

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391400 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.08.22

(22) Дата подачи заявки  
2021.12.03

(51) Int. Cl. A61K 35/17 (2015.01)  
A61K 35/28 (2015.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 37/00 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/577 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ СЕЛЕКТИВНОГО НАЦЕЛИВАНИЯ НА КЛЕТКИ CD6<sup>HIGH</sup> И СНИЖЕНИЯ АКТИВНОСТИ T<sub>EFF</sub>-КЛЕТОК

(31) 63/121,567

(32) 2020.12.04

(33) US

(86) PCT/US2021/061904

(87) WO 2022/120240 2022.06.09

(71) Заявитель:

ЭКУИЛЛИУМ, ИНК. (US)

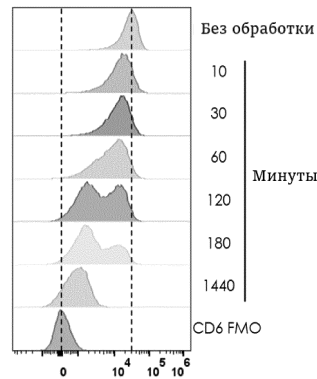
(72) Изобретатель:

Коннелли Стивен, Ампудия Жанетт,  
Чу Нху (Далена) Нго, Нг Чери Т. (US)

(74) Представитель:

Рыбина Н.А. (RU)

(57) Представлены способы и композиции, содержащие антитела к CD6, такие как итализумаб, которые селективно нацеливают CD6<sup>high</sup> T-клетки, например, для снижения уровней CD6 на клеточной поверхности таких клеток, снижения общих уровней и патогенной активности T-клеток CD6<sup>high</sup> или соотношения T-клеток CD6<sup>high</sup>:CD6<sup>low</sup> у субъекта или ex vivo, снижения общего уровня и патогенной активности T<sub>eff</sub>-клеток или соотношения T<sub>eff</sub>:T<sub>reg</sub>-клеток у субъекта или ex vivo, и/или увеличения генерации T<sub>reg</sub>-клеток у субъекта или ex vivo, и таким образом модулируют патогенный иммунный ответ у субъекта, помимо других аспектов.



A1

202391400  
A1

202391400

A1

# СПОСОБЫ СЕЛЕКТИВНОГО НАЦЕЛИВАНИЯ НА КЛЕТКИ CD6<sup>HIGH</sup> И СНИЖЕНИЯ АКТИВНОСТИ T<sub>EFF</sub>-КЛЕТОК

## ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) предварительной заявки США № 63/121,567, поданной 4 декабря 2020 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

## ПОЛОЖЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Перечень последовательностей, связанный с данной заявкой, предоставляется в текстовом формате вместо бумажной копии и настоящим включен в данное описание посредством ссылки. Имя текстового файла, содержащего перечень последовательностей, - EQIL\_010\_01WO\_ST25.txt. Текстовый файл имеет размер приблизительно 10,8 КБ, был создан 2 декабря 2021 года и представлен в электронном виде посредством EFS-Web.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

### *Область техники*

Варианты осуществления настоящего раскрытия в целом относятся к способам и композициям, содержащим антитела к CD6, такие как итолизумаб, которые селективно нацеливают T-клетки CD6<sup>high</sup>, например, с целью снижения уровня CD6 на клеточной поверхности таких клеток, снижения общего уровня и патогенной активности T-клеток CD6<sup>high</sup> или соотношения T-клеток CD6<sup>high</sup>:CD6<sup>low</sup> у субъекта или ex vivo, снижения общего уровня и патогенной активности T<sub>eff</sub>-клеток или соотношения T<sub>eff</sub>:T<sub>reg</sub>-клеток у субъекта или ex vivo, и/или увеличения генерации T<sub>reg</sub>-клеток у субъекта или ex vivo, и таким образом модулирования патогенного иммунного ответа у субъекта, помимо других аспектов.

### *Описание соответствующего уровня техники*

T-клетки или T-лимфоциты относятся к группе белых кровяных клеток, известных как лимфоциты, и играют ключевую роль в адаптивном иммунитете. Их можно отличить от других типов лимфоцитов, таких как B-клетки, по наличию на их клеточной поверхности специального рецептора, называемого T-клеточным рецептором (TCR). Существуют две основные группы - гамма-дельта T-клетки ( $\gamma\delta$ T-клетки) и альфа-бета T-клетки ( $\alpha\beta$  T-клетки); последняя включает T-клетки

CD4 и CD8. Т-клетки CD4 включают подмножества Т-хелперов (Th), такие как Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh и Tph, каждый из которых имеет свой цитокиновый профиль и выполняет свою роль в иммунном ответе. Т-клетки CD8 включают цитотоксические Т-клетки (Тс-клетки или CTL). Т-клетки также определяются по статусу активации, который объединяет подмножества наивных, эффекторных клеток и клеток памяти (центральных, эффекторных и стволовых). Другие родственные клетки включают натуральные киллерные Т-клетки (NKT-клетки) и врожденные лимфоидные клетки (ILC). ILC представляют собой TCR-отрицательные лимфоциты, но имеют подмножества, ILC1, ILC2 и ILC3, которые аналогичны различным подмножествам Th с точки зрения выделяемых ими цитокинов. Все Т-клетки (или ILC), которые были активированы (больше не являются наивными), в совокупности называются эффекторными Т-клетками ( $T_{eff}$ ).

Регуляторные Т-клетки ( $T_{reg}$ -клетки), также известные как супрессорные Т-клетки, являются специализированной субпопуляцией Т-клеток, которые действуют для подавления иммунных реакций других Т-клеток. Например,  $T_{reg}$ -клетки играют ключевую роль в подавлении Т-клеточно-опосредованного иммунитета в ходе иммунной реакции и в подавлении аутореактивных Т-клеток, избежавших процесса отрицательной селекции в тимусе. Таким образом,  $T_{reg}$ -клетки обеспечивают важный «самоконтроль» для предупреждения чрезмерных иммуногенных реакций и, следовательно, имеют решающее значение для поддержания гомеостаза иммунной системы и толерантности к аутоантигенам. Увеличение числа и активности  $T_{eff}$ -клеток, приводящее к увеличению соотношения  $T_{eff}$ : $T_{reg}$ -клеток, свидетельствует об аутоиммунных и воспалительных заболеваниях.

Два основных класса  $T_{reg}$ -клеток представляют собой естественные  $T_{reg}$ -клетки и индуцированные  $T_{reg}$ -клетки. Наиболее широко используемыми маркерами для естественных  $T_{reg}$ -клеток являются кластер дифференцировки 4 (CD4), кластер дифференцировки 25 (CD25), блок Р3 транскрипционного фактора forkhead/крылатая спираль (FoxP3), транскрипционный фактор Helios, цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4 (CTLA-4), ген семейства рецепторов фактора некроза опухоли, индуцированного глюкокортикоидами (GITR), ген активации лимфоцитов-3 (LAG-3) и кластер дифференцировки 127 (CD127). Естественные  $T_{reg}$ -клетки (также известные как  $T_{reg}$ -клетки CD4+CD25+FoxP3+) образуются в тимусе. Индуцированные  $T_{reg}$ -клетки (в том числе Tr1-клетки, Th3-клетки и  $T_{reg}$ -клетки HLA-G+) возникают на периферии в

ходе нормального иммунного ответа в ответ на взаимодействие с антигенпрезентирующими клетками и цитокинами.

Индукцированные  $T_{reg}$ -клетки обладают многими характеристиками естественно возникающих  $T_{reg}$ -клеток, но могут отличаться по критически важным биомаркерам клеточной поверхности и ядерным биомаркерам, а также по функциональным характеристикам. Например, были описаны  $Tg1$ - и  $Th3$ -клетки, которые вырабатывают  $IL-10$  и  $TGF-\beta$ , соответственно. Благодаря возможностям выделения, обогащения и размножения этих подмножеств клеток появились новые терапевтические подходы к лечению иммунологических заболеваний.

Идентификация естественных  $T_{reg}$ -клеток как важного компонента аутоотолерантности открыла важную область исследований в иммунологии и основных процессах, контролирующей иммунную толерантность. Регуляторные  $T$ -клетки характеризуются уникальным и надежным терапевтическим профилем. Для развития регуляторной активности эти клетки требуют специфической активации при помощи  $T$ -клеточного рецептора (TCR), однако их эффекторная функция, по-видимому, является неспецифической, обеспечивая регуляцию местных воспалительных реакций посредством комбинации контакта клетки с клеткой и супрессивной продукции цитокинов. Многочисленные исследования продемонстрировали значительное влияние естественных  $T_{reg}$ -клеток на подавление патологических иммунных реакций при аутоиммунных заболеваниях, трансплантации и заболеваниях «трансплантат против хозяина». Однако основным препятствием для изучения и применения естественных  $T_{reg}$ -клеток в отношении человека является отсутствие единого специфического биомаркера клеточной поверхности для определения и отделения  $T_{reg}$ -клеток от других подмножеств  $T$ -клеток, таких как, например,  $Th$ -клетки,  $Tc$ -клетки, а также для различения разных субпопуляций  $T_{reg}$ -клеток.

В исследованиях используется ряд различных способов идентификации, выделения, обогащения или иного использования  $T_{reg}$ -клеток. Маркеры  $CD4$ ,  $CD25$ ,  $FoxP3$ , транскрипционный фактор  $Helios$ ,  $CTLA-4$ ,  $GITR$ ,  $LAG-3$  и  $CD127$  используются совместно для идентификации  $T_{reg}$ -клеток, однако ни один из перечисленных маркеров не может быть использован для идентификации  $Treg$ -клеток самостоятельно, поскольку ни один из них не является строго специфичным для  $T_{reg}$ -клеток. Например, высокий уровень экспрессии поверхностных маркеров  $CD25$  и  $CD4$  (клетки  $CD4+CD25+$ ) изначально использовали для идентификации естественных  $T_{reg}$ -клеток. Однако  $CD4$  также экспрессируется на  $Th$ -клетках и

субпопуляции ТМ-клеток. CD25 также экспрессируется на отличных от регуляторных Т-клетках в условиях иммунной активации, например, в ходе иммунного ответа на патоген. Таким образом, определяемые по экспрессии CD4 и CD25, T<sub>reg</sub>-клетки составляют приблизительно 5-10% зрелых Th-клеток. Дополнительное измерение экспрессии Foxp3 в клетках обеспечило возможность более специфического анализа естественных T<sub>reg</sub>-клеток (клеток CD4+CD25+FoxP3+). Однако Foxp3 также транзиторно экспрессируется в активированных клетках ТЕМ, и в настоящее время документально подтверждено, что большинство Т-клеток человека CD4+ и CD8+ транзиторно экспрессируют Foxp3 при активации, в том числе Т-клетки CD4+ CD25 low/~, Th-клетки, Тс-клетки и Т-клетки памяти. Кроме того, FoxP3 является ядерным маркером, который требует пермеабиллизации клеточной мембраны перед окрашиванием. Таким образом, использование этого биомаркера исключает последующие шаги обработки, такие как разделение, выделение, обогащение или размножение жизнеспособных клеток.

Существует потребность в улучшенных способах селективного нацеливания на подмножества Т-клеток и способах селективного ингибирования популяции T<sub>eff</sub>-клеток, а также в способах модуляции иммунной реакции у индивидуума. Кроме того, существует потребность в разработке композиций, содержащих популяцию иммуносупрессивных регуляторных Т-клеток для модуляции иммунной реакции у индивидуума.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ**

Варианты осуществления настоящего раскрытия включают способы определения оптимальной дозы итализумаба у субъекта-человека, имеющего аутоиммунное, иммуновоспалительное или воспалительное заболевание, заболевание «трансплантат против хозяина» (GVHD) или отторжение трансплантата органа, включающие:

(а) определение исходного уровня CD6 на клеточной поверхности в образце ткани от субъекта, причем образец ткани содержит Т-лимфоциты, и, необязательно, определение целевого уровня CD6 на клеточной поверхности у субъекта;

(б) введение субъекту серии из двух или трех или более доз итализумаба, необязательно с увеличением дозы;

(в) мониторинг уровней CD6 на клеточной поверхности в образце ткани от субъекта между сериями доз, причем образец ткани содержит Т-лимфоциты;

(г) определение наименьшей дозы из серии доз как оптимальной дозы, если уровень CD6 на поверхности клеток на шаге (в) составляет приблизительно или менее, чем приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45 или 50 процентов от исходного уровня из (а), или составляет в пределах приблизительно или менее, чем приблизительно 5, 10, 15 или 20 процентов от необязательного целевого уровня из (а), и если между сериями доз не наблюдается дальнейшего снижения уровня CD6 на поверхности клеток.

Некоторые варианты осуществления включают определение уровней CD6 на клеточной поверхности клеток CD4 и/или клеток CD8 в образце ткани субъекта. В некоторых вариантах осуществления образец ткани представляет собой образец крови. Конкретные варианты осуществления включают определение целевого уровня CD6 на клеточной поверхности у субъекта на основе клинических параметров или симптомов заболевания.

Также включены режимы дозирования для лечения аутоиммунного, иммуновоспалительного или воспалительного заболевания, заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD) или отторжения трансплантата органа у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие:

(а) определение исходного уровня CD6 на клеточной поверхности в образце ткани от субъекта, причем образец ткани содержит Т-лимфоциты, и, необязательно, определение целевого уровня CD6 на клеточной поверхности у субъекта;

(б) введение субъекту дозы итализумаба, которая обеспечивает снижение уровня CD6 на клеточной поверхности в Т-лимфоцитах субъекта до приблизительно или менее чем приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 процентов от исходного уровня из (а);

(в) мониторинг уровней CD6 на клеточной поверхности в образце ткани субъекта, причем образец ткани содержит Т-лимфоциты; и

(г) введение субъекту дополнительной дозы итализумаба до того, как или если уровень CD6 на поверхности клеток в (в) возвращается к приблизительно или более чем приблизительно 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 процентам от исходного уровня из (а), или повышается до приблизительно или более чем целевого уровня из (а).

В некоторых вариантах осуществления режим дозирования поддерживает уровень CD6 на клеточной поверхности в Т-лимфоцитах (необязательно в клетках CD4 и/или CD8) субъекта на уровне приблизительно или ниже, чем приблизительно 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 процентов от исходного уровня из (а), или в пределах приблизительно 5, 10, 15 или 20 процентов от необязательного целевого уровня из (а), необязательно при определении целевого уровня CD6 на основе клинических параметров или симптомов заболевания.

Некоторые варианты осуществления относятся к режимам дозирования для лечения аутоиммунного, иммуновоспалительного или воспалительного заболевания, заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD) или отторжения трансплантата органа у нуждающегося в этом субъекта, включающим:

(а) определение исходного уровня Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> в образце крови субъекта и, необязательно, выявление целевого уровня Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup>;

(б) введение субъекту дозы италиумаба, которая обеспечивает снижение уровня Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> у субъекта до приблизительно или менее, чем приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 40 процентов от исходного уровня из (а);

(в) мониторинг уровней Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> в образце крови субъекта;  
и

(г) введение дополнительной дозы италиумаба субъекту до того, как уровни Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup>, полученные в (в), вернуться к приблизительно или более чем приблизительно 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 процентам от исходного уровня, полученного в (а), или повысятся до приблизительно или выше целевого уровня, полученного в (а), необязательно при определении целевого уровня Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> у субъекта на основании клинических параметров или симптомов заболевания.

В некоторых вариантах осуществления режим дозирования поддерживает уровни Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> у субъекта на уровне приблизительно или менее, чем приблизительно 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 процентов от исходного уровня из (а), необязательно, причем Т-лимфоциты представляют собой клетки CD4 и/или клетки CD8. В некоторых вариантах осуществления режим дозирования обеспечивает снижение соотношения CD6<sup>high</sup>:CD6<sup>low</sup> Т-лимфоцитов у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более или приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или более по сравнению с контролем, или стандартом, или исходным уровнем, необязательно, причем Т-

лимфоциты представляют собой клетки CD4 и/или клетки CD8. В некоторых вариантах осуществления режим дозирования обеспечивает снижение соотношения  $T_{eff}:T_{reg}$  клеток у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более или приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или более относительно контроля, или стандарта, или исходного уровня, необязательно клеток CD4 и/или клеток CD8, необязательно, причем клетки  $T_{eff}$  представляют собой клетки Th17.

Некоторые варианты осуществления включают способы предупреждения или ослабления заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD) у пациента с человеческим трансплантатом, включающие:

(а) инкубирование ткани трансплантата с антителом к CD6, необязательно итолизумабом, в течение времени, достаточного для снижения уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов CD6high в ткани трансплантата; и

(б) пересадка ткани трансплантата пациенту.

Некоторые варианты осуществления включают определение уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов в ткани трансплантата до и после шага (а) и выполнение шага (б), если уровни CD6 на клеточной поверхности после шага (а) снижаются приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более по сравнению с уровнем до шага (а).

В некоторых вариантах осуществления ткань трансплантата содержит клетки пуповинной крови, клетки костного мозга, клетки периферической крови, мобилизованные клетки периферической крови, мезенхимальные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, клетки, дифференцированные из стволовых клеток/прогениторных клеток, сконструированные клетки (необязательно химерные антигенные рецепторы (CAR)) или любые комбинации указанных клеток. В некоторых вариантах осуществления ткань трансплантата является аутологичной для пациента с человеческим трансплантатом. В некоторых вариантах осуществления ткань трансплантата является аллогенной для пациента с человеческим трансплантатом.

Также включены способы лечения или улучшения состояния аутоиммунного, иммуновоспалительного или воспалительного заболевания у нуждающегося в этом пациента-человека, включающие:



(а) инкубирование ткани трансплантата с антителом к CD6, необязательно итолизумабом, в течение времени, достаточного для снижения уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> в ткани трансплантата, с получением таким образом ткани трансплантата, обогащенной Т-лимфоцитами CD6<sup>low</sup>;

(б) обработку ткани трансплантата из (а) в течение времени, достаточного для генерации Treg-лимфоцитов из Т-лимфоцитов CD6<sup>low</sup>; и

(в) пересадку ткани трансплантата из (в) пациенту.

Некоторые варианты осуществления включают определение уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов в ткани трансплантата до и после шага (а) и выполнение шага (б), если уровни CD6 на клеточной поверхности после шага (а) снижаются приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более по сравнению с уровнем до шага (а). В некоторых вариантах осуществления шаг (б) включает инкубацию ткани трансплантата, обогащенной Т-лимфоцитами CD6<sup>low</sup>, с комбинацией цитокинов, факторов роста и транскрипционных факторов в течение времени, достаточного для генерации T<sub>reg</sub>-лимфоцитов.

В некоторых вариантах осуществления ткань трансплантата содержит клетки пуповинной крови, клетки костного мозга, клетки периферической крови, мобилизованные клетки периферической крови, мезенхимальные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, клетки, дифференцированные из стволовых клеток/прогениторных клеток, сконструированные клетки (необязательно химерные антигенные рецепторы (CAR)) или любые комбинации указанных клеток. В некоторых вариантах осуществления ткань трансплантата является аутологичной для пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления ткань трансплантата является аллогенной для пациента-человека.

Также включены способы лечения аутоиммунного, иммуновоспалительного или воспалительного заболевания, заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD) или отторжения трансплантата органа у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие:

(а) введение итолизумаба субъекту; и

(б) определение уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов в образце ткани субъекта, определение уровней Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> и, необязательно, CD6<sup>low</sup> в образце ткани субъекта, и/или определение уровней T<sub>eff</sub>- и T<sub>reg</sub>-клеток у субъекта, причем образец ткани содержит Т-лимфоциты;

при этом введение итолизумаба обеспечивает снижение любого одного или более из (i) уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов, необязательно клеток CD4 и/или CD8; (ii) уровней Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> у субъекта; (iii) соотношения CD6<sup>high</sup>:CD6<sup>low</sup> Т-лимфоцитов у субъекта; и/или (iv) соотношения T<sub>eff</sub>:T<sub>reg</sub> клеток у субъекта, и тем самым снижает патогенный иммунный ответ у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления введение итолизумаба обеспечивает снижение уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля, или стандарта, или исходного уровня, необязательно, причем Т-лимфоциты представляют собой клетки CD4 и/или клетки CD8;

снижение уровней Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля, или стандарта, или исходного уровня, необязательно, причем Т-лимфоциты представляют собой клетки CD4 и/или клетки CD8;

снижение соотношения CD6<sup>high</sup>:CD6<sup>low</sup> Т-лимфоцитов у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более или приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или более относительно контроля, или стандарта, или исходного уровня, необязательно, причем Т-лимфоциты представляют собой клетки CD4 и/или клетки CD8; и/или

снижение соотношения T<sub>eff</sub>:T<sub>reg</sub> клеток у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более или приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или более относительно контроля, или стандарта, или исходного уровня, необязательно, причем T<sub>eff</sub>-клетки представляют собой Th17-клетки.

Конкретные варианты осуществления включают основанный на клетках *in vitro* (т.е. на культуре клеток) способ анализа тестовой партии итолизумаба, включающий

(а) инкубирование тестовой партии итолизумаба с клетками, экспрессирующими CD6 на клеточной поверхности;

(б) измерение экспрессии CD6 на клеточной поверхности клеток; и

(в) составление тестовой партии итолизумаба в виде фармацевтической композиции, если данная тестовая партия обеспечивает снижение экспрессии CD6 на клеточной поверхности относительно контроля или стандарта, и отбраковка тестовой партии итолизумаба, если данная тестовая партия не обеспечивает снижение экспрессии CD6 на клеточной поверхности относительно контроля или стандарта.

В некоторых вариантах осуществления шаг (б) включает прямое измерение экспрессии CD6 на клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии, времяпролетной цитометрии (СуToF), клеточного ИФА или иммунофлуоресцентной микроскопии, или в случае, когда (б) включает измерение растворимого CD6 в супернатанте в качестве индикатора экспрессии CD6 на клеточной поверхности, необязательно с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), хемилюминесцентного анализа, электрохемилюминесцентного анализа, высокоэффективной жидкостной хроматографии, вестерн-блота или иммунопреципитации с последующим вестерн-блотом. В некоторых вариантах осуществления клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК). В некоторых вариантах осуществления клетки включают линию Т-клеток человека или линию клеток, сконструированную для экспрессии CD6, предпочтительно CD6 человека. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия выбрана из MOLT-4, MOLT-3, MOLT-16, HuT 78, HuT 102, Jurkat, Jurkat NFAT, CCRF-CEM, 12.1, MJ (G11), LOUCY, SUP-T1, HEL.92.1.7, EF0-21, RPMI-8226, HPB-ALL, HH, KE37, P121CHIKAWA, PEER, ALLSIL, RPMI8402, CMLT1, PF382, ЕНЕВ и клеток DU4475. В некоторых вариантах осуществления клетки включают моноциты, необязательно клеточную линию моноцитов. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия моноцитов выбрана из U937, THP1, MC-1010, TUR, AML-193 и MV-4-11. В некоторых вариантах осуществления (а) линия Т-клеток человека или клеточная линия, сконструированная для экспрессии CD6, и (б) моноциты, необязательно клеточная линия моноцитов, присутствуют в соотношении приблизительно 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 или 1:10.

Некоторые варианты осуществления включают составление тестовой партии итолизумаба в виде фармацевтической композиции, если он обеспечивает снижение экспрессии CD6 на клеточной поверхности приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля или стандарта и/или

увеличение растворимого CD6 в супернатанте приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля или стандарта.

Также включены способы скрининга антитела к CD6 или его антигенсвязывающего фрагмента для применения в качестве биологического терапевтического средства, включающие:

(а) инкубирование кандидатного антитела к CD6 или его антигенсвязывающего фрагмента с клетками, экспрессирующими CD6 на клеточной поверхности;

(б) измерение экспрессии CD6 на клеточной поверхности клеток; и

(в) составление фармацевтической композиции кандидатного антитела к CD6 или его антигенсвязывающего фрагмента, если оно обеспечивает снижение экспрессии CD6 на клеточной поверхности по сравнению с контролем или стандартом.

В некоторых вариантах осуществления шаг (б) включает прямое измерение экспрессии CD6 на клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии, времяпролетной цитометрии (СуТоF), клеточного ИФА или иммунофлуоресцентной микроскопии, или в случае, когда (б) включает измерение растворимого CD6 в супернатанте в качестве индикатора экспрессии CD6 на клеточной поверхности, необязательно с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), хемилюминесцентного анализа, электрохемилюминесцентного анализа, высокоэффективной жидкостной хроматографии, вестерн-блота или иммунопреципитации с последующим вестерн-блотом. В некоторых вариантах осуществления клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК). В некоторых вариантах осуществления клетки включают линию Т-клеток человека или линию клеток, сконструированную для экспрессии CD6, предпочтительно CD6 человека. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия выбрана из MOLT-4, MOLT-3, MOLT-16, HuT 78, HuT 102, Jurkat, Jurkat NFAT, CCRF-CEM, 12.1, MJ (G11), LOUCY, SUP-T1, HEL.92.1.7, EF0-21, RPMI-8226, HPB-ALL, HH, KE37, P121CHIKAWA, PEER, ALLSIL, RPMI8402, CMLT1, PF382, ЕНЕВ и клеток DU4475. В некоторых вариантах осуществления клетки включают моноциты, необязательно клеточную линию моноцитов. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия моноцитов выбрана из U937, THP1, MC-1010, TUR, AML-193 и MV-4-11. В некоторых вариантах осуществления (а) клеточная линия Т-клеток человека или клеточная линия, сконструированная для

экспрессии CD6, и (б) моноциты, необязательно клеточная линия моноцитов, присутствуют в соотношении приблизительно 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 или 1:10.

Некоторые варианты осуществления включают составление фармацевтической композиции кандидатного антитела к CD6 или его антигенсвязывающего фрагмента, если оно обеспечивает снижение экспрессии CD6 на клеточной поверхности приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля или стандарта, и/или если оно обеспечивает увеличение растворимого CD6 в супернатанте приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля или стандарта.

В некоторых способах или режимах дозирования субъект или пациент с аутоиммунным, иммуновоспалительным или воспалительным заболеванием имеет повышенное соотношение  $T_{eff} : T_{reg}$  клеток по сравнению со стандартом или здоровым субъектом, в том числе, если  $T_{eff}$ -клетки представляют собой Th17-клетки. В некоторых вариантах осуществления соотношение  $T_{eff} : T_{reg}$  клеток увеличивается приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз или более по сравнению со стандартом или здоровым субъектом. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное, иммуновоспалительное или воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), необязательно болезнь Крона или язвенный колит, системную красную волчанку (СКВ), необязательно СКВ с волчаночным нефритом, ревматоидный артрит (РА), рассеянный склероз (РС), псориаз, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит или астму.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

Итолизумаб вызывает потерю экспрессии CD6 на клеточной поверхности. На **фигуре 1** показан уровень экспрессии CD6 на поверхности CD4+CD45RA-клеток (эффektorных клеток и T-клеток памяти CD4) после однократной обработки итолизумабом по сравнению с изотипическим контролем и потеря CD6 на клеточной поверхности, начиная с десяти минут и в течение 24 часов, измеренная с помощью проточной цитометрии.

Итолизумаб вызывает дозозависимую потерю экспрессии CD6 на T-клетках CD4 и CD8 *in vitro*. На **фигурах 2А-2Г** представлены графики средней

интенсивности флуоресценции CD6 на клеточной поверхности после обработки четырьмя различными концентрациями итализумаба: 0,01, 0,1, 1, 10 и 100 мкг/мл. На фигуре 2А представлены клетки CD4+CD45RA+ (наивные Т-клетки); на фигуре 2Б - клетки CD4+CD45RA-; на фигуре 2В - клетки CD8+CD45RA+ (наивные Т-клетки CD8); на фигуре 2Г - клетки CD8+CD45RA- (эффекторные Т-клетки и Т-клетки памяти CD8). В каждом случае средняя интенсивность флуоресценции CD6 на клеточной поверхности нормализована к клеткам, обработанным изотипом (10 мкг/мл). На **фигуре 2Д** показано, что потеря CD6 на поверхности клеток (левый график) коррелирует с увеличением растворимого CD6 (sCD6) в супернатанте (правый график), согласно электрохемилюминесцентному анализу. В этом случае РВМС от 3 различных доноров инкубировали с 10 мкг/мл итализумаба, и экспрессию CD6 на клеточной поверхности (левый график) оценивали на Т-клетках CD4, а растворимый CD6 (правый график) количественно определяли в супернатанте МКПК в указанные временные точки. Расчетное количество рецепторов CD6 на Т-клетках CD4 на исходном уровне, определенное с помощью проточной цитометрии, использовалось для нормализации значений у 3 доноров. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

У пациентов, получающих лечение итализумабом, наблюдается снижение экспрессии CD6 на Т-клетках CD4 и CD8. На **фигурах 3А-3Л** представлены графики средней интенсивности флуоресценции CD6 на клеточной поверхности в процентах от исходного уровня по оси Y и дней после первоначального лечения по оси X, которые были измерены во всех CD4-положительных клетках и всех CD8-положительных клетках, выделенных от пациентов с GVHD, получавших лечение итализумабом. На фигурах 3А-3Г представлены четыре пациента, получавшие от 1 до 5 доз 0,4 мг/кг итализумаба, вводимого раз в две недели. На фигуре 3А представлен график процентного содержания CD6 на клеточной поверхности в CD4- и CD8-положительных клетках по сравнению с исходным уровнем у пациента, получавшего 0,4 мг/кг итализумаба в дни 1, 15, 29, 43 и 57. На фигуре 3Б представлен график процентного содержания CD6 на клеточной поверхности в CD4- и CD8-положительных клетках по сравнению с исходным уровнем у пациента, получавшего 0,4 мг/кг итализумаба в дни 1, 15 и 29. На фигуре 3В представлен график процентного содержания CD6 на клеточной поверхности в CD4- и CD8-положительных клетках по сравнению с исходным уровнем у пациента, получавшего 0,4 мг/кг итализумаба в дни 1, 15, 29, 43 и 57. На фигуре 3Г представлен график процентного содержания CD6 на клеточной поверхности в

CD4- и CD8-положительных клетках по сравнению с исходным уровнем у пациента, получавшего 0,4 мг/кг итолизумаба в день 1. На фигурах 3Д-3Ж представлены три пациента, получавшие от 2 до 4 доз 0,8 мг/кг итолизумаба, вводимых раз в две недели или с перерывами раз в две недели. На фигуре 3Д представлен график процентного содержания CD6 на клеточной поверхности в CD4- и CD8-положительных клетках по сравнению с исходным уровнем у пациента, получавшего 0,8 мг/кг итолизумаба в дни 1, 15 и 29. На фигуре 3Е представлен график процентного содержания CD6 на клеточной поверхности в CD4- и CD8-положительных клетках по сравнению с исходным уровнем у пациента, получавшего 0,8 мг/кг итолизумаба в дни 1, 15, 43 и 57. На фигуре 3Ж представлен график процентного содержания CD6 на клеточной поверхности в CD4- и CD8-положительных клетках по сравнению с исходным уровнем у пациента, получавшего 0,8 мг/кг итолизумаба в дни 1 и 15. На фигурах 3И-3Л представлены три пациента, получавшие от 2 до 5 доз 1,6 мг/кг итолизумаба, вводимого раз в две недели. На фигуре 3И представлен график процентного содержания CD6 на клеточной поверхности в CD4- и CD8-положительных клетках по сравнению с исходным уровнем у пациента, получавшего 1,6 мг/кг итолизумаба в дни 1, 15, 29, 43 и 57. На фигуре 3К представлен график процентного содержания CD6 на клеточной поверхности в CD4- и CD8-положительных клетках по сравнению с исходным уровнем у пациента, получавшего 1,6 мг/кг итолизумаба в дни 1 и 15. На фигуре 3Л представлен график процентного содержания CD6 на клеточной поверхности в CD4- и CD8-положительных клетках по сравнению с исходным уровнем у пациента, получавшего 1,6 мг/кг итолизумаба в дни 1, 15, 29 и 43.

Потеря CD6 в зависимости от дозы у пациентов, получающих лечение итолизумабом. На **фигурах 4А-4Г** представлены гистограммы средней интенсивности флуоресценции CD6 на клеточной поверхности для пациентов, получавших 0,4 мг/кг, 0,8 мг/кг и 1,6 мг/кг итолизумаба (слева направо в части каждого графика). На фигуре 4А представлена гистограмма экспрессии CD6 на поверхности по сравнению с исходным уровнем в CD4-положительных и CD8-положительных клетках через 24 часа после введения 1 дозы 0,4 мг/кг, 0,8 мг/кг или 1,6 мг/кг итолизумаба. На фигуре 4Б представлена гистограмма процентной интенсивности экспрессии CD6 на поверхности по сравнению с исходным уровнем в CD4-положительных клетках и CD8-положительных клетках через 8 дней после введения 1 дозы 0,4 мг/кг, 0,8 мг/кг или 1,6 мг/кг итолизумаба. На фигуре 4В

представлена гистограмма процентной интенсивности экспрессии CD6 на поверхности по сравнению с исходным уровнем в CD4-положительных клетках и CD8-положительных клетках на 15 день после введения 1 дозы 0,4 мг/кг, 0,8 мг/кг или 1,6 мг/кг итализумаба. На фигуре 4Г представлена гистограмма процентной интенсивности экспрессии CD6 на поверхности по сравнению с исходным уровнем в CD4-положительных клетках и CD8-положительных клетках на 29 день после введения 2 раз в две недели дозы 0,4 мг/кг, 0,8 мг/кг или 1,6 мг/кг итализумаба.

Связывание итализумаба снижается быстрее, чем скорость потери CD6. На **фигурах 5А-5Е** показаны процент положительных явлений в каждой временной точке, демонстрирующих мечение CD6, как несвязанного рецептора, так и рецептора, связанного с неконкурентным клоном антитела к CD6, на двух различных типах клеток при двух различных концентрациях итализумаба. Несвязанный рецептор (квадраты) обнаруживается в каждой временной точке путем окрашивания клеток флуоресцентно меченым итализумабом. Флуоресцентно меченый итализумаб будет связываться со всеми доступными CD6, еще не связанными немеченым итализумабом, где CD6 все еще присутствует на поверхности клеток. Связывание запатентованного неконкурентного антитела (круги) используется для определения уровня общего CD6 на поверхности клеток в каждой временной точке. Когда клетки обрабатывают итализумабом, происходит снижение общего уровня CD6 на поверхности, что также отражается в снижении количества несвязанного рецептора (квадраты). Скорость потери CD6 рассчитывают, взяв наклон между 10 и 120 минутами каждой из линий. На фигуре 5А представлены точки данных после обработки клеток CD4+CD45RA+ изотипом 1,0 мкг/мл, а расчетные наклоны составляют 0,00 и -0,01 для рецептора, связанного с антителом, и несвязанного рецептора, соответственно. На фигуре 5Б показаны точки данных после обработки клеток CD4+CD45RA+ 0,1 мкг/мл итализумаба, а расчетные наклоны составляют -0,05 и -0,18 для рецептора, связанного с антителом, и несвязанного рецептора, соответственно. На фигуре 5В показаны точки данных после обработки клеток CD4+CD45RA+ 1,0 мкг/мл итализумаба, а расчетные наклоны составляют -0,20 и -0,33 для рецептора, связанного с антителом, и несвязанного рецептора, соответственно. На фигуре 5Г показаны точки данных после обработки клеток CD4+CD45RA- изотипом 1,0 мкг/мл, а расчетные наклоны составляют 0,00 и -0,03 для рецептора, связанного с антителом, и несвязанного рецептора, соответственно. На фигуре 5Д показаны точки данных после обработки клеток CD4+CD45RA- 0,1 мкг/мл итализумаба, а расчетные



наклоны составляют -0,09 и -0,30 для рецептора, связанного с антителом, и несвязанного рецептора, соответственно. На фигуре 5Е показаны точки данных после обработки клеток CD4+CD45RA- 1,0 мкг/мл итолизумаба, а расчетные наклоны составляют -0,36 и -0,49 для рецептора, связанного с антителом, и несвязанного рецептора, соответственно.

Занятость рецепторов итолизумабом ниже на клетках с меньшей плотностью и количеством CD6 на клеточной поверхности, как показано на **фигурах 6А-6Г**. На фигуре 6А показано, что клетки CD8 имеют низкий уровень CD6 на клеточной поверхности по сравнению с клетками CD4, а на фигуре 6Б показано, что итолизумаб связывается с клетками CD8 с гораздо меньшей занятостью, чем с клетками CD4, как было измерено с помощью проточной цитометрии (все клетки инкубировались и окрашивались в одной пробирке). Если бы итолизумаб связывался с CD6 независимо от плотности клеточной поверхности, то % занятости (доля молекул CD6, связанных итолизумабом) должен быть таким же или выше в клетках CD8. Однако % занятости в Т-клетках CD8 ниже, чем в Т-клетках CD4, что свидетельствует о том, что на связывание итолизумаба влияет плотность CD6 на клеточной поверхности.

На фигуре 6В показано, что занятость у пациентов, получающих дозу, низкая. Пунктирная линия показывает исходные показатели крови в первый день перед дозировкой после введения 50 мг/мл итолизумаба для определения максимально возможной занятости рецепторов у каждого пациента. Среднее значение интенсивности флуоресценции CD6 на Т-клетках CD4 в день 1 является высоким, но снижается в течение 24 часов после введения первой дозы, демонстрируя снижение уровня CD6 на поверхности клеток. CD6 продолжает обнаруживаться на Т-клетках CD4 после дозирования (на что указывает СИФ (средняя интенсивность флуоресценции) и сравнение с контролем, квадраты); однако занятость рецептора (круги) указывает на незначительное или полное отсутствие связывания итолизумаба. Можно было бы ожидать определенного уровня занятости, если бы итолизумаб был способен связывать CD6 независимо от плотности рецептора. На фигуре 6Г показано, что занятость обнаруживается, если присутствует CD6. Цельную кровь нормальных субъектов собирали в пробирки, содержащие ЭДТА или цитрат натрия, и инкубировали с итолизумабом в течение 25 минут. Затем кровь лизировали, а клетки анализировали на занятость рецепторов.

Итолизумаб вызывает периферическое снижение количества Т-клеток CD4. На **фигурах 7А-7Г** показано периферическое снижение Т-клеток CD4+ у пациентов после лечения итолизумабом путем измерения клеток CD4+ из забора периферической крови и расчета в процентах от исходного уровня для 6 различных пациентов при четырех различных условиях: плацебо и 1,6, 2,4 и 3,6 мг/кг итолизумаба. На **фигуре 7А** показано изменение в процентах исходного уровня (исходный уровень установлен в день 1) на дни 8 и 15 после обработки посредством плацебо. На **фигуре 7Б** показано изменение в процентах исходного уровня (исходный уровень установлен в день 1) на дни 8 и 15 после обработки посредством 1,6 мг/кг итолизумаба. На **фигуре 7В** показано изменение в процентах исходного уровня (исходный уровень установлен в день 1) на дни 8 и 15 после обработки посредством 2,4 мг/кг итолизумаба. На **фигуре 7Г** показано изменение в процентах исходного уровня (исходный уровень установлен в день 1) на дни 8 и 15 после обработки посредством 3,2 мг/кг итолизумаба.

Итолизумаб вызывает периферическое снижение количества Т-клеток CD8. На **фигурах 8А-8Г** показано периферическое снижение Т-клеток CD8+ у пациентов после лечения итолизумабом путем измерения клеток CD8+ из забора периферической крови и расчета в процентах от исходного уровня для 6 различных пациентов при четырех различных условиях: плацебо и 1,6, 2,4 и 3,6 мг/кг итолизумаба. На **фигуре 8А** показано изменение в процентах исходного уровня (исходный уровень установлен в день 1) на дни 8 и 15 после обработки посредством плацебо. На **фигуре 8Б** показано изменение в процентах исходного уровня (исходный уровень установлен в день 1) на дни 8 и 15 после обработки посредством 1,6 мг/кг итолизумаба. На **фигуре 8В** показано изменение в процентах исходного уровня (исходный уровень установлен в день 1) на дни 8 и 15 после обработки посредством 2,4 мг/кг итолизумаба. На **фигуре 8Г** показано изменение в процентах исходного уровня (исходный уровень установлен в день 1) на дни 8 и 15 после обработки посредством 3,2 мг/кг итолизумаба.

На количество периферических T<sub>reg</sub> не влияет обработка итолизумабом. На **фигурах 9А-9Г** показаны изменения на дни 8 и 15, рассчитанные в процентах от количества T<sub>reg</sub>-клеток на день 1 (исходный) после четырех видов обработки: плацебо, 1,6 мг/кг итолизумаба, 2,4 мг/кг итолизумаба и 3,2 мг/кг итолизумаба. На **фигуре 9А** показана изменчивость количества T<sub>reg</sub>-клеток в контрольной группе, получавшей плацебо. На **фигуре 9Б** показано процентное изменение исходного уровня для 6 различных пациентов после лечения с помощью 1,6 мг/кг

итолизумаба в дни 8 и 15. На фигуре 9В показано процентное изменение исходного уровня для 6 различных пациентов после лечения с помощью 2,4 мг/кг итолизумаба в дни 8 и 15. На фигуре 9Г показано процентное изменение исходного уровня для 6 различных пациентов после лечения с помощью 3,2 мг/кг итолизумаба в дни 8 и 15.

Итолизумаб вызывает снижение соотношения CD4:T<sub>reg</sub> клеток. На **фигурах 10А-10Г** показано изменение по сравнению с исходным уровнем в день 1 на дни 8 и 15 в соотношении Т-клеток CD4+ и Treg-клеток у 6 пациентов после четырех видов обработки: плацебо, 1,6 мг/кг итолизумаба, 2,4 мг/кг итолизумаба и 3,2 мг/кг итолизумаба. На фигуре 10А показано соотношение CD4:Treg в процентах от исходного уровня после обработки с помощью плацебо. На фигуре 10Б показано соотношение CD4:Treg в процентах от исходного уровня после обработки с помощью 1,6 мг/кг итолизумаба. На фигуре 10В показано соотношение CD4:Treg в процентах от исходного уровня после обработки с помощью 2,4 мг/кг итолизумаба. На фигуре 10Г показано соотношение CD4:Treg в процентах от исходного уровня после обработки с помощью 3,2 мг/кг итолизумаба.

Увеличение соотношения Treg:CD4 Т-клеток у пациентов, получавших лечение итолизумабом. На **фигурах 11А-11Г** показано соотношение Treg:CD4 и соотношение Th17:CD4 клеток у пациентов после обработки с помощью 0,8 мг/кг итолизумаба или плацебо в дни 1, 8, 15, 29 и 57. Данные собирали путем отбора криоконсервированных МКПК из указанных временных точек, выделения ДНК и измерения специфических для типа клеток эпигенетических маркеров в ДНК с помощью EpiQ ID, запатентованного анализа qPCR. На фигуре 11А показано соотношение Treg:CD4 после обработки итолизумабом, а на фигуре 11Б - то же соотношение после обработки с помощью плацебо. На фигуре 11В показано соотношение Th17:CD4 после обработки итолизумабом, а на фигуре 11Д - соотношение после обработки с помощью плацебо.

Итолизумаб имеет более медленную скорость связывания с более высокой плотностью CD6. На **фигурах 12А-12Е** показано время скорости диссоциации для итолизумаба (верхняя линия) и fab итолизумаба (нижняя линия) для трех различных плотностей CD6 для поверхностного плазмонного резонанса. Низкая плотность состоит из 7 rhU CD6 и 120 сайтов связывания на квадратный микрометр. Средняя плотность составляет 55 rhU CD6 и 783 сайта связывания на квадратный микрометр. Высокая плотность составляет 255 rhU CD6 и 3493 сайта связывания на квадратный микрометр. На фигуре 12А показаны скорости

диссоциации для чипа с низкой плотностью в течение 2000 секунд. На фигуре 12Б показаны скорости диссоциации для чипа со средней плотностью в течение 2000 секунд. На фигуре 12В показаны скорости диссоциации для чипа с высокой плотностью в течение 2000 секунд. На фигуре 12Г показаны скорости диссоциации для чипа с низкой плотностью в течение 12000 секунд. На фигуре 12Д показаны скорости диссоциации для чипа со средней плотностью в течение 12000 секунд. На фигуре 12Е показаны скорости диссоциации для чипа с высокой плотностью в течение 12000 секунд.

Более комплексное связывание итолизумаба наблюдается при высокой плотности CD6. На **фигурах 13А-13Е** показано комплексное связывание итолизумаба с более высокой плотностью CD6 по сравнению с более низкой плотностью CD6. Данные собирали с использованием фаз ассоциации 240 секунд и диссоциации 1800 секунд для трех различных плотностей CD6. На фигурах 13А-13В представлены дублирующие инъекции итолизумаба с концентрацией от 900нМ до 0,137нМ. На фигурах 13Г-13Е представлены дублирующие инъекции итолизумаба с концентрацией от 900 нМ до 11,1 нМ. На фигуре 13А показано связывание различных концентраций итолизумаба с низкой плотностью CD6. На фигуре 13Б показано связывание различных концентраций итолизумаба со средней плотностью CD6. На фигуре 13В показано связывание различных концентраций итолизумаба с высокой плотностью CD6. Сенсограммы связывания итолизумаба с CD6 показывают комплексное связывание при самой высокой плотности чипа CD6. На фигуре 13Г показано связывание различных концентраций fab итолизумаба с низкой плотностью CD6. На фигуре 13Д показано связывание различных концентраций fab итолизумаба со средней плотностью CD6. На фигуре 13Е показано связывание различных концентраций fab итолизумаба с высокой плотностью CD6. Сенсограммы связывания итолизумаба с CD6 показывают минимальное комплексное связывание при всех трех (низкой, средней, высокой) плотностях чипа CD6. Эти результаты показывают, что итолизумаб проявляет сильный эффект авидности, который обеспечивает преимущественное связывание с более высокой плотностью CD6 на чипе, и таким образом подтверждают наблюдения о преимущественном связывании и селективности итолизумаба к клеткам CD6<sup>high</sup> in vivo.

