $n=5$) или рака ($n=12$). Нормальную ткань шейки матки использовали в качестве контроля ($n=5$). Образцы получали при помощи ферментативной и физической диссоциации. После промывания моноклеарные клетки инкубировали с ICOS mAb в качестве метки и подсчитывали клетки Treg. Процент Treg ICOS в подмножестве CD4⁺, отображаемый как ICOS⁺ Treg, представлен в тканях с единственной тенденцией их увеличения при раке шейки матки вследствие ограниченного количества проанализированных образцов (фиг. 7B).

Пример 8. Увеличение ICOS экспрессирующих Treg при неходжкинской лимфоме (NHL).

Авторы изобретения проанализировали количество Treg и экспрессию ICOS на Treg в образцах LNH. Свежеприготовленные клетки лимфомы, препарированные из лимфатических узлов, отбирали у 45 пациентов, проинформированных о последствиях. Образцы лимфомы соответствовали ходжкинской лимфоме (HD, $n=11$), фолликулярной лимфоме (FL, $n=13$), диффузной В-крупноклеточной лимфоме (DLBCL, $n=10$), лимфоме из клеток мантии (MCL, $n=5$) и лимфоме из клеток маргинальной зоны (MZL, $n=6$). Обнаружение клеток Treg осуществляли путем инкубации в течение 20 мин при 4°C с антителом против ICOS-PE (Becton DickinsonTM), с антителом против CD3-ECD, с антителом против CD4-Pacific Blue (Beckman Coulter®), с антителом против CD127 FITC, с антителом против CD25 APC-Cy7 и с набором, дифференцирующим живые, жизнеспособные и погибшие клетки, LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit (InvitrogenTM). После окрашивания каждый клеточный препарат дважды промывали в PBS, фиксировали 2% параформальдегидом и анализировали на проточном цитометре FACS LSR2 (Becton DickinsonTM). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (TreeStarTM). Количество Treg увеличивалось во всех образцах лимфомы за исключением HD. Большая часть Treg демонстрировала увеличенную экспрессию ICOS по сравнению с контрольными лимфатическими узлами (фиг. 8).

Пример 9. Секвенирование ICOS 314.8 (CNCM I-4180).

Тотальную РНК экстрагировали из предварительно замороженных клеток гибридомы и синтезировали кДНК (комплементарную ДНК). Затем осуществляли ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) для амплификации переменных областей (тяжелая и легкая цепи) в MAb. Переменные области в MAb тяжелой и легкой цепей клонировали в вектор для клонирования по отдельности, затем полученные последовательности анализировали для установления последовательности MAb.

Материалы.

Клетки гибридомы ICOS 314.8 (CNCM I-4180); система очистки РНК TRIzol® Plus RNA Purification System (Invitrogen, кат. № 15596-026); система для синтеза первой цепи SuperscriptTM III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, кат. № 18080-051).

Методы.

Экстракция тотальной РНК.

Тотальную РНК выделяли из клеток гибридомы в соответствии с техническим руководством к системе очистки РНК TRIzol® Plus RNA Purification System. Тотальную РНК проверяли при помощи гелелектрофореза.

ОТ-ПЦР.

Тотальную РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием изотипспецифического антисмыслового праймера или универсального праймера, и вся процедура проводилась в соответствии с техническим руководством к SuperscriptTM III First-Strand Синтез System. Фрагмент антитела амплифицируют в соответствии со стандартным рабочим протоколом метода RACE от GenScript.

Клонирование генов антитела.

Продукты направленной на гены антител ПЦР клонировали в вектор по отдельности в соответствии со стандартными способами молекулярного клонирования.

Скрининг и секвенирование.

Скрининг колоний использовали для отбора клонов со вставками правильных размеров, и не меньше чем десять независимых положительных колоний секвенировали для каждого фрагмента антитела.

Результаты и анализ.

Экстракция тотальной РНК.

Тотальную РНК образца анализировали параллельно с маркером ДНК DL3000 при помощи гель-электрофореза на 1,5% агарозном геле/GelRed TM.

