(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 036335 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.28

(21) Номер заявки
201791706

(22) Дата подачи заявки
2016.01.26

(51) Int. Cl. ***C07K 16/28*** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) СВЯЗЫВАЮЩИЕ ICOS БЕЛКИ

(31) **62/108,605; 62/192,331; 62/247,355**
(32) **2015.01.28; 2015.07.14; 2015.10.28**
(33) **US**
(43) **2018.04.30**
(86) **PCT/IB2016/050383**
(87) **WO 2016/120789 2016.08.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГЛЭКСОСМИТКЛАЙН ИНТЕЛЛЕКЧУАЛ ПРОПЕРТИ ДИВЕЛОПМЕНТ ЛИМИТЕД (GB); ЭНСЭРМ (ЭНСТИТЮ НАСЬОНАЛЬ ДЕ ЛЯ САНТЕ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ МЕДИКАЛЬ); ЭНСТИТЮ ЖАН ПАОЛИ Э ИРЭН КАЛЬМЕТТ; ЮНИВЕРСИТЕ Д'ЭКС-МАРСЕЛЬ; САНТР НАСЬОНАЛЬ ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ СЬЯНТИФИК (FR)

(72) Изобретатель:
Лиу Яо-Бин (US), Пармар Радха Шах (GB), Мэйс Патрик (US), Олив Дэниэл (FR)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A2-2011041613
WO-A1-2014089113
WO-A2-2012131004
WO-A2-2008137915
PRIYA SAKTHIVEL ET AL.: "Attenuation of Immune-Mediated Influenza Pneumonia by Targeting the Inducible Co-Stimulator (ICOS) Molecule on T Cells", PLOS ONE, vol. 9, no. 7, 16 July 2014 (2014-07-16), page e100970, XP055255507, DOI: 10.1371/journal.pone.0100970, abstract
C. FOS ET AL.: "ICOS Ligation Recruits the p50 PI3K Regulatory Subunit to the Immunological Synapse", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 181, no. 3, 18 July 2008 (2008-07-18), pages 1969-1977, XP055255651, US, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.181.3.1969, cited in the application, the whole document

(57) Изобретение относится к связывающему ICOS белку или его антигенсвязывающей части, которые являются агонистами для ICOS человека и не индуцируют комплемент, ADCC или CDC при приведении в контакт с Т-клетками in vivo, и к способам лечения злокачественной опухоли, инфекционного заболевания и/или сепсиса с использованием указанного связывающего ICOS белка или его антигенсвязывающей части. Кроме того, связывающие ICOS белки или их антигенсвязывающие части по изобретению являются способными активировать Т-клетку при приведении в контакт с указанной Т-клеткой; стимулировать пролиферацию Т-клетки при приведении в контакт с указанной Т-клеткой и/или индуцировать продукцию цитокинов при приведении в контакт с указанной Т-клеткой. Изобретение относится к связывающим ICOS белкам или их антигенсвязывающим частям, содержащим одну или несколько из SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5 и/или SEQ ID NO:6.

036335 B1

036335 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится, главным образом, к иммунотерапии в лечении заболевания человека и к уменьшению связанных с ней неблагоприятных событий. Более конкретно, настоящее изобретение относится к применению связывающих ICOS белков, включая антитела-агонисты ICOS, и к их применению в качестве иммуномодуляторов для лечения злокачественной опухоли, инфекционного заболевания и/или сепсиса.

Уровень техники для изобретения

Усиление функции противоопухолевых Т-клеток и индукция пролиферации Т-клеток является мощным и новым способом лечения злокачественных опухолей. Три иммуноонкологических антитела, (например, иммуномодуляторы), представлены на рынке в настоящее время. Считается, что антитело против CTLA-4 (ЕРВОЙ/ипилимумаб) усиливает иммунные ответы в точке примирования Т-клеток, и считают, что антитела против PD-1 (ОПДИВО/ниволумаб и КЕЙТРУДА/пембролизумаб) действуют в местном микроокружении опухолей посредством ослабления ингибирующей контрольной точки в специфических для опухолей Т-клетках, которые уже были примированы и активированы.