Итолизумаб вызывает потерю CD6 на клеточной поверхности линии клеток. На **фигуре 14** показано, что итолизумаб снижает уровень CD6 на клеточной поверхности линии Т-клеток, экспрессирующих CD6. В данном случае клетки

Jurkat NFAT размораживали и ресуспендировали в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл, а затем распределяли в отдельные пробирки в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл. Добавляли изотипические контрольные антитела или итолизумаб, осторожно перемешивали клетки и инкубировали в течение 6 ч. при  $37^\circ\text{C}$ . Общий уровень CD6 на поверхности клеток оценивали с помощью проточной цитометрии (во время окрашивания клетки хранили при  $4^\circ\text{C}$ ).

Клетки CD6<sup>low</sup> характеризуются гипореактивностью при стимуляции TCR. На **фигурах 15А-15Б** показано, что клетки CD6<sup>low</sup> характеризуются гипореактивностью при стимуляции. В данном случае МКПК инкубировали с итолизумабом в течение 24 часов для удаления CD6 с клеточной поверхности (см. фигуру 15А; левый столбец CD6<sup>high</sup>, правый столбец CD6<sup>low</sup>), промывали по меньшей мере 3 раза для удаления избытка и связанного итолизумаба и стимулировали с помощью 0,25 мкг/мл анти-CD3 и 1 мкг/мл ALCAM в течение 24 часов. Маркеры активации оценивали с помощью проточной цитометрии, а цитокины - с помощью проточного ИФА. Как показано на **фигуре 15Б**, клетки CD6<sup>low</sup> (правая колонка в каждом графике) демонстрируют снижение поверхностных маркеров активации и высвобождения цитокинов по сравнению с клетками CD6<sup>high</sup> (левая колонка в каждом графике), что свидетельствует о том, что итолизумаб не только снижает уровень CD6 на клеточной поверхности в МКПК, но и делает клетки менее чувствительными к факторам активации Т-клеток, таким как CD3.

Схема выбора дозы на основе экспрессии CD6. На **фигуре 16** показано использование CD6 клеточной поверхности для выбора дозы итолизумаба. Один из подходов заключается в том, чтобы дозировать пациенту или группе пациентов возрастающее количество итолизумаба. Нижний уровень CD6 определяется, если при добавлении большего количества лекарственного средства в увеличенной дозе или последующей дозе через фиксированный интервал времени не наблюдается дальнейшего снижения уровня CD6. После определения оптимальной дозы, которая снижает уровень CD6 до более низкого уровня, уровни CD6 также можно использовать для определения оптимального режима дозирования.

Схема режима дозирования в зависимости от экспрессии CD6. На **фигурах 17А-17Б** показан выбор подходящего режима дозирования. Один из подходов заключается в мониторинге уровня CD6 на клеточной поверхности с течением времени, чтобы определить, как долго любая заданная доза обеспечивает устойчивый фармакодинамический эффект потери CD6 на клеточной поверхности.

Иллюстративный график на фигуре 17А показывает, что подходящими будут дозирования раз в две недели и раз в месяц, но ежеквартальные дозирования на этом уровне будут непригодны, поскольку уровень CD6 на клеточной поверхности пересекает порог на восьмой неделе. Эта информация может указывать на то, что для достижения устойчивой потери CD6 на клеточной поверхности при ежеквартальном дозировании требуется больше лекарственного средства. В некоторых случаях верхний предел или порог составляет приблизительно, менее приблизительно или между приблизительно 25-50% от исходного уровня CD6 на клеточной поверхности. На фигуре 17Б показан этот подход при коротком курсе терапии итализумабом, когда уровни CD6 на клеточной поверхности могут быть использованы для определения необходимости возобновления дозирования или возможности обострения заболевания. После завершения начального периода дозирования можно отслеживать уровни CD6 на клеточной поверхности в течение определенного времени, и как только эти уровни повышаются до или приближаются к пороговому значению относительно исходного уровня (например, уровня CD6 на клеточной поверхности до лечения) или относительно определенного порогового или целевого уровня (например, клинически приемлемого или желательного уровня CD6 на клеточной поверхности, например, определенного по другим параметрам заболевания или симптомам), можно принять решение о повторном введении пациенту дозы итализумаба.

На **фигурах 18А-18Б** показаны уровни белка CD6 после лечения итализумабом. На **фигуре 18А** показаны уровни ассоциированного с клетками CD6, а на **фигуре 18Б** - уровни растворимого CD6 (sCD6) в супернатанте клеток.

На **фигуре 19** показано, что итализумаб вызывает расщепление CD6 на клеточной поверхности и сопутствующее увеличение растворимого CD6.

На **фигурах 20А-20Б** показана роль моноцитов в индуцированном итализумабом расщеплении CD6 с клеточной поверхности Т-лимфоцитов.

На **фигурах 21А-21Д** показано, что вызванное итализумабом снижение уровня CD6 на клеточной поверхности коррелирует со снижением активации Т-клеток.

На **фигуре 22** показано, что клетки CD6<sup>low</sup>, образованные при первоначальной инкубации с итализумабом, не только оставались CD6<sup>low</sup>, но и были менее -подобными (например, менее T<sub>h</sub>1- и T<sub>h</sub>17-подобными) после последующей стимуляции CD3 + ALCAM.

На **фигурах 23А-23Г** показано, что итализумаб снижает аллореактивность Т-лимфоцитов.

На **фигурах 24А-24Б** показано влияние первоначального лечения итализумабом на последующую генерацию Treg-лимфоцитов. На **фигуре 24А** показано выделение наивных Т-клеток CD4<sup>+</sup> и потеря CD6 в наивных Т-клетках CD4<sup>+</sup> (CD3+CD4+CD45RA+CD45RO-), выделенных из МКПК, предварительно обработанных изотипом или итализумабом для получения наивных Т-клеток CD6<sup>high</sup> или CD6<sup>low</sup>, соответственно. На **фигуре 24Б** показано образование T<sub>reg</sub> после предварительной обработки изотипическим контролем (CD6<sup>high</sup>) или итализумабом (CD6<sup>low</sup>), о чем свидетельствует положительное окрашивание FoxP3 и Helios.

На **фигуре 25** показано, что CD6<sup>low</sup> T<sub>reg</sub> обладают повышенной супрессивной активностью по сравнению с CD6<sup>high</sup> T<sub>reg</sub>.

На **фигуре 26А** показано, что вызванная итализумабом потеря CD6 на клеточной поверхности происходит дозозависимым образом (обнаружение CD6 на МКПК от двух доноров после 24-часовой инкубации с диапазоном концентраций итализумаба, как указано). На **фигуре 26Б** показано, что анализ способен различать изменения в статусе гликозилирования.

На **фигурах 27А-27Д** показана потеря CD6 на клеточной поверхности в Т-клетках пациентов с СКВ, получавших лечение итализумабом.

На **фигурах 28А-28Б** показано, что CD6 на клеточной поверхности Т-клеток CD4 (28А) и CD8 (28В) снижается после первой дозы итализумаба у пациентов с СКВ, и что большая потеря CD6 поверхности наблюдается при более высоких дозах итализумаба.

На **фигурах 29А-29Б** показано, что лечение итализумабом в дозе 0,8 мг/кг вызывало 3-кратное снижение количества T<sub>H</sub>17-клеток и 2,5-кратное увеличение количества T<sub>reg</sub>-клеток по сравнению с плацебо.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

Ниже приводится подробное описание, призванное помочь специалистам в данной области в осуществлении настоящего раскрытия. Специалисты в данной области техники могут вносить изменения и вариации в описанные в данном документе варианты осуществления без отклонения от сути или объема настоящего раскрытия. Все публикации, патентные заявки, патенты, фигуры и

другие ссылки, упомянутые в данном документе, явным образом включены в него посредством ссылки во всей своей полноте.

Некоторые варианты осуществления включают способы идентификации оптимизированного антитела к CD6. В некоторых вариантах осуществления способы идентификации оптимизированного антитела к CD6 основаны на измерениях селективности, включая измерения avidности. В некоторых вариантах осуществления способы идентификации оптимизированного антитела к CD6 включают измерение потерь CD6 на клеточной поверхности с течением времени после лечения. В некоторых вариантах осуществления оптимизированное антитело к CD6 представляет собой fab, f(ab)<sub>2</sub> или слитый белок.

Некоторые варианты осуществления включают способы селективного связывания с клетками с высоким уровнем CD6 на клеточной поверхности, или CD6<sup>high</sup>-клетками. В некоторых вариантах осуществления способы включают удаление или иным образом снижение уровня CD6 с клеточной поверхности CD6<sup>high</sup>-клеток. В некоторых вариантах осуществления CD6<sup>high</sup>-клетки представляют собой Т-лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления Т-лимфоциты представляют собой одно или более из Т-хелперов CD4 (Th1, Th2, Th22, Th9, Th17, Tfh, Tph), наивных CD8, эффекторов, эффекторных клеток памяти, стволовых клеток памяти или центральных клеток памяти CD4 или CD8, натуральных киллеров (NK) и врожденных лимфоидных клеток (ILC), например, ILC1, ILC2 и/или ILC3 клеток.

В некоторых вариантах осуществления представлены способы селективного удаления или снижения CD6 клеточной поверхности в CD6<sup>high</sup>-клетках. В некоторых вариантах осуществления способы включают лечение оптимизированным антителом к CD6. В некоторых вариантах осуществления измеряется экспрессия поверхностного CD6. В некоторых вариантах осуществления представлены способы определения терапевтических дозировок оптимизированного антитела к CD6, включающие измерение потерь CD6 на клеточной поверхности с течением времени после лечения. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой итализумаб. В некоторых вариантах осуществления представлены способы снижения патогенности клеток, включающие введение оптимизированного антитела к CD6. Некоторые варианты осуществления включают способы скрининга антитела к CD6 или его антигенсвязывающего фрагмента для применения как биологического терапевтического средства, включающие: инкубацию кандидатного антитела к CD6



или его антигенсвязывающего фрагмента с клетками, экспрессирующими CD6 на клеточной поверхности; измерение экспрессии CD6 на клеточной поверхности клеток; и составление кандидатного антитела к CD6 или его антигенсвязывающего фрагмента в виде фармацевтической композиции, если оно обеспечивает снижение экспрессии CD6 на клеточной поверхности по сравнению с контролем или стандартом.

Некоторые варианты осуществления включают способы селективного снижения уровня CD6 на клеточной поверхности T-лимфоцитов и селективного снижения уровня CD6<sup>high</sup> T-лимфоцитов и/или T<sub>eff</sub>-клеток у субъекта. При использовании в данном документе «T<sub>eff</sub>-клетки» включают активированные T-хелперные клетки, такие как Th1-клетки и Th17-клетки. В конкретных вариантах осуществления «T<sub>eff</sub>-клетки» представляют собой Th17-клетки.

Некоторые варианты осуществления включают получение исходного измерения уровня CD6 клеточной поверхности и/или определение порогового или целевого уровня CD6 клеточной поверхности и введение терапевтической дозы антитела к CD6, такого как итолизумаб. В некоторых вариантах осуществления способы включают мониторинг уровня CD6 в образце ткани субъекта, причем образец ткани содержит T-лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение дополнительной дозы итолизумаба субъекту, если уровни CD6 клеточной поверхности возвращаются к приблизительно или более чем приблизительно 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 процентам от исходного уровня CD6 клеточной поверхности. Некоторые варианты осуществления включают введение дополнительной дозы итолизумаба, если уровень CD6 клеточной поверхности повышается до целевого уровня CD6 клеточной поверхности или выше (см., например, фиг. 17А-17Б).

В некоторых вариантах осуществления представлены способы предупреждения или ослабления GVHD у пациента, нуждающегося в трансплантации, включающие инкубацию тканей, подлежащих трансплантации, с антителом к CD6, которое селективно отделяет, удаляет или иным образом снижает уровень CD6 на клеточной поверхности от CD6<sup>high</sup>-клеток; и трансплантацию тканей пациенту. В некоторых вариантах осуществления способы включают измерение уровня CD6 у пациента. В некоторых вариантах осуществления способы включают измерение исходных данных.

В некоторых вариантах осуществления представлены способы модулирования соотношения  $T_{eff}$ -клеток и  $T_{reg}$ -клеток. Также в данном документе раскрыты способы увеличения соотношения  $T_{reg}$ -клеток и  $T_{eff}$ -клеток.

Также включены способы преобразования  $T_{eff}$ -клеток в  $T_{reg}$ -клетки, включающие обработку оптимизированным антителом к CD6. В некоторых вариантах осуществления оптимизированное антитело к CD6 представляет собой итолизумаб.

Некоторые варианты осуществления включают способы селективного нацеливания на  $T_{eff}$ -клетки. В некоторых вариантах осуществления представлены способы селективного нацеливания на  $T_{eff}$ -клетки, включающие введение оптимизированного антитела к CD6. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD6 представляет собой итолизумаб.

В некоторых вариантах осуществления представлены способы селективного удаления CD6 из патогенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение оптимизированного антитела к CD6. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой итолизумаб. В некоторых вариантах осуществления представлены способы селективного ослабления патогенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение оптимизированного антитела к CD6. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой итолизумаб.

Некоторые варианты осуществления относятся к способам создания гипореактивных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение оптимизированного антитела к CD6. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой итолизумаб. В некоторых вариантах осуществления представлены способы снижения аутореактивности Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления представлены способы снижения аллореактивности Т-клеток.

В данном документе раскрыты способы селективного нацеливания на  $CD6^{high}$ -клетки. В некоторых вариантах осуществления селективно нацеленные CD6-клетки включают подмножества Т-хелперов CD4 (Th1, Th2, Th22, Th9, Th17, Tfh, Tph) и наивных CD8-клеток, эффекторных, эффекторных клеток памяти, стволовых клеток памяти и подтипов центральной памяти; натуральные киллерные Т-клетки и врожденные лимфоидные клетки. Также в данном документе раскрыты способы модулирования соотношения  $T_{eff}$ -клеток и  $T_{reg}$ -клеток. Также в данном документе раскрыты способы удержания  $T_{reg}$ -клеток. Также в данном документе

раскрыты способы преобразования  $T_{eff}$ -клеток в  $T_{reg}$ -клетки. Также в данном документе раскрыты способы применения оптимизированного антитела к CD6 для модификации ответов T-клеток и ослабления заболевания.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее раскрытие предоставляет способы взаимодействия CD6 с антителом к CD6 таким образом, что антитело к CD6 связывается только с клетками с высоким уровнем экспрессии CD6 на клеточной поверхности, и при этом антитело вызывает устойчивую потерю CD6 с клеточной поверхности. Другие аспекты настоящего раскрытия описаны в данном документе.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистами в той области техники, к которой относится данное раскрытие. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы в практике или испытаниях настоящего раскрытия, описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации и ссылки, в том числе, без ограничения, патенты и патентные заявки, приведенные в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, как если бы каждая отдельная публикация или ссылка была конкретно и индивидуально указана для включения в данный документ посредством ссылки как полностью изложенная. Любая патентная заявка, на приоритет которой претендует настоящая заявка, также включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте способом, описанным выше для публикаций и ссылок. Для целей настоящего раскрытия ниже приведены определения следующих терминов.

В данном документе формы единственного и множественного числа используются для обозначения одного или более чем одного (т.е. по меньшей мере одного) грамматического объекта данной статьи. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

Выражение «и/или» используется в настоящем раскрытии для обозначения либо «и», либо «или», если не указано иное.

Термин «н-р» используется в данном документе для обозначения «например» и подразумевает включение указанного шага или элемента или группы шагов или элементов, но не исключение любого другого шага или элемента или группы шагов или элементов.

Под «приблизительно» подразумевается количество, уровень, значение, число, частота, процент, размер, величина, количество, вес или длина, которые отличаются на 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% от контрольного количества, уровня, значения, числа, частоты, процента, размера, величины, количества, веса или длины.

Термин «введение», как он используется в данном документе, относится к любому способу передачи, доставки, внесения или транспортировки субъекту вещества, такого как соединение, например, фармацевтическое соединение, или другого средства, такого как антиген. Пути введения включают пероральное введение, местный контакт, внутривенное, внутривенное, внутримышечное, интраназальное или подкожное введение. Введение «в комбинации с» другими веществами, такими как одно или несколько терапевтических средств, включает одновременное (параллельное) и последовательное введение в любом порядке.

Термин «авидность», как он используется в данном документе, относится к измерению силы связывания между антигенсвязывающей молекулой (такой как антитело к CD6) и соответствующим антигеном. Авидность связана как с аффинностью между антигенной детерминантой и ее антигенсвязывающим сайтом на антигенсвязывающей молекуле, так и с количеством соответствующих сайтов связывания, присутствующих на антигенсвязывающей молекуле.

Термин "партнер по связыванию", используемый в данном документе, относится к веществу, такому как молекула, в частности полимерная молекула, которая может связывать молекулу нуклеиновой кислоты, такую как ДНК или молекулу РНК, включая молекулу мРНК, а также пептид, белок, сахарид, полисахарид или липид посредством взаимодействия, достаточного для того, чтобы средство образовало комплекс с молекулой нуклеиновой кислоты, пептидом, белком или сахаридом, полисахаридом или липидом, как правило, посредством нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию представляет собой иммуноглобулин или белокподобную связывающую молекулу с иммуноглобулиноподобными функциями, как определено ниже. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию представляет собой аптамер. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию является специфичным для определенной мишени. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию включает множество сайтов связывания, при этом каждый сайт связывания специфичен для определенной мишени. В качестве иллюстративного примера партнер по связыванию может

представлять собой белокподобное средство с иммуноглобулиноподобными функциями с двумя сайтами связывания. Это может быть, например, антигенсвязывающий фрагмент антитела. Например, это может быть биспецифическое диатело, такое как биспецифическое одноцепочечное диатело.

Термин «носитель», используемый в настоящем раскрытии, включает носители, вспомогательные вещества и разбавители и означает материал, композицию или транспортирующее средство, такое как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или инкапсулирующий материал, участвующий в переносе или транспортировке фармацевтического средства из одного органа или части тела в другой орган или часть тела субъекта.

Как используется в данном документе, термин «химерное антитело» относится к полипептиду иммуноглобулина или домену антитела, который включает последовательности из более чем одного вида. В химерном антителе тяжелая или легкая цепь может содержать последовательность варибельной области одного вида, например, человека, и последовательность константной области другого вида, например, мыши. В качестве примера, «химерное антитело» может представлять собой иммуноглобулин, который имеет варибельные области, полученные из животного антитела, например, крысиного или мышинового антитела, слитые с другой молекулой, например, константными доменами, полученными из человеческого антитела. Термин «химерное антитело» предназначен для охвата антител, в которых: (i) тяжелая цепь является химерной, но легкая цепь содержит области Y и C только одного вида; (ii) легкая цепь является химерной, но тяжелая цепь содержит области Y и C только одного вида; и (iii) и тяжелая цепь, и легкая цепь являются химерными.

Под «эффективным количеством», когда речь идет о соединении, понимается количество соединения, такого как антитело к CD6 (например, итолизумаб или EQ001), необходимое для того, чтобы вызвать желаемый ответ. В некоторых вариантах осуществления желаемый ответ представляет собой биологический ответ, например, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления соединение (например, антитело к CD6) может быть введено субъекту в эффективном количестве, чтобы вызвать биологический ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой «терапевтически эффективное количество».

Термины «терапевтически эффективное количество» и «терапевтическая доза» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения количества соединения, такого как антитело к CD6 (например, итализумаб или EQ001), которое является эффективным после введения субъекту для лечения заболевания или нарушения у субъекта, описанного в данном документе.

Термин «патогенность» используется в данном документе для обозначения способности Т-клетки проявлять патогенный ответ в виде повышенной пролиферации и секреции цитокинов.

Термин "профилактически эффективное количество" используется в данном документе для обозначения количества соединения, такого как антитело к CD6 (например, итализумаб или EQ001), которое является эффективным после введения субъекту для предупреждения или задержки начала заболевания или нарушения у субъекта, описанного в данном документе.

В этом отношении «гуманизованное антитело», как используется в данном документе, представляет собой полипептид иммуноглобулина или домен антитела, содержащий структурные элементы человеческого антитела и антигенсвязывающий сайт антитела, отличного от человеческого. «Гуманизованные антитела» содержат минимальное количество остатков от антитела, отличного от человеческого, из которого они получены. Например, они могут содержать только области CDR антитела, отличного от человеческого, или только те остатки, которые составляют гипервариабельные области антитела, отличного от человеческого. Они также могут содержать определенные остатки вне вариабельных областей полипептида, отличного от человеческого, например, остатки, необходимые для имитации структуры антитела, отличного от человеческого, или для минимизации стерических влияний. Как правило, гуманизованное антитело содержит человеческий каркас, по меньшей мере одну CDR из антитела, отличного от человеческого, при этом любая присутствующая константная область по сути идентична константной области иммуноглобулина человека, т.е. по меньшей мере на 85-90%, например, по меньшей мере на 95%. Таким образом, в некоторых случаях все части гуманизованного иммуноглобулина, за исключением, возможно, CDR, по сути, идентичны соответствующим частям одной или нескольких последовательностей нативного иммуноглобулина человека. Кроме того, гуманизованные антитела могут содержать остатки, которые не соответствуют ни человеческим антителам, ни антителам, отличным от человеческих.

При использовании в данном документе термин «фрагмент антитела» относится к любой форме антитела, отличной от полноразмерной формы. Фрагменты антител, описанные в данном документе, включают антитела, которые являются компонентами меньшего размера, существующими в составе полноразмерных антител, и антитела, которые были сконструированы. Фрагменты антител включают, без ограничения, Fv, Fc, Fab и (Fab')<sub>2</sub>, одноцепочечные Fv (scFv), диатела, триатела, тетратела, бифункциональные гибридные антитела, CDR1, CDR2, CDR3, комбинации CDR, переменные области, каркасные области, константные области, тяжелые цепи, легкие цепи, альтернативные молекулы, не являющиеся антителами, и биспецифические антитела. Если конкретно не указано иное, утверждения и пункты формулы изобретения, в которых используется термин «антитело» или «антитела», могут в частности включать «фрагмент антитела» и «фрагменты антител».

Термин «VH» используется в данном документе для обозначения переменной части тяжелой цепи антитела.

Термин «VL» используется в данном документе для обозначения переменной части легкой цепи антитела.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» в отношении антитела относится к любому фрагменту антитела, который сохраняет аффинность связывания с антигеном, с которым связывается родительское полноразмерное антитело, и антигенсвязывающие фрагменты включают, без ограничения, Fv, Fab, (Fab')<sub>2</sub>, scFv, диатела, триатела, тетратела, бифункциональные гибридные антитела, CDR1, CDR2, CDR3, комбинации CDR, переменные области, тяжелые цепи, легкие цепи и биспецифические антитела.

Во всем настоящем описании, если контекст не требует иного, слова «содержать», «содержит» и «содержащий» будут пониматься как подразумевающие включение указанного шага или элемента или группы шагов или элементов, но не исключающие любой другой шаг или элемент или группу шагов или элементов. Под «состоящим из» подразумевается, включая и ограничиваясь тем, что следует за фразой «состоящий из». Таким образом, фраза «состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, и что никакие другие элементы не могут присутствовать. Под «состоящим по сути из» подразумевается включение любых элементов, перечисленных после этой фразы, и ограниченное другими элементами, которые не мешают и не способствуют активности или действию, указанному в раскрытии для

перечисленных элементов. Таким образом, фраза «состоящий по сути из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, но что другие элементы являются необязательными и могут присутствовать или не присутствовать в зависимости от того, влияют ли они существенно на активность или действие перечисленных элементов.

Термин «модулирующий» включает «увеличение», «усиление» или «стимулирование», а также «уменьшение» или «снижение», как правило, в статистически значимом или физиологически значимом количестве по сравнению с контролем. «Увеличенное», «стимулированное» или «усиленное» количество как правило является «статистически значимым» количеством и может включать увеличение в 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз (например, в 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные точки между и выше 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т.д.) по сравнению с количеством, полученным при отсутствии композиции (например, при отсутствии любого из антител к CD6 согласно раскрытию) или контрольной композиции, образца или субъекта тестирования. «Сниженное» или «уменьшенное» количество обычно является «статистически значимым» количеством и может включать 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% снижение количества, полученного при отсутствии композиции (отсутствие средства или соединения) или контрольной композиции, включая все целые числа между ними.

Термины «полипептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислотных остатков и его вариантов и синтетических аналогов. Таким образом, эти термины применимы к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются синтетическими аминокислотами не природного происхождения, например, химическим аналогом соответствующей аминокислоты природного происхождения, а также к полимерам аминокислот природного происхождения.

«Субъект» или «пациент», как используется в данном документе, включает любое животное, у которого проявляется симптом или существует риск проявления симптома, который можно подвергать лечению или диагностике с помощью антитела к CD6 или его антигенсвязывающего фрагмента. Подходящие субъекты (пациенты) включают, предпочтительно, пациентов-людей. Подходящие субъекты



также включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или морская свинка), сельскохозяйственных животных (таких как свинья, лошадь, корова) и домашних животных или питомцев (таких как кошка или собака). Приматы, отличные от человека (такие как обезьяна, шимпанзе, бабуин или резус), также включены в этот перечень.

«По существу» или «по сути» означает почти полностью или полностью, например, 95% или более от некоторого заданного количества.

«Лечение» или «осуществление лечения», как используется в данном документе, включает любое желательное воздействие на симптомы или патологию заболевания или состояния, и может включать даже минимальные изменения или улучшения в одном или нескольких измеряемых маркерах заболевания или состояния, которое подвергается лечению. «Лечение» или «осуществление лечения» не обязательно означает полное искоренение или излечение заболевания или состояния, или связанных с ним симптомов. Субъектом, получающим такое лечение, является любой нуждающийся в нем субъект. Иллюстративные маркеры клинического улучшения будут очевидны специалистам в данной области.

Настоящее раскрытие относится, например, к способам идентификации антител к CD6, способных удалять CD6 с клеточной поверхности CD6<sup>high</sup>-клеток, и способам применения антител к CD6 для преобразования T<sub>eff</sub> в T<sub>reg</sub>-клетки, а также к способам лечения, предупреждения или ослабления ауто- или аллореактивных T-клеток, натуральных киллеров (NK) или врожденных лимфоидных клеток (ILC), включающим введение субъекту антитела к CD6.

CD6 - важный белок клеточной поверхности, преимущественно экспрессируемый NK-клетками человека, ILC, T-клетками и подмножеством В-клеток, а также некоторыми В-клеточными хроническими лимфоцитарными лейкозами и нейронами [Aruffo et al., J. Exp. Med. 1991, 174:949; Kantoun et al., J. Immunol. 1981, 127:987; Mayer et al., J. Neuroimmunol. 1990, 29: 193] CD6 является представителем большого семейства белков, характеризующихся наличием по меньшей мере одного домена, гомологичного цистеин-богатому домену фагоцитарного рецептора (SRCR) макрофагов типа I [Matsumoto, et al., J. Exp. Med. 1991, 173:55 и Resnick et al., Trends Biochem. Sci. 1994, 19:5] Другие представители этого семейства включают CD5 [Jones et al., Nature. 1986, 323 :346]; циклофилин С [Friedman et al. 1993, PNAS 90:6815]; фактор комплемента I, который связывает активированные белки комплемента C3b и C4b [Goldberger, et al., J. Biol. Chem. 1987, 262: 10065]; бычий WC-1, представленный  $\tau/\delta$ . T cells [Wijngaard et

al., J. Immunol. 1992, 149:3273] и M130 [Law et al., Eur J. Immunol. 1993, 23 :2320], маркер активации макрофагов.

Внеклеточный домен зрелого белка CD6 состоит из трех SRCR доменов (далее обозначаемых D1, D2 и D3). D3 соответствует мембранному проксимальному домену SRCR, за которым следует короткая 33-аминокислотная область стебля. Эти внеклеточные домены закреплены на клеточной мембране с помощью короткого трансмембранного домена, за которым следует цитоплазматический домен переменной длины [Aruffo et al. Med. 1991, 174:949].

Сообщалось, что растворимая форма CD6 (sCD6) неизвестного происхождения циркулирует на очень низком уровне (пико-/наномолярный диапазон) в сыворотках здоровых людей. Повышенные уровни sCD6 наблюдались у людей с синдромом системного воспалительного ответа и первичным синдромом Сьогрена, но прямые механистические и функциональные связи между этими явлениями отсутствуют. Сообщается, что sCD6 образуется в результате отщепления мембраносвязанного рецептора под действием протеолитического воздействия представителей семейства металлопротеиназ ADAM (Carrasco, et al., *Frontiers in Immunology* 2017. 8:769). Кроме того, хотя функциональная роль sCD6 в физиологии Т-клеток еще не известна, результаты *in vitro* показывают, что sCD6 ингибирует активацию Т-клеток и созревание иммунологического синапса, что побуждает некоторых исследователей предположить, что sCD6 действует как рецептор-приманка для инактивации сторонних Т-клеток вблизи сайта воспаления.

Исследования с применением белков слияния CD6-иммуноглобулина, содержащих отдельные внеклеточные домены CD6, слитые с константными доменами IgG1 человека (CD6-Rgs), привели к идентификации и клонированию лиганда CD6, обозначенного как «активированная молекула клеточной адгезии лейкоцитов» (ALCAM), также известного как CD166 [Patel, et al., J. Exp. Med. 1995. 181 : 1563-1568; Bowen et al., J. Exp. Med 1995, 181 :2213-2220]

ALCAM представляет собой 100-105 кД трансмембранный гликопротеин I типа, который является представителем суперсемейства иммуноглобулинов и состоит из пяти внеклеточных иммуноглобулиновых доменов (2 NH<sub>2</sub> - терминальных, мембранно-дистальных переменных (V)-типа (V1, V2 или D1, D2) и 3 мембранно-проксимальных константных (C2)-типа Ig складок [C1, C2, C3], трансмембранной области и короткого цитоплазматического хвоста. N-концевой домен (D1) участвует исключительно в связывании лигандов, тогда как

проксимальные домены мембраны (C2, C3 или D4, D5) необходимы для гомофильных взаимодействий.

ALCAM связывается с доменом 3 CD6, соответствующим мембранному проксимальному домену SRCR [Whitney, et. al., J. Biol. Chem 1995, 270: 18187-18190].

Исследования роли взаимодействия CD6/ALCAM в регуляции Т-клеток показали, что эта пара рецептор-лиганд способна опосредовать адгезию CD6-экспрессирующих клеток к тимическим эпителиальным клеткам. Это позволяет предположить, что взаимодействие CD6/ALCAM важно для модулирования развития и активации Т-клеток. Кроме того, сообщалось об отщеплении ALCAM, и, как и в случае с sCD6, этот процесс, по-видимому, является продуктом расщепления, опосредованного металлопротеиназами семейства ADAM.

CD6 играет важную роль в модулировании функции Т-клеток *in vivo*. Также сообщается, что CD6 является частью иммунологического синапса, опосредующего раннее и позднее взаимодействие Т-клеток и антигенпрезентирующих клеток (АПК). Более того, было показано, что Т-клетки CD6<sup>high</sup> являются патогенными, а Т-клетки CD6<sup>low</sup> не являются патогенными (см., например, Ma et al., Journal of Crohn's and Colitis. 13: 510–524, 2019). Способы определения высокой и низкой экспрессии CD6 известны в данной области, и клетки CD6<sup>high</sup> и CD6<sup>low</sup> могут быть определены путем сравнения экспрессии белка и/или мРНК на различных подмножествах клеток (см., например, Ma et al., выше; и Santana et al., Cytometry A. 85:901-8, 2014).

Патент США № 6372215 раскрывает антитела и другие связывающие средства, которые специфически связываются с SRCR доменами 3 (D3) человеческого CD6 (hCD6) или стебельчатым доменом человеческого CD6 (CD6S) и ингибируют связывание активированной молекулы клеточной адгезии лейкоцитов (ALCAM) с CD6.

В предыдущих публикациях и патентах были раскрыты последовательности моноклонального мышинового антитела к CD6 (IOR-T1) и аминокислотные модификации, которые были проведены для гуманизации IOR-T1 до T1h (гуманизированный IOR-T1). Патент США № 5712120 и его эквивалент EP 0699755 раскрывают конкретные способы гуманизации мышинных моноклональных антител и последовательности IOR-T1 и T1h. Патент США № 6572857 и его эквивалент EP 0807125 раскрывают последовательность IOR-T1 и T1h (гуманизированная IOR-T1). PCT/IN2008/00562, под названием "A Monoclonal Antibody and a Method

Thereof", раскрывает производство антитела к CD6 в клетках NS0, которое имеет последовательности тяжелой и легкой цепи, представленные в данном документе как SEQ ID NOS: 1 и 2. INN название этого антитела - итолизумаб. Итолизумаб производится в клеточной линии NS0, полученной от мыши, и в клетках яичника китайского хомячка (CHO), и упоминается в данном документе под торговым названием EQ001, если производится в клетках CHO, и под торговым названием ALZUMAB, если производится в клетках NS0. EQ001 (т.е. итолизумаб, произведенный в клетках CHO) также известен в данной области как «mab-600». В некоторых вариантах осуществления само антитело, независимо от способа его получения, обозначается его INN названием - итолизумаб. Таким образом, термин «итолизумаб», как он используется в данном документе, охватывает ALZUMAB и EQ001, каждый из которых имеет ту же последовательность, что и итолизумаб (см. **таблицу S1**). Аминокислотные последовательности переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL) итолизумаба (и EQ001 / ALZUMAB) представлены в настоящем документе как SEQ ID NOS: 1 и 2, соответственно. Нуклеотидные (ДНК) последовательности VH и VL итолизумаба (и EQ001 / ALZUMAB) представлены в данном документе как SEQ ID NOS: 3 и 4, соответственно. Аминокислотная последовательность CDR 1-3 VH итолизумаба (и EQ001 / ALZUMAB) представлена как SEQ ID NOS: 5-7, соответственно. Аминокислотная последовательность CDR 1-3 VL итолизумаба (и EQ001 / ALZUMAB) представлена как SEQ ID NOS: 8-10, соответственно.

Антитела, нацеленные на CD6, показали свою перспективность в качестве терапии широкого спектра заболеваний и состояний, которые, по меньшей мере частично, вызваны aberrантной активностью Т-клеток. Например, в PCT/IN2008/000562 раскрыто применение итолизумаба для ингибирования пролиферации наивных Т-клеток и лечения различных воспалительных заболеваний, в том числе рассеянного склероза, отторжения трансплантата, ревматоидного артрита и псориаза. Действительно, в настоящее время ALZUMAB продается в Индии для лечения псориаза. Кроме того, применение итолизумаба для лечения волчанки раскрыто в PCT/IB2017/056428. Однако вследствие гетерогенности этих заболеваний и их тенденции к переходу от одной формы заболевания к другой, опосредованной Т-клетками, В-клетками, дендритными клетками, моноцитами и нейтрофилами, для более полного освоения потенциала этих антител необходимы более целенаправленные виды терапии.

Пока еще не существует стратегии биомаркеров, используемой в клинической практике для определения того, когда пациент с наибольшей вероятностью может благоприятно ответить на лечение с помощью антитела к CD6 (например, итолизумаба) или в целом на снижение экспрессии CD6 на клеточной поверхности клеток CD6<sup>high</sup>. Варианты осуществления настоящего раскрытия включают способы определения режимов дозирования для получения желаемого ослабления клеток CD6<sup>high</sup>.

Некоторые варианты осуществления включают способы определения оптимальной дозы итолизумаба у человека, страдающего аутоиммунным, иммуновоспалительным или воспалительным заболеванием, заболеванием "трансплантат против хозяина" (GVHD) или отторжением трансплантата органа, включающие:

(а) определение исходного уровня CD6 на клеточной поверхности в образце ткани от субъекта, причем образец ткани содержит Т-лимфоциты, и, необязательно, определение целевого уровня CD6 на клеточной поверхности у субъекта;

(б) введение субъекту серии из двух или трех или более доз итолизумаба (например, 3, 4, 5 или 6 доз), необязательно с увеличением дозы (например, до приблизительно 4 мг/кг), например, с увеличением каждой дозы или каждой второй дозы (например, с увеличением приблизительно на 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг или 1,0 мг/кг или более на дозу или на каждую вторую дозу);

(в) мониторинг уровней CD6 на клеточной поверхности в образце ткани от субъекта между сериями доз, причем образец ткани содержит Т-лимфоциты;

(г) определение наименьшей дозы из серии доз как оптимальной дозы, если уровни CD6 на клеточной поверхности на шаге (в) составляют приблизительно или менее приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45 или 50 процентов от исходного уровня из (а), или составляют в пределах приблизительно или менее приблизительно 5, 10, 15 или 20 процентов от необязательного целевого уровня из (а), и если между сериями доз не наблюдается дальнейшего снижения (например, статистически значимого снижения) уровней CD6 на клеточной поверхности. Некоторые варианты осуществления включают определение уровней CD6 на клеточной поверхности клеток CD4 и/или клеток CD8 в образце ткани от субъекта. В конкретных вариантах осуществления образец ткани представляет собой образец крови. Некоторые варианты осуществления включают определение

целевого уровня CD6 на клеточной поверхности у субъекта на основании клинических параметров или симптомов заболевания.

Некоторые варианты осуществления относятся к режиму дозирования для лечения аутоиммунного, иммуновоспалительного или воспалительного заболевания, заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD) или отторжения трансплантата органа у нуждающегося в этом субъекта, включающему:

(а) определение исходного уровня CD6 на клеточной поверхности в образце ткани от субъекта, причем образец ткани содержит Т-лимфоциты, и, необязательно, определение целевого уровня CD6 на клеточной поверхности у субъекта;

(б) введение субъекту дозы итализумаба, которая обеспечивает снижение уровня CD6 на клеточной поверхности в Т-лимфоцитах субъекта до приблизительно или менее чем приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 процентов от исходного уровня из (а);

(в) мониторинг уровней CD6 на клеточной поверхности в образце ткани субъекта, причем образец ткани содержит Т-лимфоциты; и

(г) введение субъекту дополнительной дозы итализумаба до того, как или если уровень CD6 на поверхности клеток в (в) возвращается к приблизительно или более чем приблизительно 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 процентам от исходного уровня из (а), или повышается до приблизительно или более чем целевого уровня из (а).

В некоторых вариантах осуществления режим дозирования поддерживает уровни CD6 на клеточной поверхности в Т-лимфоцитах (например, клетках CD4 и/или CD8) субъекта на уровне или ниже, чем приблизительно 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75% от исходного уровня из (а), или в пределах приблизительно 5, 10, 15 или 20% от необязательного целевого уровня из (а), и некоторые варианты осуществления включают определение целевого уровня CD6 на клеточной поверхности у субъекта на основе клинических параметров или симптомов заболевания.

Также включены режимы дозирования для лечения аутоиммунного, иммуновоспалительного или воспалительного заболевания, заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD) или отторжения трансплантата органа у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие:

(а) определение исходного уровня Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> в образце крови субъекта и, необязательно, выявление целевого уровня Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup>;

(б) введение субъекту дозы итализумаба, которая обеспечивает снижение уровня Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> у субъекта до приблизительно или менее, чем приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 40 процентов от исходного уровня из (а);

(в) мониторинг уровней Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> в образце крови субъекта;  
и

(г) введение дополнительной дозы итализумаба субъекту до того, как уровни Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> из (в) вернуться к приблизительно или более чем приблизительно 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 процентам от исходного уровня из (а), или повысятся до приблизительно или выше целевого уровня из (а), и в некоторых случаях, с определением целевого уровня Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> у субъекта на основе клинических параметров или симптомов заболевания.

В некоторых вариантах осуществления режим дозирования поддерживает уровень Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> у субъекта на уровне приблизительно или менее чем приблизительно 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 процентов от исходного уровня из (а), в том числе, когда Т-лимфоциты представляют собой клетки CD4 и/или клетки CD8. В некоторых вариантах осуществления режим дозирования обеспечивает снижение соотношения CD6<sup>high</sup>:CD6<sup>low</sup> Т-лимфоцитов у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более или приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или более по сравнению с контролем, или стандартом, или исходным уровнем, необязательно, причем Т-лимфоциты представляют собой клетки CD4 и/или клетки CD8.

В некоторых вариантах осуществления режим дозирования снижает соотношение T<sub>eff</sub>:T<sub>reg</sub> клеток у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более или приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или более относительно контроля или стандарта или исходного уровня, необязательно клеток CD4 и/или клеток CD8.

Также включены способы клеточной терапии для предупреждения или ослабления заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD) у пациента с человеческим трансплантатом, включающие следующее:

(а) инкубирование ткани трансплантата с антителом к CD6, необязательно итализумабом, в течение времени, достаточного для снижения уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> в ткани трансплантата; и

(б) пересадка ткани трансплантата пациенту.

Некоторые способы включают определение уровня CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов в ткани трансплантата до и после шага (а) и выполнение шага (б), если уровень CD6 на клеточной поверхности после шага (а) снижается приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более по сравнению с уровнем до шага (а). В некоторых вариантах осуществления ткань трансплантата включает клетки пуповинной крови, клетки костного мозга, клетки периферической крови, мобилизованные клетки периферической крови, мезенхимальные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, клетки, дифференцированные из стволовых клеток/прогениторных клеток, сконструированные клетки (например, химерные антигенные рецепторы (CAR), такие как CAR Т-клетки) или любые комбинации указанных клеток. В некоторых вариантах осуществления ткань трансплантата является аутологичной для пациента с человеческим трансплантатом, то есть, когда ткань трансплантата удаляется у пациента, обрабатывается, как описано в данном документе, и впоследствии вводится тому же пациенту. В некоторых вариантах осуществления ткань трансплантата представляет собой аллотрансплантационную ткань или ткань, которая является аллогенной для пациента с человеческим трансплантатом, например, когда ткань трансплантата получают от генетически неидентичного донора-человека, обрабатывают, как описано в данном документе, и затем вводят пациенту-человеку.

Также включены способы клеточной терапии (например, T<sub>reg</sub>-терапии) для лечения или улучшения течения аутоиммунного, иммуновоспалительного или воспалительного заболевания у нуждающегося в этом пациента, включающие:

(а) инкубирование ткани трансплантата с антителом к CD6, необязательно итализумабом, в течение времени, достаточного для снижения уровня CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> в ткани трансплантата, с получением ткани трансплантата, обогащенной Т-лимфоцитами CD6<sup>low</sup> (наивными);

(б) обработку ткани трансплантата из (а) в течение времени, достаточного для генерации T<sub>reg</sub>-лимфоцитов из Т-лимфоцитов CD6<sup>low</sup> (наивных); и

(в) пересадку ткани трансплантата из (в) пациенту.

Как указано выше, некоторые варианты осуществления включают шаг (и) определения уровня CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов в ткани



трансплантата до и после шага (а) и выполнение шага (б), если уровень CD6 на клеточной поверхности после шага (а) снижается приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более по сравнению с уровнем до шага (а).

В некоторых вариантах осуществления шаг (б), описанный выше, включает инкубацию ткани трансплантата, обогащенной Т-лимфоцитами CD6<sup>low</sup> (наивными), с комбинацией активаторов Т-клеток/стимулирующих сигналов, цитокинов, факторов роста, транскрипционных факторов и/или стабилизирующих средств (например, активаторов CD3/CD28, коктейлей для дифференцировки T<sub>reg</sub>, таких как ImmunoCult™ Human Treg Differentiation Supplement от STEMCELL TECHNOLOGIES™) в течение времени, достаточного для генерации или обогащения T<sub>reg</sub>-лимфоцитов. Примеры таких видов лечения или протоколов для генерации (например, дифференцировки, размножения) T<sub>reg</sub> известны в данной области (см., например, Golovina et al., PLoS ONE (2011) 6:e15868. doi: 10.1371/journal.pone.0015868; Scottà et al., Haematologica 98:1291-9, 2013; Dons et al., Hum Immunol. 73:328-34, 2012; Fraser et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 8:198–209, 2018; Romano et al., Front. Immunol. 31 January 2019, doi.org/10.3389/fimmu.2019.00043; Haddadi et al., Clinical and Experimental Immunol. 201(2):205-221, 2020), включая протокол, объединяющий ROR $\gamma$ -специфический обратный агонист (SR) и сигнальный промотор TGF- $\beta$  [N-ацетил пуромицин (N-Ac)]).

Дополнительные протоколы для генерации T<sub>reg</sub>-лимфоцитов описаны, например, в Chen et al. (The Journal of Experimental Med. 198(12):1875-1886, 2003), где описывается костимуляция наивных Т-клеток TCRs и TGF- $\beta$ ; Zheng et al. (J. Immunol. 178:2018-2027, 2007), где описана стимуляция IL-2 и TGF- $\beta$ ; Schiavon et al. (PNAS. 116:6298-6307, 2019), где описана стимуляция IL-2, TGF- $\beta$  и PGE<sub>2</sub>; и Ferreira et al. (Nat Rev Drug Discov. 18(10): 749–769, 2019), в котором описаны различные методики и клинические испытания, иллюстрирующие ex vivo генерацию T<sub>reg</sub>-лимфоцитов. В Zagury et al. (WO 2018/024896) описаны иллюстративные протоколы, включающие культивирование Т-клеток в присутствии активатора  $\gamma\delta$  Т-клеток и следующих средств: i) активатора cAMP (циклического аденозинмонофосфата), ii) активатора пути TGFP (трансформирующего фактора роста бета), iii) ингибитора mTOR, необязательно iv) по меньшей мере одного цитокина, выбранного из группы IL-2, IL-7, IL-15 и TSLP, и необязательно v) по меньшей мере одного активатора ферментов TET

и/или по меньшей мере одного ингибитора DNMT. В Alvarez-Salazar et al. (Front. Immunol. 11:375. doi: 10.3389/fimmu.2020.00375) описана крупномасштабная генерация человеческих T<sub>reg</sub>-лимфоцитов с функциональной стабильностью для применения в иммунотерапии при трансплантации, например, путем совместного культивирования наивных Т-клеток с дендритными клетками в присутствии TGF-β1, IL-2 и ретиноевой кислоты для генерации T<sub>reg</sub> и размножения T<sub>reg</sub> в присутствии TGF-β1, IL-2 и рапамицина. В описанных в данном документе способах (например, на шаге (б), описанном выше) можно использовать любой один или несколько вышеописанных способов или других способов, известных в данной области, для генерации T<sub>reg</sub> из обогащенной итализумабом популяции Т-лимфоцитов CD6<sup>low</sup> (наивных).