Продукт ПЦР генов антитела.

4 мкл продуктов ПЦР для каждого образца анализировали параллельно с маркером ДНК DL3000 при помощи гель-электрофореза на 1,5% агарозном геле/GelRed TM.

Результаты секвенирования и анализ.

Результаты секвенирования являются следующими.

Консенсусные последовательности ДНК и соответствующие аминокислотные последовательности представлены ниже.

Тяжелая цепь: последовательность ДНК (426 п.о.): лидерная последовательность-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGGGATGGCGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTATCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG
GTCCAACACAGCAGCCTGGGACTGAACTTATGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGC
TTCTGGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGT
GGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGATAGTTATGTTAACTACAATCAAACTTTAAGGGCAAGGCCACA
TTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATACAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGC
GGTCTATTTTGTGCGAGATCCCTGATTACTACGGTACTAGTCTTGCTGGTTGATTACTGGGGCCA
AGGACTCTGGTCACTGTCTCTACA (SEQ ID NO:13)

Тяжелая цепь: аминокислотная последовательность (142 а.к.): лидерная последовательность-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MGWRCILFLVSTATGVHSQVQLQQPGTELMKPGASVKLSCKASGYTFTTYWMHWVKQRPQG
GLEWIGEIDPSDSYVNYNQNFKGKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYFCARSPDYGTSLAWFDYWG
QGTSLTVST (SEQ ID NO:14)

Легкая цепь: последовательность ДНК (396 п.о.): лидерная последовательность-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGAGGTGCCTAGCTGAGTTCCTGGGGCTGCTTGCTCTGGATCCCTGGAGTCATTGG
GGATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCTG
CAGGTCTAGTAAGAGTCCCCTGCATAGTAACGGCAACATTTACTTATATTGGTTCCTGCAGAGGCCAG
GCCAGTCTCCTCAGTCTCTGATATATCGGATGTCCAACCTTGCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTG
GCAGTGGGTGAGGAACACTTTACACTGAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTAT
TACTGTATGCAACATCTAGAATATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ
ID NO:15)

Легкая цепь: аминокислотная последовательность (132 а.к.): лидерная последовательность-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MRCLAELGLLVLPWPGVIGDIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSPLHSNGNIYLYWFLQRPQ
QSPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSTFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID
NO:16)

Таким образом, последовательности ICOS 314.8 (CNCM I-4180) могут быть обобщены следующим образом:

	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
H-CDR1	GGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGC AC (SEQ ID NO:1)	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO:7)
H-CDR2	GAGATTGATCCTTCTGATAGTTATGTTAA CTACAATCAAACTTTAAGGGC (SEQ ID NO:2)	EIDPSDSYVNYNQNFKG (SEQ ID NO:8)
H-CDR3	TTTGATTAC (SEQ ID NO:3)	FDY (SEQ ID NO:9)
L-CDR1	AGGTCTAGTAAGAGTCCCCTGCATAGTA ACGGCAACATTTACTTATAT (SEQ ID NO:4)	RSSKSPLHSNGNIYLY (SEQ ID NO:10)
L-CDR2	CGGATGTCCAACCTTGCTCA (SEQ ID NO:5)	RMSNLAS (SEQ ID NO:11)
L-CDR3	ATGCAACATCTAGAATATCCGTACACG (SEQ ID NO:6)	MQHLEYPYT (SEQ ID NO:12)

Пример 10. Секвенирование Icos 88.2 (CNCM I-4177).

Тотальную РНК экстрагировали из предварительно замороженных клеток гибридомы и синтезировали кДНК. Затем осуществляли ОТ-ПЦР для амплификации вариабельных областей (тяжелая и легкая цепи) в МАb. Вариабельные области в МАb тяжелой и легкой цепей клонировали в вектор для клонирования по отдельности, затем полученные последовательности анализировали для установления последовательности МАb.

Материалы.