ICOS представляет собой костимулирующий рецептор Т-клеток с структурной и функциональной взаимосвязью с суперсемейством CD28/CTLA-4-Ig (Hutloff, et al., "ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28", Nature, 397: 263-266 (1999)). Активация ICOS происходит посредством связывания с ICOS-L (B7RP-1/B7-H2). Ни B7-1, ни B7-2 (лиганды для CD2 8 и CTLA4) не связывают или не активируют ICOS. Однако показано, что ICOS-L слабо связывается как с CD28, так и с CTLA-4 (Yao S. et al., "B7-H2 is a costimulatory лиганд for CD28 in human", Immunity, 34(5); 729-40 (2011)). Экспрессия ICOS, по-видимому, ограничена Т-клетками. Уровни экспрессии ICOS меняются между различными подгруппами Т-клеток и в зависимости от статуса активации Т-клеток. Экспрессия ICOS показана на покоящихся клетках TH17, фолликулярных Т-клетках-помощниках (TFH) и регуляторных Т-клетках (Трег); однако в отличие от CD28, он не экспрессируется на высоком уровне на популяциях наивных эффекторных Т-клеток T_H1 и T_H2 (Paulos C.M. et al., "The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human Th17 cells", Sci Transl Med, 2(55); 55ra78 (2010)). Экспрессия ICOS сильно индуцируется на CD4+ и CD8+ эффекторных Т-клетках после активации посредством привлечения TCR (Wakamatsu E., et al., "Convergent and divergent effects of costimulatory molecules in conventional and regulatory CD4+ T cells", Proc Natal Acad Sci USA, 110(3); 1023-8 (2013)). Передача костимулирующих сигналов через рецептор ICOS происходит только в Т-клетках, получающих параллельный сигнал активации TCR (Sharpe A.H. и Freeman G.J. "The B7-CD28 Superfamily", Nat. Rev Immunol, 2(2); 116-26 (2002)). В активированных антигенспецифических Т-клетках ICOS регулирует продукцию цитокинов как T_H1, так и T_H2, включая IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-4, IL-13 и другие. ICOS стимулирует также пролиферацию эффекторных Т-клеток, хотя и в меньшей степени, чем CD28 (Sharpe A.H. and Freeman G.J. "The B7-CD28 Superfamily", Nat. Rev Immunol, 2(2); 116-26 (2002))

Растущий объем литературы подтверждает идею, что активация ICOS на CD4+ и CD8+ эффекторных Т-клетках обладает противоопухолевым потенциалом. Слитый белок ICOS-L-Fc вызывал задержку роста опухолей и полное уничтожение опухолей у мышей с сингенными опухолями SA-1 (саркомой), Meth (фибросаркомой), EMT6 (опухолью молочной железы) и P815 (мастоцитомой), и EL-4 (плазмацитомой), в то время как активности не наблюдали в модели опухоли B16-F10 (меланомы), которая, как известно, является слабо иммуногенной (Ara G. et al., "Potent activity of soluble B7RP-1-Fc in therapy of murine tumors in syngeneic hosts", Int. J Cancer, 103(4); 501-7 (2003)). Противоопухолевая активность ICOS-L-Fc зависела от интактного иммунного ответа, поскольку активность была полностью утрачена в опухолях, выращенных у мышей nude. Анализ опухолей из мышей, подвергнутых лечению ICOS-L-Fc, показал значительное увеличение инфильтрации CD4+ и CD8+ Т-клеток в опухоли, способные отвечать на лечение, что поддерживает иммуностимулирующий эффект ICOS-L-Fc в этих моделях.

В другом сообщении с использованием мышей $ICOS^{-/-}$ и $ICOS\text{-}L^{-/-}$ показано привлечение передачи сигналов ICOS в опосредовании противоопухолевой активности антитела против CTLA4 в модели сингенной опухоли меланомы B16/B16 (Fu T. et al., "The ICOS/ICOSL pathway is required for optimal antitumor responses mediated by anti-CTLA-4 therapy", Cancer Res, 71(16); 5445-54 (2011)). Мыши, лишенные ICOS или ICOS-L, обладали значительно уменьшенными процентами выживаемости по сравнению с мышами дикого типа после лечения антителом против CTLA4. В отдельном исследовании клетки опухолей B16/B16 трансдуцировали для сверхэкспрессии рекомбинантного мышиного ICOS-L. Обнаружено, что эти опухоли являются значительно более чувствительными к лечению против CTLA4 по сравнению с клетками опухолей B16/B16, трансдуцированными контрольным белком (Allison J. et al., "Combination immunotherapy for the treatment of cancer", WO2011/041613 A2 (2009)). В этих исследованиях представлено доказательство противоопухолевого потенциала агониста ICOS как отдельно, так и в комбинации с другими иммуномодулирующими антителами.