В некоторых вариантах осуществления ткань трансплантата включает клетки пуповинной крови, клетки костного мозга, клетки периферической крови, мобилизованные клетки периферической крови, мезенхимальные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, клетки, дифференцированные из стволовых клеток/прогениторных клеток, сконструированные клетки (например, химерные антигенные рецепторы (CAR), такие как CAR Т-клетки) или любые комбинации указанных клеток. В некоторых вариантах осуществления ткань трансплантата является аутологичной для пациента-человека, например, проводится аутологичная T<sub>reg</sub>-терапия. В некоторых вариантах осуществления ткань трансплантата представляет собой аллотрансплантационную ткань или ткань, которая является аллогенной для пациента-человека.

Некоторые варианты осуществления включают способы лечения аутоиммунного, иммуновоспалительного или воспалительного заболевания, заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD) или отторжения трансплантата органа у нуждающегося в этом субъекта, включающие:

(а) введение итализумаба субъекту; и

(б) определение уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов в образце ткани от субъекта, определение уровней Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> и, необязательно, Т-лимфоцитов CD6<sup>low</sup> в образце ткани от субъекта, и/или определение уровней/соотношения T<sub>eff</sub> и T<sub>reg</sub>-клеток у субъекта, при этом образец ткани содержит Т-лимфоциты;

при этом введение итализумаба обеспечивает снижение любого одного или более из (i) уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов, необязательно клеток CD4 и/или CD8; (ii) уровней Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> у субъекта; (iii)

соотношения  $CD6^{high}:CD6^{low}$  Т-лимфоцитов у субъекта; и/или (iv) соотношения  $T_{eff}:T_{reg}$  клеток у субъекта, и тем самым снижает патогенный иммунный ответ у субъекта. Способы определения любого одного или нескольких из (i)-(iv), приведенных выше, описаны в настоящем документе (см. Примеры) и известны в данной области.

В некоторых случаях введение итализумаба снижает уровни CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля или стандарта или исходного уровня, необязательно, при этом Т-лимфоциты представляют собой клетки CD4 и/или клетки CD8; снижает уровни Т-лимфоцитов  $CD6^{high}$  у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля или стандарта или исходного уровня, необязательно, при этом Т-лимфоциты представляют собой клетки CD4 и/или клетки CD8; снижает соотношение  $CD6^{high}:CD6^{low}$  Т-лимфоцитов у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более или приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или более относительно контроля или стандарта или исходного уровня, необязательно, при этом Т-лимфоциты представляют собой клетки CD4 и/или клетки CD8; и/или снижает соотношение  $T_{eff}:T_{reg}$  клеток у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более или приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или более относительно контроля или стандарта или исходного уровня.

В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное, иммуновоспалительное или воспалительное заболевание у пациента или субъекта характеризуется повышенным соотношением  $T_{eff}:T_{reg}$  клеток по сравнению со стандартом или здоровым субъектом. В конкретных вариантах осуществления соотношение  $T_{eff}:T_{reg}$  клеток у субъекта или пациента увеличивается приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз или более по сравнению со стандартом или здоровым субъектом. В конкретных вариантах осуществления аутоиммунное, иммуновоспалительное или воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), необязательно болезнь Крона или язвенный колит, системную

красную волчанку (СКВ), необязательно СКВ с волчаночным нефритом, ревматоидный артрит (РА), рассеянный склероз (РС), псориаз, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит или астму.

Определенные варианты осуществления включают способы анализа тестовой партии итолизумаба на основе клеток *in vitro* (т.е. на основе клеточной культуры), включающие:

- (а) инкубирование тестовой партии итолизумаба с (культивируемыми) клетками, экспрессирующими CD6 на клеточной поверхности;
- (б) измерение экспрессии CD6 на клеточной поверхности клеток; и
- (в) составление тестовой партии итолизумаба в виде фармацевтической композиции, если тестовая партия обеспечивает снижение экспрессии CD6 на клеточной поверхности (например, на Т-лимфоцитах) по сравнению с контролем или стандартом, и отбраковку тестовой партии итолизумаба, если тестовая партия не обеспечивает снижения экспрессии CD6 на клеточной поверхности по сравнению с контролем или стандартом.

В некоторых вариантах осуществления шаг (б) включает прямое измерение экспрессии CD6 на клеточной поверхности клеток, например, Т-лимфоцитов. Уровень CD6 на клеточной поверхности может быть измерен в соответствии с различными методиками в данной области, например, с помощью проточной цитометрии, времяпролетной цитометрии (СуТоF), клеточного ИФА или иммунофлуоресцентной микроскопии. В некоторых вариантах осуществления шаг (б) включает косвенное измерение/определение экспрессии CD6 на клеточной поверхности путем измерения растворимого CD6 в супернатанте клеток, который служит индикатором или косвенным показателем экспрессии CD6 на клеточной поверхности. В этом и других вариантах осуществления увеличение растворимого CD6 в супернатанте указывает на снижение экспрессии CD6 на клеточной поверхности. К примерным способам измерения растворимого CD6 в супернатанте клеток относятся иммуноферментный анализ (ИФА), хемилюминесцентный анализ, электрохемилюминесцентный анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография, вестерн-блот, иммунопреципитация с последующим вестерн-блотом и другие, известные в данной области.

В некоторых вариантах осуществления клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), которые как правило включают популяции предшественников, такие как моноциты и лимфоциты CD14+, такие как В-клетки CD19+, хелперные Т-клетки CD4+, цитотоксические Т-клетки CD8+ и натуральные

киллерные (NK) клетки CD56+. В конкретных вариантах осуществления клетки включают линию Т-клеток человека или линию клеток, созданную для экспрессии CD6, например, CD6 человека. Примеры клеточных линий включают клетки MOLT-4, MOLT-3, MOLT-16, HuT 78, HuT 102, Jurkat, Jurkat NFAT, CCRF-CEM, 12.1, MJ (G11), LOUCY, SUP-T1, HEL.92.1.7, EF0-21, RPMI-8226, HPB-ALL, HH, KE37, P12ICHIKAWA, PEER, ALLSIL, RPMI8402, CMLT1, PF382, ЕНЕВ и DU4475.

В некоторых вариантах осуществления клетки включают моноциты, например, моноциты человека, например, клеточную линию моноцитов. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия моноцитов выбрана из клеток U937, THP1, MC-1010, TUR, AML-193 и MV-4-11. В некоторых вариантах осуществления клетки включают смесь (а) Т-клеток человека (например, линия Т-клеток человека) или другой клеточной линии человека, сконструированной для экспрессии CD6, и (б) моноцитов человека (например, клеточная линия моноцитов человека). В некоторых вариантах осуществления смесь (а):(б) составляет в соотношении приблизительно, по меньшей мере приблизительно или не более чем приблизительно 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 или 1:10.

Некоторые варианты осуществления включают шаг составления тестовой партии итолизумаба в виде фармацевтической композиции, если она обеспечивает снижение экспрессии CD6 на клеточной поверхности приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля или стандарта и/или если она обеспечивает увеличение растворимого CD6 в супернатанте клеток приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля или стандарта.

В целом, некоторые варианты осуществления включают способы скрининга антитела к CD6 или его антигенсвязывающего фрагмента для применения как биологического терапевтического средства, включающие:

(а) инкубирование кандидатного антитела к CD6 или его антигенсвязывающего фрагмента с (культивируемыми) клетками, экспрессирующими CD6 на клеточной поверхности;

(б) измерение экспрессии CD6 на клеточной поверхности клеток; и

(в) составление фармацевтической композиции кандидатного антитела к CD6 или его антигенсвязывающего фрагмента, если оно обеспечивает снижение

экспрессии CD6 на клеточной поверхности по сравнению с контролем или стандартом. Такие способы можно применять для идентификации кандидатных антител к CD6, которые характеризуются биологическими свойствами, имеющими клиническое значение, как описано в данном документе для итолизумаба.

Как указано выше, уровни экспрессии CD6 на клеточной поверхности могут быть измерены прямо или косвенно в соответствии с различными методиками в данной области. Например, уровень экспрессии CD6 на клеточной поверхности может быть измерен непосредственно с помощью проточной цитометрии, времяпролетной цитометрии (CyToF), клеточного ИФА или иммунофлуоресцентной микроскопии immunofluorescent microscopy. Кроме того, уровень экспрессии CD6 на клеточной поверхности может быть измерен или определен косвенно путем измерения растворимого CD6 в супернатанте клеток, например, с помощью ИФА, хемилюминесцентного анализа, электрохемилюминесцентного анализа, высокоэффективной жидкостной хроматографии, вестерн-блота, иммунопреципитации с последующим вестерн-блотом и других методик в данной области.

В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой МКПК. В конкретных вариантах осуществления клетки включают линию Т-клеток человека или линию клеток, созданную для экспрессии CD6, например, CD6 человека. Примеры клеточных линий включают клетки MOLT-4, MOLT-3, MOLT-16, HuT 78, HuT 102, Jurkat, Jurkat NFAT, CCRF-CEM, 12.1, MJ (G11), LOUCY, SUP-T1, HEL.92.1.7, EF0-21, RPMI-8226, HPB-ALL, HN, KE37, P121CHIKAWA, PEER, ALLSIL, RPMI8402, CMLT1, PF382, ENEB и DU4475.

В некоторых вариантах осуществления клетки включают моноциты, например, моноциты человека, например, клеточную линию моноцитов. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия моноцитов выбрана из клеток U937, THP1, MC-1010, TUR, AML-193 и MV-4-11. В некоторых вариантах осуществления клетки включают смесь (а) Т-клеток человека (например, линия Т-клеток человека) или другой клеточной линии человека, сконструированной для экспрессии CD6, и (б) моноцитов человека (например, клеточная линия моноцитов человека). В некоторых вариантах осуществления смесь (а):(б) составляет в соотношении приблизительно, по меньшей мере приблизительно или не более чем приблизительно 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 или 1:10, в том числе все диапазоны соотношений между ними (например, 9:1).

Конкретные варианты осуществления включают составление кандидатного антитела к CD6 или его антигенсвязывающего фрагмента в виде фармацевтической композиции, если оно обеспечивает снижение экспрессии CD6 на клеточной поверхности приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля или стандарта и/или если оно обеспечивает увеличение растворимого CD6 в супернатанте клеток приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля или стандарта.

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие предоставляет способы снижения уровня CD6 на Т-клетках у пациентов, включающие введение терапевтической дозы итализумаба либо путем подкожного, либо внутривенного введения.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективные количества моноклонального антитела к CD6 вводят каждые две недели, пока не будет установлено, что пациент выздоровел или выписан из больницы. В некоторых вариантах осуществления доза составляет 3,2 мг/кг или менее. В некоторых вариантах осуществления пациенты получают дозу от 0,1 до 3,2 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления вводят однократную дозу. В некоторых вариантах осуществления вводят две дозы. В некоторых вариантах осуществления вводят от 1 до 12 доз. В некоторых вариантах осуществления вводят две дозы. В некоторых вариантах осуществления вводят три дозы. В некоторых вариантах осуществления вводят четыре дозы. В некоторых вариантах осуществления дозирование является долгосрочным. В некоторых вариантах осуществления доза составляет 100 мг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет 200 мг. В некоторых вариантах осуществления дозы вводят раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления дозы вводят один раз в месяц. В некоторых вариантах осуществления дозы вводят каждые два месяца. В некоторых вариантах осуществления дозы вводят каждые шесть недель. В некоторых вариантах осуществления дозы вводят каждые восемь недель. В некоторых вариантах осуществления дозы вводят каждые десять недель. В некоторых вариантах осуществления дозы вводят каждые двенадцать недель. В некоторых вариантах осуществления дозы вводят каждые три месяца. В некоторых вариантах осуществления дозы вводят каждые четыре месяца. В некоторых вариантах осуществления дозы вводят каждые пять месяцев. В некоторых вариантах

осуществления дозы вводят каждые шесть месяцев. В некоторых вариантах осуществления дозы вводят с разницей более чем в шесть месяцев.

Примерный, не ограничивающий диапазон для терапевтически эффективного количества моноклонального антитела к CD6, используемого в настоящем раскрытии, составляет приблизительно 0,01-100 мг/кг на массу тела субъекта, например, приблизительно 0,01-50 мг/кг, например, приблизительно 0,01-25 мг/кг. В некоторых вариантах для определения дозы используется идеальный вес для роста пациента. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят более одной дозы. В некоторых вариантах осуществления пациенту назначают большую начальную дозу. В некоторых вариантах осуществления вторую дозу вводят через неделю. В некоторых вариантах осуществления вторую дозу вводят через две недели. В некоторых вариантах осуществления вторая доза имеет ту же силу, что и первая. В некоторых вариантах осуществления вторая доза составляет три четверти или менее от начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления вторая доза составляет половину начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления вводят третий вид лечения. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективные количества моноклонального антитела к CD6 вводят каждые две недели, пока не будет установлено, что пациент выздоровел или выписан из больницы. В некоторых вариантах осуществления дозы составляют 0,8 мг/кг или 1,6 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления дозы составляют 1,6 мг/кг и 0,8 мг/кг. Примерные, не ограничивающие дозы для терапевтически эффективного количества моноклонального антитела к CD6 составляют приблизительно или в диапазоне от приблизительно 0,8 мг/кг до 1,6 мг/кг. Медицинский работник, обладающий обычными навыками в данной области, может легко определить и назначить необходимое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, доктор может начать введение дозы моноклонального антитела к CD6 на уровне ниже, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до достижения желаемого эффекта.

В некоторых вариантах осуществления доза составляет 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,1 мг/кг, 1,2 мг/кг, 1,3 мг/кг, 1,4 мг/кг, 1,5 мг/кг, 1,6 мг/кг, 1,7 мг/кг, 1,8 мг/кг, 1,9 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,1 мг/кг, 2,2 мг/кг, 2,3 мг/кг, 2,4 мг/кг, 2,5 мг/кг, 2,6 мг/кг, 2,7 мг/кг, 2,8 мг/кг, 2,9 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,1 мг/кг, 3,2 мг/кг, 3,3 мг/кг, 3,4 мг/кг, 3,5 мг/кг, 3,6 мг/кг, 3,7 мг/кг, 3,8 мг/кг, 3,9 мг/кг или 4,0 мг/кг. В некоторых вариантах



осуществления дозы составляют 0,2 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,8 мг/кг, 1,2 мг/кг, 1,6 мг/кг, 2,0 мг/кг или 2,2 мг/г. В некоторых вариантах осуществления дозы италиумаба составляют 0,4 мг/кг, 0,8 мг/кг, 1,6 мг/кг или 3,2 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет приблизительно 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 125 мг, 150 мг, 175 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 275 мг, 300 мг, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 или 500 мг. В настоящую заявку включены иллюстративные, не ограничивающие дозы для терапевтически эффективного количества моноклонального антитела к CD6, используемого в настоящем раскрытии. Медицинский работник, обладающий обычными навыками в данной области, может легко определить и назначить необходимое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, доктор может начать введение дозы моноклонального антитела к CD6 на уровне ниже, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до достижения желаемого эффекта. В некоторых вариантах осуществления способы включают анализ крови пациента для определения частоты дозирования. В некоторых вариантах осуществления образцы от пациентов анализируют на предмет экспрессии CD6 на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления сыворотку пациента анализируют на наличие растворимого CD6.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело к CD6 вводят путем инфузии в недельной дозе от 0,1 до 50 мг/кг на массу тела субъекта, например, от 0,5 до 3 мг/кг. Такое введение можно повторять, например, от 1 до 8 раз, например, от 2 до 4 раз или от 3 до 5 раз. В некоторых случаях введение можно осуществлять путем непрерывной инфузии в течение периода от 2 до 24 часов, например, от 2 до 12 часов.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело к CD6 вводят в дозе раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело к CD6 вводят в дозе раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело к CD6 вводят периодически один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело к CD6 вводят периодически раз в две недели. В некоторых из этих и подобных вариантов осуществления дозу от приблизительно 50 мг до приблизительно 350 мг италиумаба вводят до 7 раз, например, от 2 до 4 раз. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD6 вводят раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD6 вводят периодически раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления периодическое дозирование раз

в две недели представляет собой первую дозу, за которой раз в две недели следует оценка для определения необходимости последующих доз. Введение может осуществляться путем непрерывной инфузии в течение приблизительно 1 часа или в течение периода от 1 до 24 часов, от 1 до 12 часов, от 1 до 6 часов, от 1 до 2 часов или от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часов. Такой режим можно повторять один или несколько раз по мере необходимости, например, через одну неделю или через две недели.

<b>Таблица S1. Последовательности иголизумаба</b>		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1	Вариабельная область легкой цепи	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Arg Asp Ile Arg Ser Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Phe Thr Leu Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
2	Вариабельная область тяжелой цепи	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Arg Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Asp Leu Asp Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
3	Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи	gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc tctgtgcag cctctggatt caagtttagt agatatgccca tgtcttgggt tcgccaggct ccggggaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtgtagtta catctactat ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgtcaagaa

		caccctgtat ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagacgagat tacgacctgg actactttga ctctggggc caaggcacc ttgtaccctg ctctca
4	Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи	gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat cgggggaga cagagtact atcacttgca aggcgagtcg ggacattaga agctatttaa cctggtacca gcagaaacca gggaaagctc ctaagaccct gatctattat gcaacaagct tggcagatgg ggtcccctcg agattcagtg gcagtggatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtct gacgatacag caacttacta ctgtctacaa catggtgaga gtccattcac gctcggctcg gggaccaagc tggaaatcaa a
5	Полная аминокислотная последовательность тяжелой цепи	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Arg Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Asp Leu Asp Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

		Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
6	Полная аминокислотная последовательность легкой цепи	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Arg Asp Ile Arg Ser Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Phe Thr Leu Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
7	VHCDR1	GFKFSRYAMS
8	VHCDR2	TISSGGSYIYYPDSVKG
9	VHCDR3	RDYDLDYFDS
10	VLCDR1	KASRDIRSYLT
11	VLCDR2	YATSLAD
12	VLCDR3	LQHGESP

Заголовки разделов, используемые в данном документе, приведены исключительно в организационных целях и не должны рассматриваться как ограничивающие описываемый объект.

Примеры, которые следуют далее, приведены для облегчения понимания раскрытия, но не предназначены и не должны быть истолкованы как ограничивающие его объем каким-либо образом. Примеры не содержат подробного описания стандартных способов, используемых в процедурах анализа. Такие способы хорошо известны специалистам в данной области техники и описаны в многочисленных публикациях, в том числе в качестве примеров.

## ПРИМЕРЫ

Указанные примеры приведены исключительно в иллюстративных целях и не ограничивают объем приведенной в настоящем документе формулы изобретения.

### Пример 1

#### **Потерю уровней CD6 на клеточной поверхности *in vitro* анализировали с помощью проточной цитометрии на криоконсервированных МКПК**

Криоконсервированные мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) размораживали и ресуспендировали в полной среде (RPMI + 10% FBS + 1X пенициллин/стрептомицин). МКПК подсчитывали, и концентрацию клеток доводили до 4 млн. клеток на мл в полной среде. Обработку итолизумабом и изотипом готовили в полной среде при 2-кратной конечной концентрации обработки. МКПК обрабатывали либо итолизумабом, либо изотипом в 24W TC-планшете, объединяя 250 мл МКПК и 250 мл 2X обработки в одной лунке для конечного объема 500 мл. Обработанные МКПК инкубировали при 37°C на протяжении определенных временных точек (10, 30, 60, 120, 180, 1440 минут). В каждой временной точке все клетки собирали из обозначенных лунок и переносили в буфер для промывки FACS при 4°C (FWB, 1X PBS + 2% FBS + 0,5 г NaN<sub>3</sub>). Клетки осаждали при 1500 об./мин. в течение 5 минут и удаляли супернатант. Окрашивание на жизнеспособность и блокирование Fc проводили при комнатной температуре. Уровни CD6 на клеточной поверхности определяли с помощью запатентованного клона антитела к CD6, конъюгированного с PE, который не конкурирует за связывание с итолизумабом. Результаты показаны на **фигуре 1**. Эксперименты также проводили на клеточной линии (см. **фигуру 14**).

## **Пример 2**

### **Уровни CD6 на клеточной поверхности у пациентов после лечения итолизумабом анализировали с помощью проточной цитометрии на свежей цельной крови**

Цельную кровь (ЦК) собирали у пациентов в определенные временные точки в соответствии с клиническим протоколом и отправляли на ночь для анализа на следующий день. Красные кровяные клетки (ККК) лизировали в соотношении 9:1 (1X лизирующий буфер к ЦК). После лизиса ККК ресуспендировали клетки в буфере для окрашивания и переносили на планшет для определения уровней CD6 на поверхности. Клетки окрашивали запатентованным неконкурирующим клоном антитела к CD6 и подвергали флуоресцентной метке PE для измерения общего количества рецепторов CD6 на клеточной поверхности.

## **Пример 3**

### **Имунофенотипирование МКПК нормальных здоровых добровольцев для выявления изменений в популяциях иммунных клеток после лечения итолизумабом**

Цельную кровь собирали у нормальных здоровых добровольцев после лечения итолизумабом, а МКПК выделяли из ЦК с помощью градиентного центрифугирования по плотности и криоконсервировали стандартным образом. Для анализа криоконсервированные МКПК размораживали, промывали и подвергали флуоресцентной метке антителами, нацеливающими CD3, CD4, CD6, CD8, CD25, CCR6, HELIOS и FOXP3, чтобы определить изменения в подмножествах иммунных клеток, таких как наивные Т-клетки, Teff и Treg-клетки, с помощью проточной цитометрии.

## **Пример 4**

### **Соотношение T<sub>reg</sub> клеток и клеток CD4+ определяли путем измерения специфических для типа клеток эпигенетических маркеров в ДНК с помощью Epiontis ID**

Epiontis ID обеспечивает точный подсчет типов клеток путем измерения специфических для типа клеток эпигенетических маркеров с помощью qPCR. Криоконсервированные МКПК пациентов, получавших лечение итолизумабом, содержащие смесь целевых и нецелевых клеток, подвергали бисульфитной

конверсии специфических деметилированных последовательностей ДНК, которые деметируются только в целевых клетках. ДНК очищали, добавляли специально разработанные праймеры для ПЦР, которые амплифицируют только бисульфит-конвертированные мишени, и проводили qPCR. Для анализа образцов пациентов использовали следующие эпигенетические qPCR-анализы (анализ/тип клеток): FOXP3 (T<sub>reg</sub>-клетки), CD4 (Т-клетки CD4), CD8B (Т-клетки CD8), PD1-положительные клетки, LRP5 (В-клетки), LCN2 (нейтрофилы), MVD (NK-клетки), S1PR1-положительные клетки, PRG2 (эозинофилы), CBX6 (В-клетки памяти), CCR7-положительные клетки, S1PR5-положительные клетки, IL17A (Th17-клетки).

### Пример 5

**Характеристики связывания итолизумаба с низкой, средней и высокой плотностью CD6 анализировали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР)**

Анализ проводили при 25°C в буферной системе HBS-P (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl и 0,05% поверхностно-активного вещества P20) с использованием оптического биосенсора Biacore 3000, оснащенного сенсорным чипом со стрептавидином (СА). Биотинилированный рекомбинантный CD6 человека захватывался на Fc2, Fc3 и Fc4 сенсорного чипа с низкой (7 ЕО), средней (55 ЕО) и высокой (255 ЕО) плотностью, соответственно. Эти плотности аналогичны низким, средним и высоким уровням CD6, наблюдаемым на Т-клетках.

Поверхность чипа	Rhu CD6 (ЕО)	Расчетное количество сайтов связывания CD6/мкм <sup>2</sup>
Низкий уровень	7	120
Средний уровень	55	783
Высокий уровень	255	3493

Серии концентраций аналитов от 900 нМ или 0,137 нМ готовили с использованием 3-кратных разведений в буфере для проведения анализа. Фазы ассоциации для всех концентраций аналита отслеживали в течение 240 с при скорости потока 50 мл/мин., а фазы диссоциации собирали в течение 1800 с при скорости потока 50 мл/мин. Поверхность регенерировали с помощью 1 М MgCl<sub>2</sub> в течение 15 с, при скорости потока 50 мкл/мин. Результаты показаны на **фигурах 12А-12Е и 13А-13Е**.

## Пример 6

### Итолизумаб индуцирует расщепление CD6 на клеточной поверхности

МКПК обрабатывали изотипом или итолизумабом в течение 72 часов при 37С. Через 72 часа клетки и супернатант собирали.

Связанный с клетками CD6. Уровень CD6 на клеточной поверхности анализировали с помощью проточной цитометрии. Клеточные осадки использовали для выделения общих белков с помощью RIPA-буфера с 0,1% тритоном. Растворимый CD6 иммунопреципитировали из супернатанта с помощью специфического антитела к CD6, которое распознает внеклеточную часть CD6. Уровни растворимого CD6 в супернатанте также анализировали с помощью MSD.

CD6 в клеточном супернатанте. Уровни CD6 далее анализировали в супернатанте иммунопреципитата и в лизате клеток методом вестерн-блоттинга. Белки загружали на 4-12% гель Nu-Page и переносили на PVDF мембрану. Мембрану окрашивали с помощью понсо, а затем инкубировали в течение ночи при 4С с первичным антителом к CD6 или анти-gardh. На следующий день мембрану промывали TBS+твин и инкубировали 1 ч. при комнатной температуре с HRP-конъюгированным вторичным антителом, снова промывали TBS+твин и получали сигнал после добавления субстрата HRP с помощью хемилюминесцентного анализатора. Результаты показаны на **фигурах 18А-18Б** и **Фигуре 19**.

## Пример 7

### Роль моноцитов в индуцированном итолизумабом расщеплении CD6

Чтобы оценить вклад других типов клеток в индуцированное итолизумабом расщепление CD6, Т-клетки, моноциты, НК-клетки и В-клетки выделяли из МКПК с помощью негативной магнитной сепарации. Затем выделенные Т-клетки обрабатывали изотипом или итолизумабом в присутствии моноцитов, НК-клеток или В-клеток. Также выделенные Т-клетки обрабатывали изотипом или итолизумабом в присутствии возрастающего соотношения Т-клеток и моноцитов.

После обработки уровни CD6 на поверхности Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии с применением антитела для обнаружения CD6, которое не мешает связыванию итолизумаба. Результаты показаны на **фигурах 20А-20Б**. На **фигуре 20А** показано, что потеря CD6 на Т-клетках наблюдается только при наличии моноцитов и, в меньшей степени, НК-клеток во время лечения.



На **фигуре 20Б** показано, что при увеличении количества моноцитов наблюдается повышенная потеря CD6.

### **Пример 8**

#### **Влияние итолизумаба на характеристики и функцию Т-клеток**

На девяносто шестилуночные планшеты с плоским дном наносили CD3 + ALCAM (в PBS) в течение 2 часов при 37°C. После 2-часовой инкубации планшеты промывали один раз 1xBS с последующим блокированием 5%BSA в течение 30 минут. После 2-часовой инкубации планшеты промывали один раз 1x PBS, после чего проводили блокирование 5%BSA в течение 30 минут при 37°C. После блокирования планшеты промывали 1x PBS дважды. После блокирования планшеты дважды промывали 1xPBS.

Замороженные МКПК осторожно размораживали в полной среде RPMI. Концентрацию клеток доводили до  $2 \times 10^6$  клеток/мл. Затем клетки высевали по 200 тыс. клеток на лунку в 100 лунок. Итолизумаб готовили по кривой 3-кратного разведения в полной среде при 3x. Конечный объем анализа составляет 200 мкл в 96-луночном планшете с плоским дном.

МКПК инкубировали в течение 24 часов при 37°C. Планшеты подвергались процедуре отжима, в ходе которой собирался супернатант для выявления цитокинов. Затем клетки собирали для выявления потери CD6 на Т-клетках CD4 и CD8 и снижения маркеров активации. Для оценки потери CD6 с помощью проточной цитометрии использовали неконкурирующее антитело CD6. CD6 представляли как среднее геометрическое значение флуоресценции (гСИФ). Результаты представлены на **фигурах 21А-21Д**, которые свидетельствуют о том, что снижение уровня CD6 на клеточной поверхности коррелирует со снижением уровня маркеров активации Т-клеток CD71, PD-1, CD25, IL-2 и TNF $\alpha$ .

МКПК обрабатывали изотипическим контролем или итолизумабом в течение 24 часов для получения клеток CD6<sup>high</sup> и CD6<sup>low</sup>, соответственно. После 24-часовой обработки клетки собирали и многократно промывали средой для удаления остатков антител. Отмытые клетки подсчитывали, а концентрацию корректировали до  $1 \times 10^6$  клеток/мл.

96-луночные планшеты с плоским дном покрывали CD3 + ALCAM в PBS в течение 2 часов при 37°C. После 2-часовой инкубации планшеты дважды промывали PBS. Отмытые клетки CD6<sup>high</sup> и CD6<sup>low</sup> высевали в количестве 200 тыс. клеток/лунка и инкубировали в течение 24, 48, 72 и 96 часов. В каждой указанной

временной точке активацию Т-клеток оценивали по поверхностному и внутриклеточному окрашиванию на транскрипционные факторы с помощью проточной цитометрии. Результаты показаны на **фигуре 22**, где показано, что клетки CD6<sup>low</sup>, сгенерированные при первоначальной инкубации с итолизумабом, не только оставались CD6<sup>low</sup>, но и были менее T<sub>eff</sub>-подобными (например, менее T<sub>h</sub>1 и T<sub>h</sub>17-подобными) после последующей стимуляции CD3 + ALCAM. Напротив, клетки CD6<sup>high</sup>, сгенерированные при инкубации с изотипическим контролем, были более T<sub>eff</sub>-подобными по своим характеристикам после последующей стимуляции.

### **Пример 9**

#### **Итолизумаб снижает аллореактивность Т-лимфоцитов**

Для оценки эффективности итолизумаба в снижении аллореактивности Т-клеток использовали одностороннюю смешанную реакцию лимфоцитов. Определялись пары респондеров и стимуляторов МКПК, и количество респондеров на момент взятия использовалось в качестве показаний. Респондерные МКПК размораживали, помечали фиолетовым для отслеживания клеток и предварительно обрабатывали изотипом или итолизумабом в течение 2 часов. Стимулирующие МКПК размораживали и обрабатывали Митомицином С в течение 20 минут для ингибирования пролиферации. После обработки митомицином С стимуляторные МКПК многократно промывали средой. Респондерные и стимуляторные МКПК подсчитывали и смешивали в соотношении 1:1 в 96-луночной планшете с U-образным дном с обработкой итолизумабом или изотипом.

Респондерные клетки стимулировали в присутствии стимулирующих клеток примерно через 96-168 часов. В каждой временной точке клетки собирали, а пролиферацию и активацию респондерных клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. Результаты показаны на **фигурах 23А-23Г**. В данном случае респондерные клетки, обработанные итолизумабом, экспрессировали более низкий уровень CD6 (23А), были менее пролиферативными, о чем свидетельствует более низкое количество CD4<sup>+</sup> (23Б) и уровень CD71 через 168 часов (23Г), и были менее активированными, о чем свидетельствует более низкий уровень CD25 через 168 часов (23В).

### **Пример 10**

#### **Итолизумаб применим для обогащения T<sub>reg</sub>-лимфоцитов**

Способность итолизумаба обогащать Т-клетки CD6<sup>low</sup> использовалась в качестве основы для проверки возможности генерации T<sub>reg</sub>-лимфоцитов из обогащенных итолизумабом Т-клеток CD6<sup>low</sup> по сравнению с генерацией T<sub>reg</sub>-лимфоцитов из Т-клеток CD6<sup>high</sup>.

Генерация Т-клеток CD6<sup>low</sup> и CD6<sup>high</sup>. Замороженные МКПК осторожно размораживали в полной среде RPMI. Общие МКПК обрабатывали изотипическим контролем или итолизумабом в течение 24 часов при 37С. Через 24 часа клетки собирали для подтверждения потери CD6 на Т-клетках CD4 и для выделения наивных Т-клеток.

Дифференциация T<sub>reg</sub> из наивных Т-клеток. Те МКПК, которые были обработаны, как указано выше, были обогащены на наивные Т-клетки с помощью набора STEMCELL. Чтобы дифференцировать T<sub>reg</sub> из CD6<sup>low</sup> и CD6<sup>high</sup>, активатор CD3/CD28 добавляли в комбинации с коктейлем для дифференцировки T<sub>reg</sub> от STEMCELL в течение 7 дней.

Подтверждение фенотипа Treg. Через 7 дней в условиях дифференцировки Treg, CD6<sup>low</sup> и CD6<sup>high</sup> собирали для внутриклеточного окрашивания и получали данные на проточном цитометре. Клетки подтверждали коэкспрессией Foxp3 и Helios. Результаты на **фигурах 24А-24Б** свидетельствуют о том, что предварительная обработка МКПК итолизумабом обогащает их наивными Т-клетками CD6<sup>low</sup>, которые можно применять для более эффективной генерации большего числа T<sub>reg</sub> по сравнению с предварительной обработкой изотипическим контролем.

Анализ супрессии Treg. На 7-й день дифференцировки собирали Treg CD6<sup>low</sup> и CD6<sup>high</sup>. Treg подсчитывали и высевали в количестве 100k, 50k и 25k для получения трех соотношений 1:1, 1:2 и 1:4.

Генерация Т-респондерных клеток. Замороженные МКПК от того же донора осторожно размораживали. МКПК обогащали для получения Т-клеток CD4, которые были CD25-, в общей сложности два набора объединили для получения этих клеток. Оба набора были получены от компании STEMCELL. После того, как эти клетки выделяли, их помечали с помощью фиолетового для отслеживания клеток (Cell Trace Violet).

Стимуляция Т-респондеров и совместное культивирование с T<sub>reg</sub>. Т-респондеры добавляли в лунки с Treg. Тестировались условия без стимулов и с разными уровнями стимулов. Анализ на супрессию культивировали в течение 4 дней при 37°С.

Расчет супрессии клеток  $T_{\text{responder}}$ . Клетки  $T_{\text{responder}}$ , которые культивировали отдельно с различными уровнями стимулов, оценивали по пролиферации фиолетового для отслеживания клеток. Обычный способ гейтирования рассчитывал супрессию пролиферации клеток  $T_{\text{responder}}$ . Результаты показаны на **фигуре 25**. В данном случае  $T_{\text{reg}}$ , сгенерированные из наивных Т-клеток  $CD6^{\text{low}}$ , обладают повышенной супрессивной активностью по сравнению с  $T_{\text{reg}} CD6^{\text{high}}$  при любом соотношении  $T_{\text{reg}}$  и Т-клеток-респондеров; наибольшая супрессия наблюдается при соотношении 1:1,  $T_{\text{reg}}:T_{\text{responder}}$ .

Эти наблюдения свидетельствуют о том, что потеря CD6 на поверхности (индуцируемая итализумабом) нарушает дифференцировку наивных Т-клеток в  $T_{\text{reg}}$ , которые обладают большей способностью супрессировать гиперактивные и патогенные функции иммунных клеток, что способствует восстановлению баланса в иммунной системе.

Подводя итог, можно сказать, что предварительная обработка наивных Т-клеток итализумабом приводит к формированию фенотипа  $T_{\text{reg}}$  с повышенной коэкспрессией Foxp3 и HELIOS, и это увеличение частоты и СИФ, как было показано, коррелирует с большей активностью супрессии.

## **Пример 11**

### **Предупреждение GVHD у пациентов из группы риска с помощью селективного обогащения $CD6^{\text{low}}$ /удаления $CD6^{\text{high}}$ клеток из пересаживаемой ткани**

Специалистам в данной области будет очевидно, как использовать известные способы в комбинации со способами настоящего раскрытия для снижения риска GVHD у пациента путем применения оптимизированного антитела к CD6 для удаления CD6 из клеток  $CD6^{\text{high}}$  в популяции клеток пуповинной крови, клеток костного мозга или HLA-совместимых клеток сиблингов до трансплантации. Клетки могут быть размножены *ex vivo* до или после обработки оптимизированным антителом к CD6 для снижения экспрессии CD6 на клеточной поверхности с целью предупреждения GVHD у реципиента трансплантата.

Например, итализумаб можно применять для обработки образцов пуповинной крови человека, полученных при нормальных полнотерминых родах. Единицы пуповинной крови можно истощить от эритроцитов и подвергнуть клинической селекции клеток  $CD34^+$  до обработки антителом к CD6, антигенсвязывающим фрагментом или слитым антителом к CD6.

Образцы, лишенные CD6, можно вводить пациенту, нуждающемуся в терапии стволовыми клетками и подверженному риску GVHD. Будет измеряться один или несколько биомаркеров, и пациент будет находиться под тщательным наблюдением на предмет положительного и отрицательного клинического ответа.

Прогениторные клетки, предварительно обработанные антителом к CD6, его антигенсвязывающим фрагментом или слитым антителом, можно применять для предупреждения GVHD у пациента, нуждающегося в трансплантации стволовых клеток. Перед трансплантацией трансплантат пуповинной крови, трансплантат костного мозга или HLA-совместимый трансплантат обрабатывают итолизумабом в количестве, достаточном для снижения количества пересаженных CD6 на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или более чем на 80%. Уровни CD6 можно отслеживать с помощью обычных методик, известных в данной области, например, с помощью FACS-анализа клеток или анализа сыворотки крови, взятой у пациента. Например, специалист в данной области может взять образец крови у пациента в различные временные точки и определить степень содержания CD6 на клеточной поверхности путем проведения FACS-анализа. Специалист в данной области может оценить клинические проявления GVHD после введения пациенту антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, ADC или растворимого лиганда, способного связывать CD6, например, антитела к CD6, описанного в настоящем документе.

## **Пример 12**

### **Анализ эффективности итолизумаба**

Был разработан анализ на определение эффективности для оценки функциональности итолизумаба при потере CD6. МКПК высевали по 200 тыс. клеток/лунка в 100 лунках. Итолизумаб готовили по кривой 3-кратного разведения в полной среде при 3х. Конечный объем анализа составляет 200 мкл в 96-луночном планшете с плоским дном.

МКПК инкубировали в течение 24 часов при 37C. Планшеты подвергали процедуре отжима, в ходе которой собирали супернатант для обнаружения растворимого CD6. Затем клетки собирали для обнаружения потери CD6 на T-клетках CD4 и CD8. Для оценки потери CD6 с помощью проточной цитометрии использовали неконкурирующее антитело CD6. CD6 представляли как среднее геометрическое значение флуоресценции (гСИФ). Результаты показаны на **фигурах 26А-26Б**. Полученные результаты свидетельствуют о том, что анализ надежен и воспроизводим, демонстрирует отличную чувствительность к

изменениям концентрации белка (см. 26А) и достаточно чувствителен для обнаружения изменений в Fc-области антитела (см. 26Б). Изменения в mAb, влияющие на связывание с CD6 или Fc-рецептором, приведут к снижению потери CD6 и, таким образом, послужат хорошим показателем эффективности партий итолизумаба.

В целом, итолизумаб вызывает расщепление CD6 в дозозависимым и зависимым от времени образом, и степень потери CD6 коррелирует со снижением активации Т-клеток и экспрессии цитокинов. Потеря CD6 наблюдается у пациентов, получающих итолизумаб, и итолизумаб вызывает расщепление надежным образом у нескольких доноров. Как показано в данном документе, расщепление CD6, таким образом, является суррогатом действия лекарственного средства, а анализы *in vitro* для измерения расщепления CD6 обеспечивают надежный и воспроизводимый подход, который имеет значение для клинической практики.

### **Пример 13**

**У пациентов с волчанкой (СКВ), получающих лечение итолизумабом, наблюдается снижение экспрессии CD6 на Т-клетках CD4 и CD8**

Анализировали уровни CD6 на поверхности Т-клеток CD4 и CD8 от субъектов с СКВ (из исследования EQUALISE) после лечения итолизумабом, выраженные в виде средней флуоресценции CD6. Хотя исходный (до приема лекарственного средства) уровень CD6 у разных субъектов был разным, потеря CD6 на поверхности наблюдалась при всех дозах (см. **фигуры 27А-27Д**). Уровни CD6 на клеточной поверхности на протяжении всего исследования более изменчивы у субъектов, получавших более низкую дозу итолизумаба (0,4 мг/кг). Субъекты, получавшие более высокую дозу итолизумаба (0,8 - 3,2 мг/кг), сохраняют низкий уровень CD6 через несколько недель после приема последней дозы. Стрелки указывают, когда субъекты получали дозу итолизумаба. Пунктирная линия указывает на отсутствие CD6 на клеточной поверхности, как определено с помощью контроля флуоресценции без одной из меток (FMO). Показана статистика для CD6 на Т-клетках CD4 по сравнению с исходным уровнем. Всего N=26 субъектов, включенных в анализ по пяти когортам доз. На **фигурах 28А-28Б** показано, что CD6 на клеточной поверхности Т-клеток CD4 (28А) и CD8 (28Б) снижается после введения первой дозы итолизумаба, и что большая потеря CD6 на поверхности наблюдается при более высоких дозах итолизумаба. Данные

выражены в % от исходного уровня (до приема лекарственного средства) и приведены на 15-й день (14 дней после приема первой дозы, до приема второй). \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ .

#### **Пример 14**

##### **Итолизумаб модулирует соотношение $T_{H17}$ : $T_{reg}$ у пациентов**

Образцы МКПК, полученные от субъектов исследования EQUIP (4 субъекта, получивших дозу 0,8 мг/кг, и 1 субъект, получивший плацебо), были иммунофенотипированы с помощью ePiontisID. Как показано на **фигурах 29А-29Б**, обработка итолизумабом в дозе 0,8 мг/кг вызвала 3-кратное снижение количества  $T_{H17}$ -клеток и 2,5-кратное увеличение количества  $T_{reg}$ -клеток по сравнению с плацебо.

Несмотря на то, что некоторые варианты осуществления настоящего раскрытия были показаны и описаны в настоящем документе, специалистам в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Многочисленные вариации, изменения и замены теперь будут доступны специалистам в данной области без отступления от раскрытия. Следует понимать, что при осуществлении раскрытия могут быть использованы различные альтернативы описанным в данном документе вариантам осуществления раскрытия. Предполагается, что приведенные ниже пункты формулы определяют объем раскрытия и что способы и конструкции в пределах объема этих пунктов и их эквивалентов охватываются ими.

Все патенты, патентные заявки и публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в него посредством ссылки во всей своей полноте.

Хотя для ясности понимания раскрытие было представлено в некоторых деталях посредством иллюстрации и примеров, специалистам в данной области будет очевидно, что различные изменения и модификации могут быть осуществлены без отклонения от сути или объема раскрытия. Соответственно, приведенные выше описания и примеры не должны рассматриваться как ограничивающие.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения оптимальной дозировки итолизумаба у субъекта-человека с аутоиммунным, иммуновоспалительным или воспалительным заболеванием, заболеванием «трансплантат против хозяина» (GVHD) или отторжением трансплантата органа, включающий:

(а) определение исходного уровня CD6 на клеточной поверхности в образце ткани от субъекта, причем образец ткани содержит Т-лимфоциты, и, необязательно, определение целевого уровня CD6 на клеточной поверхности у субъекта;

(б) введение субъекту серии из двух или трех или более доз итолизумаба, необязательно с увеличением дозы;

(в) мониторинг уровней CD6 на клеточной поверхности в образце ткани от субъекта между сериями доз, причем образец ткани содержит Т-лимфоциты;

(г) определение наименьшей дозы из серии доз как оптимальной дозы, если уровень CD6 на поверхности клеток на шаге (в) составляет приблизительно или менее, чем приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45 или 50 процентов от исходного уровня из (а), или составляет в пределах приблизительно или менее, чем приблизительно 5, 10, 15 или 20 процентов от необязательного целевого уровня из (а), и если между сериями доз не наблюдается дальнейшего снижения уровня CD6 на поверхности клеток.

2. Способ по п. 1, включающий определение уровней CD6 на клеточной поверхности клеток CD4 и/или клеток CD8 в образце ткани от субъекта.

3. Способ по п. 1 или п. 2, в котором образец ткани представляет собой образец крови.

4. Способ по любому из пп. 1-3, включающий определение целевого уровня CD6 на клеточной поверхности у субъекта на основании клинических параметров или симптомов заболевания.

5. Режим дозирования для лечения аутоиммунного, иммуновоспалительного или воспалительного заболевания, заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD) или отторжения трансплантата органа у нуждающегося в этом субъекта, включающий:



(а) определение исходного уровня CD6 на клеточной поверхности в образце ткани от субъекта, причем образец ткани содержит Т-лимфоциты, и, необязательно, определение целевого уровня CD6 на клеточной поверхности у субъекта;

(б) введение субъекту дозы италиумаба, которая обеспечивает снижение уровня CD6 на клеточной поверхности в Т-лимфоцитах субъекта до приблизительно или менее чем приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 процентов от исходного уровня из (а);

(в) мониторинг уровней CD6 на клеточной поверхности в образце ткани субъекта, причем образец ткани содержит Т-лимфоциты; и

(г) введение субъекту дополнительной дозы италиумаба до того, как или если уровень CD6 на поверхности клеток в (в) возвращается к приблизительно или более чем приблизительно 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 процентам от исходного уровня из (а), или повышается до приблизительно или более чем целевого уровня из (а).