Клетки гибридомы ICOS 88.2 (CNCM I-4177); система очистки РНК TRIzol® Plus RNA Purification System (Invitrogen, кат. № 15596-026); система для синтеза первой цепи Superscript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, кат. № 18080-051).

Способы.

Экстракция тотальной РНК.

Тотальную РНК выделяли из клеток гибридомы в соответствии с техническим руководством к системе очистки РНК TRIzol® Plus RNA Purification System. Тотальную РНК проверяли при помощи гель-электрофореза.

ОТ-ПЦР.

Тотальную РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием изотипспецифического антисмыслового праймера или универсального праймера, полная процедура проводилась в соответствии с техническим руководством к системе Superscript™ III First-Strand Synthesis System. Фрагмент антитела амплифицируют в соответствии со стандартным рабочим протоколом метода RACE от GenScript.

Клонирование генов антитела.

Продукты направленной на гены антител ПЦР клонировали в вектор по отдельности в соответствии со стандартными способами молекулярного клонирования.

Скрининг и секвенирование.

Скрининг колоний использовали для отбора клонов со вставками правильных размеров и не меньше чем десять независимых положительных колоний секвенировали для каждого фрагмента антитела.

Результаты и анализ.

Экстракция тотальной РНК.

Образец тотальной РНК анализировали параллельно с маркером ДНК DL3000 при помощи гель-электрофореза на 1,5% агарозном геле/GelRed TM.

Продукт ПЦР генов антитела.

4 мкл продуктов ПЦР для каждого образца анализировали параллельно с маркером ДНК DL3000 при помощи гель-электрофореза на 1,5% агарозном геле/GelRed TM.

Результаты секвенирования и анализ.

Результаты секвенирования являются следующими.

Консенсусные последовательности ДНК и соответствующие аминокислотные последовательности представлены ниже.

Тяжелая цепь: последовательность ДНК (429 п.о.): лидерная последовательность-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG
GTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGC
TTCTGGCTACAGTTTCACCAGCTACTGGATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGT
GGATCGGAATAATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAATCAAATGTTCAAGGACAAGGCCACA
TTGACTGTAGACAAATCCTCCAACACAGCCTACATGCAGCTCACCAGCCGACATCTGAGGACTCTGC
GGTCTATTACTGTACAAGATGGAATCTTCTTATTACTTCGATAATAACTACTACTTGGACTACTGGGG
CCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCTCA (SEQ ID NO:29)

Тяжелая цепь: аминокислотная последовательность (143 а.к.): лидерная последовательность-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLQPGAEVLRPGASVKLSCKASGYSFTSYWINVWKQRPQGQ
LEWIGNIYPSDSYTNYNQMFKDKATLTVDKSSNTAYMQLTSPSTSEDSAVYYCTRWNLSYYFDNNYYLDY
WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:30)

Легкая цепь: последовательность ДНК (396 п.о.): лидерная последовательность-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGAGGTGCCTAGCTGAGTTCTCTGGGGCTGCTTGCTCTGGATCCCTGGAGCCATTGG
GGATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCTG
CAGGTCTAGTAAGAGTCTCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTAATGGTTCTGACAGAGGCCAG

GCCAGTCTCCTCAACTCCTGATATATCGGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTG
GCAGTGGGTCAGGAAGTCTTTCACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTAT
TACTGTATGCAACATCTAGAATATCCGTGGACGTTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ
ID NO:31)

Легкая цепь: аминокислотная последовательность (132 а.к.): лидерная последовательность-FR1-
CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MRCLAEFLGLLVLPWIPGAIGDIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLSNGNTYLYWFLQRP

GQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSFTAFLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPWTFGGGKLEIK (SEQ
ID NO:32)

Таким образом, последовательности ICOS 88.2 (CNCM I-4177) могут быть обобщены следующим образом:

	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
H-CDR1	GGCTACAGTTTCACCAGCTACTGGATAAAC (SEQ ID NO:17)	GYSFTSYWIN (SEQ ID NO:23)
H-CDR2	AATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTA CAATCAAATGTTCAAGGAC (SEQ ID NO:18)	NIYPSDSYTNYNQMFKD (SEQ ID NO:24)
H-CDR3	TGGAATCTTTCTTATTACTTCGATAATAACTA CTACTTGGACTAC (SEQ ID NO:19)	WNLSYYFDNNYYLDY (SEQ ID NO:25)
L-CDR1	AGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATG GCAACACTTACTTGTAT (SEQ ID NO:20)	RSSKSLLSNGNTYLY (SEQ ID NO:26)
L-CDR2	CGGATGTCCAACCTTGCCTCA (SEQ ID NO:21)	RMSNLAS (SEQ ID NO:27)
L-CDR3	ATGCAACATCTAGAATATCCGTGGACG (SEQ ID NO:22)	MQHLEYPWT (SEQ ID NO:28)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, направленное против ICOS, выбранное из антител Icos 53-3, Icos 88-2 и Icos 92-17, получаемых, соответственно, из гибридом CNCM I-4176, CNCM I-4177 и CNCM I-4178.

2. Антитело по п.1, имеющее следующие 6 CDR:

	Аминокислотная последовательность
H-CDR1	GYSFTSYWIN (SEQ ID NO:23)
H-CDR2	NIYPSDSYTNYNQMFKD (SEQ ID NO:24)
H-CDR3	WNLSYYFDNNYYLDY (SEQ ID NO:25)
L-CDR1	RSSKSLLSNGNTYLY (SEQ ID NO :26)
L-CDR2	RMSNLAS (SEQ ID NO :27)
L-CDR3	MQHLEYPWT (SEQ ID NO :28)

3. Антитело по п.2, где нуклеотидные последовательности, кодирующие указанные 6 CDR, являются следующими:

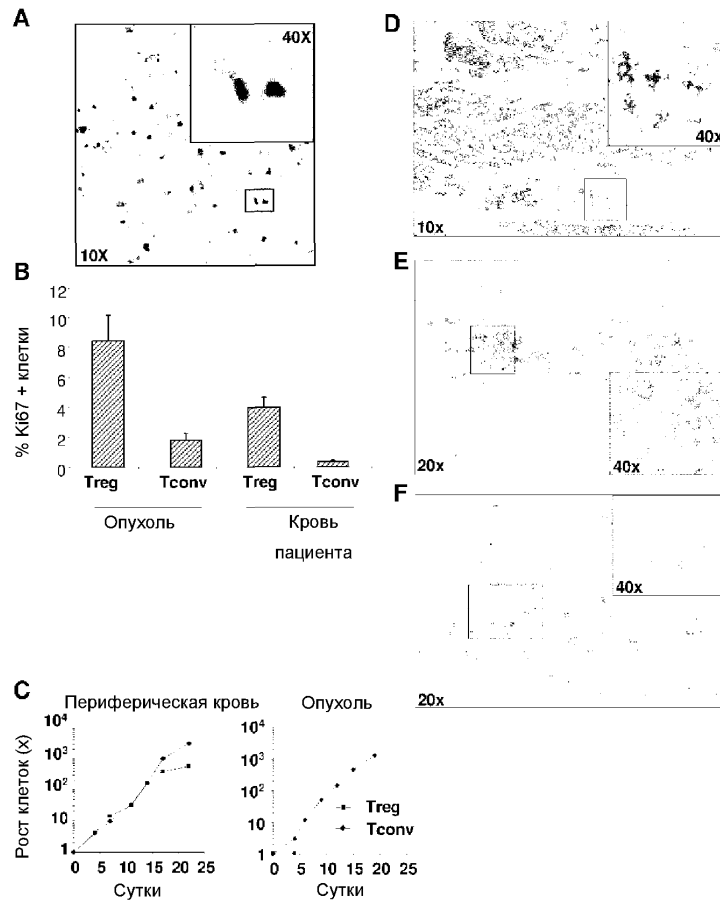
	Последовательность ДНК
H-CDR1	GGCTACAGTTTCACCAGCTACTGGATAAAC (SEQ ID NO:17)
H-CDR2	AATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAATCAAATGTTCAAGG AC (SEQ ID NO:18)
H-CDR3	TGGAATCTTTCTTATTACTTCGATAATAACTACTACTTGGACTAC (SEQ ID NO:19)
L-CDR1	AGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT (SEQ ID NO:20)
L-CDR2	CGGATGTCCAACCTTGCCTCA (SEQ ID NO:21)
L-CDR3	ATGCAACATCTAGAATATCCGTGGACG (SEQ ID NO:22)