Поступающие данные для пациентов, подвергнутых лечению с использованием антител против CTLA4, также указывают на положительную роль ICOS+ эффекторных Т-клеток в опосредовании противоопухолевого иммунного ответа. Пациенты с метастазирующей меланомой (Giacomo A.M.D. et al., "Long-term survival and immunological parameters in metastatic melanom patients who respond to ipilimumab

10 mg/kg within an expanded access program", Cancer Immunol Immunother., 62(6); 1021-8 (2013)); уротелиальным раком (Carthon B.C. et al., "Preoperative CTLA-4 blockade: Tolerability and immune monitoring in the setting of a presurgical clinical trial", Clin Cancer Res., 16(10); 2861-71 (2010)); раком молочной железы (Vonderheide R.H. et al., "Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patient T cells", Clin Cancer Res., 16(13); 3485-94 (2010)) и раком предстательной железы, обладающие увеличенным абсолютным количеством циркулирующих и инфильтрующих опухоль $CD4^+$ $ICOS^+$ и $CD8^+$ $ICOS^+$ Т-клеток после лечения ипилимумабом, обладают значительно лучшими связанными с лечением исходами, чем пациенты, у которых наблюдали небольшое увеличение или отсутствие увеличения. Важно, показано, что ипилимумаб изменяет соотношение $ICOS^+$ Т эффекторные:T_{per}, обращая преобладание T_{per} до лечения в значительное преобладание Т эффекторных по сравнению с T_{per} после лечения (Liakou C.I. et al., "CTLA-4 blockade increases IFN-gamm producing CD4+ICOShi cells to shift ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients", Proc Natl Acad Sci USA. 105(39); 14987-92 (2008)) и (Vonderheide R.H. et al., Clin Cancer Res., 16(13); 3485-94 (2010)). Таким образом, положительные по ICOS эффекторные Т-клетки являются положительным прогностическим биомаркером ответа на ипилимумаб, который указывает на потенциальное преимущество активации этой популяции клеток с использованием антитела-агониста ICOS.

Таким образом, существует необходимость в дополнительных молекулах, индуцирующих пролиферацию Т-клеток, для лечения злокачественных опухолей.

Сущность изобретения

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к связывающим ICOS белкам или их антигенсвязывающим частям, содержащим одно или несколько из CDRH1, как указано в SEQ ID NO:1; CDRH2, как указано в SEQ ID NO:2; CDRH3, как указано в SEQ ID NO:3; CDRL1, как указано в SEQ ID NO:4; CDRL2, как указано в SEQ ID NO:5? и/или CDRL3, как указано в SEQ ID NO:6, или прямого эквивалента каждой CDR, где прямой эквивалент имеет не более двух аминокислотных замен в указанной CDR.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к связывающим ICOS белкам их или их антигенсвязывающим частям, специфически связывающимся с ICOS человека, где указанный связывающий ICOS белок содержит домен V_H, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:7, и/или домен V_L, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:8.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим частям, содержащим CDR тяжелой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, и CDR легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированным моноклональным антителам, содержащим каркас hIgG4PE; домен V_H, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:7; и домен V_L, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:8. Антитела по настоящему изобретению могут стимулировать продукцию цитокинов при контакте с Т-клетками.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к связывающим ICOS белкам, конкурирующим за связывание с ICOS человека с любым из связывающих ICOS белков или с их антигенсвязывающими частями по изобретению.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли, инфекционного заболевания и/или сепсиса с использованием связывающего ICOS белка или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один связывающий ICOS белок по настоящему изобретению.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - продукция IFN-γ CD4+CD25- Т-клетками.

Фиг. 2 - пролиферация CD4+CD25- Т-клеток.

Фиг. 3 - для гуманизированного варианта H2L5 антитела против ICOS 422.2 показана лучшая продукция цитокинов в клетках PBMC.

Фиг. 4 - 422 H2L5 IgG1 индуцировало уменьшенную жизнеспособность Т-клеток, чего не наблюдали для изотипа с инактивированным Fc или изотипа hIgG4PE.

Фиг. 5 - зависимый от дозы ответ индуцированной H2L5 hIgG4PE индукции провоспалительных цитокинов в CD4+ Т-клетках человека.

Фиг. 6 - H2L5 hIgG4PE индуцирует пролиферацию, продукцию цитокинов и увеличивает цитотоксический потенциал в активированных PBMC от здоровых доноров-людей.

Фиг. 7 - анализ Meso Scale Discovery (MSD), показывающий ингибирование связывания ICOS-L с ICOS посредством H2L5 hIgG4PE, показывающее, что оно связывается с тем же самым эпитопом на ICOS, что и ICOS-L, и конкурирует за связывание.

Фиг. 8 - выделенные гены V_H и V_L антитела из РНК клона гибридомы 422.2.