6. Режим дозирования по п. 5, который поддерживает уровни CD6 на клеточной поверхности в Т-лимфоцитах (необязательно клетках CD4 и/или CD8) от субъекта приблизительно на уровне или ниже приблизительно 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 процентов от исходного уровня из (а), или в пределах приблизительно 5, 10, 15 или 20 процентов от необязательного целевого уровня из (а), необязательно с определением целевого уровня CD6 на основе клинических параметров или симптомов заболевания.

7. Режим дозирования для лечения аутоиммунного, иммуновоспалительного или воспалительного заболевания, или заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD), или отторжения трансплантата органа у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

(а) определение исходного уровня Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> в образце крови субъекта и, необязательно, выявление целевого уровня Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup>;

(б) введение субъекту дозы италиумаба, которая обеспечивает снижение уровня Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> у субъекта до приблизительно или менее, чем приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 40 процентов от исходного уровня из (а);

(в) мониторинг уровней Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> в образце крови субъекта;

и

(г) введение дополнительной дозы италиумаба субъекту до того, как уровни Т-лимфоцитов  $CD6^{high}$ , полученные в (в), вернуться к приблизительно или более чем приблизительно 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 процентам от исходного уровня, полученного в (а), или повысятся до приблизительно или выше целевого уровня, полученного в (а), необязательно при определении целевого уровня Т-лимфоцитов  $CD6^{high}$  у субъекта на основании клинических параметров или симптомов заболевания.

8. Режим дозирования по п. 5, который поддерживает уровень Т-лимфоцитов  $CD6^{high}$  у субъекта на уровне приблизительно или менее приблизительно 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 процентов от исходного уровня из (а), необязательно, причем Т-лимфоциты представляют собой клетки CD4 и/или клетки CD8.

9. Режим дозирования по любому из пп. 5-8, который снижает соотношение Т-лимфоцитов  $CD6^{high}:CD6^{low}$  у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более или приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или более относительно контроля или стандарта или исходного уровня, необязательно, причем Т-лимфоциты представляют собой клетки CD4 и/или клетки CD8.

10. Режим дозирования по любому из пп. 5-8, который снижает соотношение  $T_{eff}:T_{reg}$  клеток у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более или приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или более относительно контроля или стандарта или исходного уровня, необязательно клеток CD4 и/или клеток CD8, необязательно, причем  $T_{eff}$ -клетки представляют собой клетки Th17.

11. Способ предупреждения или ослабления заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD) у пациента с человеческим трансплантатом, включающий следующее:

(а) инкубирование ткани трансплантата с антителом к CD6, необязательно италиумабом, в течение времени, достаточного для снижения

уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> в ткани трансплантата; и

(б) пересадка ткани трансплантата пациенту.

12. Способ по п. 11, включающий определение уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов в ткани трансплантата до и после шага (а), и выполнение шага (б), если уровни CD6 на клеточной поверхности после шага (а) снижаются приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более по сравнению с уровнем до шага (а).

13. Способ по п. 11 или п. 12, в котором ткань трансплантата содержит клетки пуповинной крови, клетки костного мозга, клетки периферической крови, мобилизованные клетки периферической крови, мезенхимальные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, клетки, дифференцированные из стволовых клеток/прогениторные клетки, сконструированные клетки (необязательно химерные антигенные рецепторы (CAR)) или любые комбинации указанных клеток.

14. Способ по любому из пп. 11-13, в котором ткань трансплантата является аутологичной для пациента с человеческим трансплантатом.

15. Способ по любому из пп. 11-13, в котором ткань трансплантата является аллогенной для пациента с человеческим трансплантатом.

16. Способ лечения или улучшения состояния аутоиммунного, иммуновоспалительного или воспалительного заболевания у нуждающегося в этом пациента, включающий:

(а) инкубирование ткани трансплантата с антителом к CD6, необязательно итализумабом, в течение времени, достаточного для снижения уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> в ткани трансплантата, с получением таким образом ткани трансплантата, обогащенной Т-лимфоцитами CD6<sup>low</sup>;

(б) обработку ткани трансплантата из (а) в течение времени, достаточного для генерации Treg-лимфоцитов из Т-лимфоцитов CD6<sup>low</sup>; и

(в) пересадку ткани трансплантата из (в) пациенту.

17. Способ по п. 16, включающий определение уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов в ткани трансплантата до и после шага (а), и выполнение шага (б), если уровни CD6 на клеточной поверхности после шага (а) снижаются приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более по сравнению с уровнем до шага (а).

18. Способ по п. 16 или п. 17, в котором (б) включает инкубацию ткани трансплантата, обогащенной Т-лимфоцитами CD6<sup>low</sup>, с комбинацией цитокинов, факторов роста и транскрипционных факторов в течение времени, достаточного для генерации T<sub>reg</sub>-лимфоцитов.

19. Способ по любому из пп. 16-18, в котором ткань трансплантата содержит клетки пуповинной крови, клетки костного мозга, клетки периферической крови, мобилизованные клетки периферической крови, мезенхимальные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, клетки, дифференцированные из стволовых клеток/прогениторные клетки, сконструированные клетки (необязательно химерные антигенные рецепторы (CAR)) или любые комбинации указанных клеток.

20. Способ по любому из пп. 16-19, в котором ткань трансплантата является аутологичной для пациента-человека.

21. Способ по любому из пп. 16-19, в котором ткань трансплантата является аллогенной для пациента-человека.

22. Способ лечения аутоиммунного, иммуновоспалительного или воспалительного заболевания, заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD) или отторжения трансплантата органа у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

(а) введение итолизумаба субъекту; и

(б) определение уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов в образце ткани субъекта, определение уровней Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> и,

необязательно, CD6<sup>low</sup> в образце ткани субъекта, и/или определение уровней T<sub>eff</sub>- и T<sub>reg</sub>-клеток у субъекта, причем образец ткани содержит Т-лимфоциты;

при этом введение итализумаба обеспечивает снижение любого одного или более из (i) уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов, необязательно клеток CD4 и/или CD8; (ii) уровней Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> у субъекта; (iii) соотношения CD6<sup>high</sup>:CD6<sup>low</sup> Т-лимфоцитов у субъекта; и/или (iv) соотношения T<sub>eff</sub>:T<sub>reg</sub> клеток у субъекта, и тем самым снижает патогенный иммунный ответ у субъекта.

23. Способ по п. 22, в котором введение итализумаба обеспечивает:

снижение уровней CD6 на клеточной поверхности Т-лимфоцитов субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля, или стандарта, или исходного уровня, необязательно, причем Т-лимфоциты представляют собой клетки CD4 и/или клетки CD8;

снижение уровней Т-лимфоцитов CD6<sup>high</sup> у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля, или стандарта, или исходного уровня, необязательно, причем Т-лимфоциты представляют собой клетки CD4 и/или клетки CD8;

снижение соотношения CD6<sup>high</sup>:CD6<sup>low</sup> Т-лимфоцитов у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более или приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или более относительно контроля, или стандарта, или исходного уровня, необязательно, причем Т-лимфоциты представляют собой клетки CD4 и/или клетки CD8; и/или

снижение соотношения T<sub>eff</sub>:T<sub>reg</sub> клеток у субъекта приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более или приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или более относительно контроля, или стандарта, или исходного уровня, необязательно, причем T<sub>eff</sub>-клетки представляют собой Th17-клетки.

24. Способ анализа тестовой партии итализумаба на основе клеток *in vitro*, включающий

- (а) инкубирование тестовой партии итолизумаба с клетками, экспрессирующими CD6 на клеточной поверхности;
- (б) измерение экспрессии CD6 на клеточной поверхности клеток; и
- (в) составление тестовой партии итолизумаба в виде фармацевтической композиции, если данная тестовая партия обеспечивает снижение экспрессии CD6 на клеточной поверхности относительно контроля или стандарта, и отбраковка тестовой партии итолизумаба, если данная тестовая партия не обеспечивает снижение экспрессии CD6 на клеточной поверхности относительно контроля или стандарта.

25. Способ по п. 24, в котором (б) включает прямое измерение экспрессии CD6 на клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии, времяпролетной цитометрии (CyToF), клеточного ИФА или иммунофлуоресцентной микроскопии, или в котором (б) включает измерение растворимого CD6 в супернатанте как индикатора экспрессии CD6 на клеточной поверхности, необязательно с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), хемилюминесцентного анализа, электрохемилюминесцентного анализа, высокоэффективной жидкостной хроматографии, вестерн-блота или иммунопреципитации с последующим вестерн-блотом.

26. Способ по п. 24 или п. 25, в котором клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС).

27. Способ по любому из пп. 24-26, в котором клетки включают линию Т-клеток человека или линию клеток, сконструированную для экспрессии CD6, необязательно CD6 человека.

28. Способ по п. 27, в котором клеточная линия выбрана из клеток MOLT-4, MOLT-3, MOLT-16, HuT 78, HuT 102, Jurkat, Jurkat NFAT, CCRF-CEM, 12.1, MJ (G11), LOUCY, SUP-T1, HEL.92.1.7, EF0-21, RPMI-8226, HPB-ALL, HH, KE37, P12ICHIKAWA, PEER, ALLSIL, RPMI8402, CMLT1, PF382, EHEB и DU4475.

29. Способ по любому из пп. 24-28, в котором клетки включают моноциты, необязательно клеточную линию моноцитов.

30. Способ по п. 29, в котором клеточная линия моноцитов выбрана из U937, THP1, MC-1010, TUR, AML-193 и MV-4-11.

31. Способ по любому из пп. 27-30, в котором (а) линия Т-клеток человека или линия клеток, сконструированная для экспрессии CD6, и (б) моноциты, необязательно клеточная линия моноцитов, присутствуют в соотношении приблизительно 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 или 1:10.

32. Способ по любому из пп. 24-31, включающий составление тестовой партии итализумаба в виде фармацевтической композиции, если он снижает экспрессию CD6 на клеточной поверхности приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля или стандарта и/или если он увеличивает растворимый CD6 в супернатанте приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля или стандарта.

33. Способ скрининга антитела к CD6 или его антигенсвязывающего фрагмента для применения как биологического терапевтического средства, включающий:

(а) инкубирование кандидатного антитела к CD6 или его антигенсвязывающего фрагмента с клетками, экспрессирующими CD6 на клеточной поверхности;

(б) измерение экспрессии CD6 на клеточной поверхности клеток; и

(в) составление фармацевтической композиции кандидатного антитела к CD6 или его антигенсвязывающего фрагмента, если оно обеспечивает снижение экспрессии CD6 на клеточной поверхности по сравнению с контролем или стандартом.

34. Способ по п. 21, в котором (б) включает прямое измерение экспрессии CD6 на клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии, времяпролетной цитометрии (CyToF), клеточного ИФА или иммунофлуоресцентной микроскопии, или в котором (б) включает измерение растворимого CD6 в супернатанте как индикатора экспрессии CD6 на клеточной

поверхности, необязательно с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), хемилюминесцентного анализа, электрохемилюминесцентного анализа, высокоэффективной жидкостной хроматографии, вестерн-блота или иммунопреципитации с последующим вестерн-блотом.

35. Способ по п. 33 или п. 34, в котором клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС).

36. Способ по любому из пп. 33-35, в котором клетки включают линию Т-клеток человека или линию клеток, сконструированную для экспрессии CD6, необязательно CD6 человека.

37. Способ по п. 36, в котором клеточная линия выбрана из клеток MOLT-4, MOLT-3, MOLT-16, HuT 78, HuT 102, Jurkat, Jurkat NFAT, CCRF-CEM, 12.1, MJ (G11), LOUCY, SUP-T1, HEL.92.1.7, EF0-21, RPMI-8226, HPB-ALL, HH, KE37, P12ICHIKAWA, PEER, ALLSIL, RPMI8402, CMLT1, PF382, EHEB и DU4475.

38. Способ по любому из пп. 33-37, в котором клетки включают моноциты, необязательно клеточную линию моноцитов.

39. Способ по п. 38, в котором клеточная линия моноцитов выбрана из U937, THP1, MC-1010, TUR, AML-193 и MV-4-11.

40. Способ по любому из пп. 33-39, в котором (а) линия Т-клеток человека или линия клеток, сконструированная для экспрессии CD6, и (б) моноциты, необязательно клеточная линия моноцитов, присутствуют в соотношении приблизительно 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 или 1:10.

41. Способ по любому из пп. 33-40, включающий составление кандидатного антитела к CD6 или его антигенсвязывающего фрагмента в виде фармацевтической композиции, если оно снижает экспрессию CD6 на клеточной поверхности приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля или стандарта и/или если оно увеличивает растворимый CD6 в

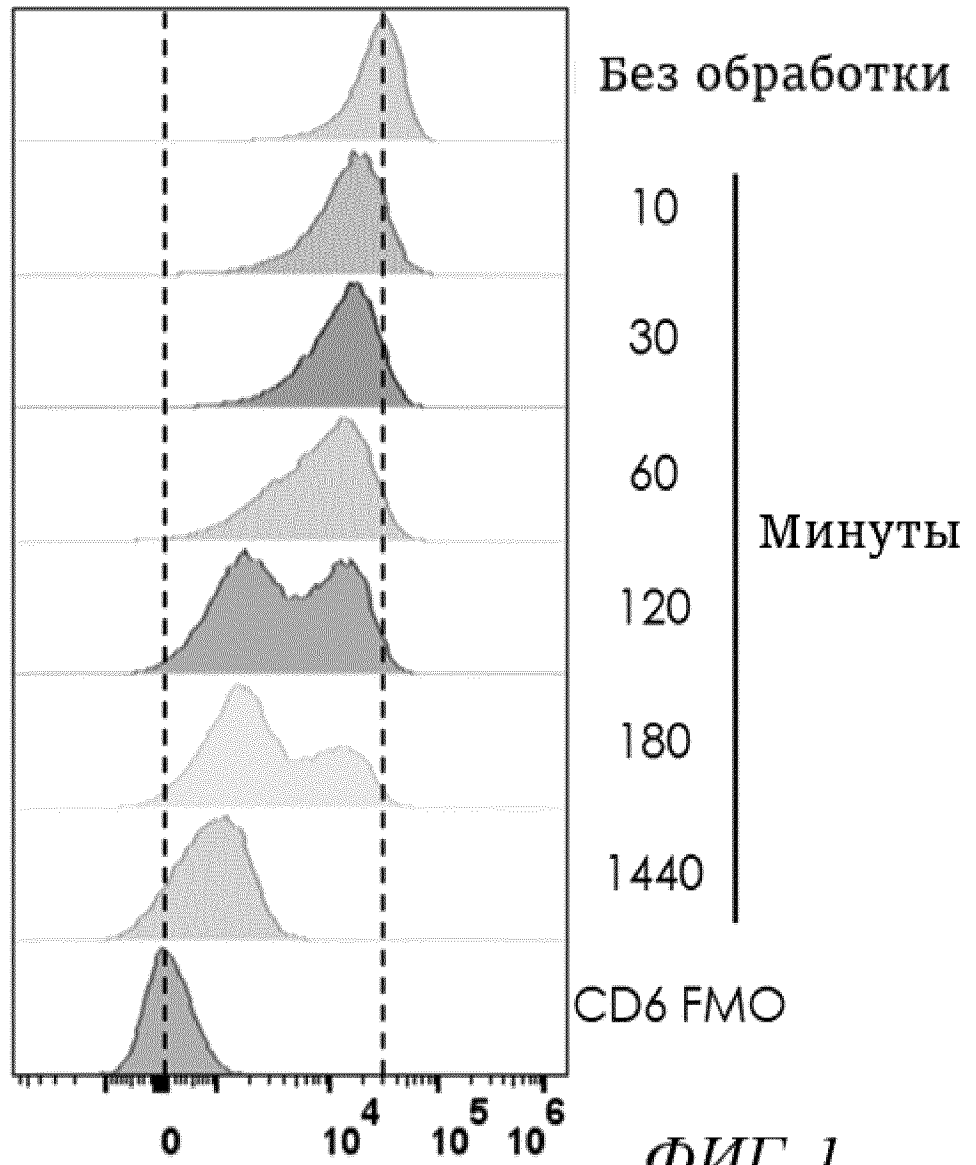


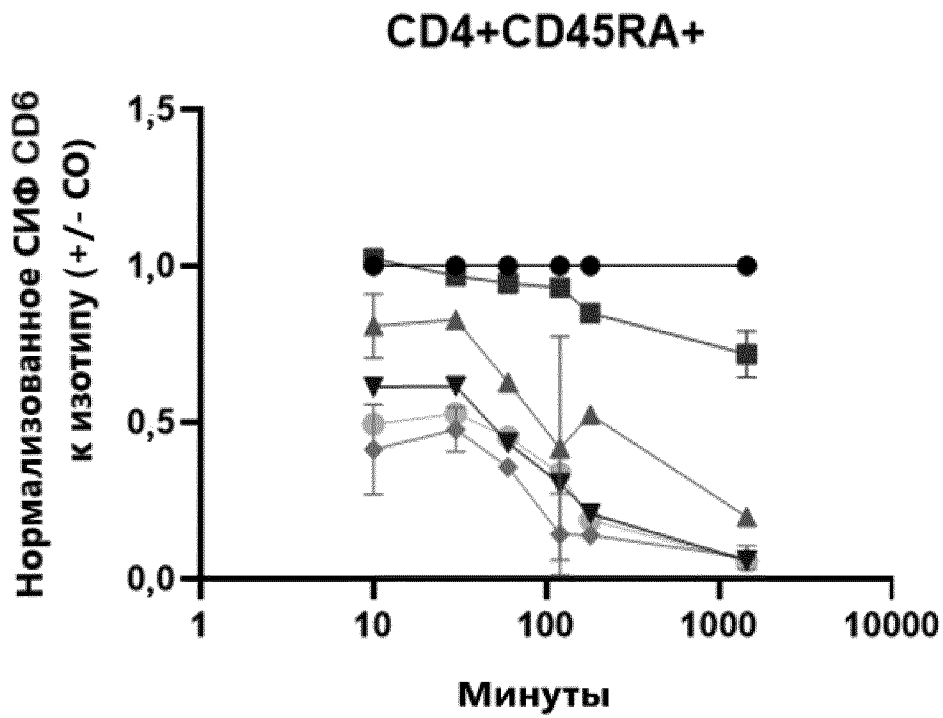
супернатанте приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 процентов или более относительно контроля или стандарта.

42. Способ или режим дозирования по любому из пп. 1-23, в котором субъект или пациент с аутоиммунным, иммуновоспалительным или воспалительным заболеванием имеет повышенное соотношение клеток  $T_{eff} : T_{reg}$  по сравнению со стандартом или здоровым субъектом, необязательно, если  $T_{eff}$ -клетки представляют собой Th17-клетки.

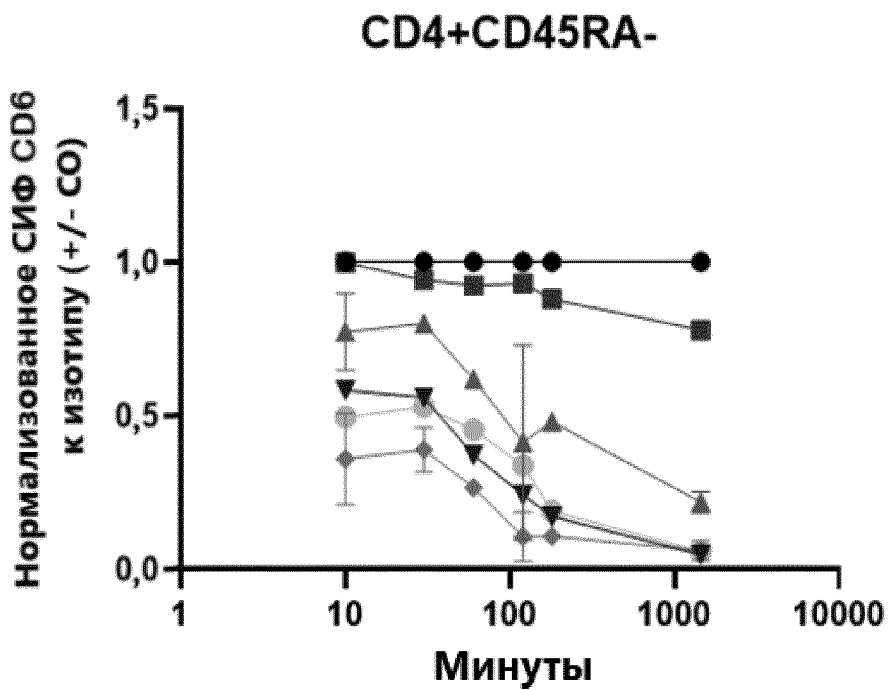
43. Способ или режим дозирования по п. 42, в котором соотношение клеток  $T_{eff} : T_{reg}$  увеличивается приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз или более по сравнению со стандартом или здоровым субъектом.

44. Способ или режим дозирования по любому из пп. 1-23 или пп. 42-43, в котором аутоиммунное, иммуновоспалительное или воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), необязательно болезнь Крона или язвенный колит, системную красную волчанку (СКВ), необязательно СКВ с волчаночным нефритом, ревматоидный артрит (РА), рассеянный склероз (РС), псориаз, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит или астму.

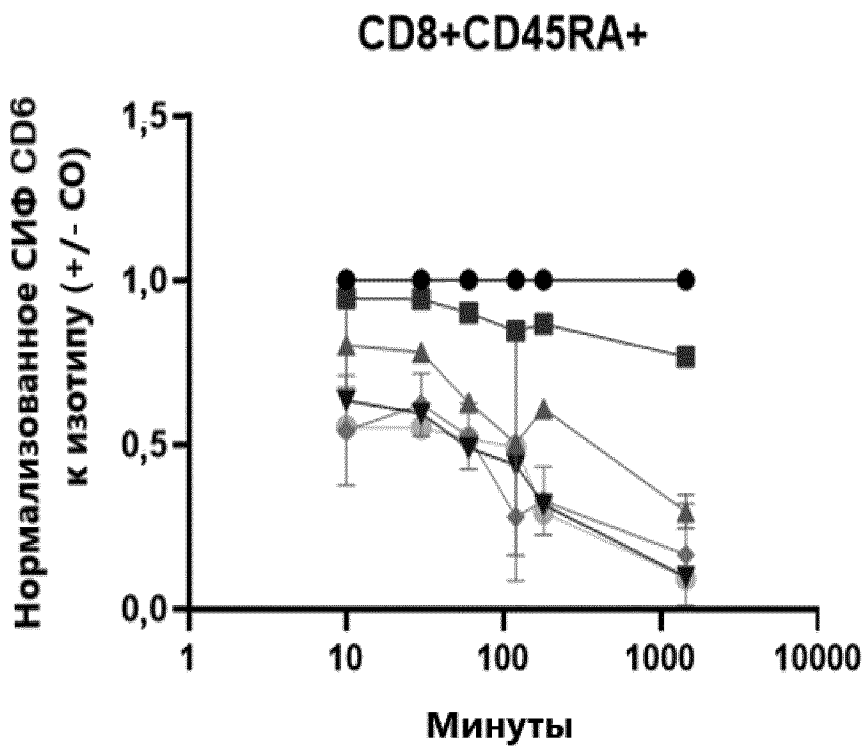




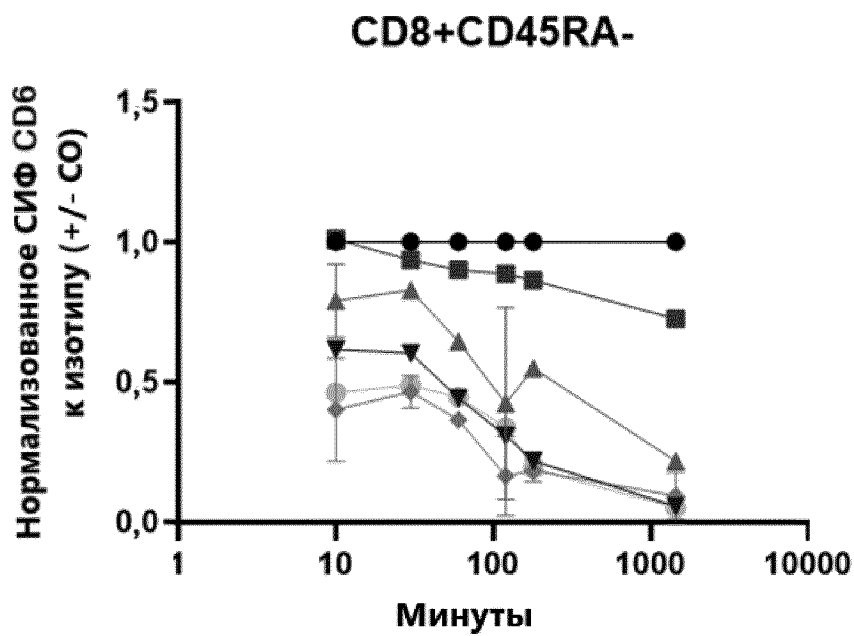
ФИГ. 2А



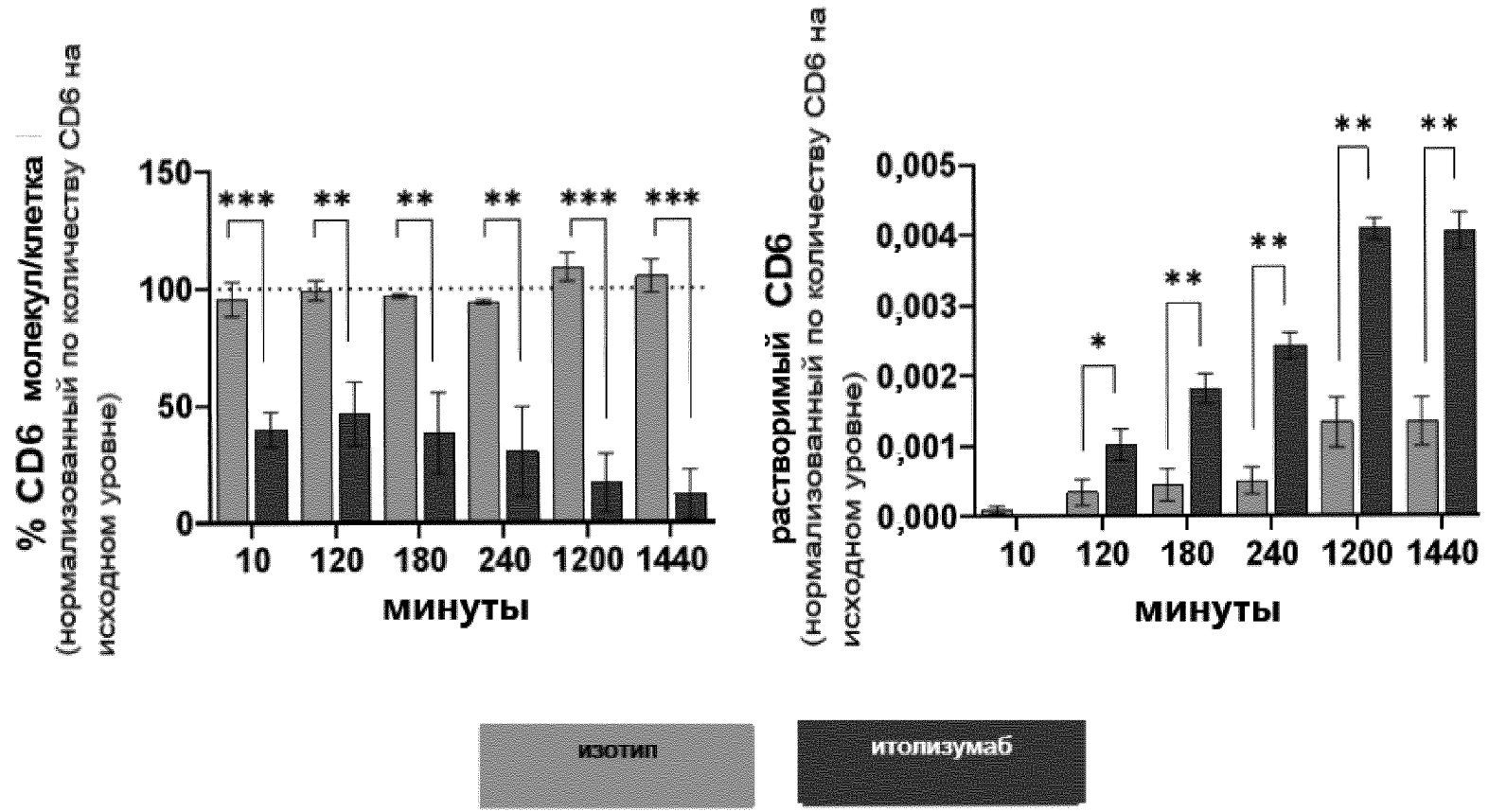
ФИГ. 2Б



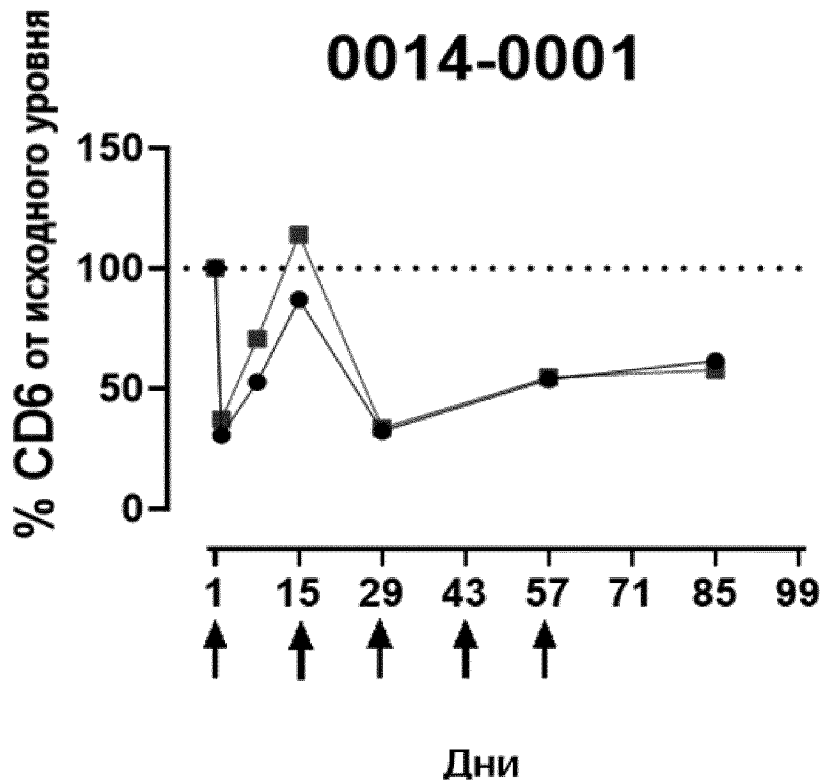
ФИГ. 2В



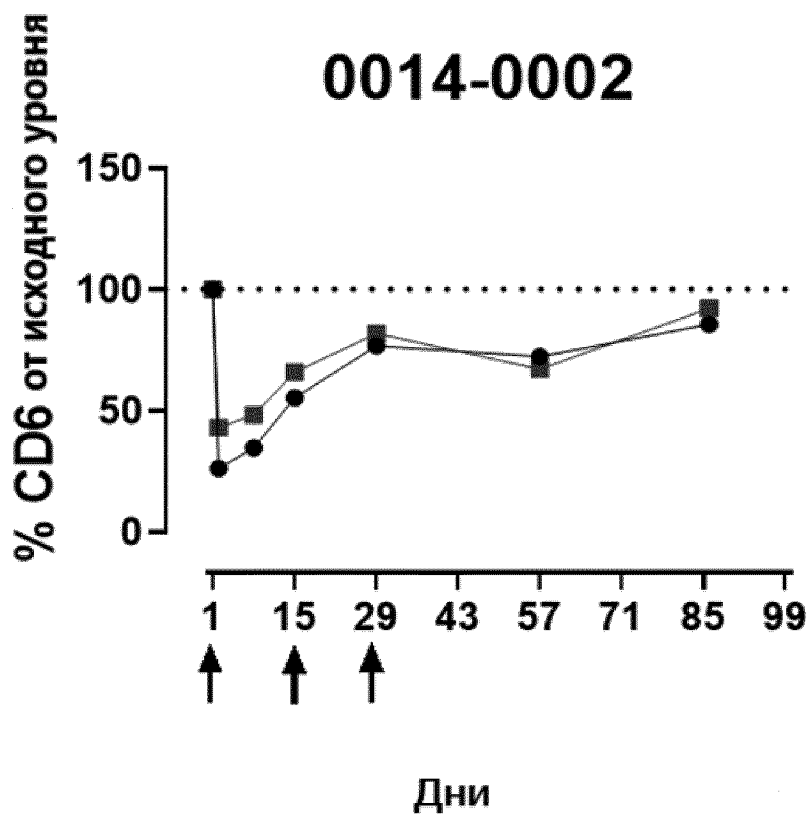
ФИГ. 2Г



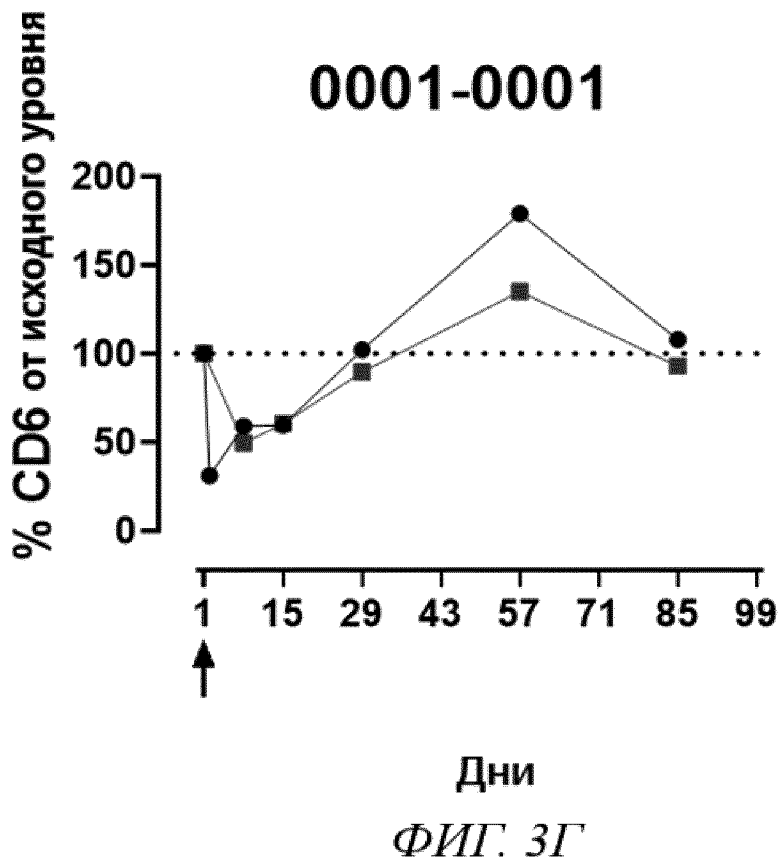
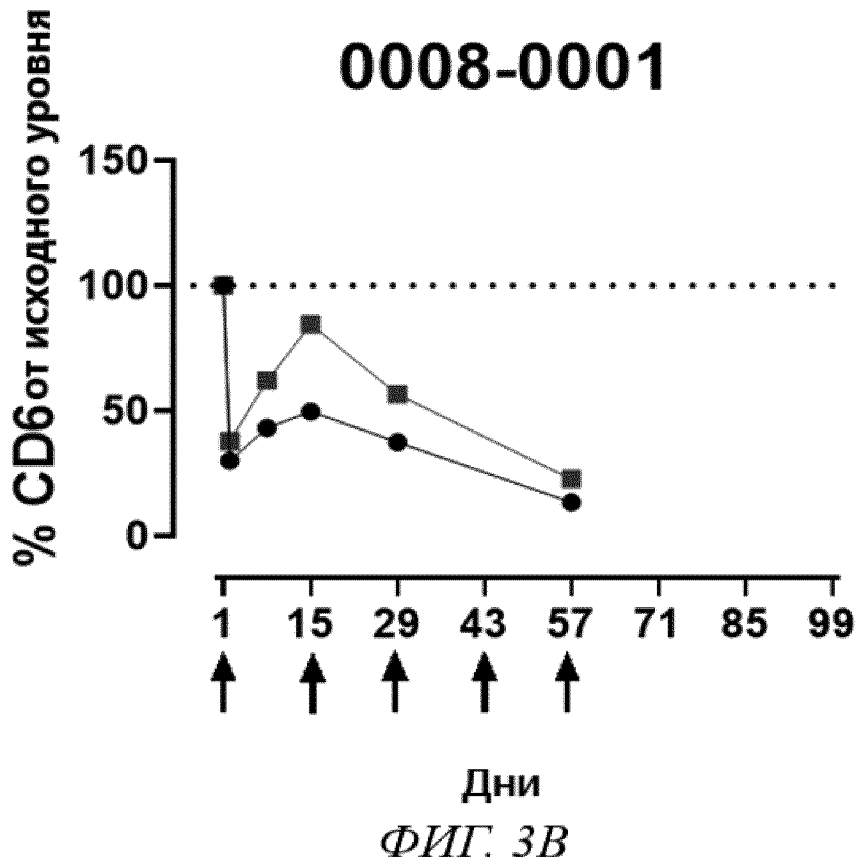
ФИГ. 2Д

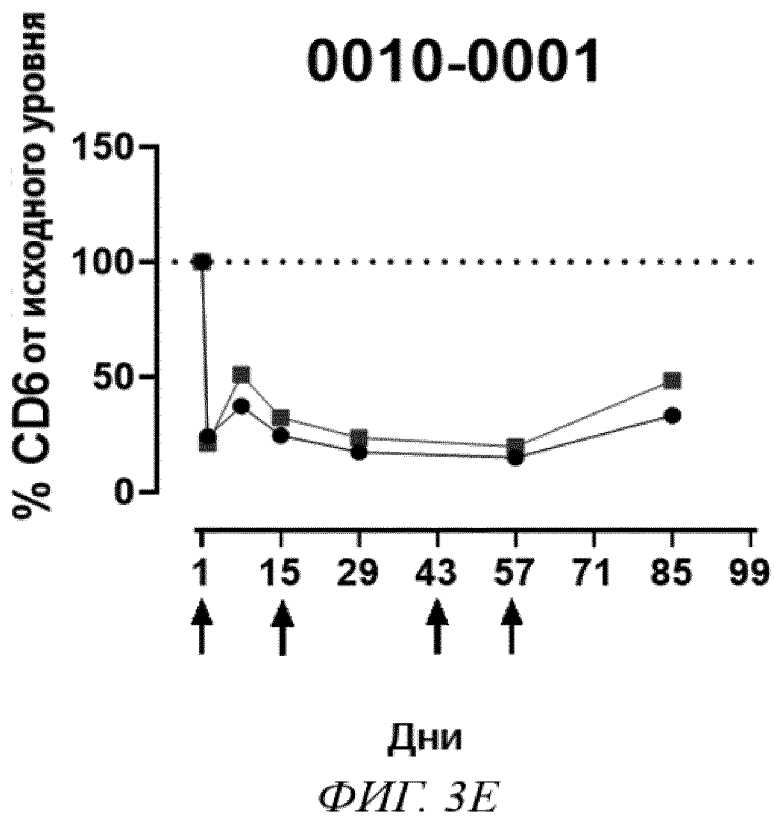
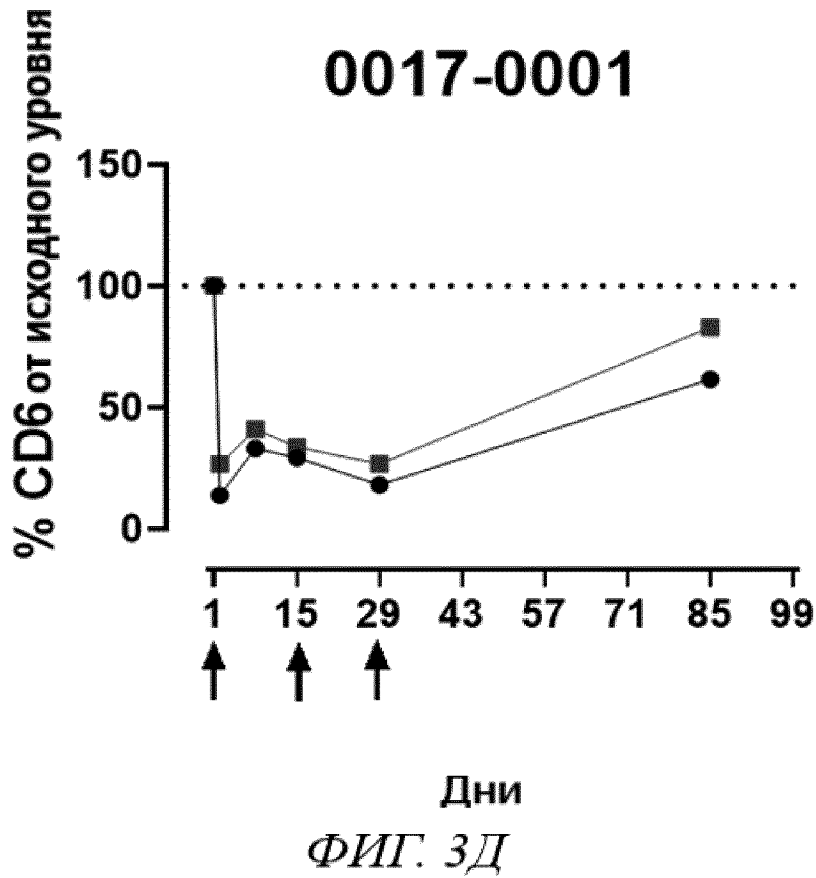


ФИГ. 3А

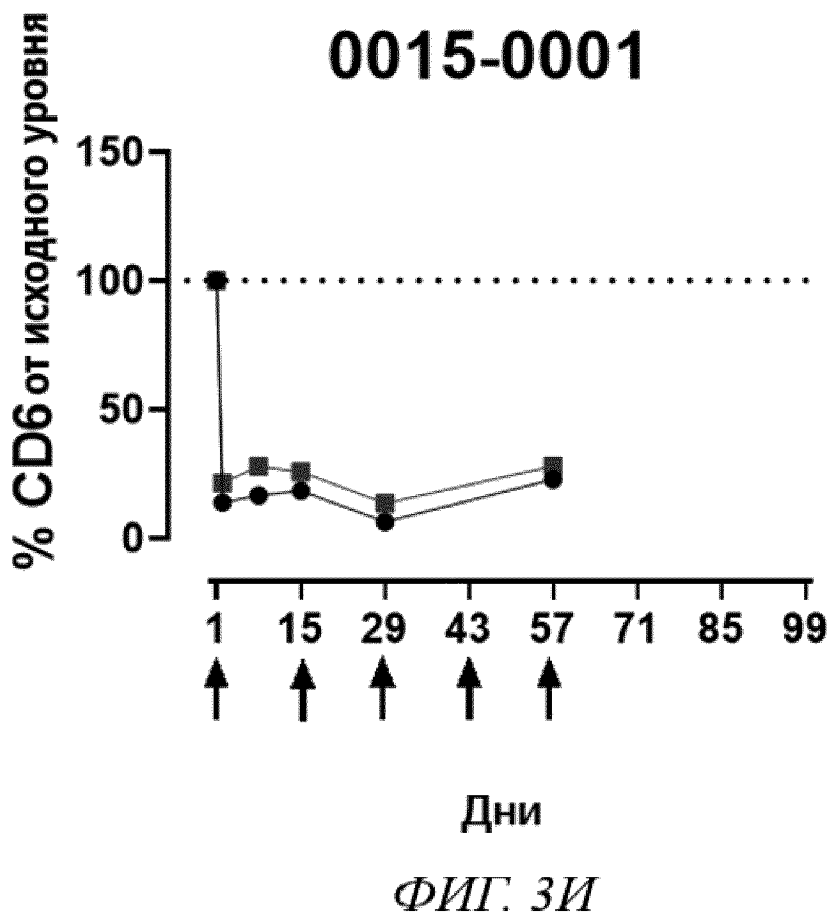
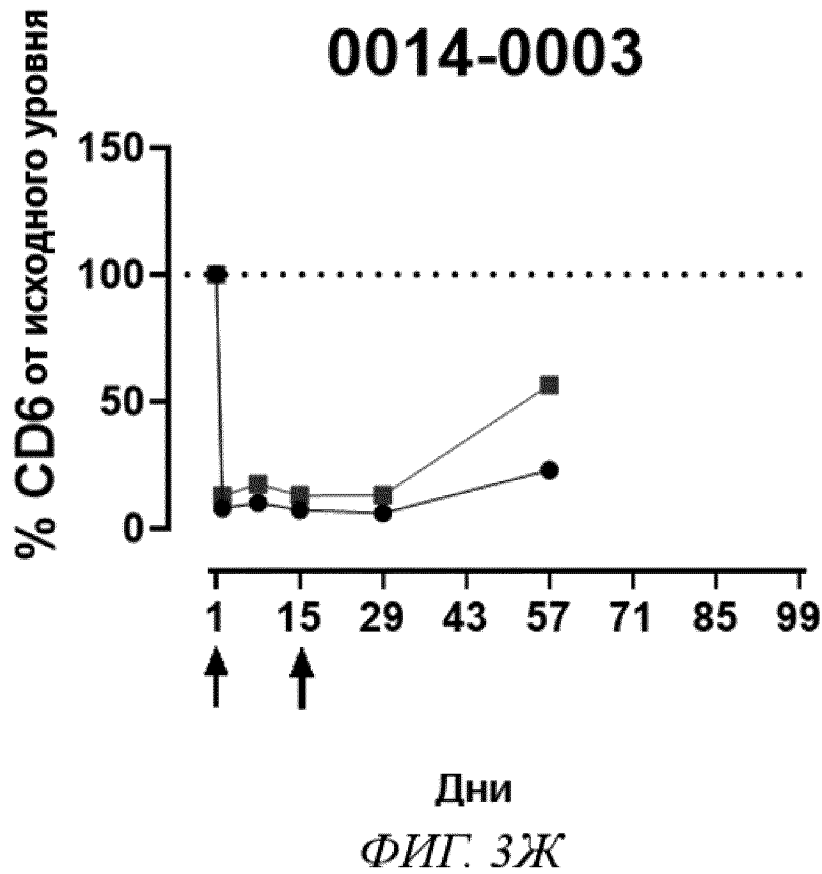