4. Применение антитела по любому из пп.1-3 для лечения заболевания, выбранного из аутоиммунного заболевания, реакции отторжения трансплантата или заболевания "трансплантат против хозяина".

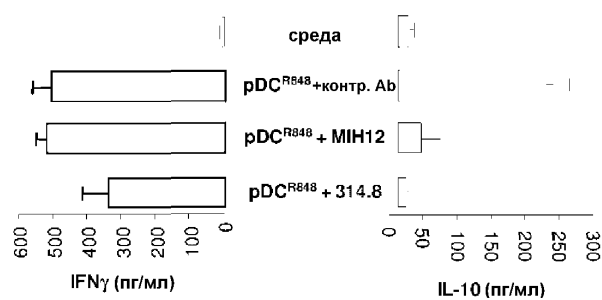
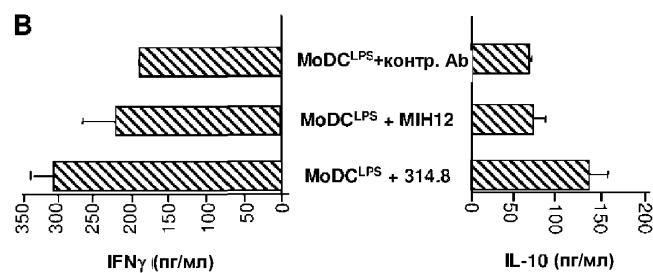
5. Применение антитела по любому из пп.1-3 для лечения воспалительного расстройства.

6. Применение по п.5, где указанное воспалительное расстройство выбрано из группы, состоящей из воспалительного расстройства нервной системы, воспалительного заболевания слизистой оболочки, воспалительного заболевания кожи и аутоиммунного артрита.

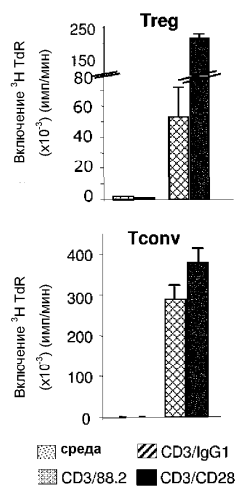
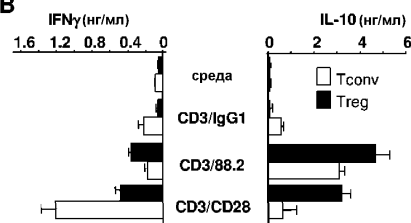
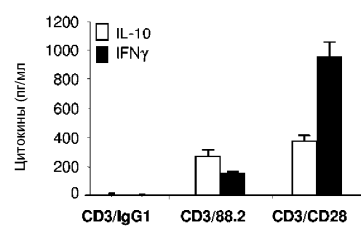
7. Применение по п.5, где указанное воспалительное расстройство выбрано из рассеянного склероза, воспалительного заболевания кишечника, астмы или тонзиллита, дерматита, псориаза, контактной гиперчувствительности и ревматоидного артрита.