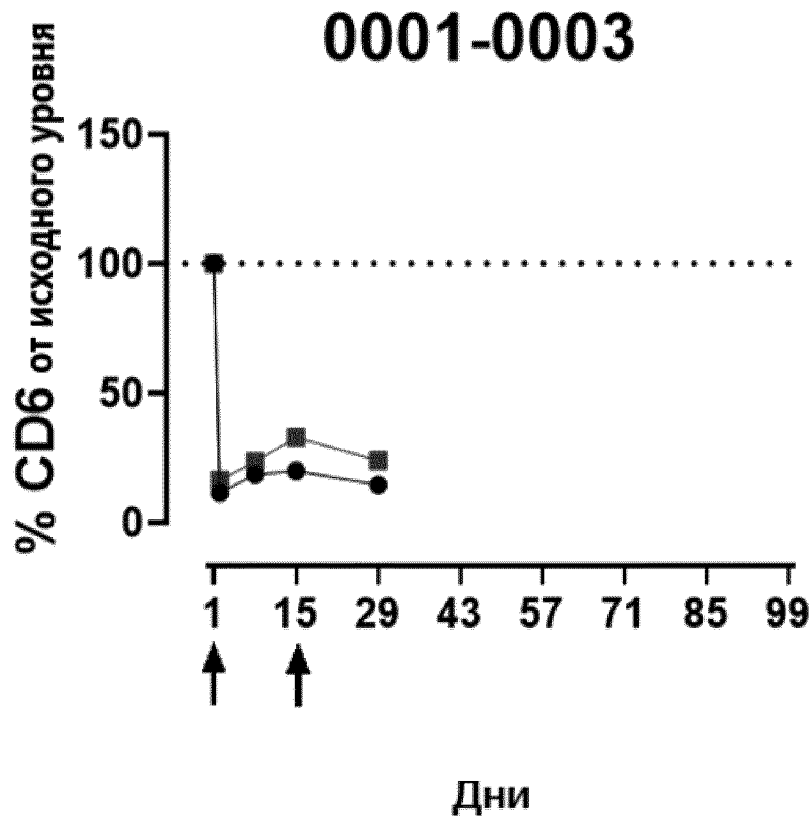
ФИГ. 3Б



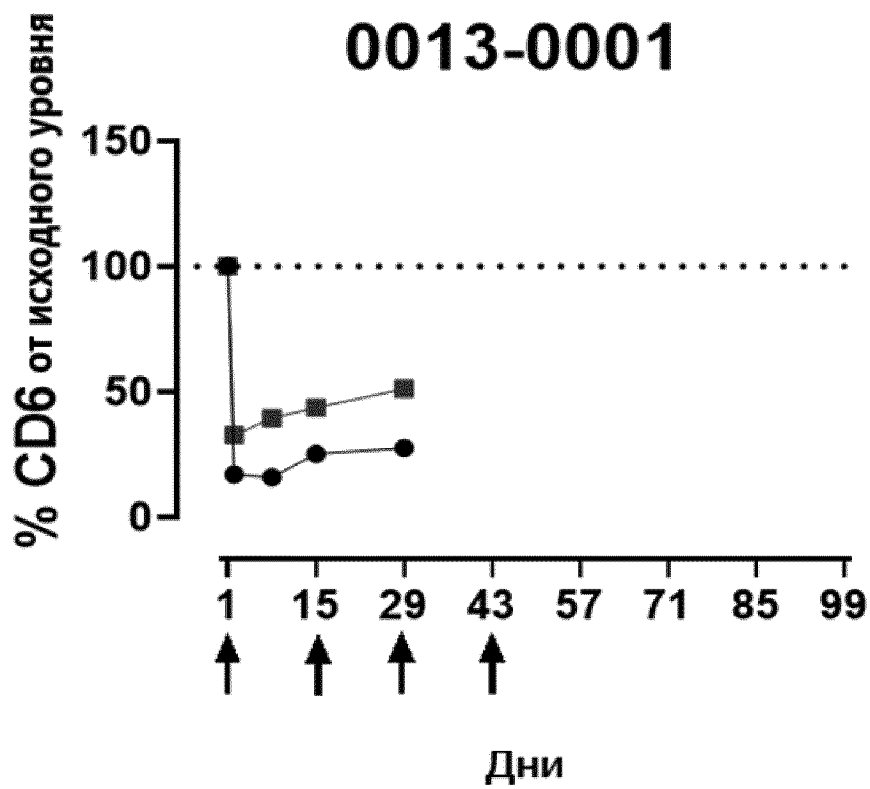






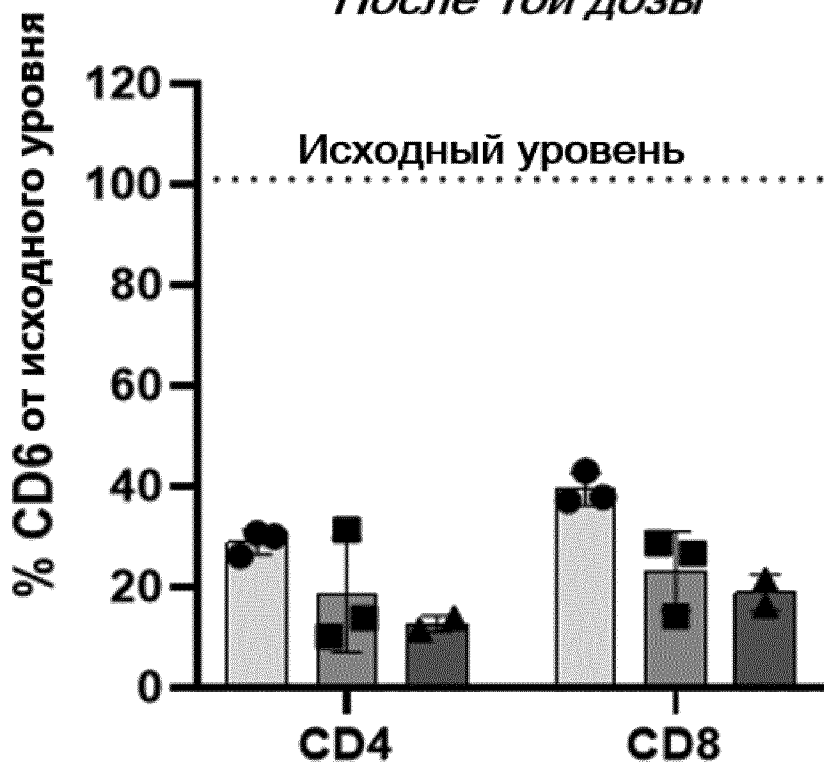


ФИГ. 3К



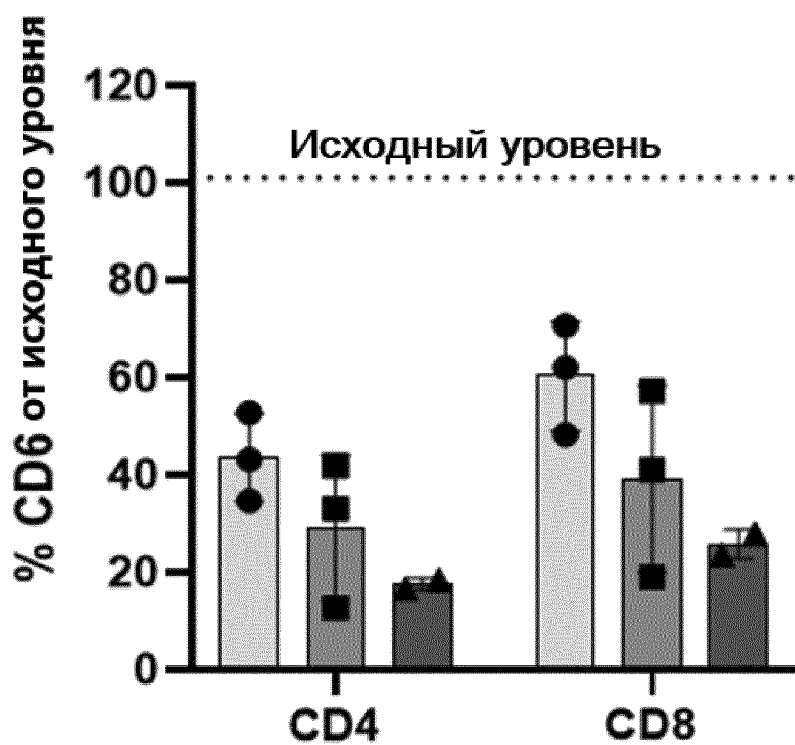
ФИГ. 3Л

**24 часа**  
*После 1ой дозы*



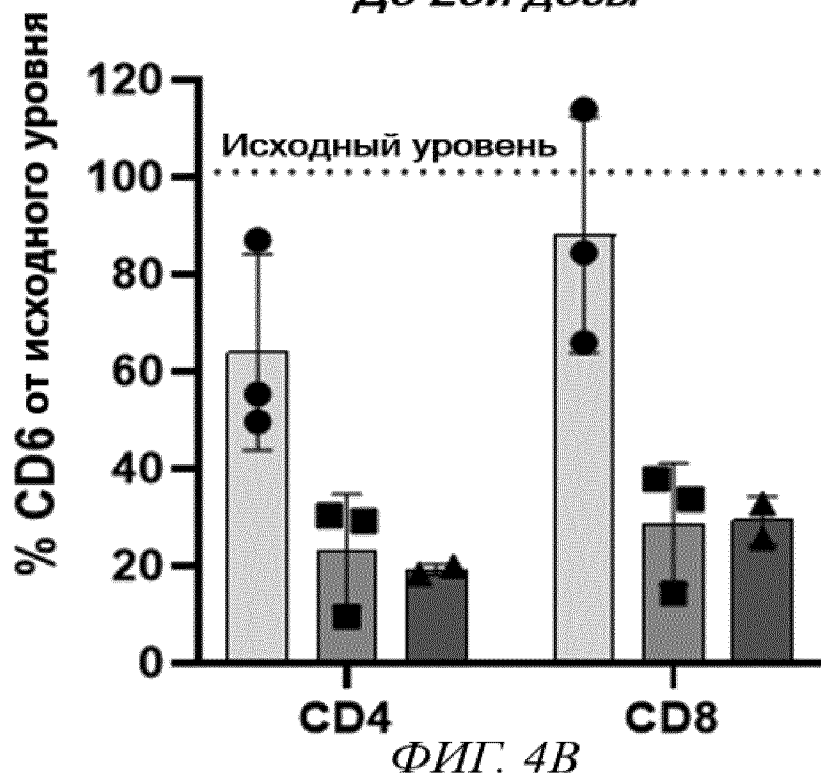
*ФИГ. 4А*

**День 8**

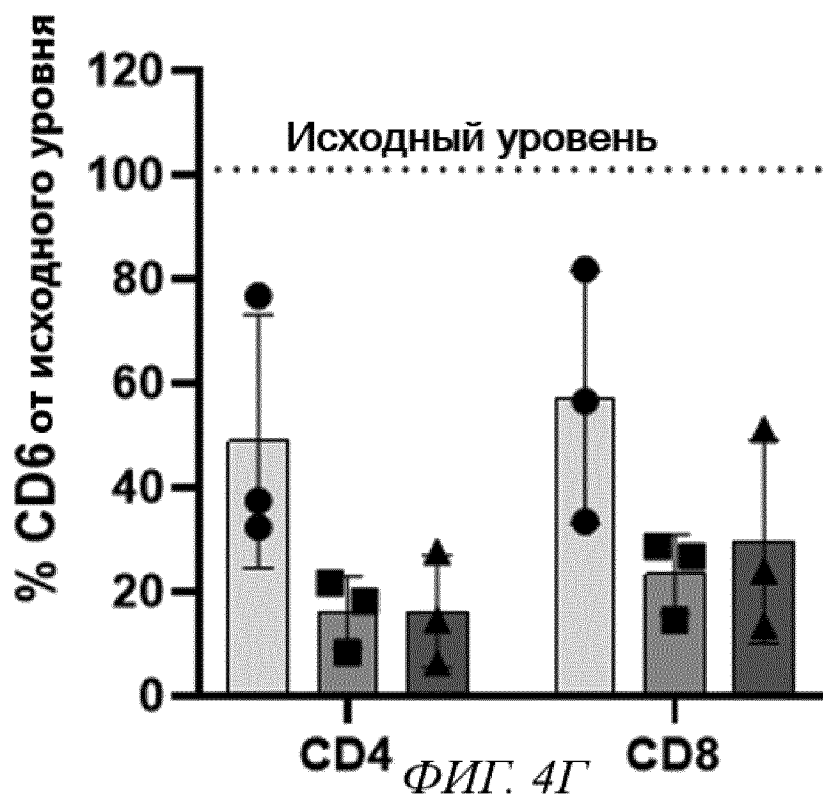


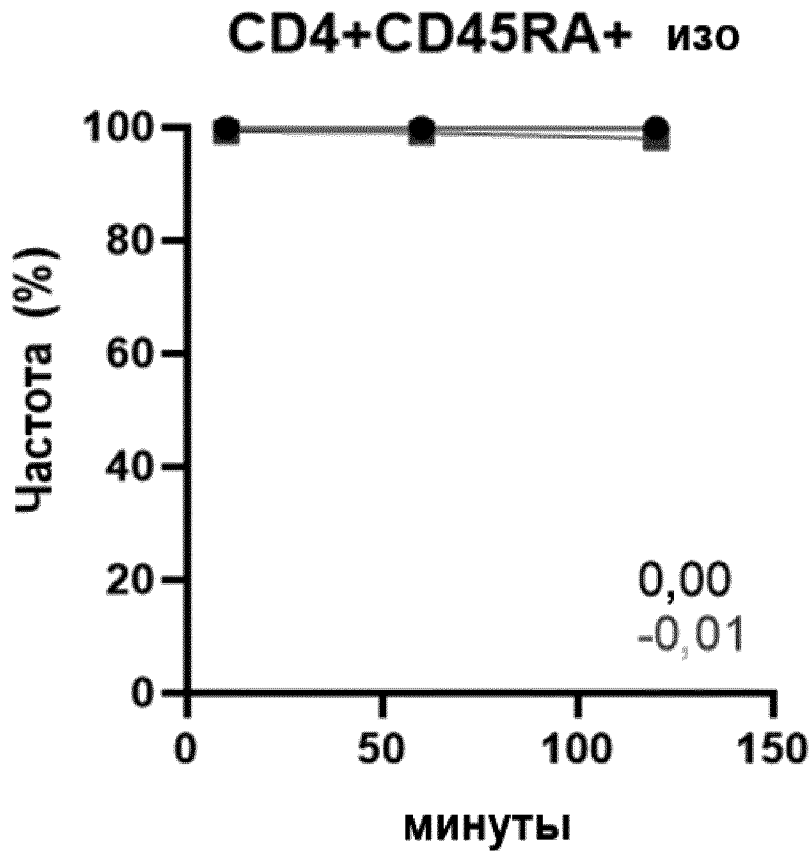
*ФИГ. 4Б*

День 15  
До 2ой дозы

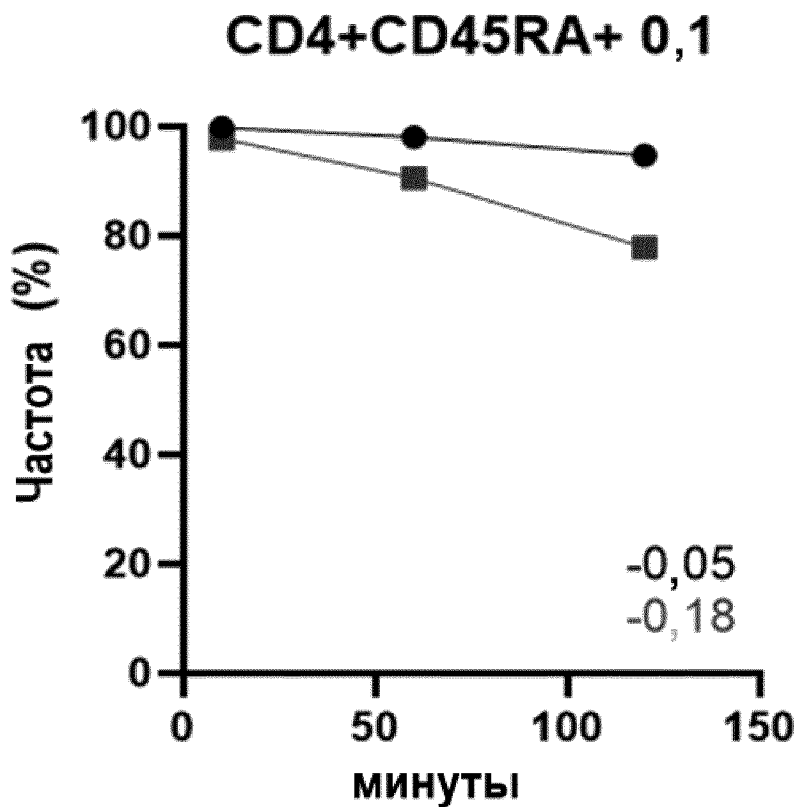


День 29

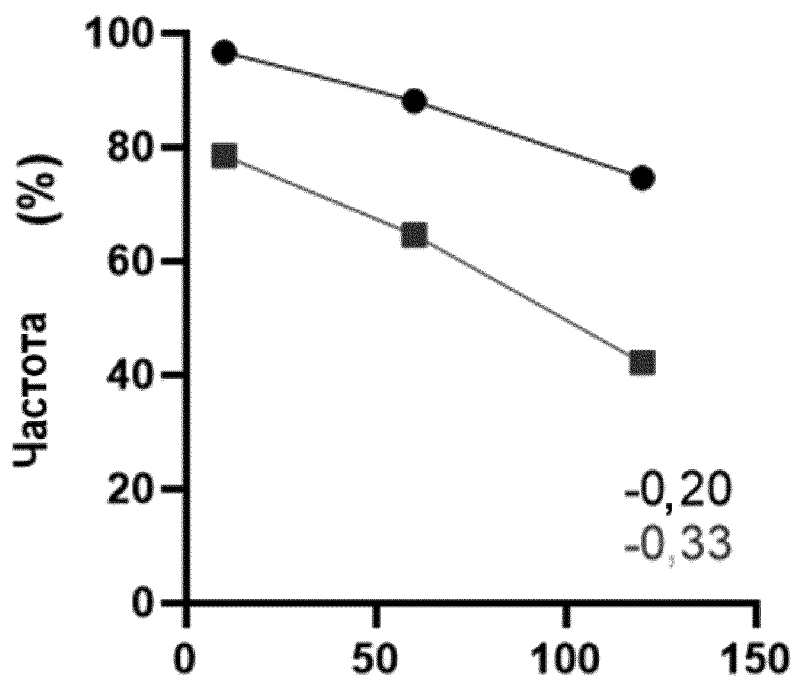




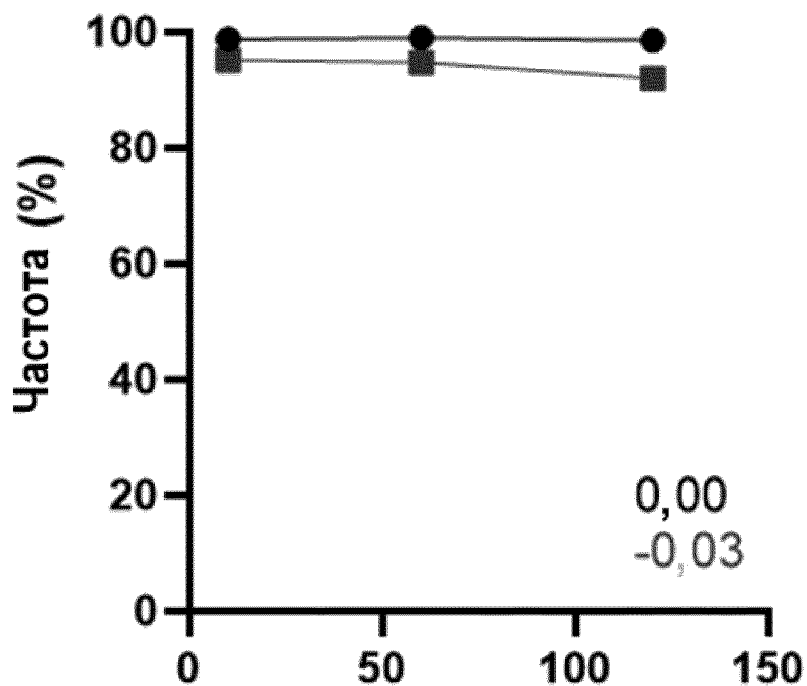
ФИГ. 5А



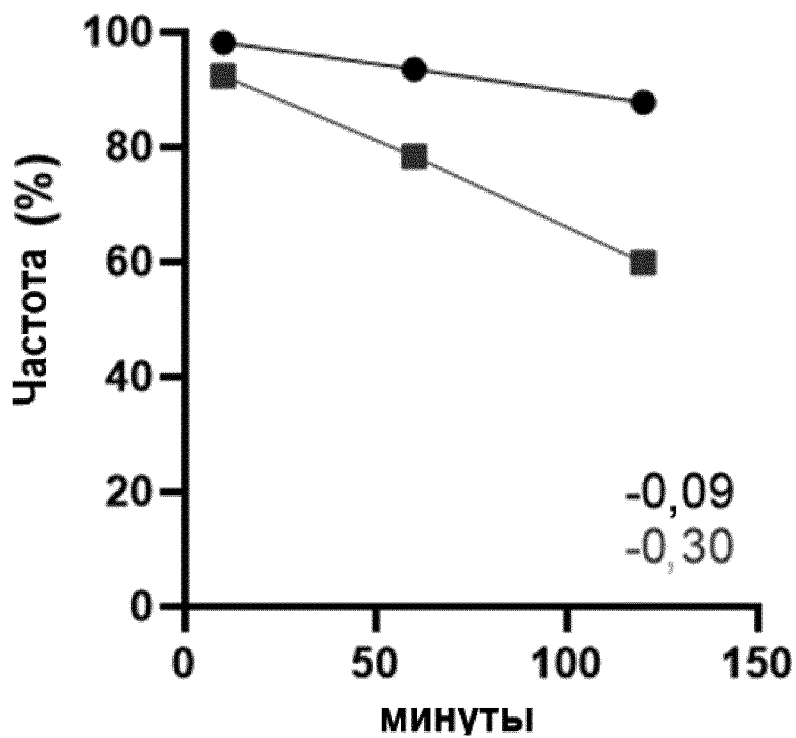
ФИГ. 5Б

**CD4+CD45RA+ 1**

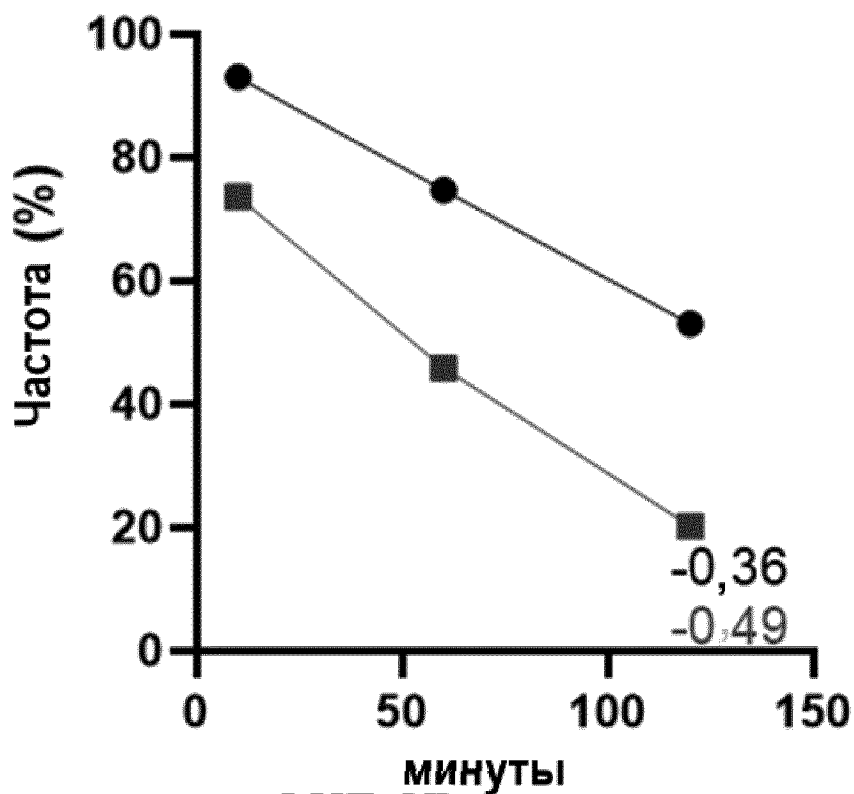
МИНУТЫ  
ФИГ. 5В

**CD4+CD45RA- ИЗО**

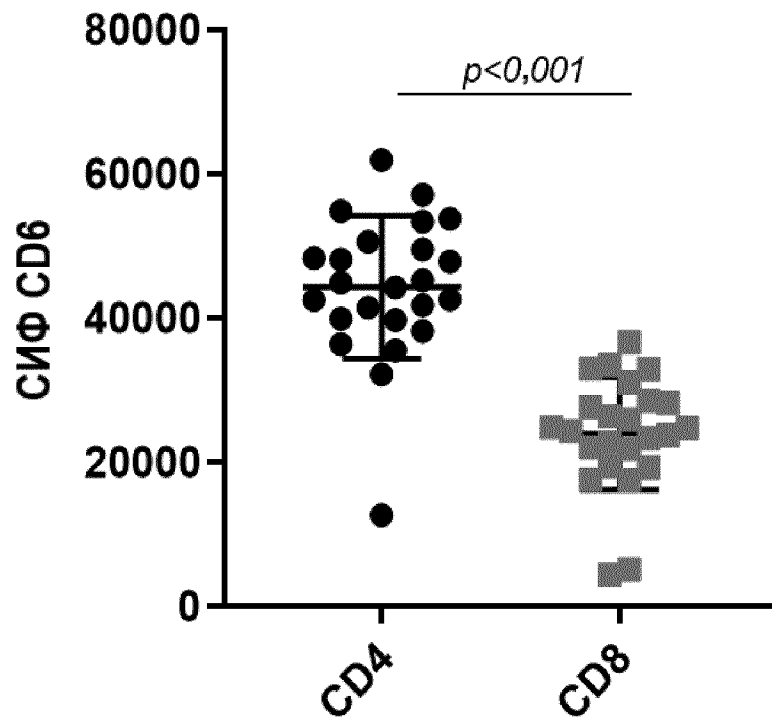
МИНУТЫ  
ФИГ. 5Г

**CD4+CD45RA- 0,1**

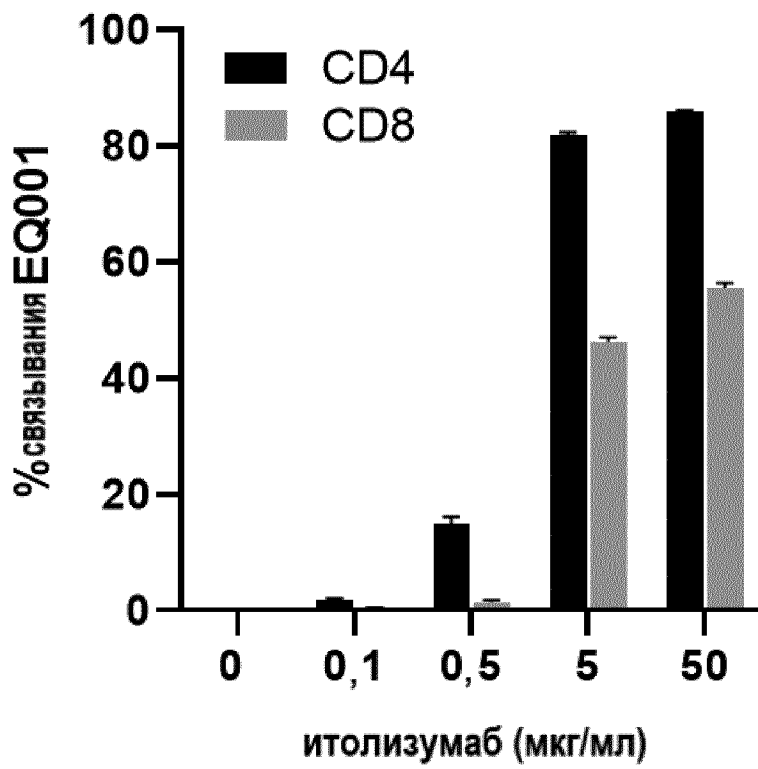
ФИГ. 5Д

**CD4+CD45RA- 1**

ФИГ. 5Е



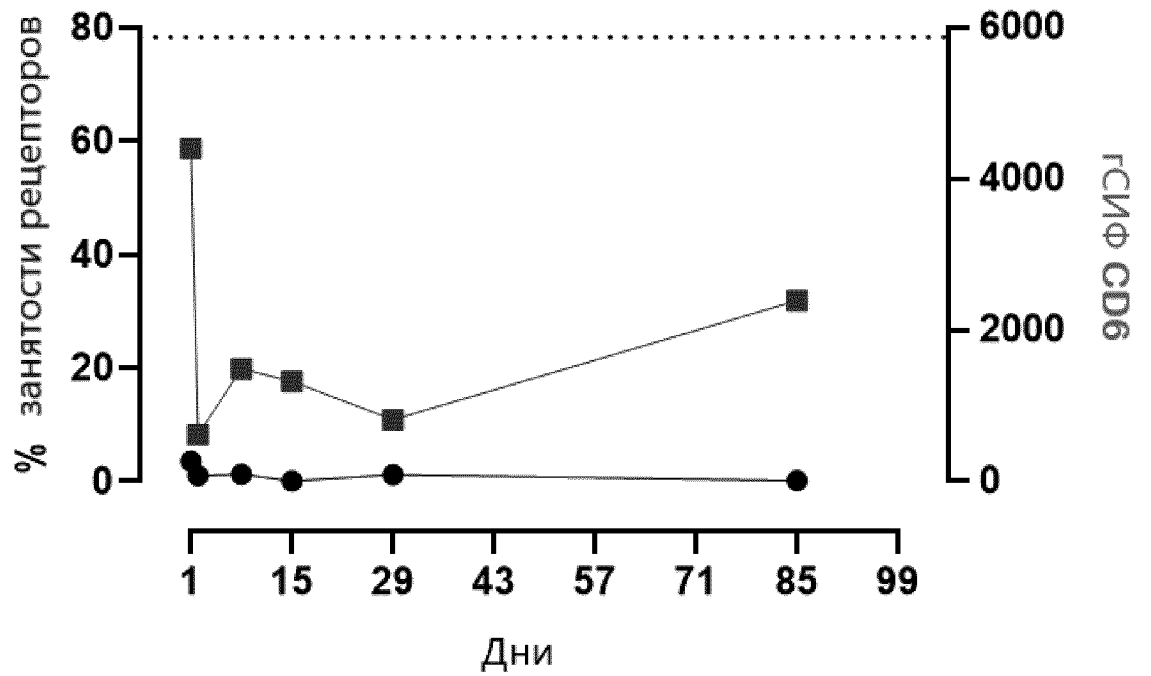
ФИГ. 6А



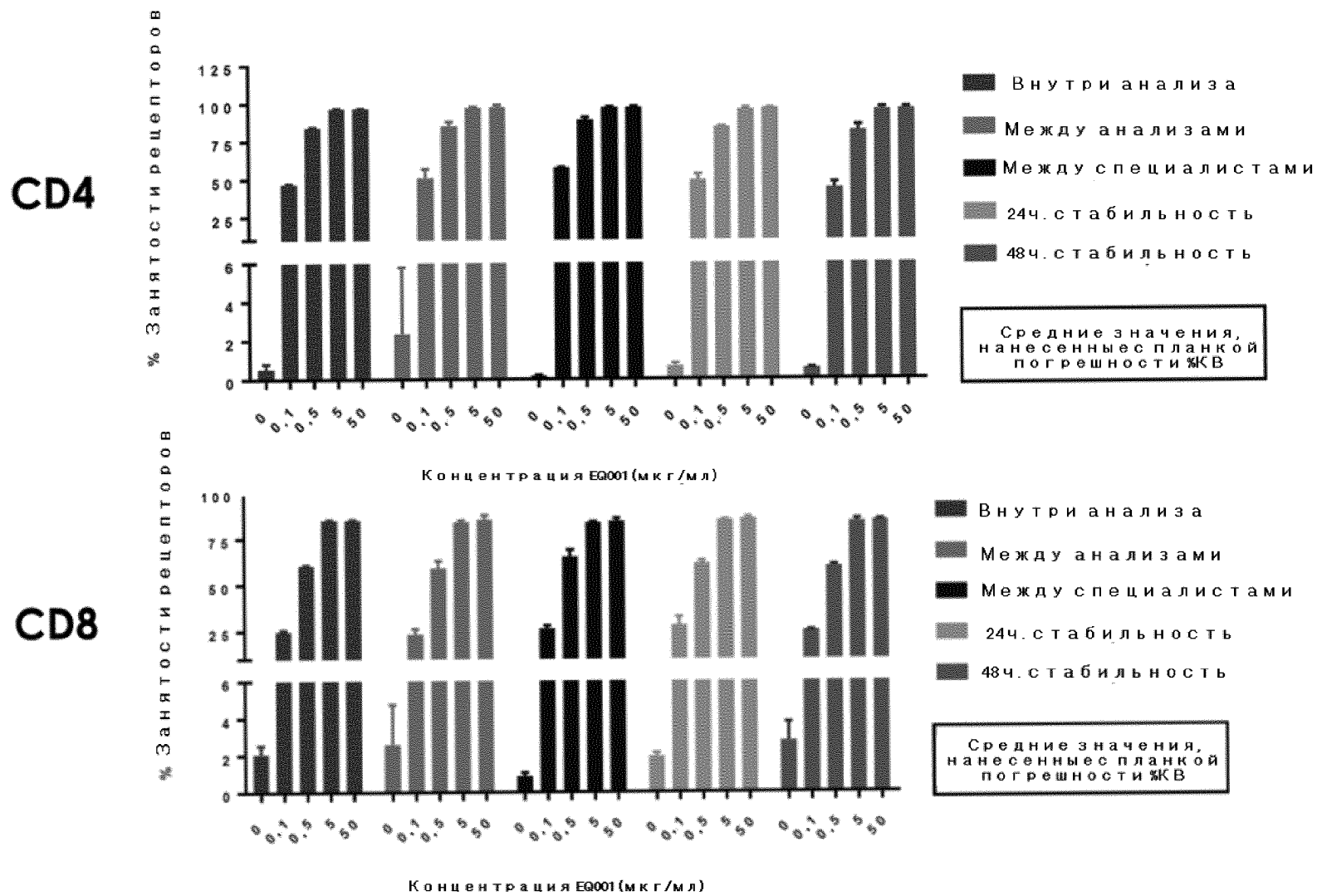
ФИГ. 6Б



0017-0001

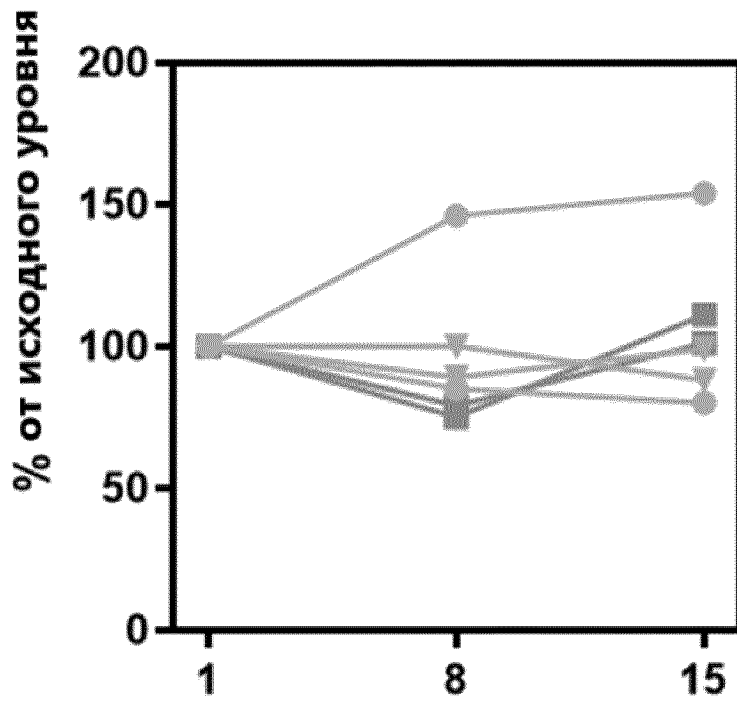


ФИГ. 6В



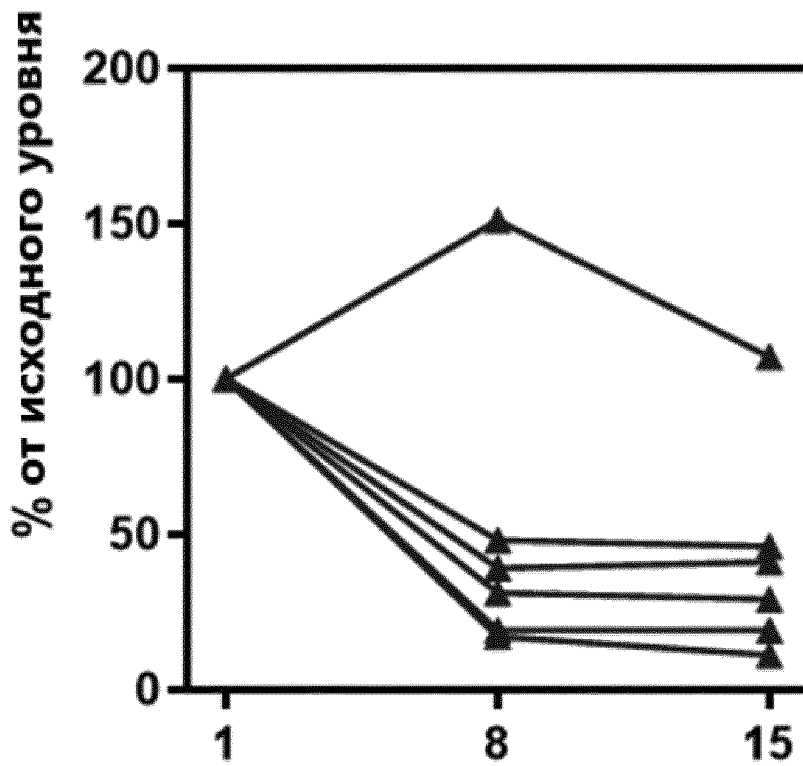
ФИГ. 6Г

## плацебо



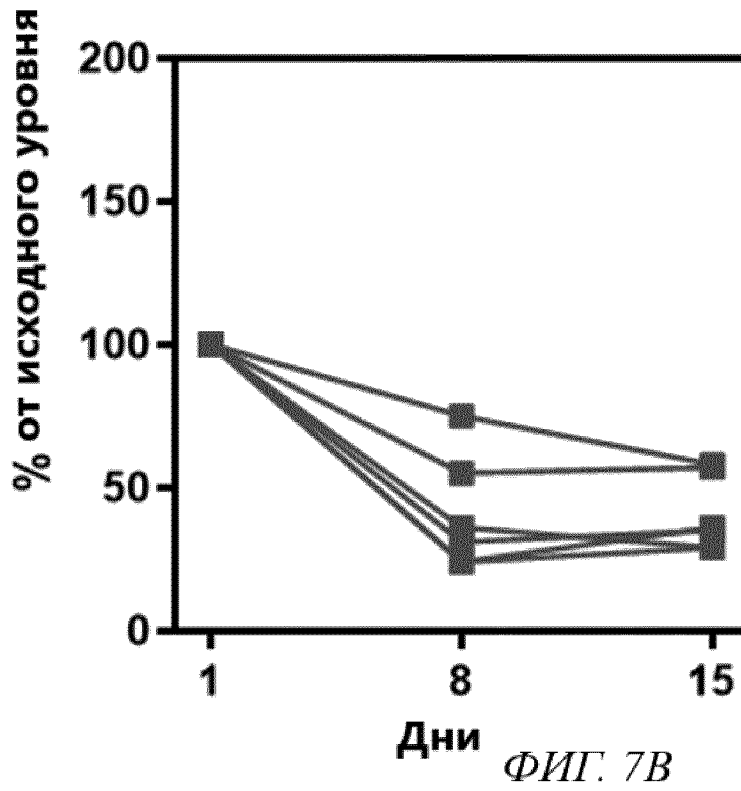
ФИГ. 7А Дни

## 1,6 мг/кг

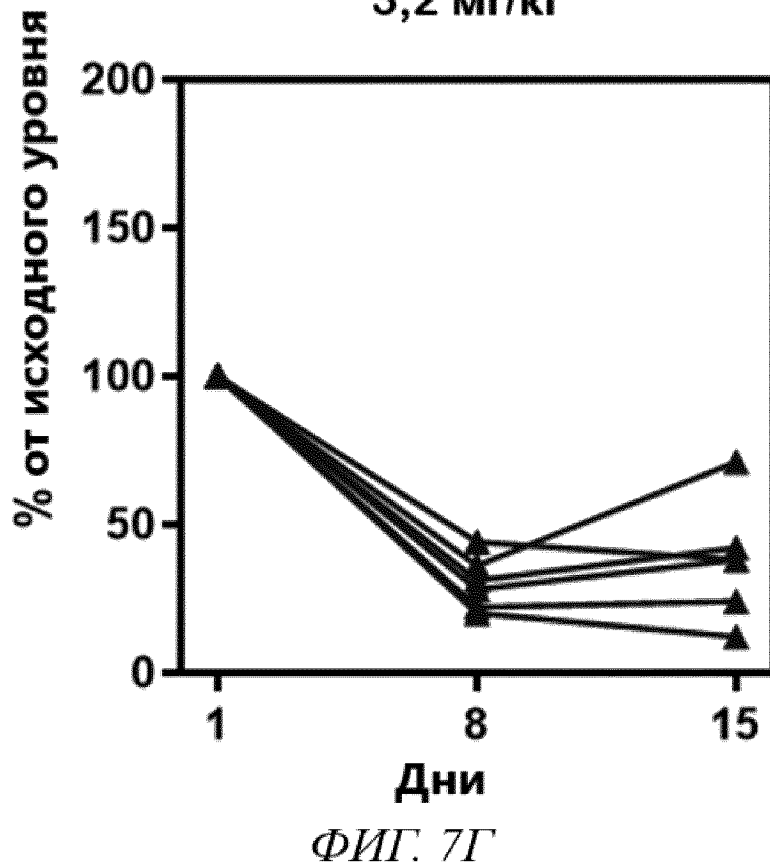


ФИГ. 7Б Дни

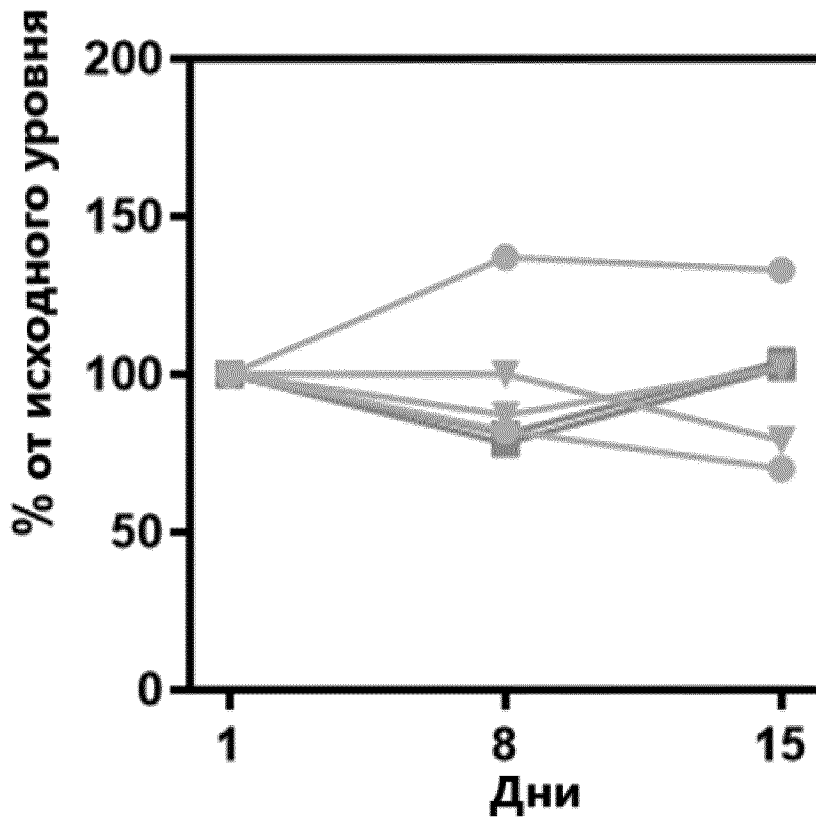
2,4 мг/кг



3,2 мг/кг

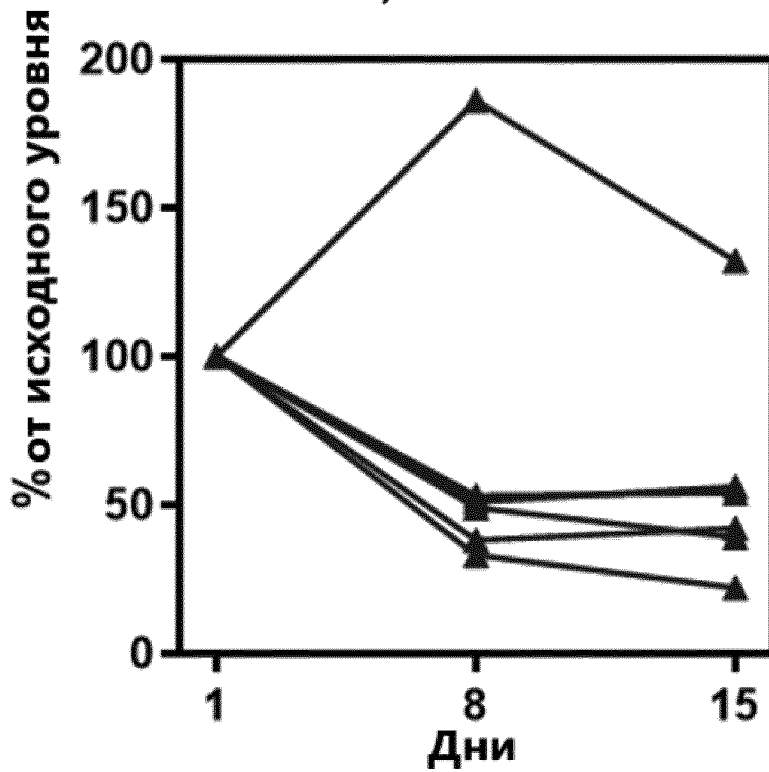


## плацебо



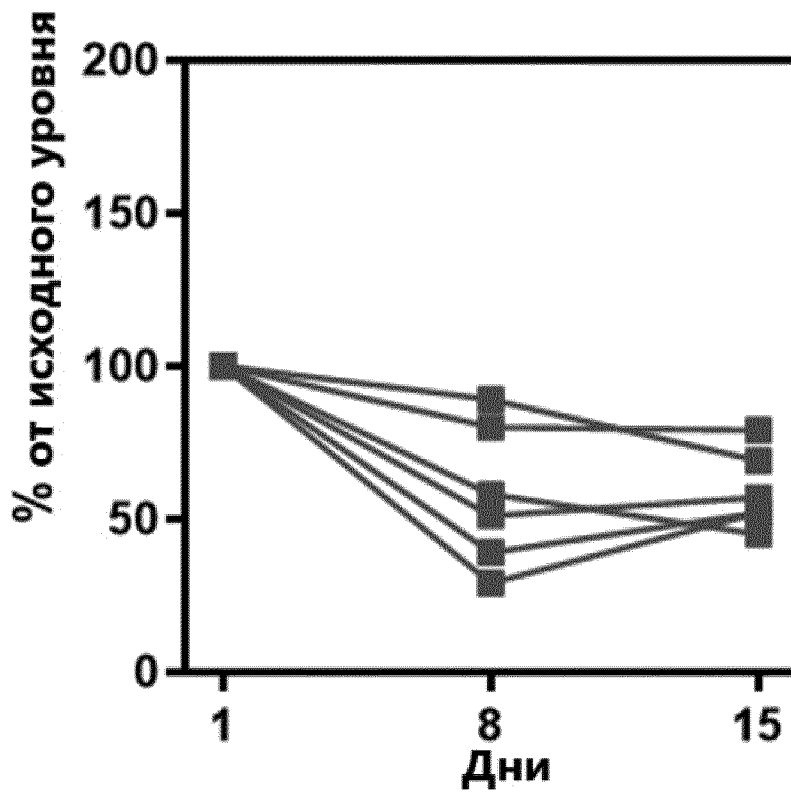
ФИГ. 8А

## 1,6 мг/кг



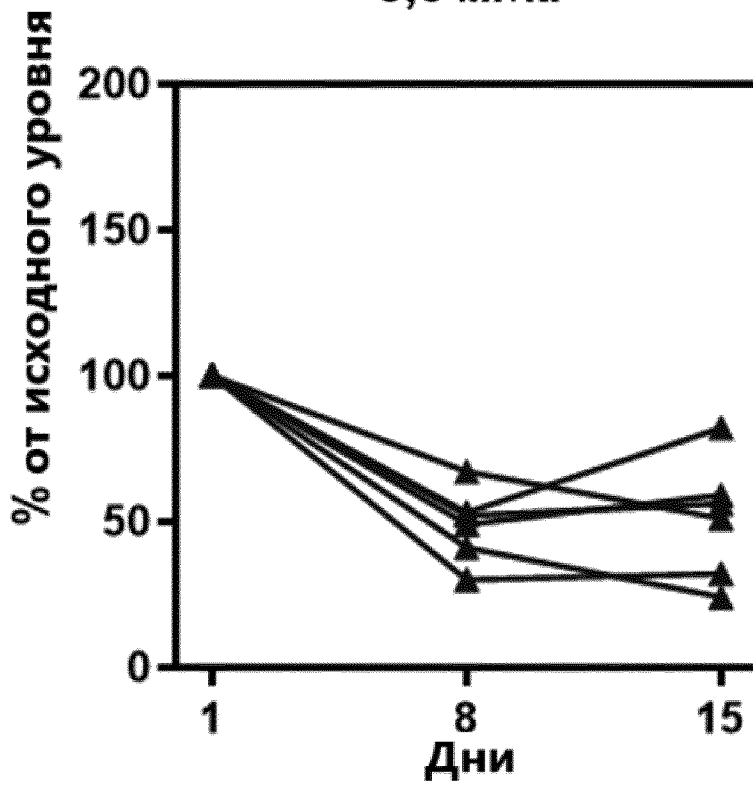
ФИГ. 8Б

2,4 мг/кг



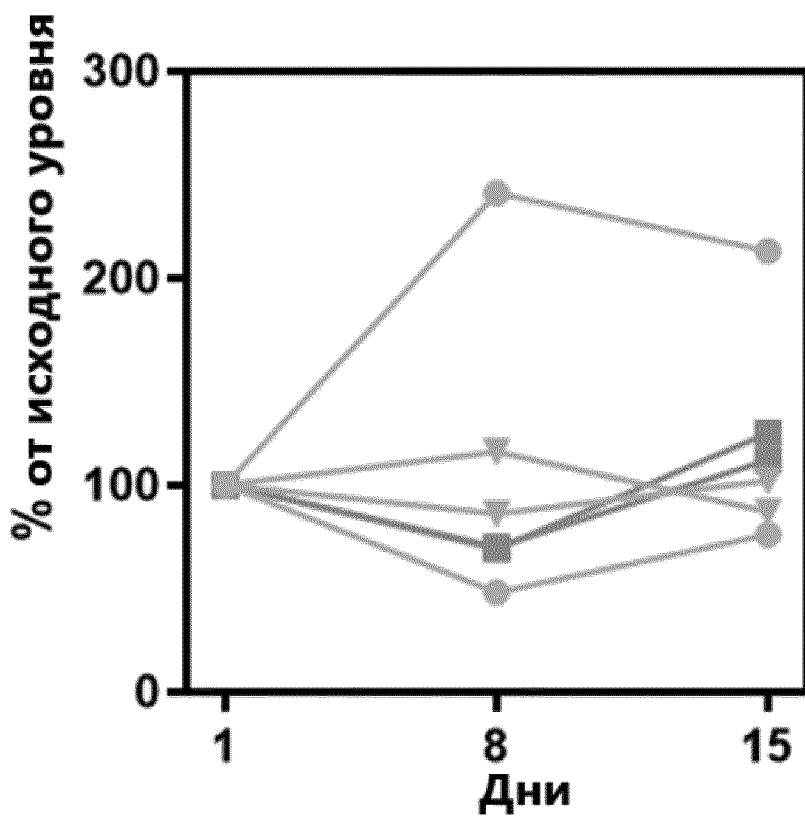
ФИГ. 8В

3,6 мг/кг



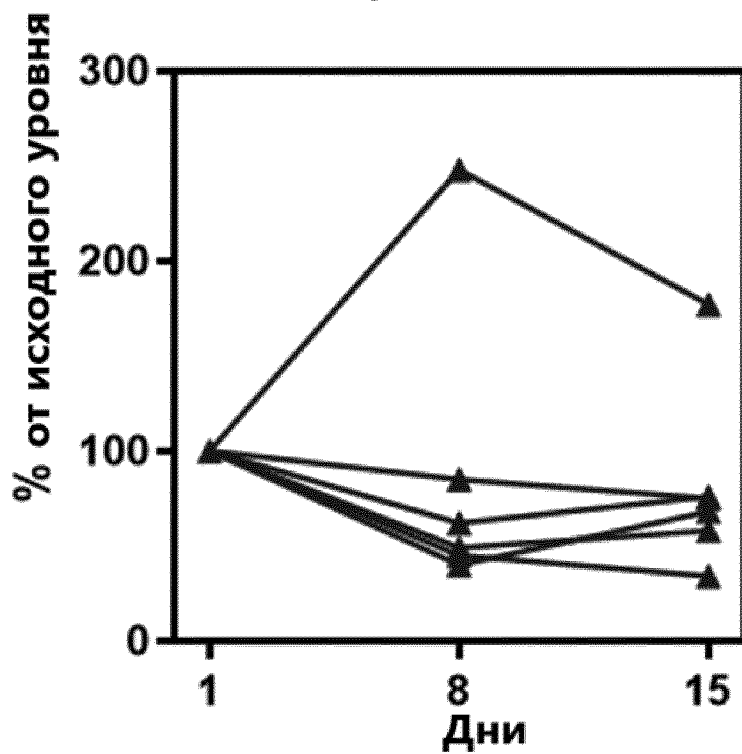
ФИГ. 8Г

**плацебо**

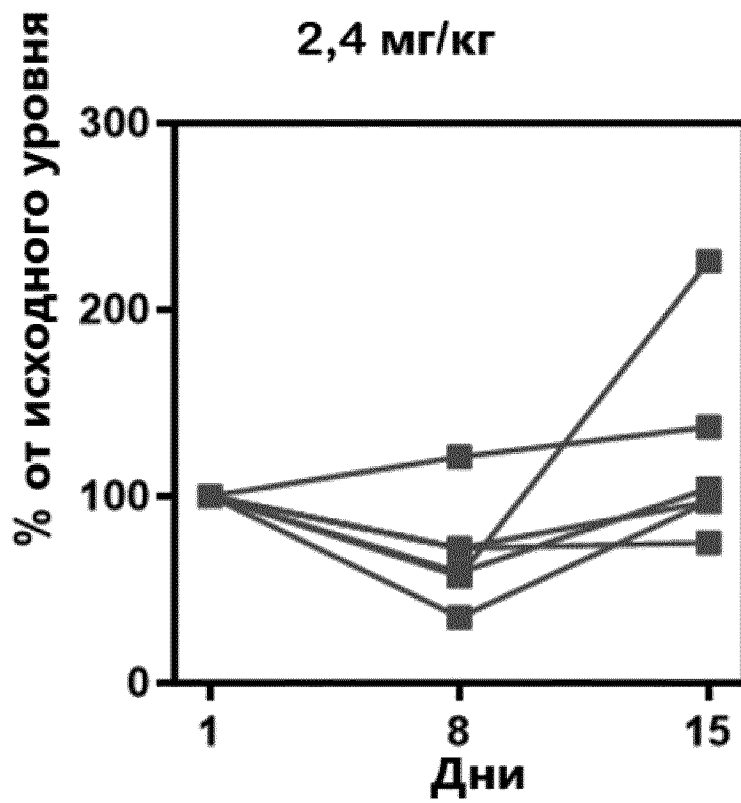


*ФИГ. 9А*

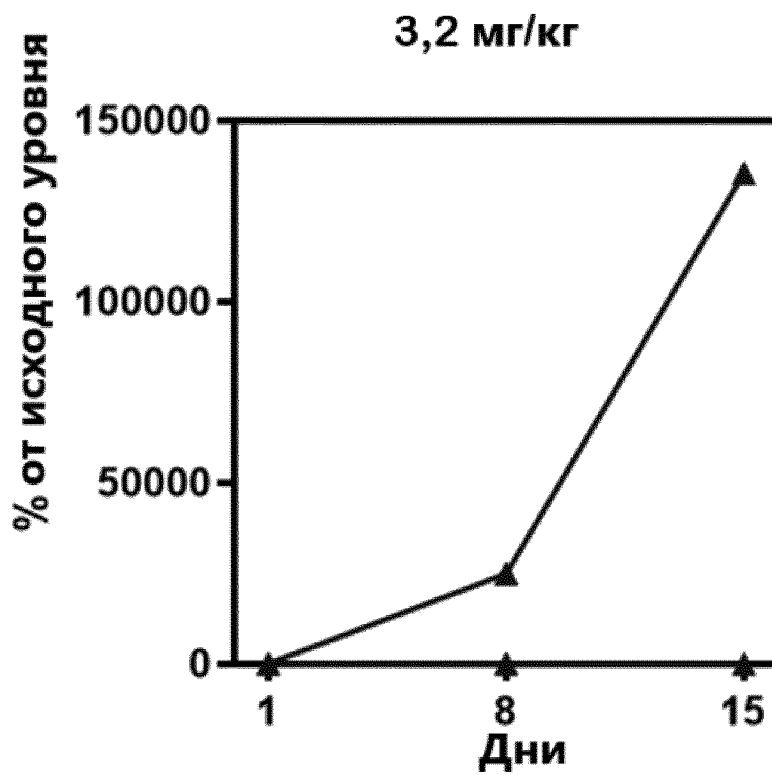
**1,6 мг/кг**



*ФИГ. 9Б*

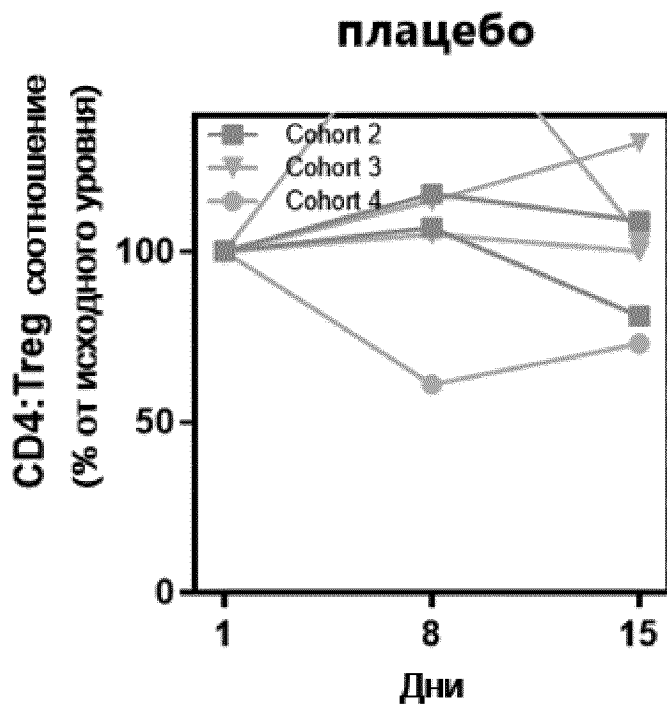


ФИГ. 9В

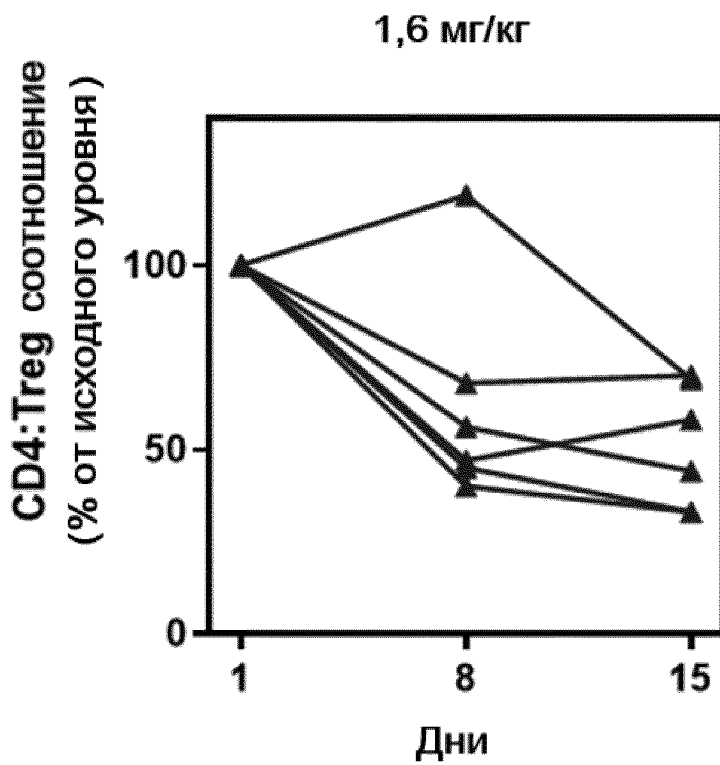


ФИГ. 9Г

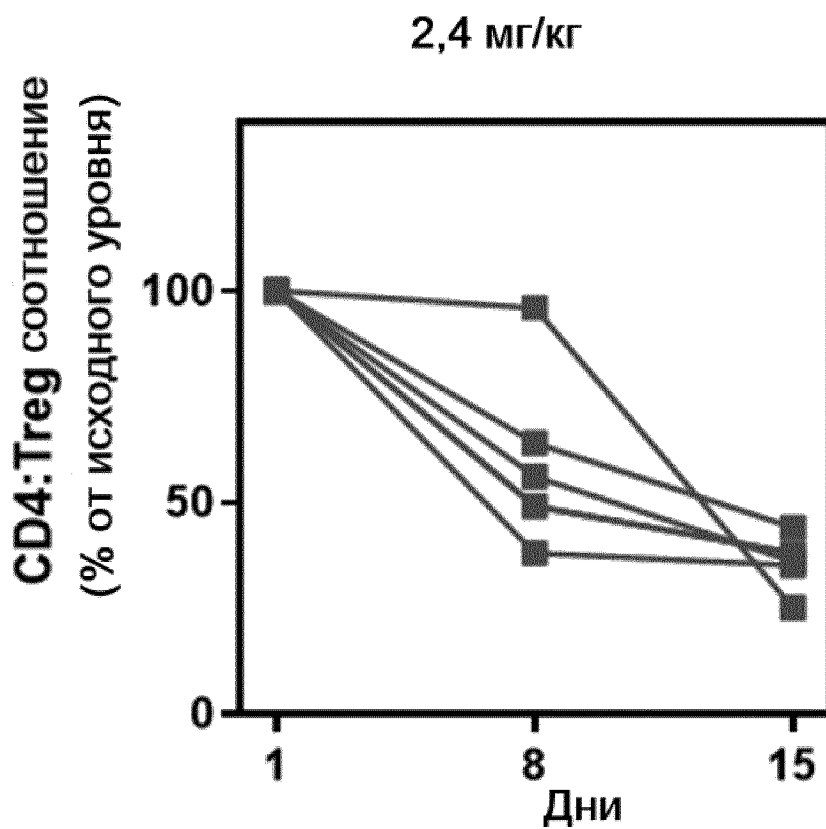




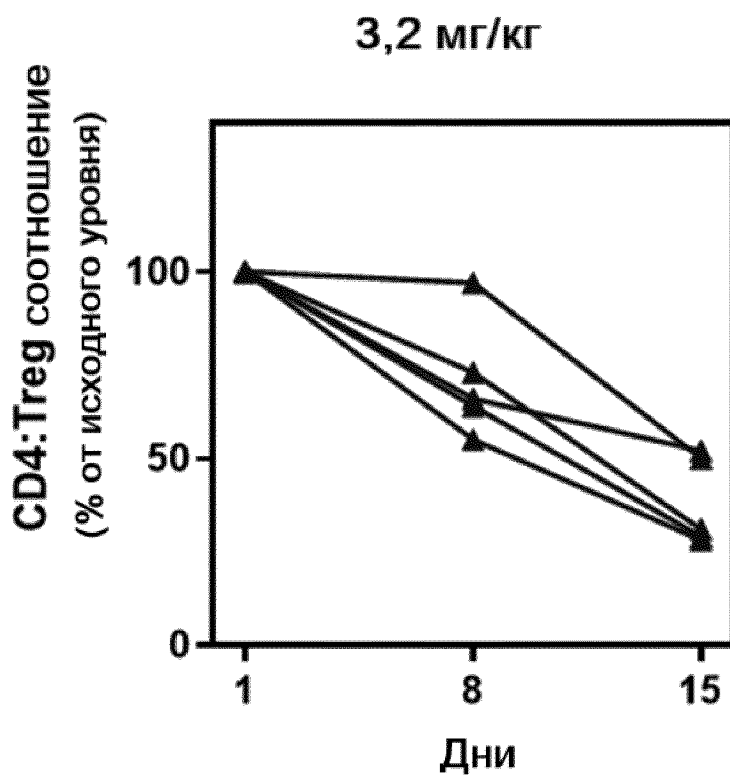
ФИГ. 10А



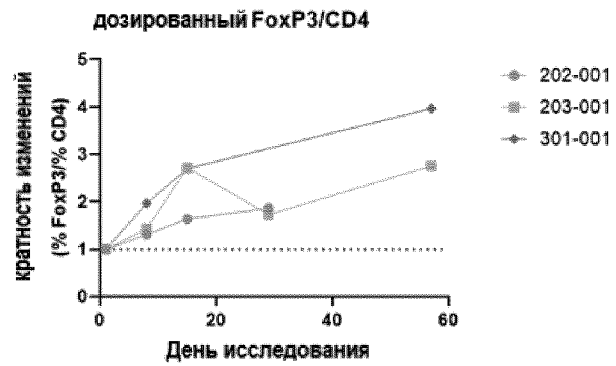
ФИГ. 10Б



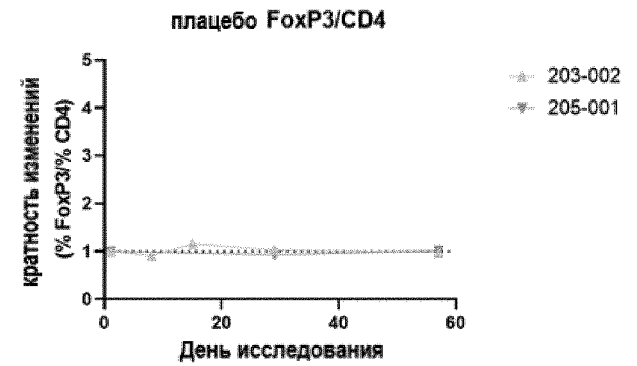
ФИГ. 10В



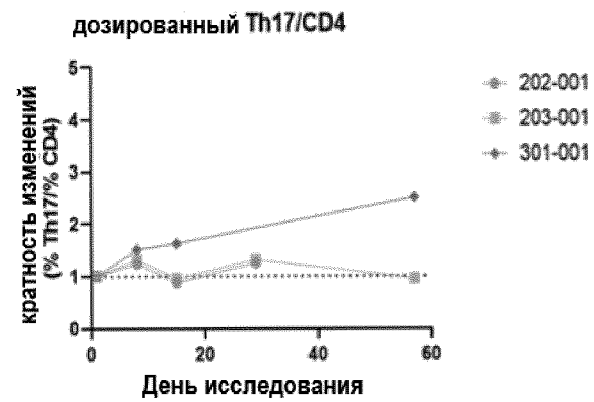
ФИГ. 10Г



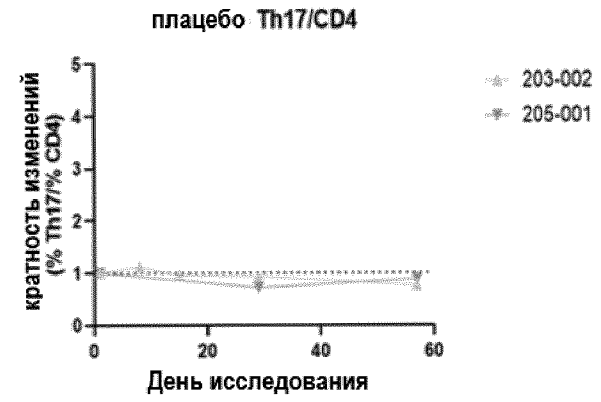
ФИГ. 11А



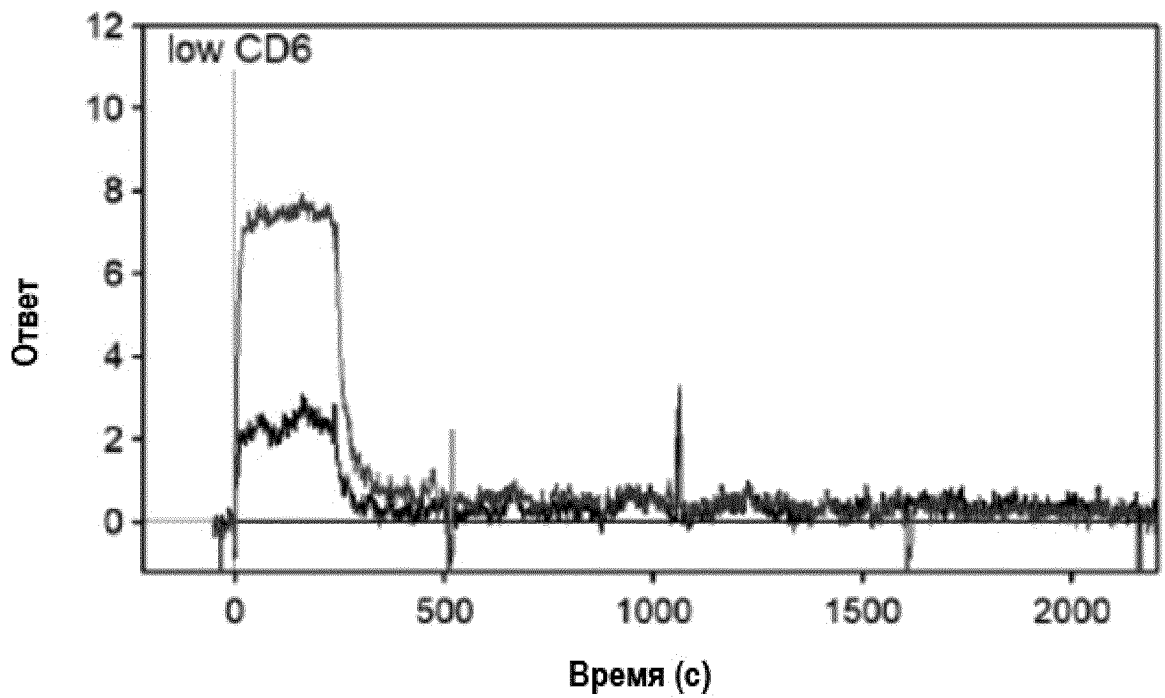
ФИГ. 11Б



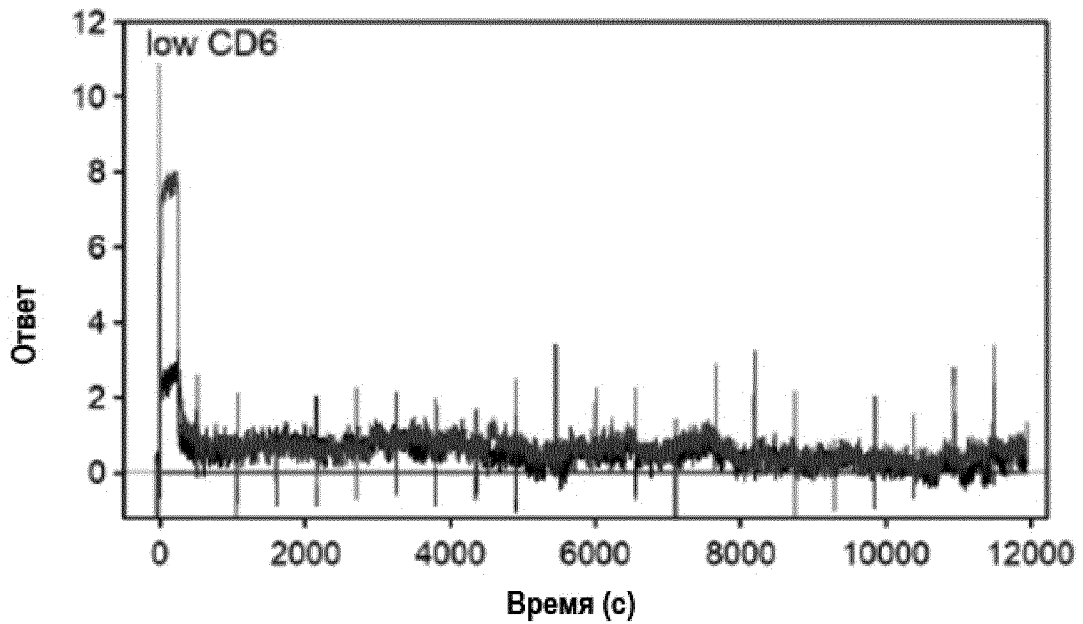
ФИГ. 11В



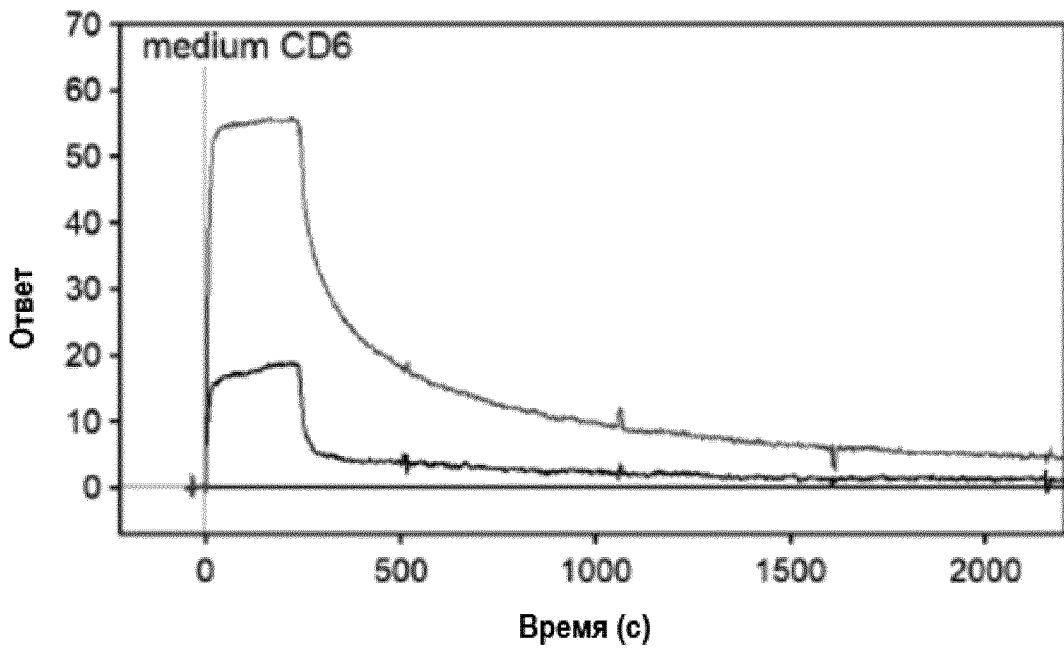
ФИГ. 11Г



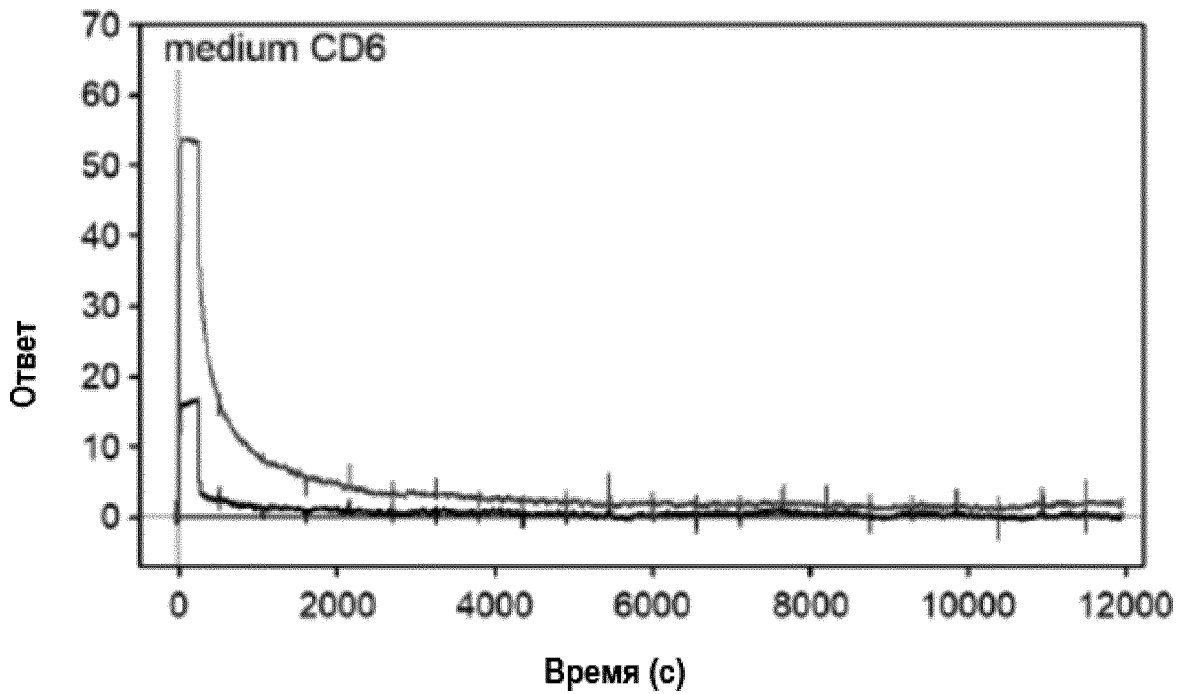
ФИГ. 12А



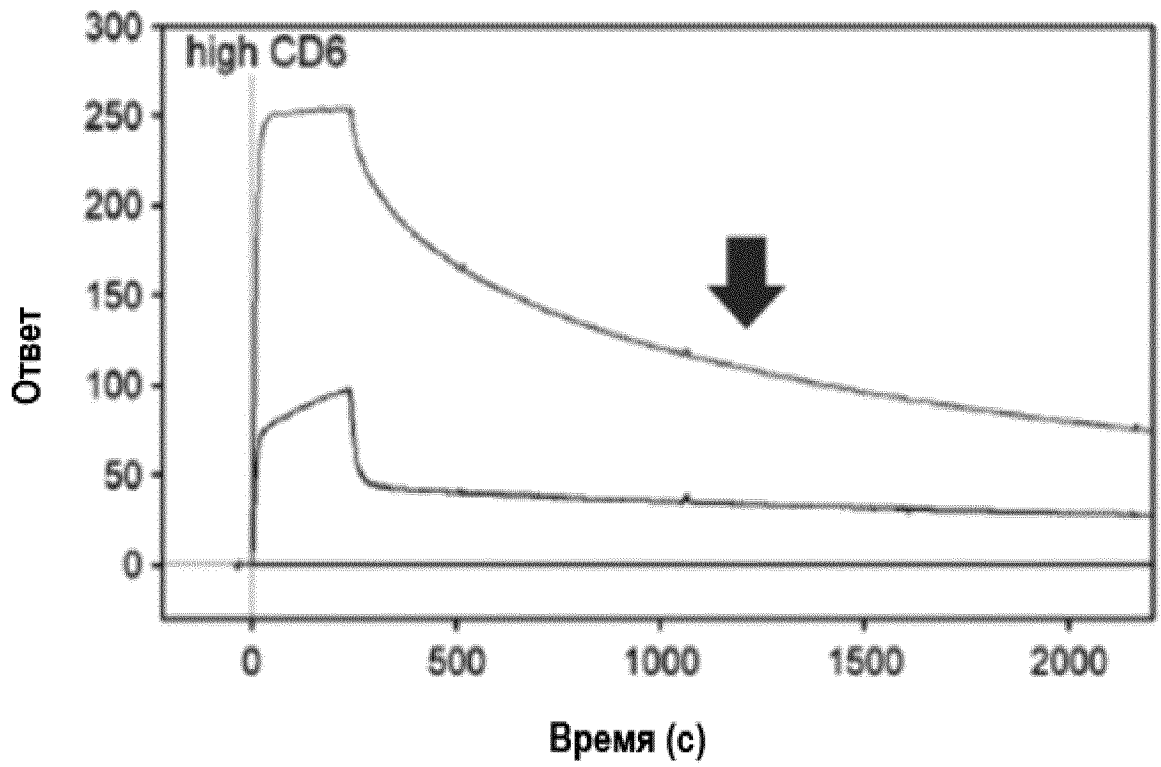
ФИГ. 12Б



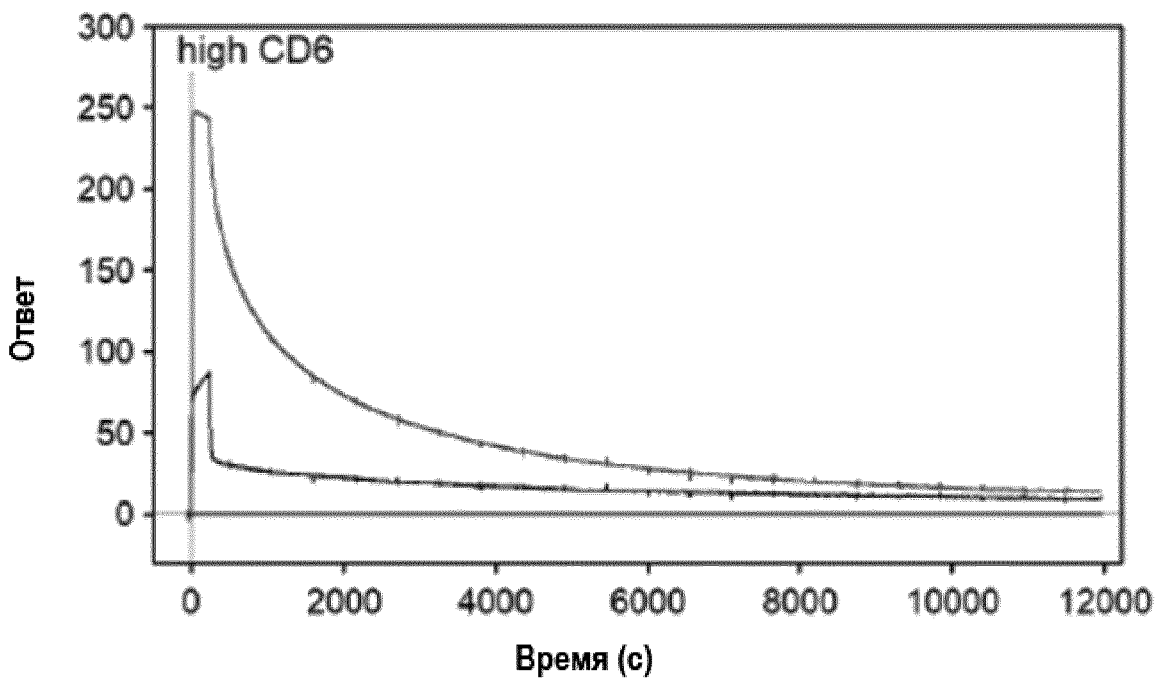