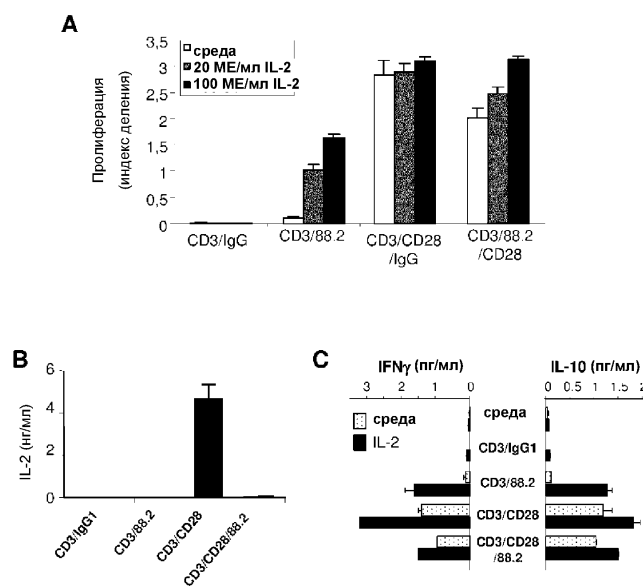
Фиг. 1

A**B**

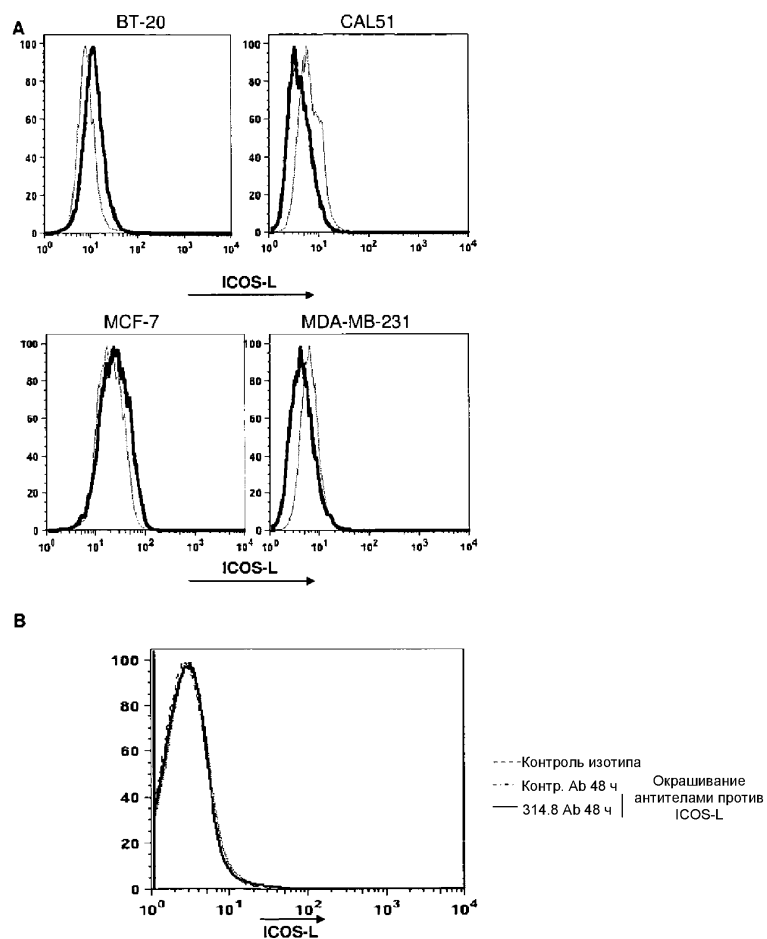
Фиг. 2

A**B****C**

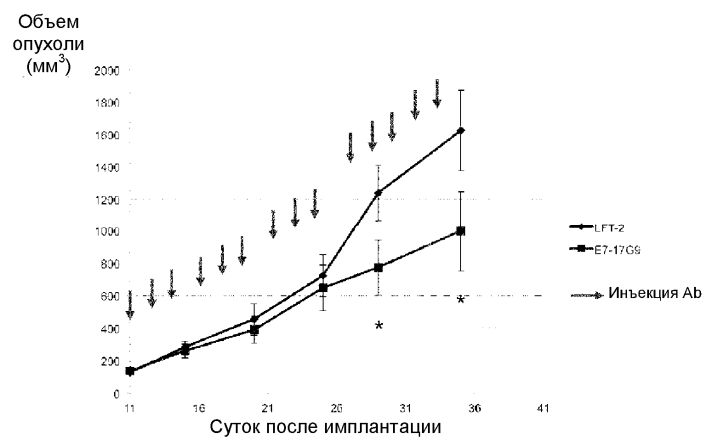
Фиг. 3



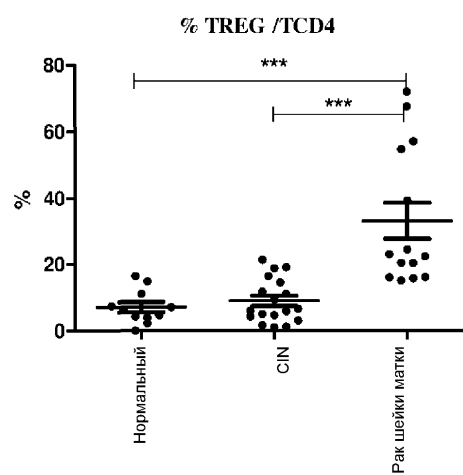