ФИГ. 12В



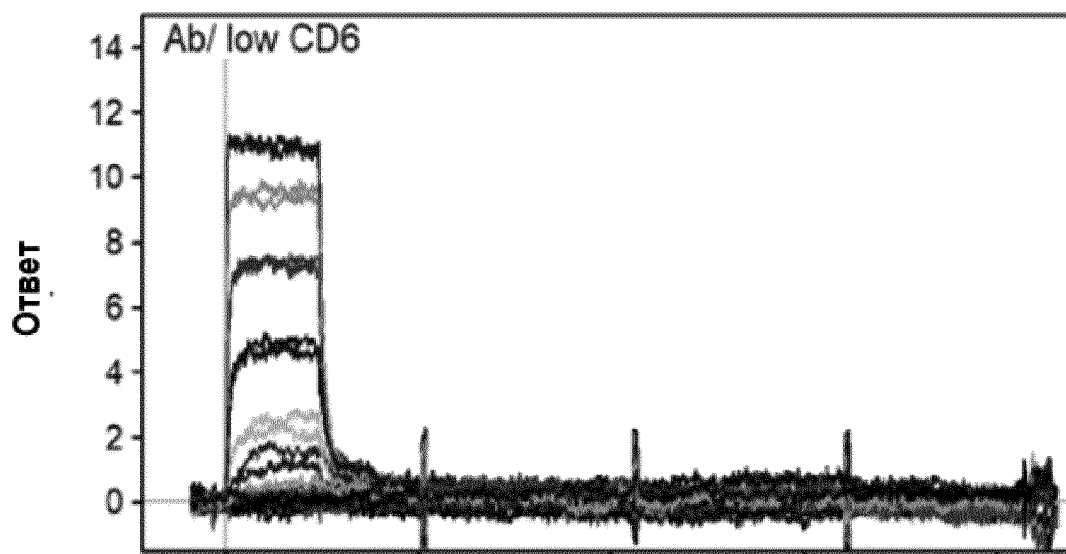
ФИГ. 12Г



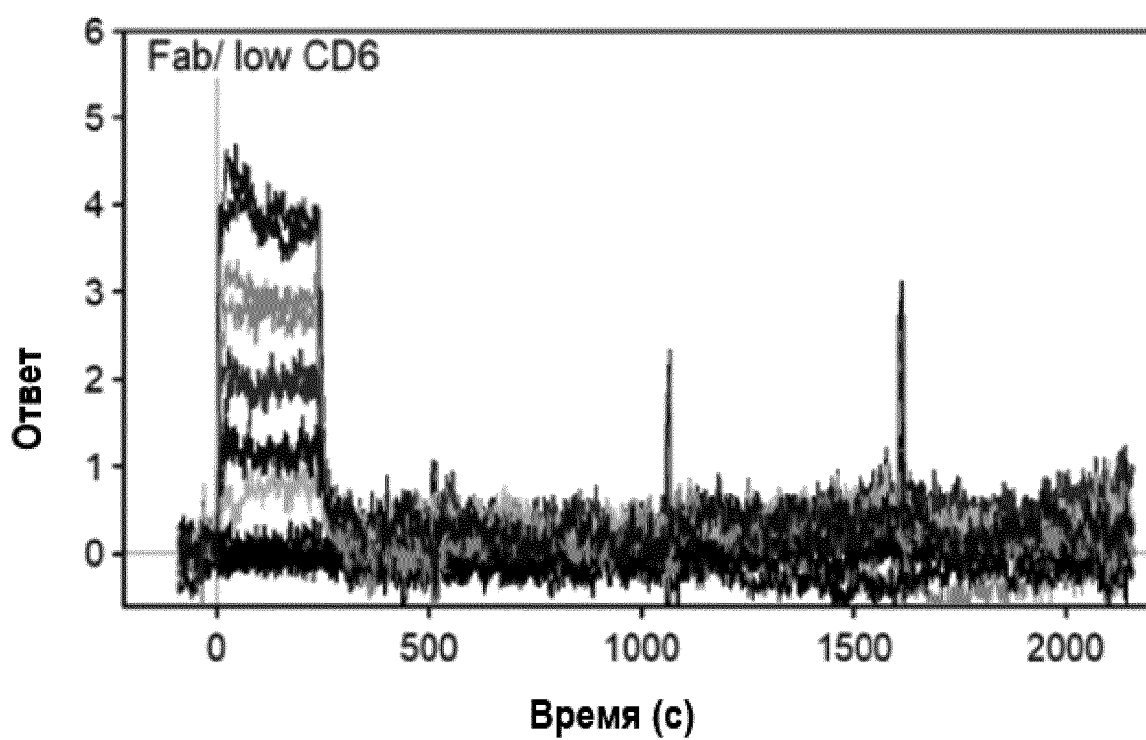
ФИГ. 12Д



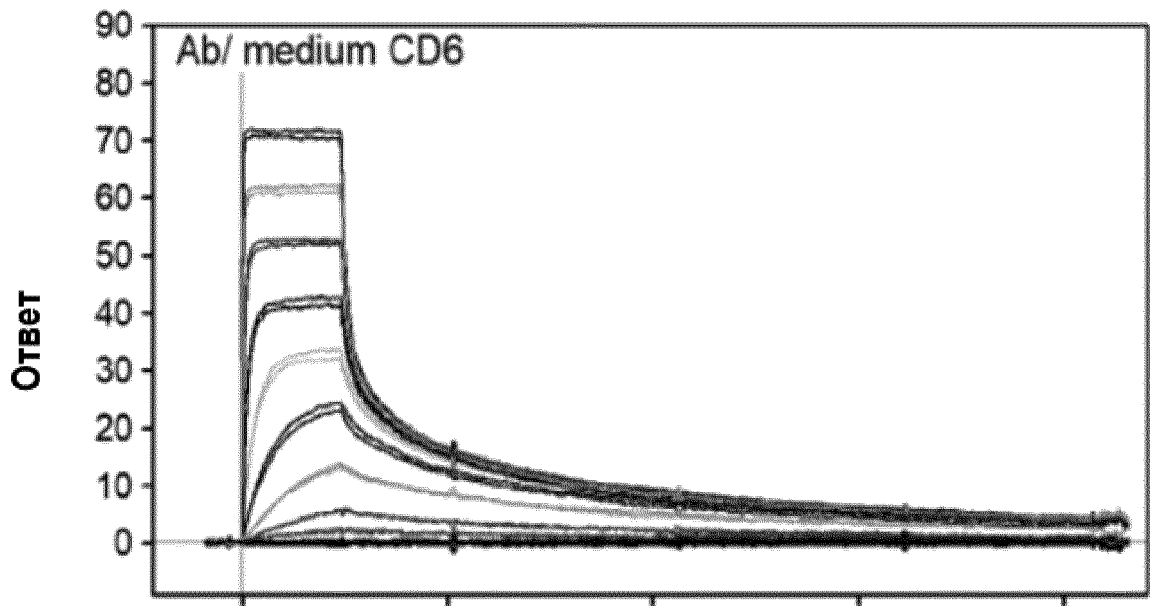
ФИГ. 12Е



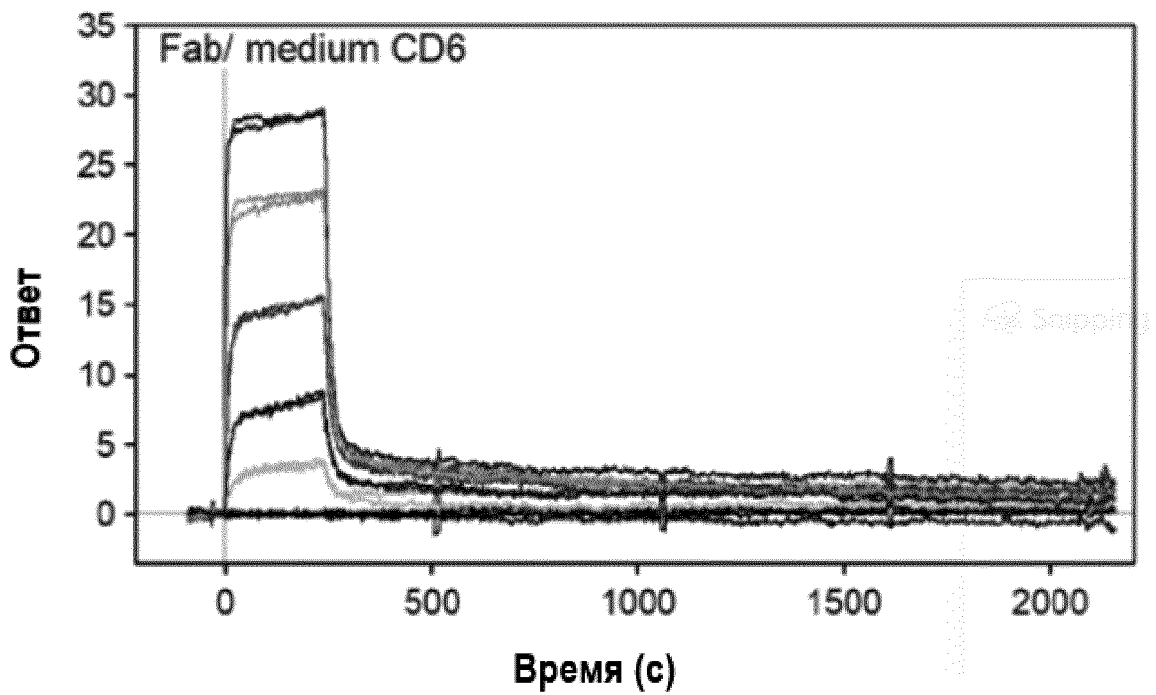
ФИГ. 13А



ФИГ. 13Б

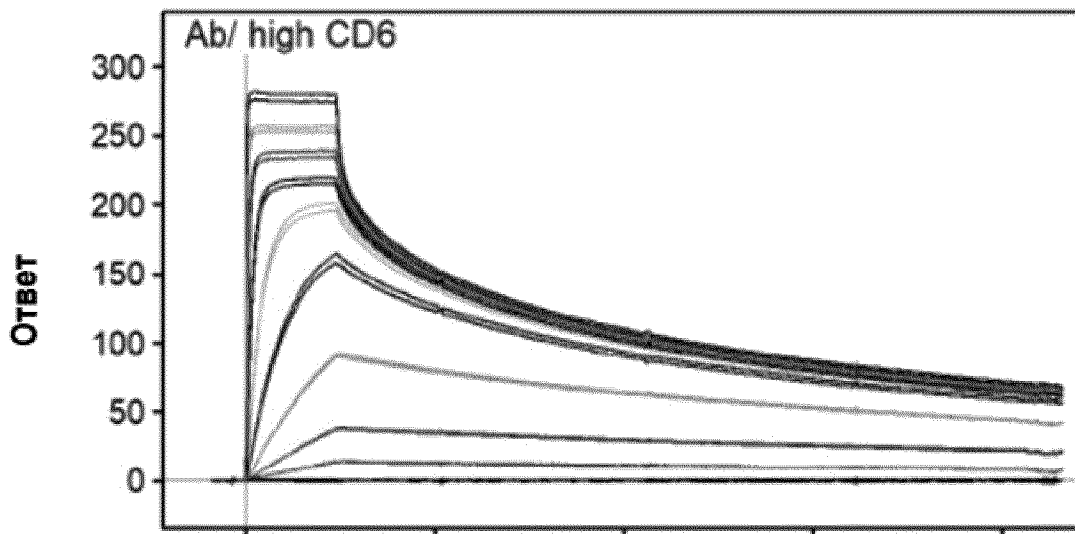


ФИГ. 13В

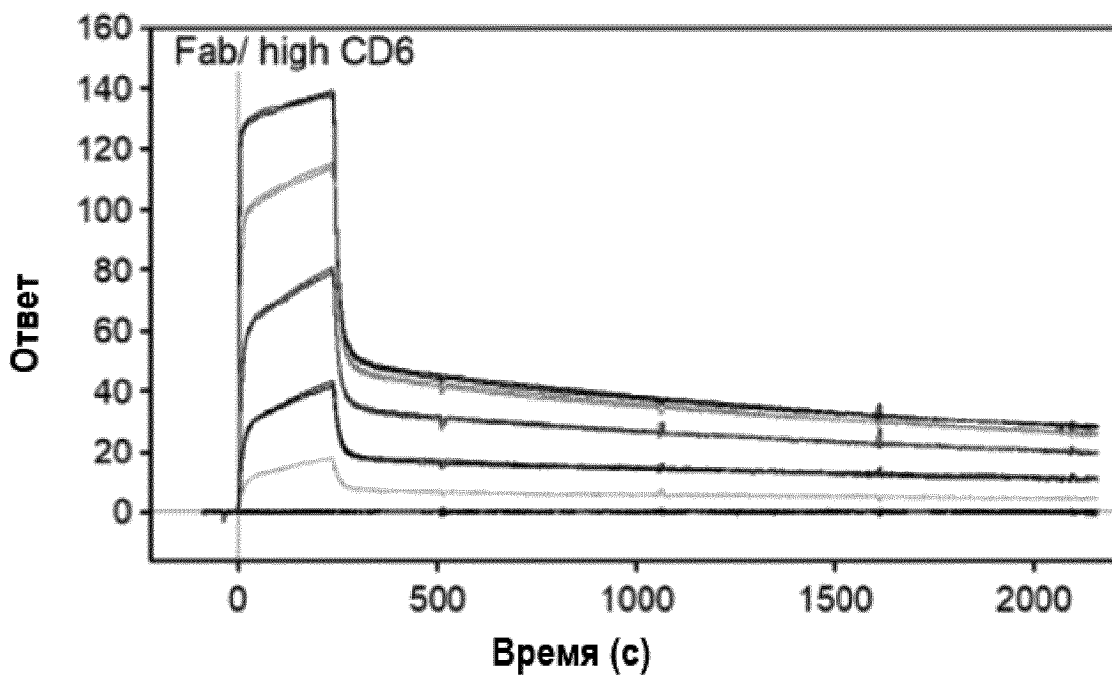


ФИГ. 13Г

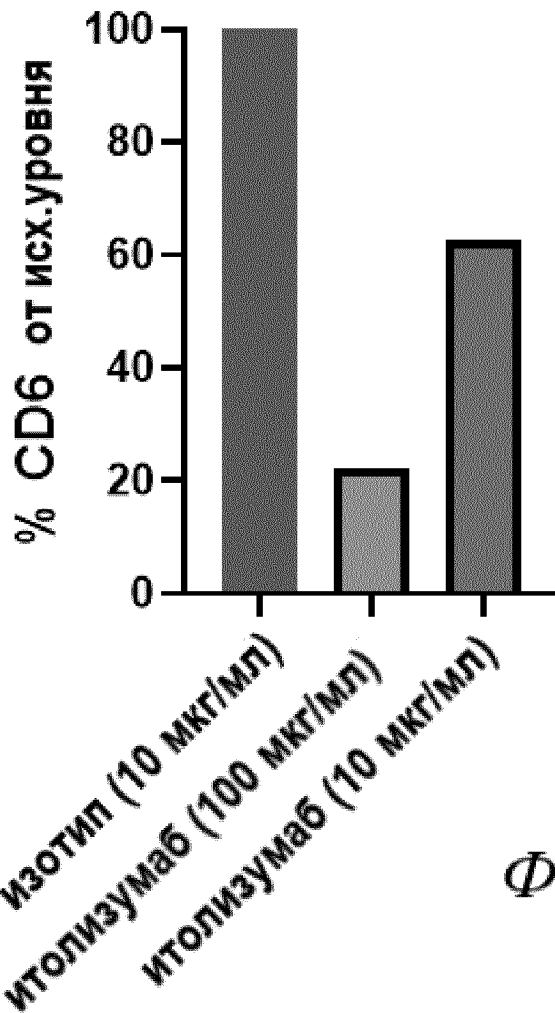


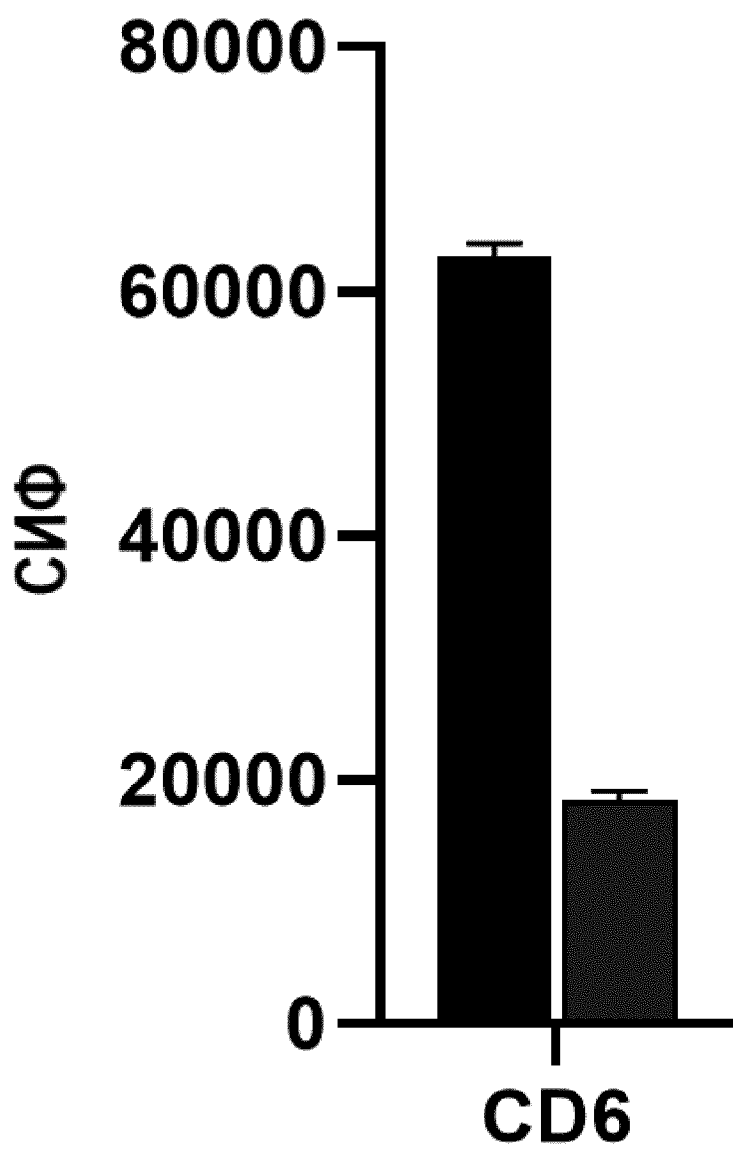


ФИГ. 13Д

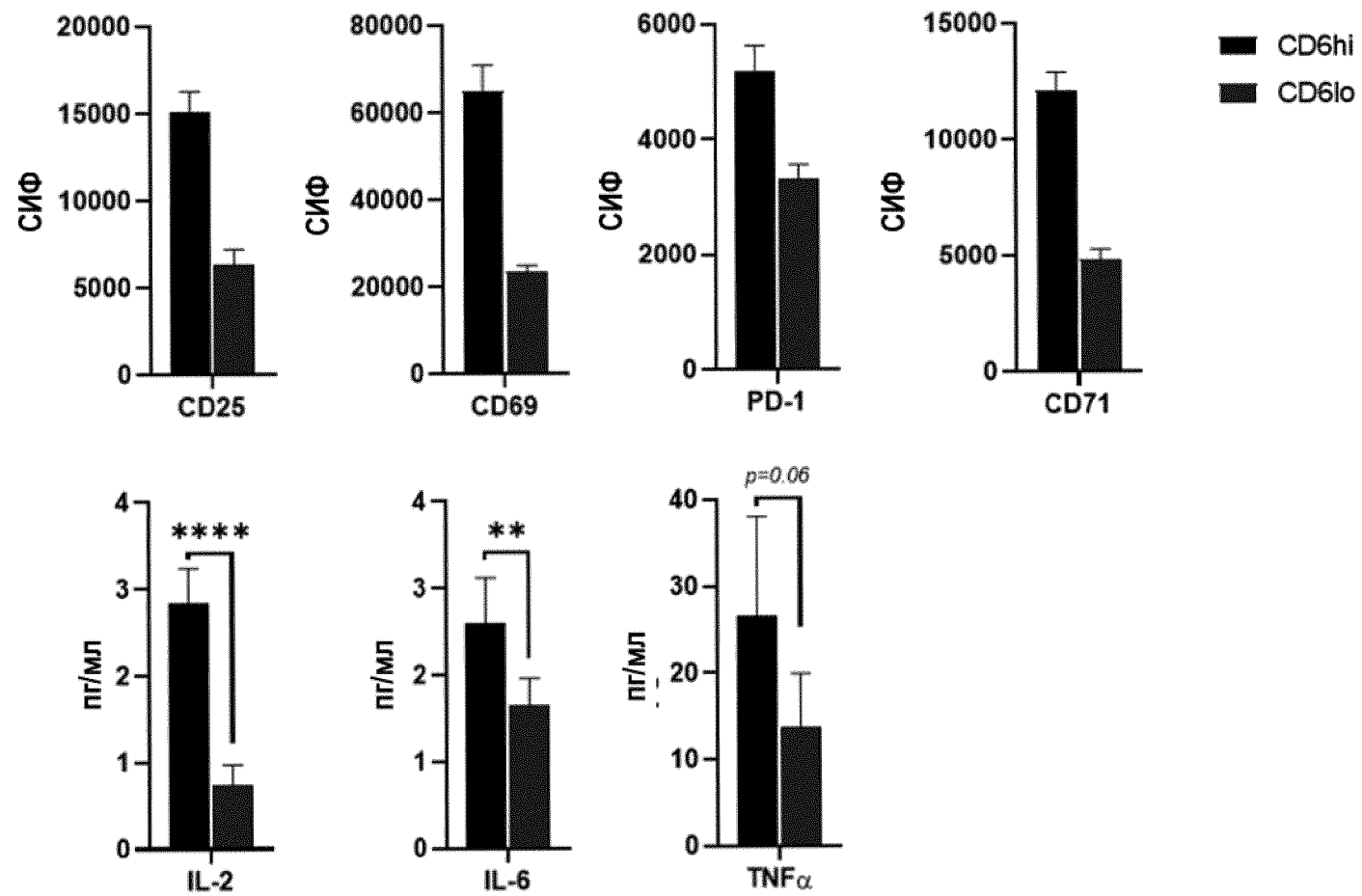


ФИГ. 13Е

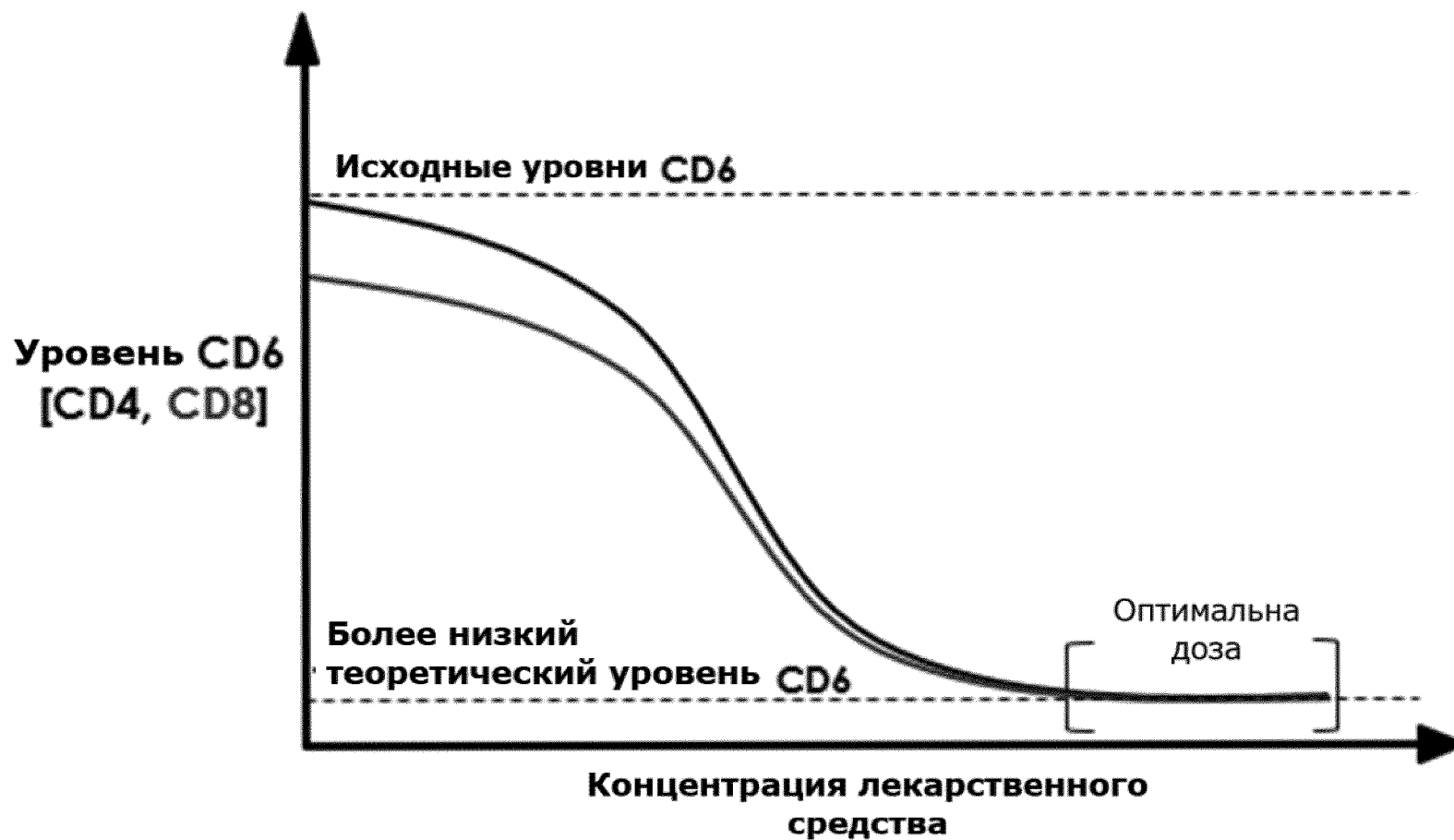
**6 ч. Jurkat NFAT- исходный уровень***ФИГ. 14*



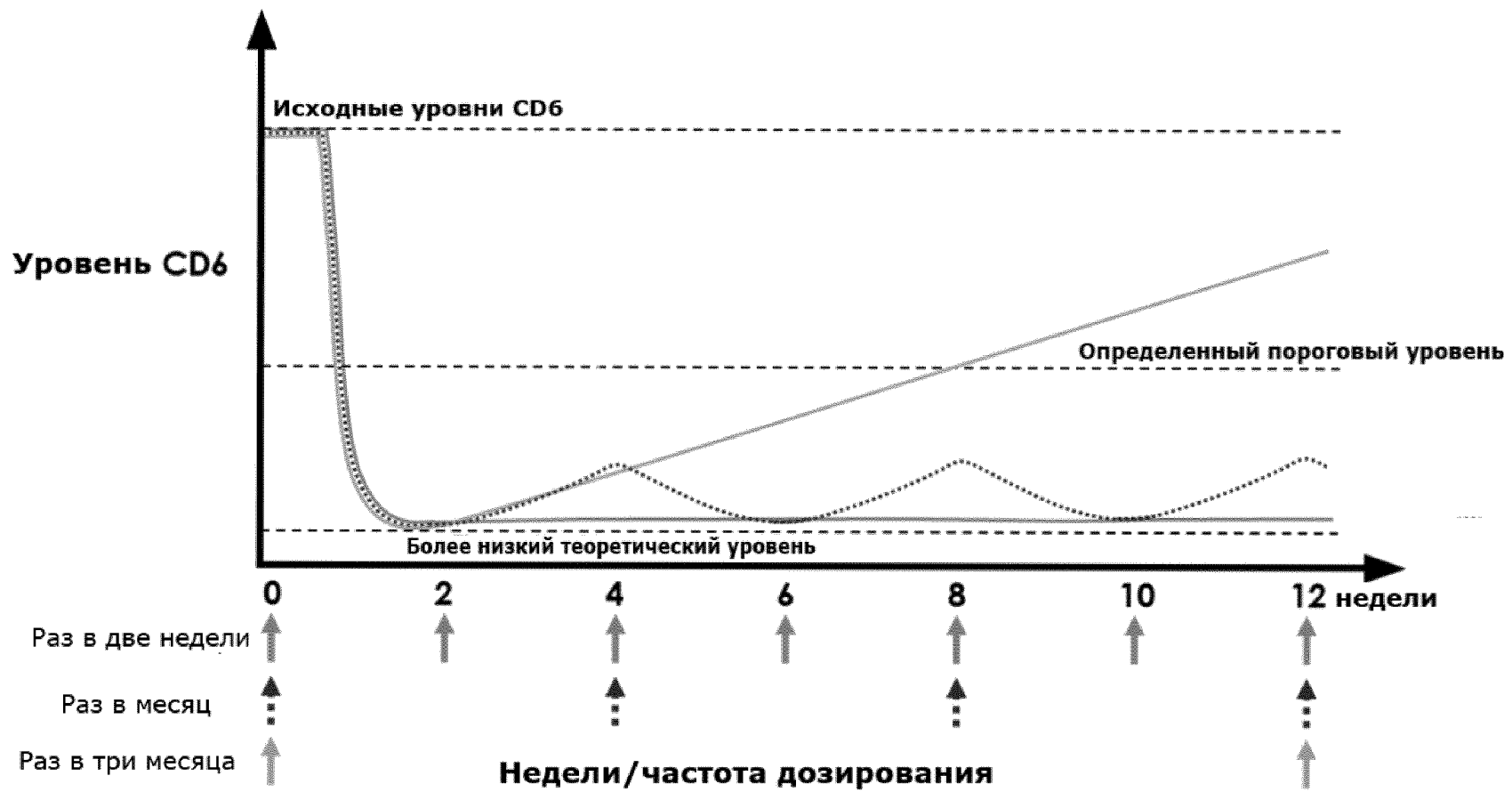
*ФИГ. 15А*



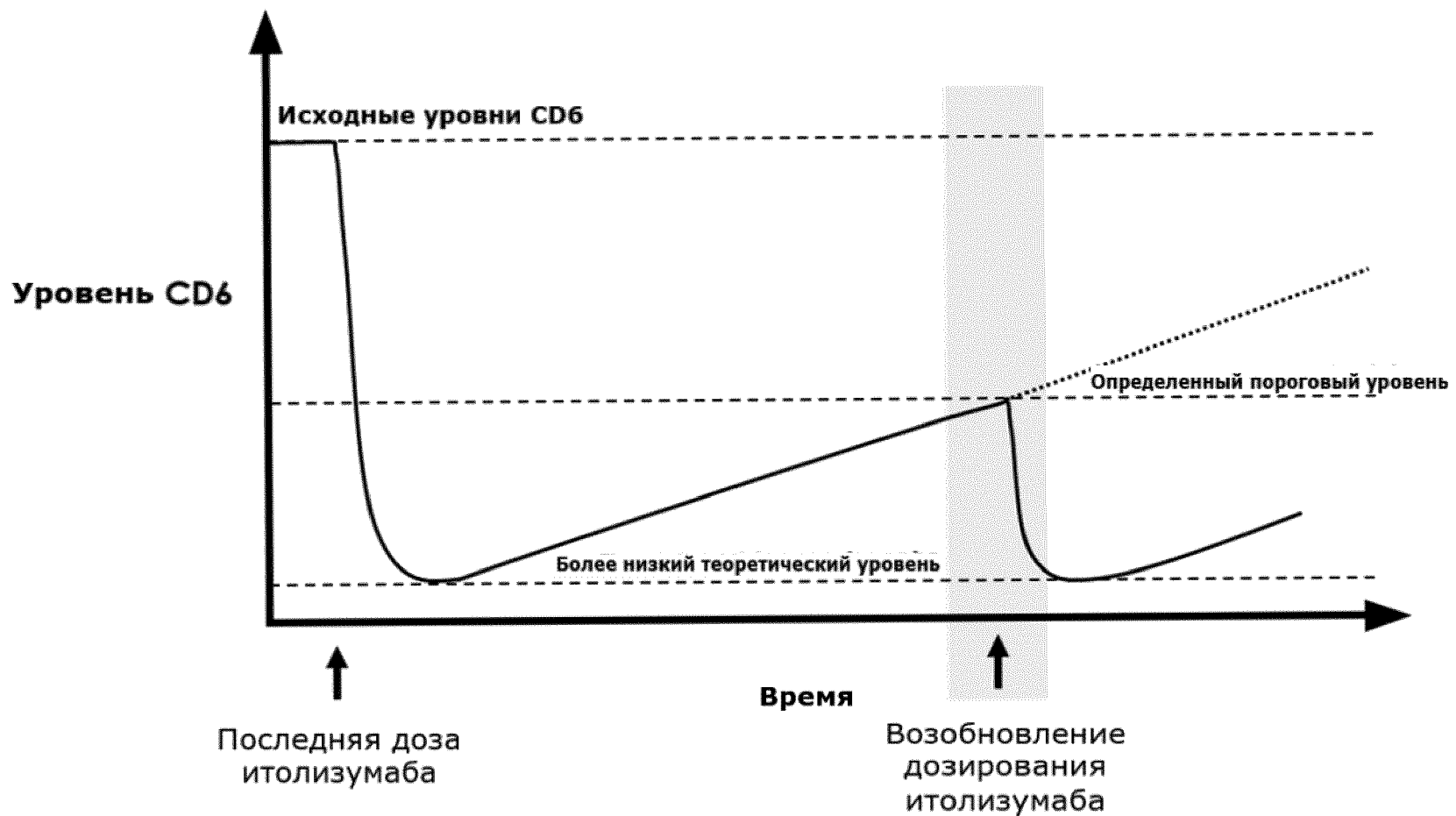
ФИГ. 15Б



ФИГ. 16

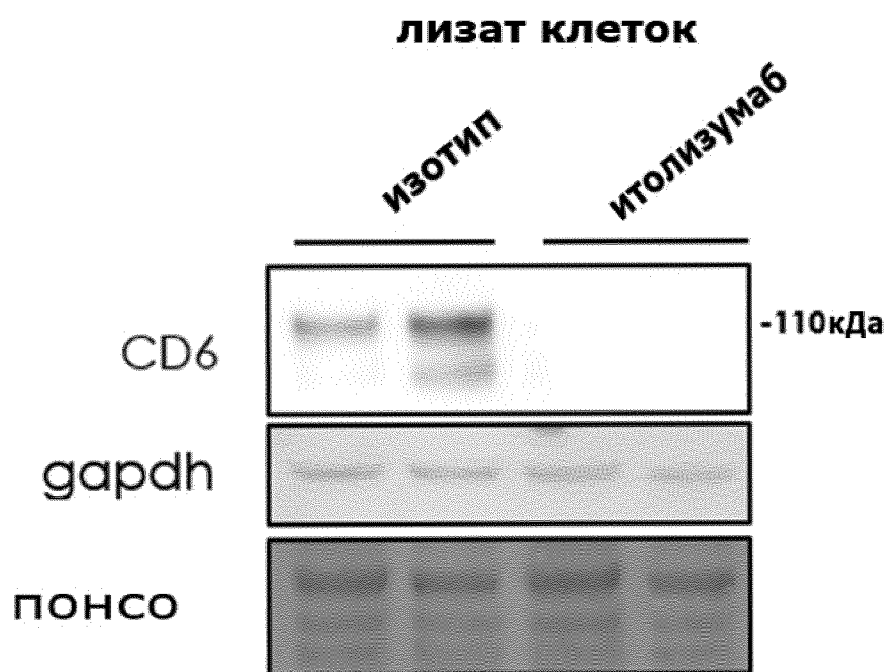


ФИГ. 17А

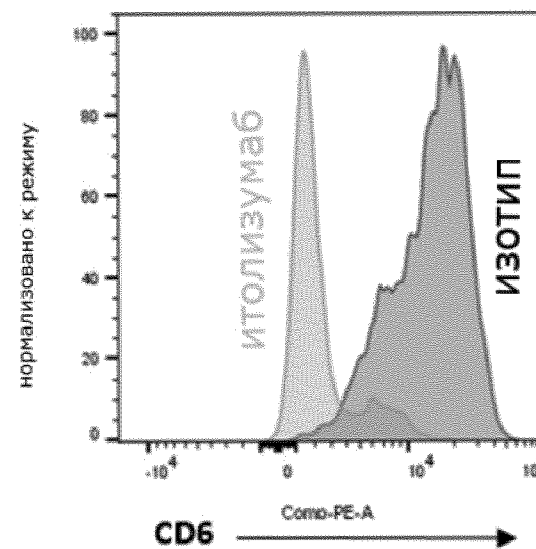


ФИГ. 17Б

## Клеточно-ассоциированный



## CD6 поверхности (анализ проточной цитометрии)

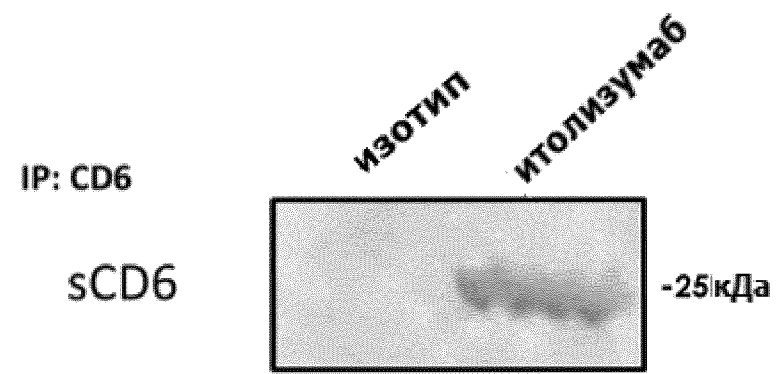


ФИГ. 18А

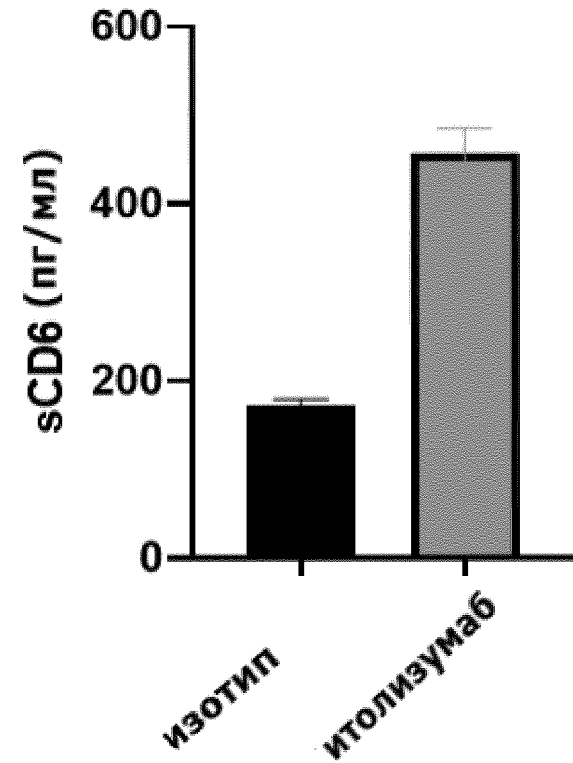


# Клеточный супернатант

IP вестерн-блот

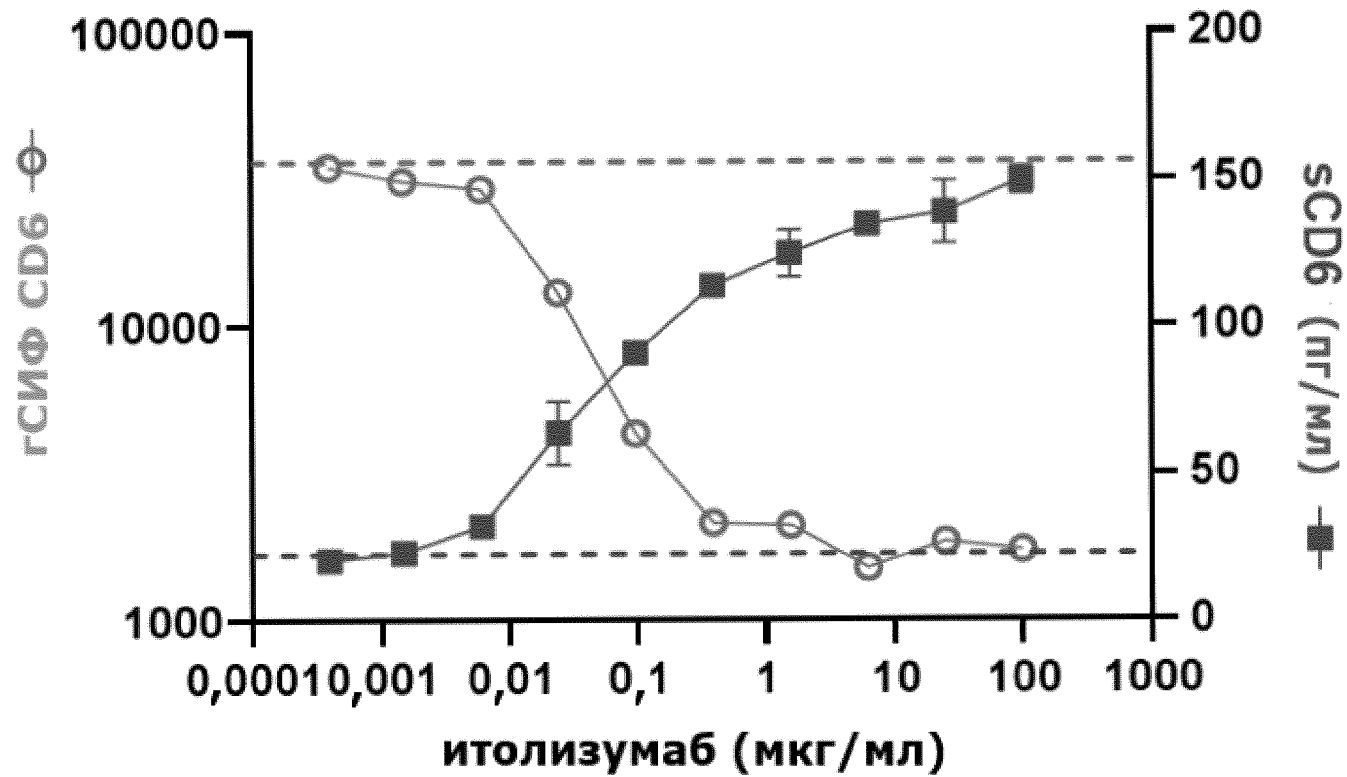


MSD

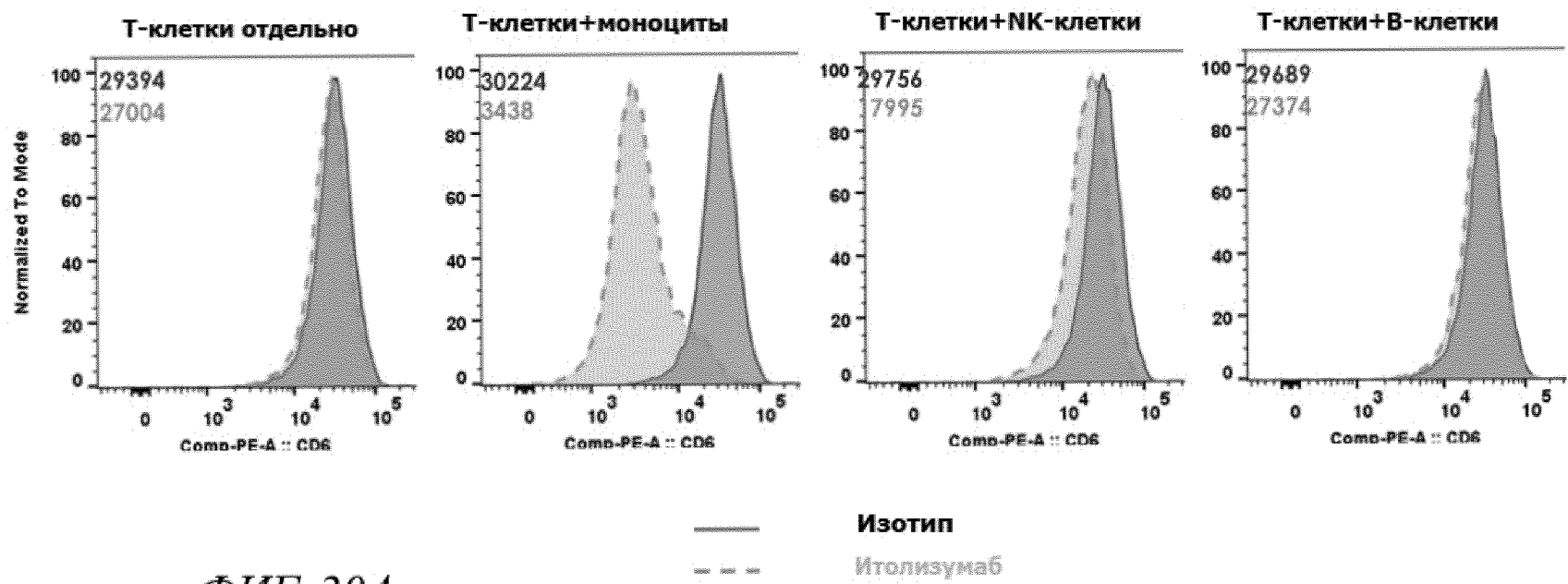


ФИГ. 18Б

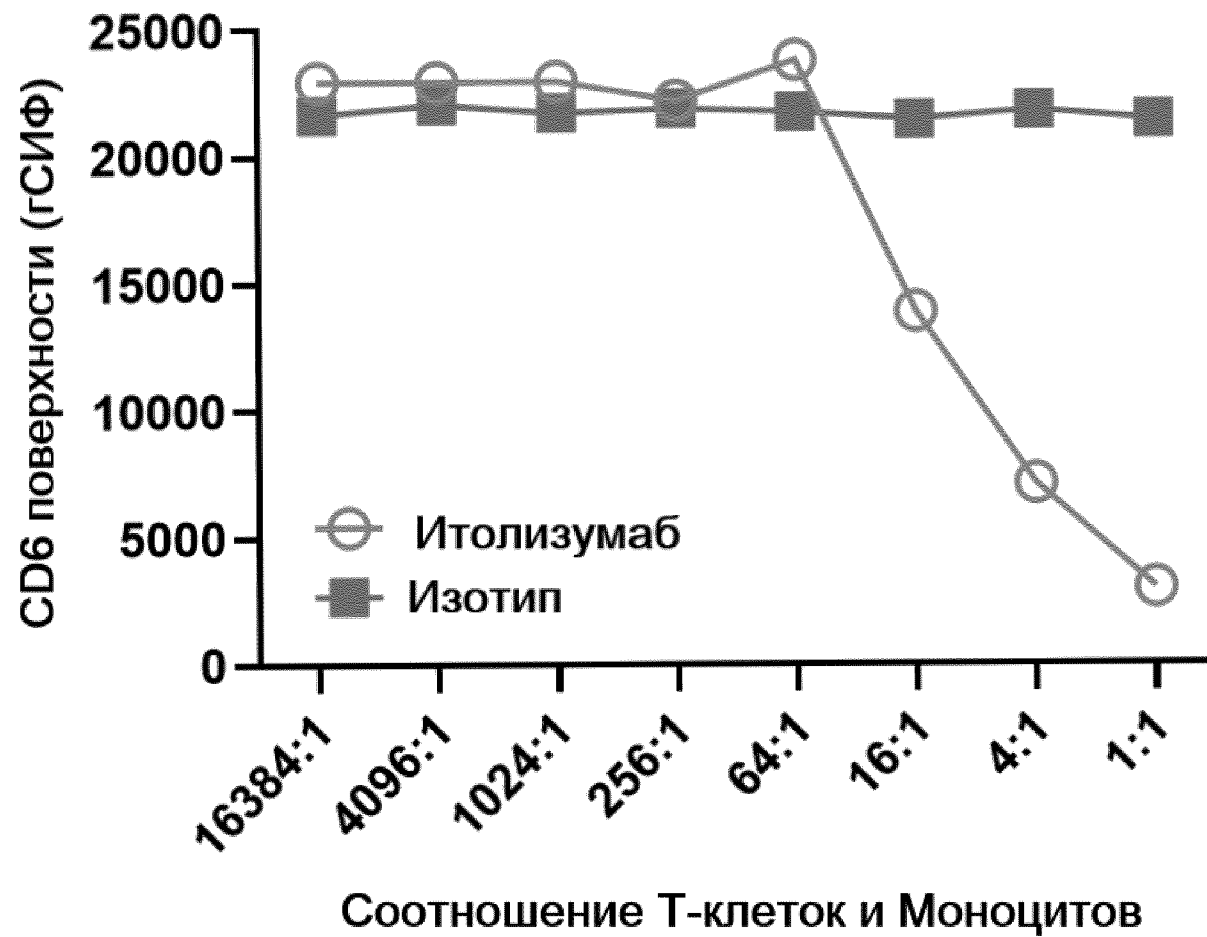
### Повышение загрязнения в растворимом CD6



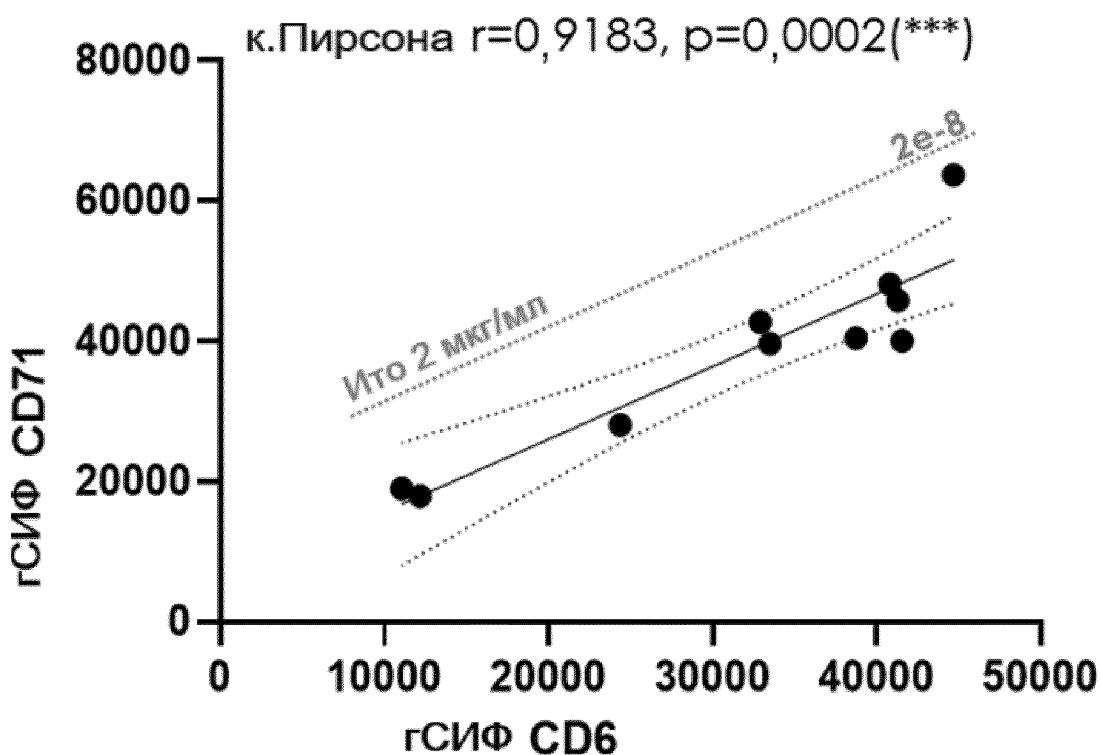
ФИГ. 19



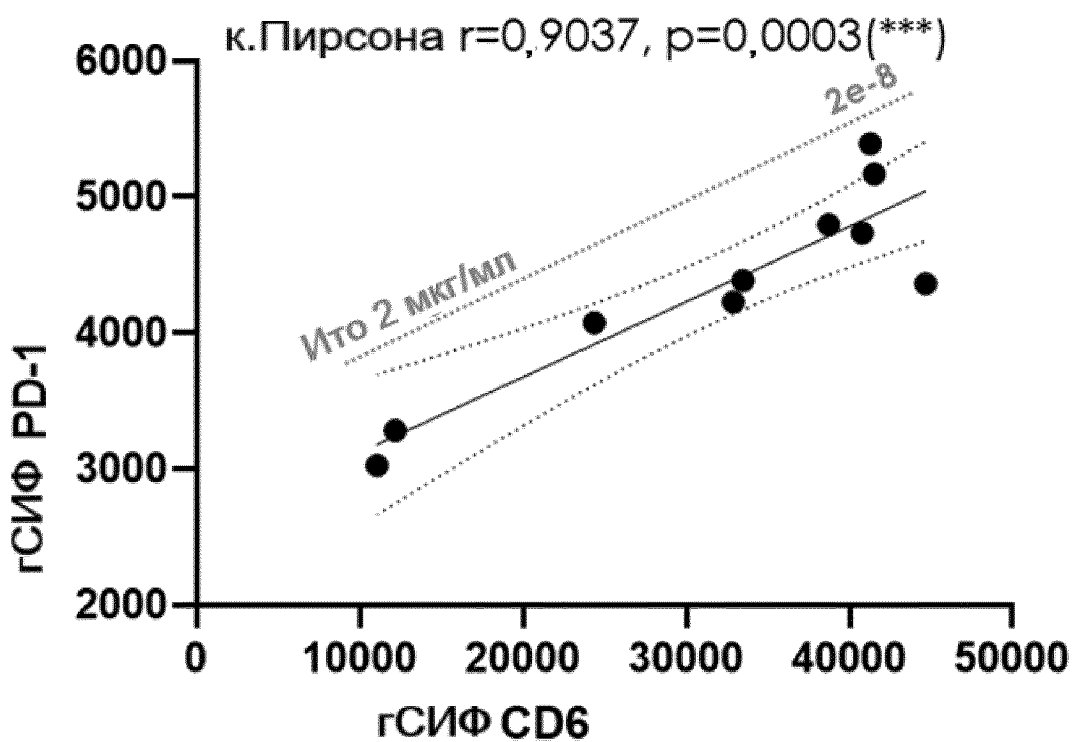
ФИГ. 20А



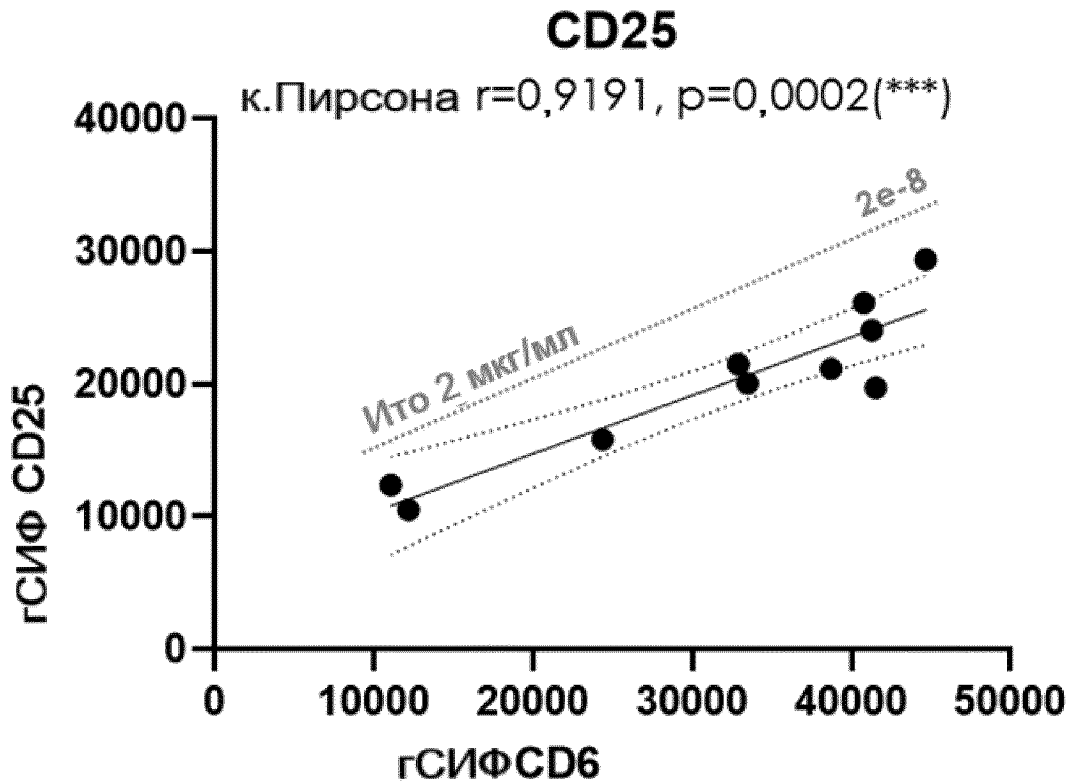
ФИГ. 20Б

**CD71**

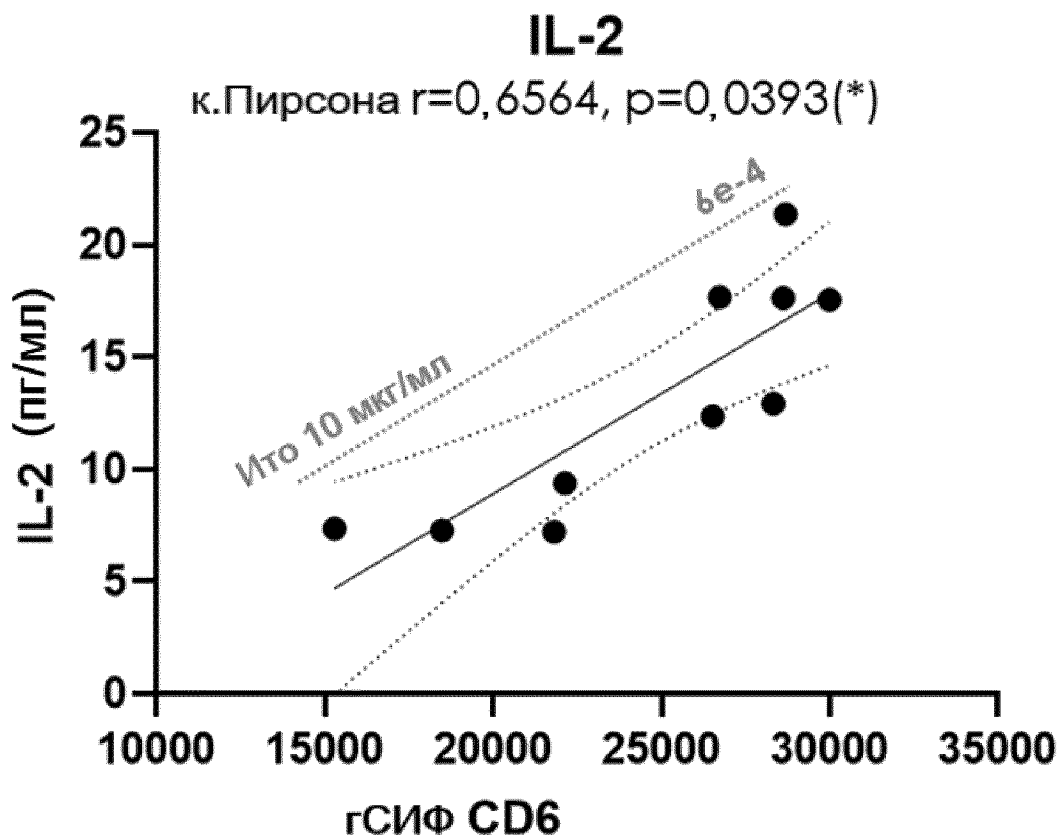
ФИГ. 21А

**PD-1**

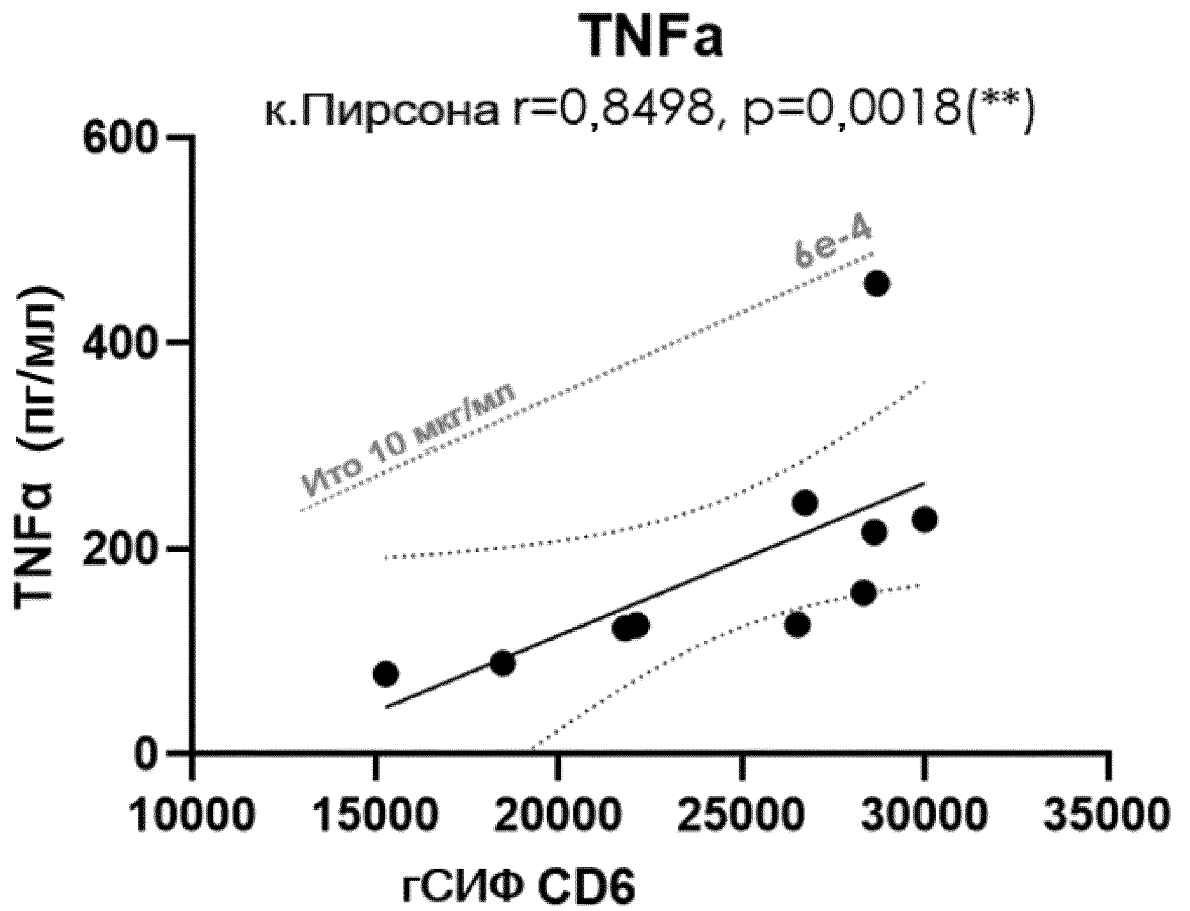
ФИГ. 21Б



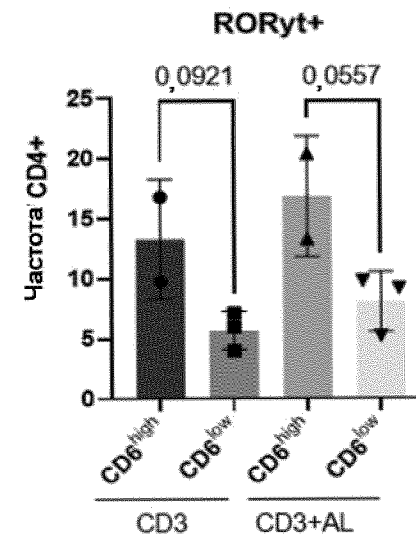
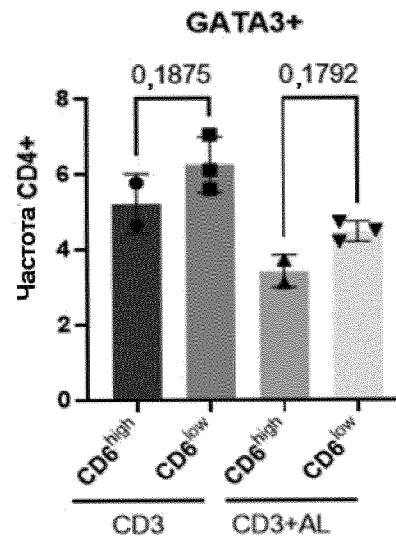
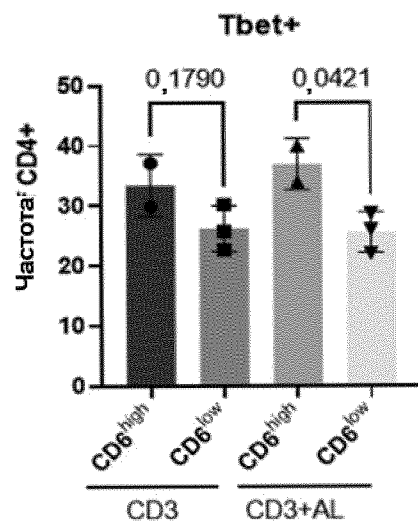
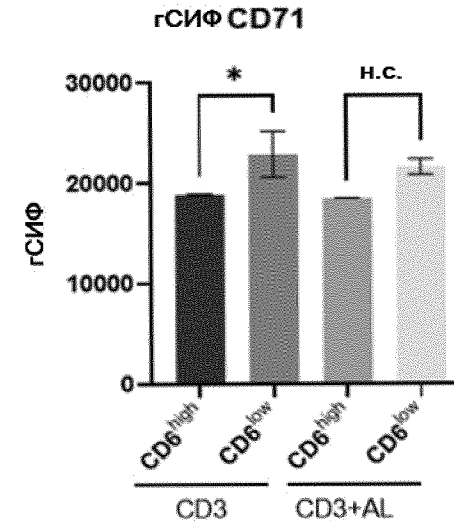
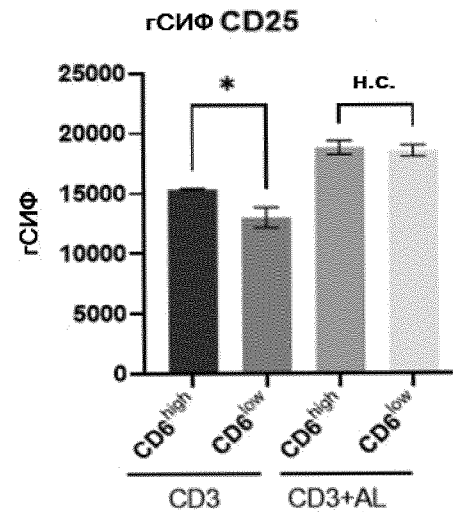
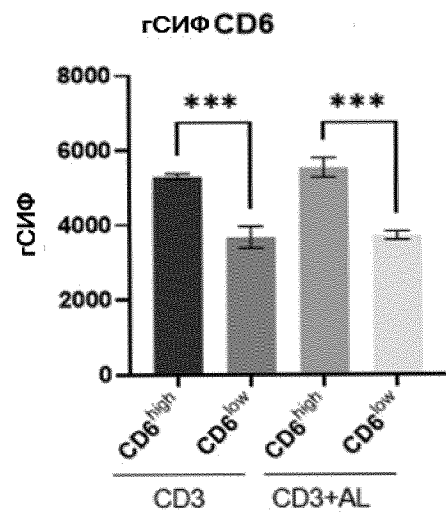
ФИГ. 21В



ФИГ. 21 Г

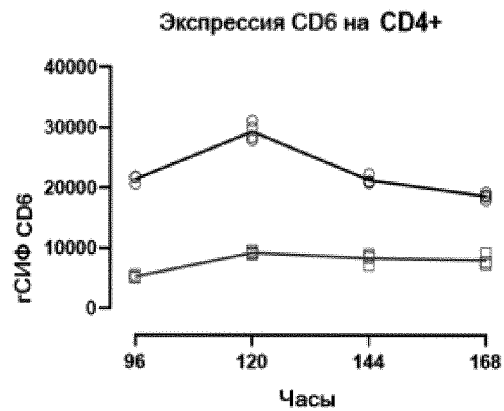


ФИГ. 21Д

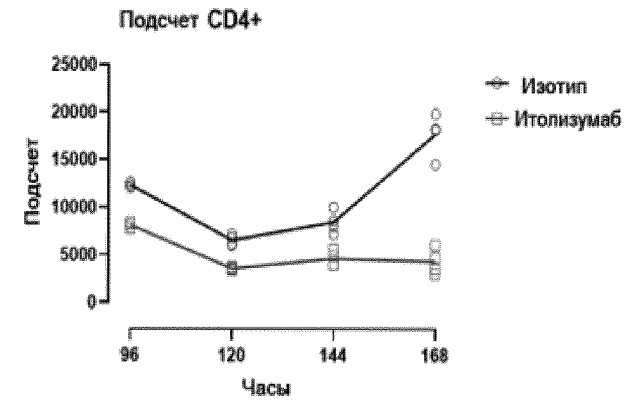


ФИГ. 22

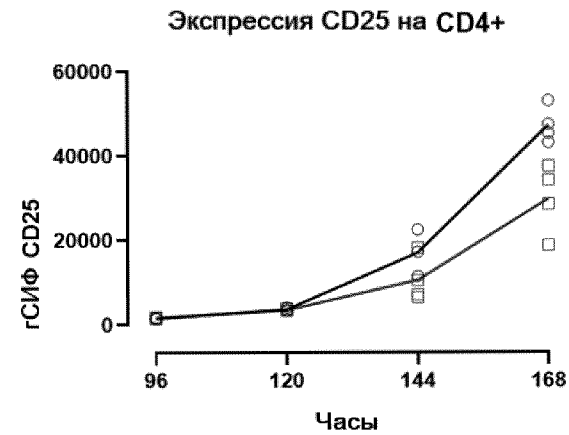




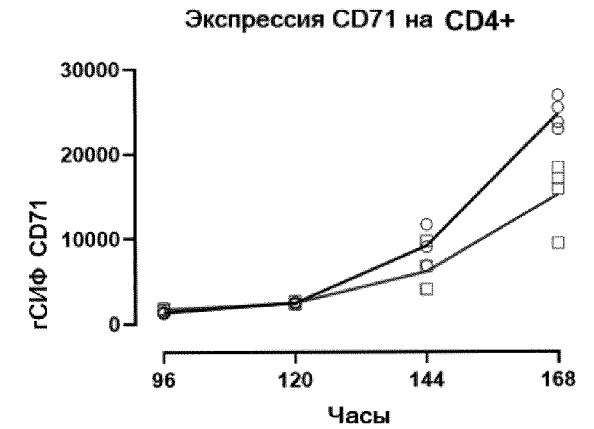
ФИГ. 23А



ФИГ. 23Б

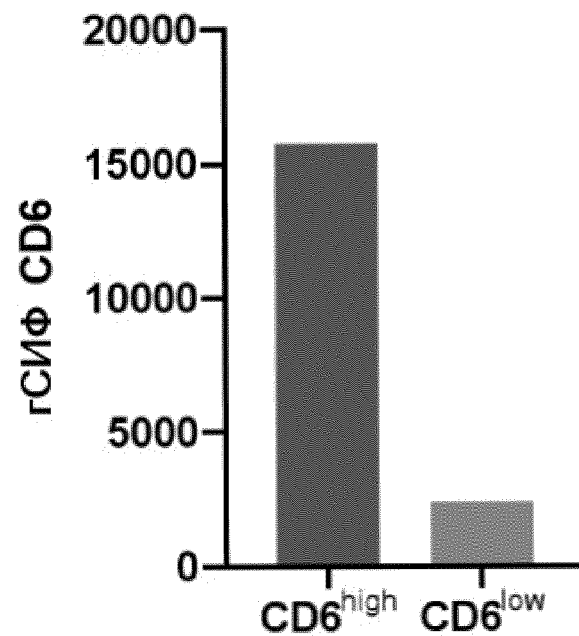
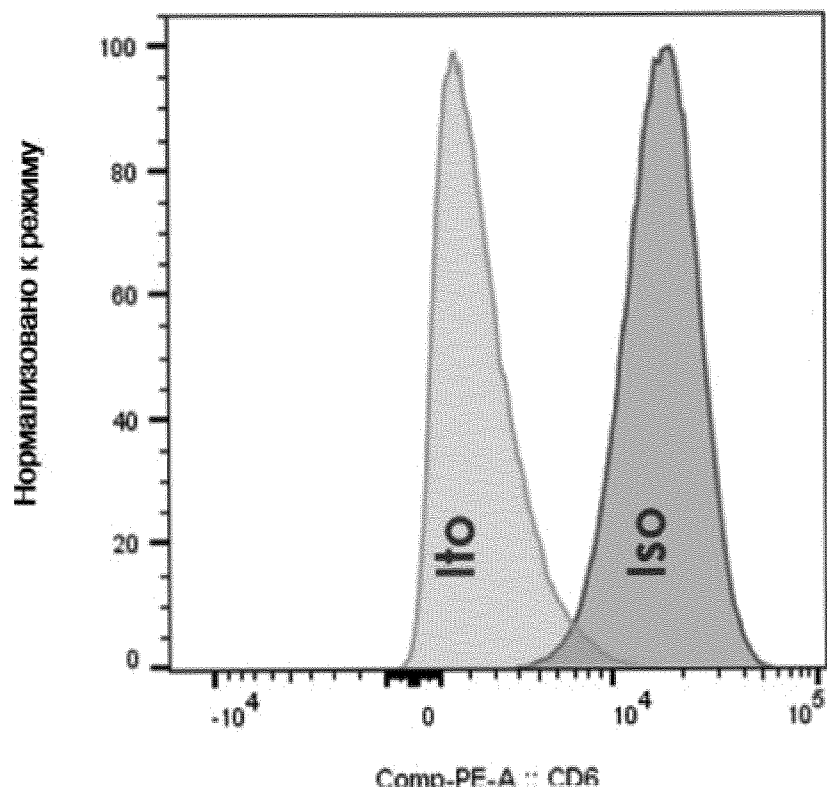


ФИГ. 23В



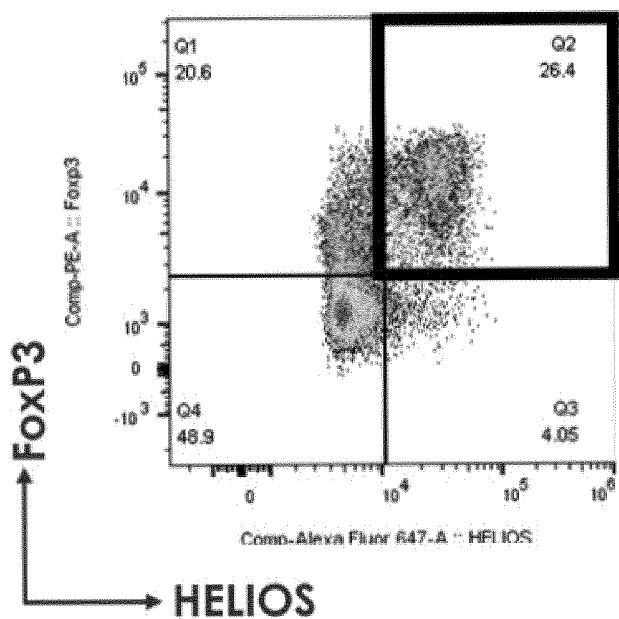
ФИГ. 23Г

### Выделенные наивные Т-клетки CD4+

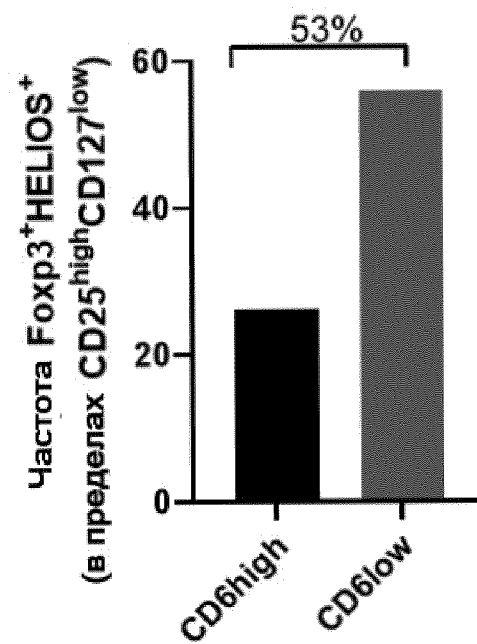
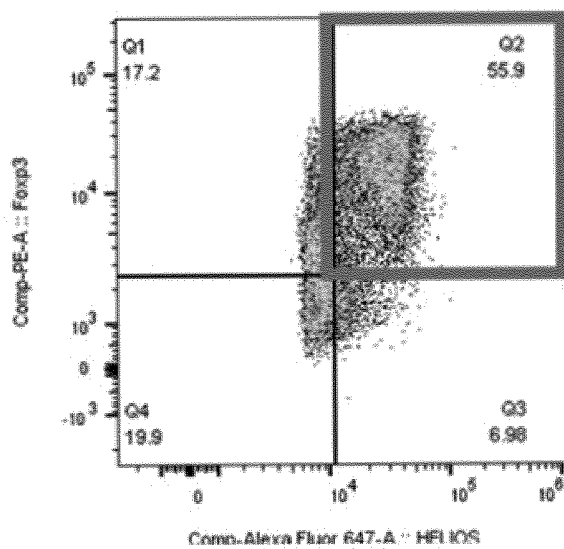


ФИГ. 24А

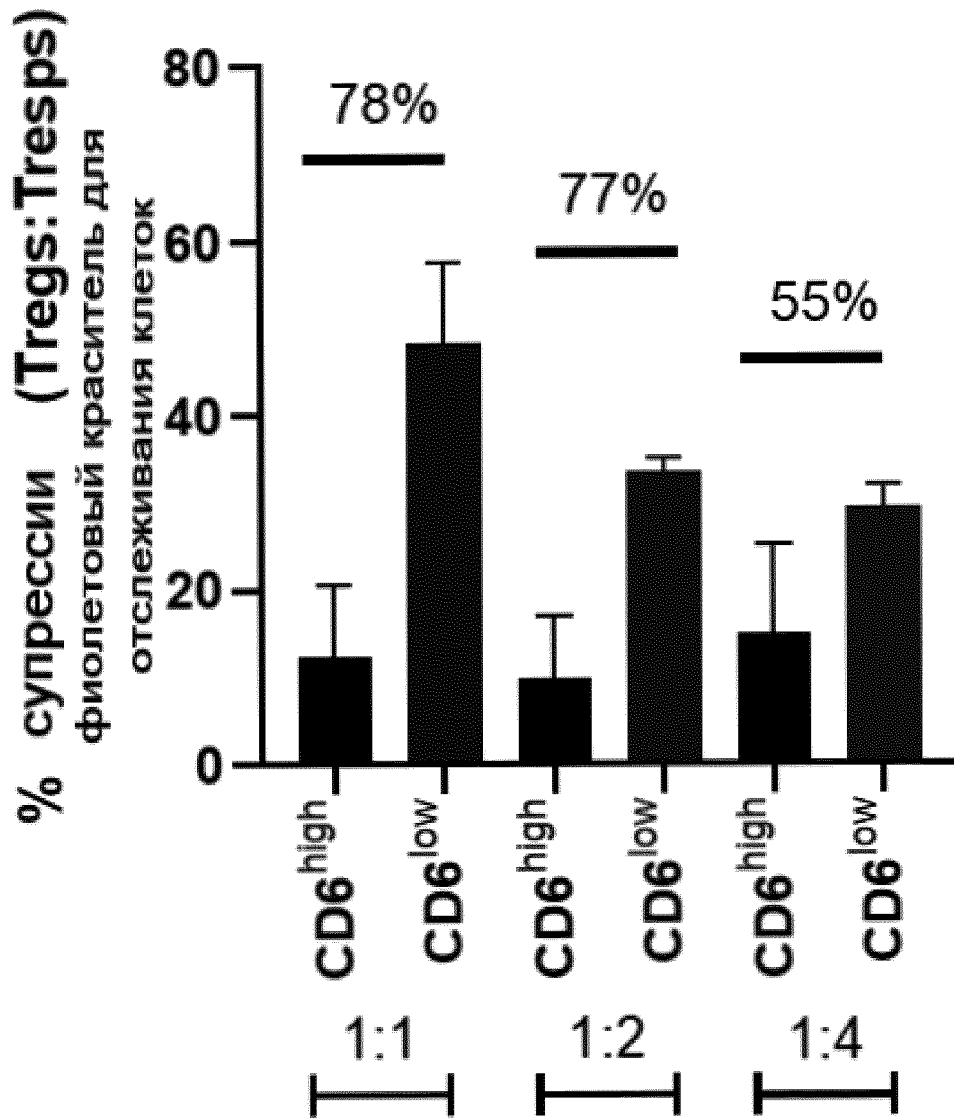
Трег, полученные из  
CD6<sup>high</sup>



Трег, полученные из  
CD6<sup>low</sup>



ФИГ. 24Б

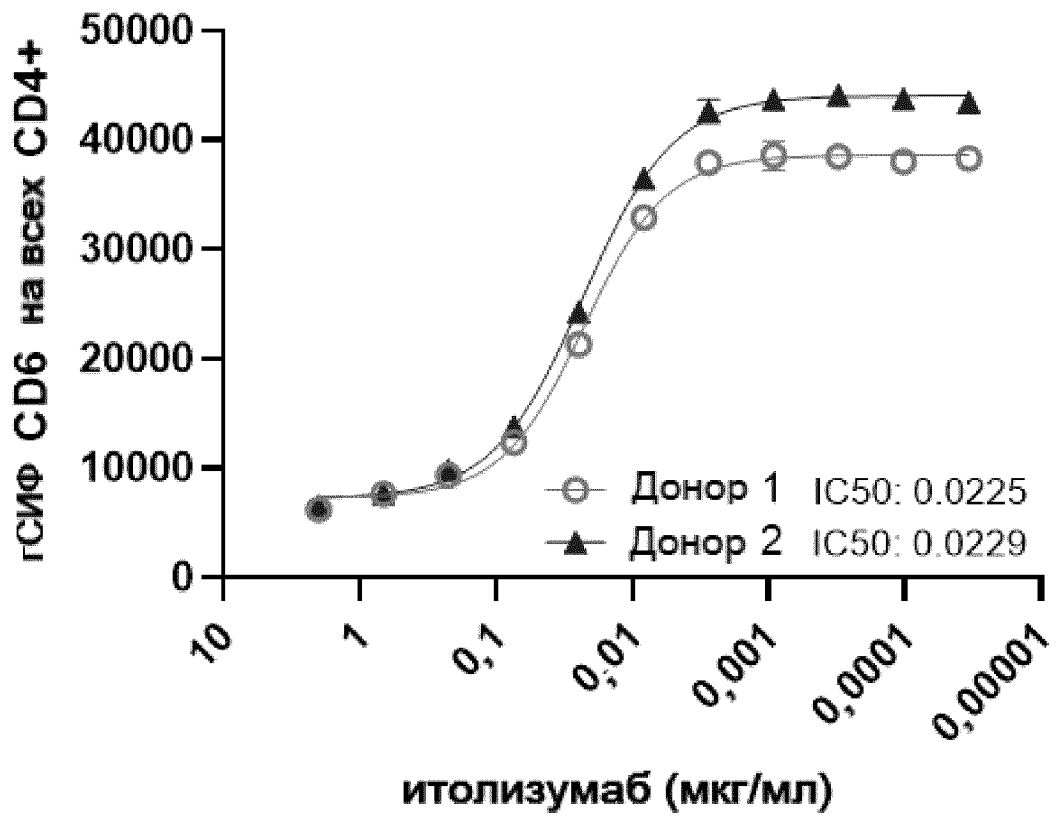


1:1; 100k T<sub>regs</sub> + 100k T<sub>респондеры</sub>

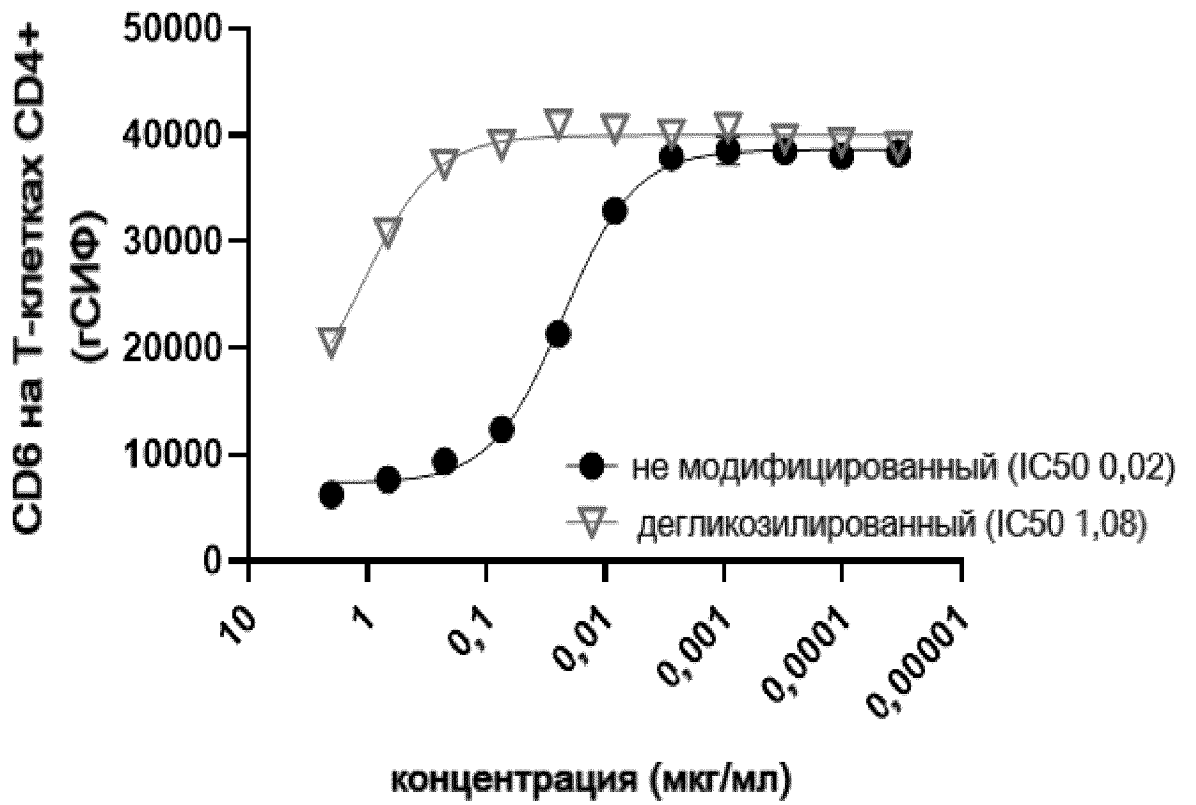
1:2; 50k T<sub>regs</sub> + 100k T<sub>респондеры</sub>

1:4; 25k T<sub>regs</sub> + 100k T<sub>респондеры</sub>

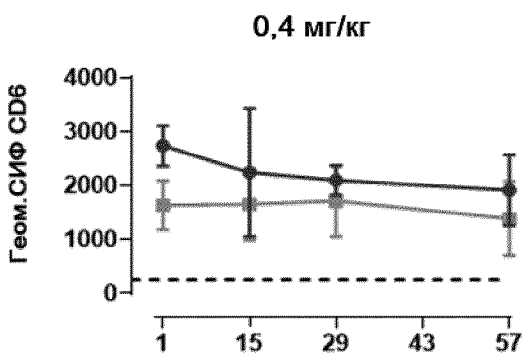
*ФИГ. 25*



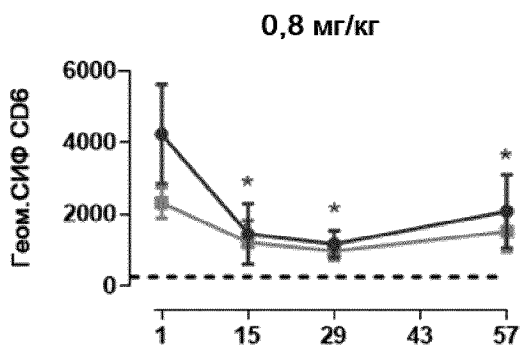
ФИГ. 26А



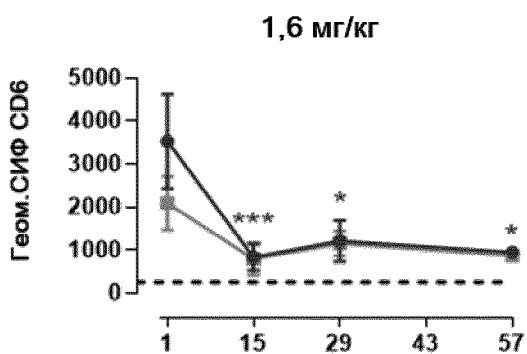
ФИГ. 26Б



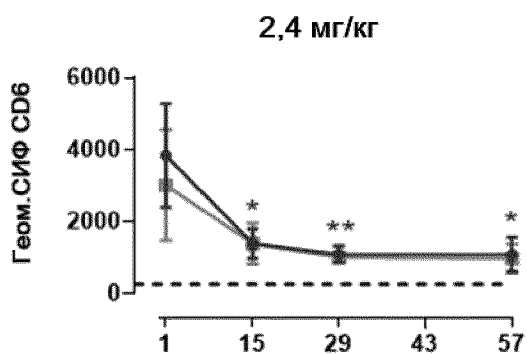
ФИГ. 27А



ФИГ. 27Б

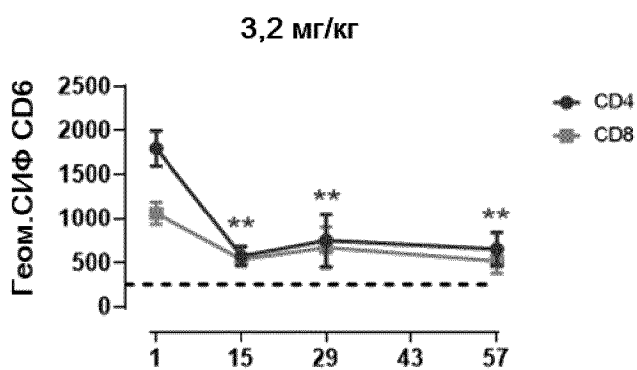


ФИГ. 27В



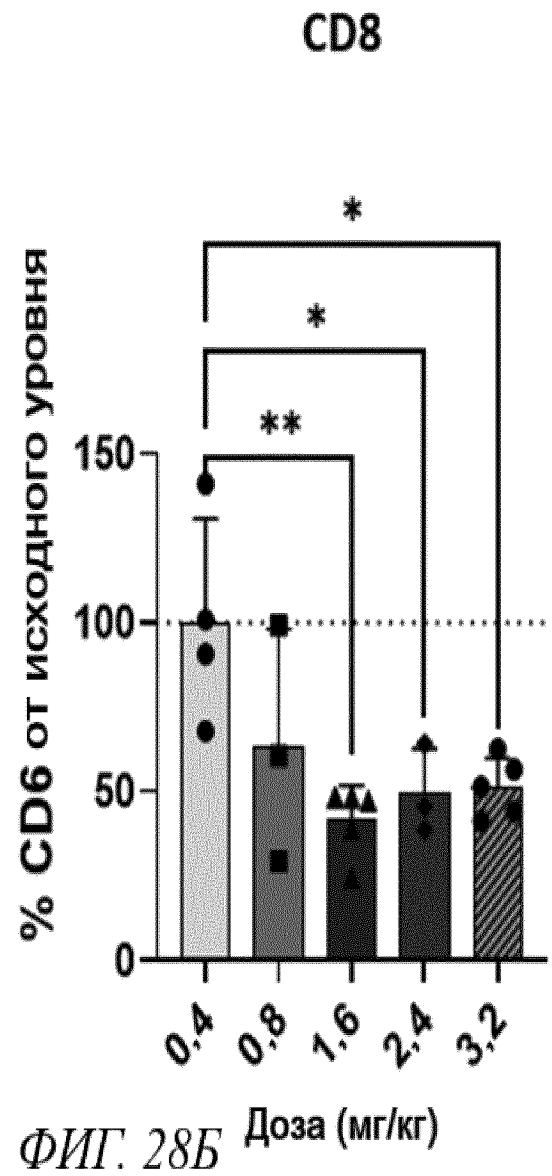
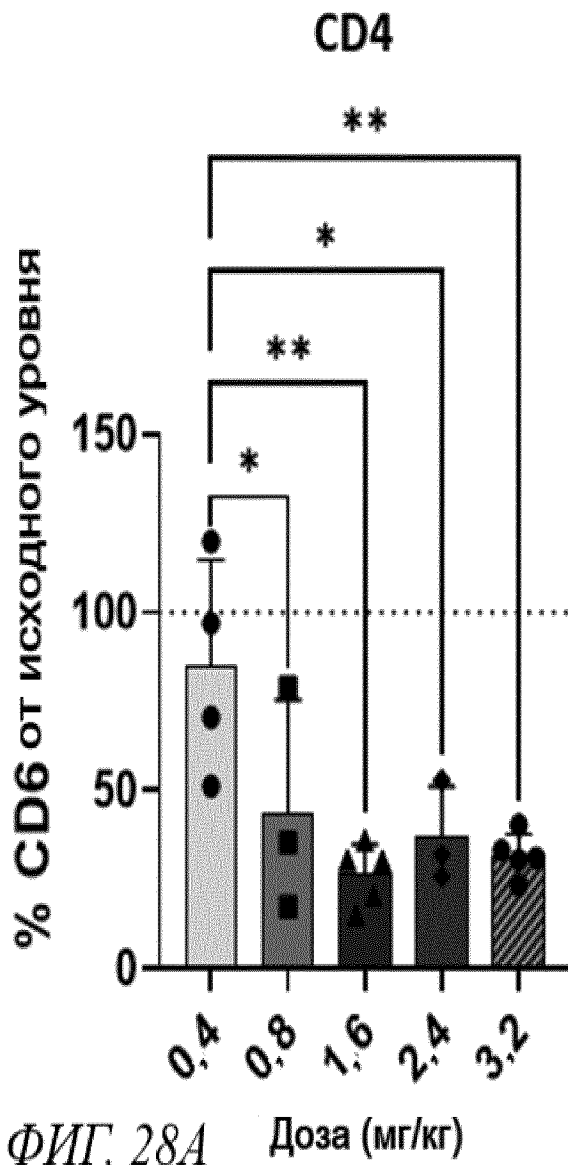
День исследования

ФИГ. 27Г

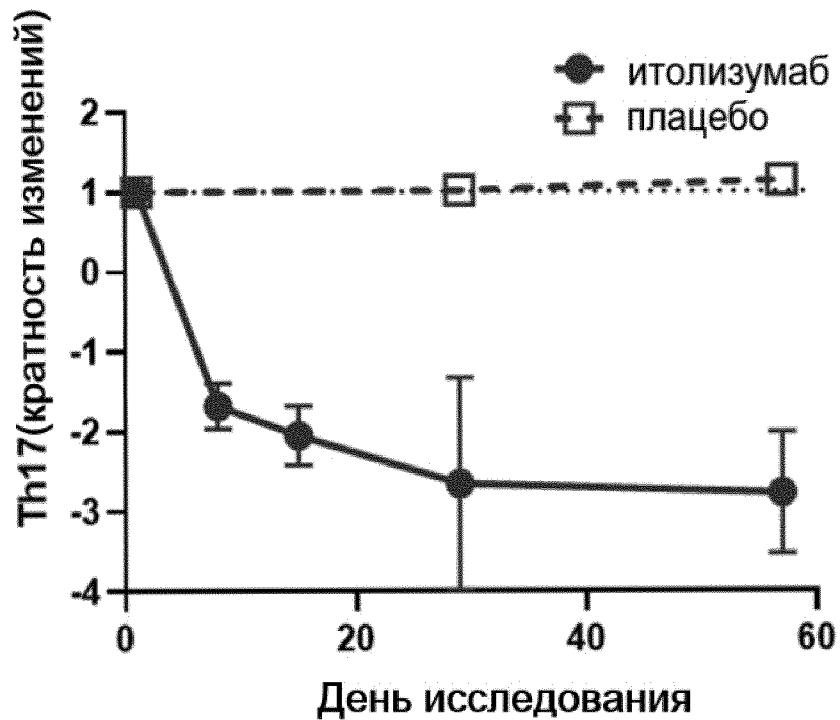


День исследования

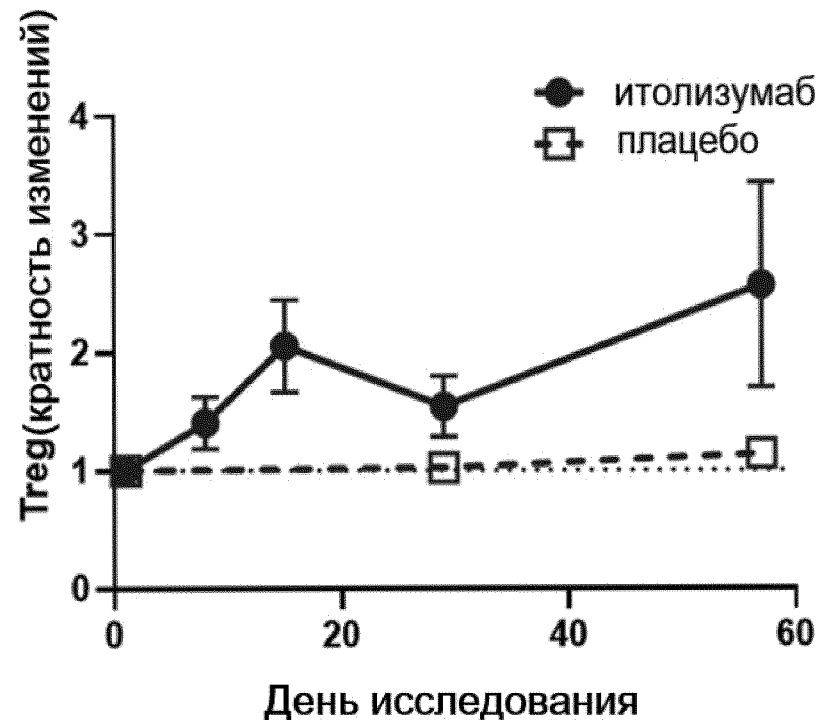
ФИГ. 27Д







ФИГ. 29А



ФИГ. 29Б