Фиг. 4



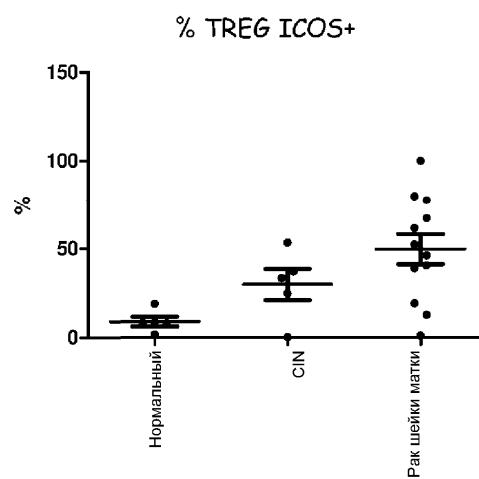
Фиг. 5



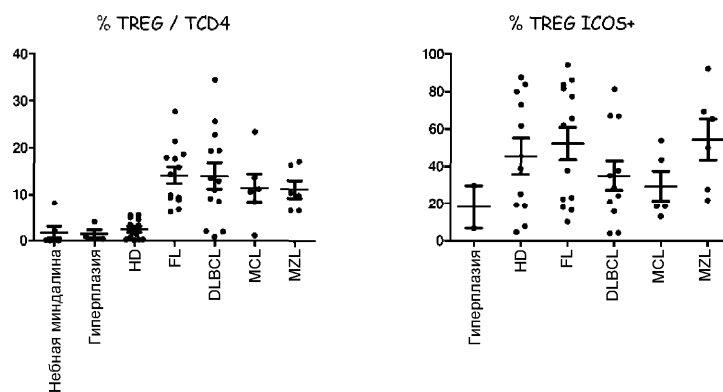
А



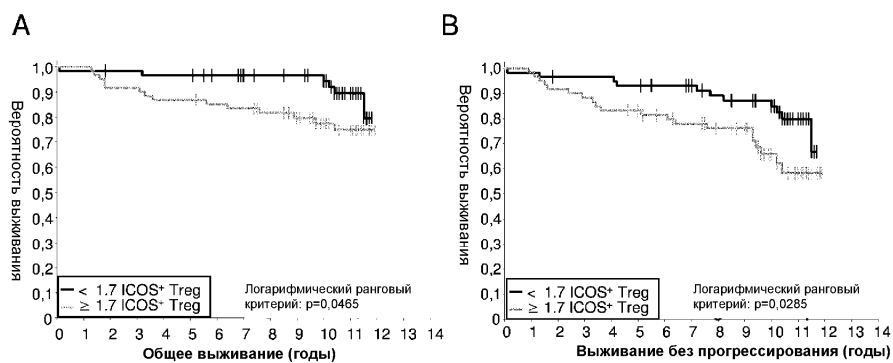
В



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2