Фиг. 9 - белковые последовательности тяжелых и легких цепей H2L5 hIgG4PE с сигнальной последовательностью.

Фиг. 10 - последовательность ДНК кодирующей области тяжелой цепи H2L5 hIgG4PE с сигнальной последовательностью.

Фиг. 11 - последовательность ДНК кодирующей области легкой цепи H2L5 hIgG4PE с сигнальной последовательностью.

Фиг. 12 - концентрации H2L5 hIgG4PE в плазме яванских макаков. Концентрации определяли после (A) первой или (B) второй дозы (сутки 15) H2L5 hIgG4PE. Животных умерщвляли через 48 ч после второй дозы для сбора образцов ткани и гистопатологического анализа.

Фиг. 13 - детекция связывания H2L5 hIgG4PE с CD4+ Т-клетками из селезенки и подмышечных лимфатических узлов обезьян. Ткань собирали через 48 ч после второй дозы (сутки 17).

Фиг. 14 - занятость рецепторов H2L5 hIgG4PE в CD4+ Т-клетках крови яванских макаков.

(A) "Свободный рецептор" ICOS, как измерено по положительному связыванию флуоресцентно меченного антитела против ICOS, использованного для проточной цитометрии, которое связывается только когда H2L5 hIgG4PE не присутствует.

(B) Рецептор, связанный с H2L5 hIgG4PE на CD4+ клетках периферической крови, как измерено по флуоресцентно меченному антителу против IgG человека.

Фиг. 15(a) - уровни экспрессии фосфо-AKT (T308) в клетках Ba/F3-ICOS, обработанных H2L5 hIgG4PE - массив антител для внутриклеточной передачи сигналов. (b) Уровни экспрессии фосфо-AKT (S473) в клетках Ba/F3-ICOS, обработанных H2L5 hIgG4PE - массив антител для внутриклеточной передачи сигналов.

Фиг. 16 - H2L5 hIgG4PE в комбинации с ипилимумабом приводит к увеличенной продукции провоспалительных цитокинов по сравнению с обработкой одиночным антителом в анализе предварительной стимуляции PBMC.

Фиг. 17 - H2L5 hIgG4PE в комбинации с пембролизумабом приводит к увеличенной продукции провоспалительных цитокинов по сравнению с лечением одиночным антителом в анализе предварительной стимуляции PBMC.

Фиг. 18 - комбинация H2L5 hIgG4PE плюс ипилимумаб индуцирует увеличенную продукцию провоспалительных цитокинов в модифицированном анализе MLR с использованием пептида CEFT и предварительной инкубации.

Фиг. 19 - комбинация H2L5 hIgG4PE плюс пембролизумаб индуцирует увеличенную продукцию провоспалительных цитокинов в модифицированном анализе MLR с использованием пептида CEFT и предварительной инкубации.

Фиг. 20 - агонистическое mAb против ICOS H2L5 hIgG4PE отдельно и в комбинации с пембролизумабом приводит к ингибированию роста опухолей в модели опухоли меланомы PBMC A2058 человека на мышах.

Фиг. 21 - мышиное суррогатное mAb против ICOS приводит к значительному ингибированию роста опухолей и увеличенной выживаемости в комбинации с мышиным суррогатным mAb против PD1 в модели опухоли CT26 на мышах.

Фиг. 22 - мышиное суррогатное mAb против ICOS приводит к значительному ингибированию роста опухолей и увеличенной выживаемости в комбинации с мышиным суррогатным mAb против PD1 в модели опухоли EMT6 на мышах.

Подробное описание изобретения

Определения

В рамках изобретения "ICOS" обозначает любой индуцируемый костимулирующий Т-клетки белок. Другие обозначения для ICOS (Inducible T-cell COStimulator (индуцируемый костимулятор Т-клеток)) включают в себя AILIM; CD278; CVID1, JTT-1 или JTT-2, MGC39850 или 8F4. ICOS представляет собой костимулирующую молекулу суперсемейства CD28, которая экспрессируется на активированных Т-клетках. Белок, кодируемый этим геном, принадлежит к семейству рецепторов поверхности клеток CD28 и CTLA-4. Он формирует гомодимеры и играет важную роль в передаче сигналов клетка-клетка, иммунных ответах и регуляции пролиферации клеток. Аминокислотная последовательность ICOS человека показана ниже как SEQ ID NO:10.

MKSGLWYFFLFCLRIKVLTGEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGG

QILCDLTKTKGSGNTVSIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNLDHSHANYYFCNLSIFDPPPFKVTL

TGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKM (SEQ ID NO:10)

В рамках изобретения "ICOS-L" и "лиганд ICOS" используют взаимозаменяемо, и они относятся к связанному с мембраной природному лиганду ICOS человека. Лиганд ICOS представляет собой белок, кодируемый у человека геном ICOSLG. ICOSLG обозначают также как CD275 (кластер дифференцировки 275). Другие обозначения для ICOS-L включают в себя B7RP-1 и B7-H2.

В рамках изобретения термин "агонист" относится к антигенсвязывающему белку, например к связывающему ICOS белку, который при контакте с ICOS вызывает одно или несколько из следующего: (1)

стимулирует или активирует рецептор ICOS, (2) усиливает, увеличивает или стимулирует, индуцирует или продлевает активность, функцию или присутствие ICOS и/или (3) усиливает, увеличивает, стимулирует или индуцирует экспрессию ICOS. Агонистическую активность можно измерять in vitro посредством различных анализов, известных в данной области, таких как, но без ограничения, измерение передачи сигналов в клетках, пролиферации клеток, маркеров активации иммуноцитов, продукции цитокинов. Агонистическую активность можно также измерять in vivo посредством различных анализов, измеряющих суррогатные конечные точки, таких как, но без ограничения, измерение пролиферации Т-клеток или продукции цитокинов.

В рамках изобретения, термин "перекрестная конкуренция за связывание" относится к любому связывающему ICOS белку, который может конкурировать за связывание с ICOS с любым из связывающих ICOS белков по настоящему изобретению. Конкуренцию за связывание с ICOS между двумя молекулами можно тестировать различными способами, известными в данной области, включая проточную цитометрию, Meso Scale Discovery и ELISA. Связывание можно измерять напрямую, что означает, что два или более связывающих белка можно приводить в контакт с ICOS, и связывание можно измерять для одного или для каждого. Альтернативно, можно тестировать связывание представляющей интерес молекулы против связывания природного лиганда и количественно сравнивать друг с другом.

Термин "связывающий ICOS белок" в рамках изобретения относится к антителам и другим белковым конструкциям, таким как домены, способным связывать ICOS. В некоторых случаях, ICOS представляет собой ICOS человека. Термин "связывающий ICOS белок" можно использовать взаимозаменяемо с "антигенсвязывающий белок для ICOS". Таким образом, как известно в данной области, антитела против ICOS и/или антигенсвязывающие белки для ICOS рассматривают как связывающие ICOS белки. В рамках изобретения, "антигенсвязывающие белок" представляет собой любой белок, включая, но без ограничения, антитела, домены и другие конструкции, описанные в настоящем документе, которые связываются с антигеном, таким как ICOS. В рамках изобретения, "антигенсвязывающая часть" связывающего ICOS белка может включать любую часть связывающего ICOS белка, способную связывать ICOS, включая, но без ограничения, антигенсвязывающий фрагмент антитела.

Термин "антитело" используют в настоящем описании в самом широком смысле для обозначения молекул с иммуноглобулиноподобным доменом (например, IgG, IgM, IgA, IgD или IgE), и он включает в себя моноклональные, рекомбинантные, поликлональные, химерные, человеческие, гуманизированные, мультиспецифические антитела, включая биспецифические антитела, и гетероконъюгированные антитела; антитело с одиночным вариабельным доменом (например, V_H, V_{HH}, V_L (dAb™)), антигенсвязывающие фрагменты антител, Fab, $F(ab')_2$, Fv, связанные дисульфидными связями Fv, одноцепочечные Fv, связанные дисульфидными связями scFv, диатела, TANDABS™ и т.д. и модифицированные варианты любого из вышеуказанного.

Альтернативные форматы антител включают альтернативные кракасы, в которых один или несколько CDR антигенсвязывающего белка могут быть аранжированы в подходящем каркасе или скелете не относящегося к иммуноглобулинам белка, такого как аффитело, каркас SpA, домен рецептора LDL класса A, авимер или домен EGF.

Термин "домен" относится к свернутой белковой структуре, которая сохраняет свою третичную структуру независимо от остальной части белка. Как правило, домены являются ответственными за отдельные функциональные свойства белков, и во многих случаях их можно добавлять, удалять или переносить в другие белки без потери функции остального белка и/или домена.

Термин "одиночный вариабельный домен" относится к свернутому полипептидному домену, содержащему последовательности, характерные для вариабельных доменов антител. Таким образом, он включает полные вариабельные домены антител, такие как V_H, V_{HH} и V_L, и модифицированные вариабельные домены антител, например домены, в которых одна или несколько петель заменены последовательностями, не характерными для вариабельных доменов антител, или вариабельные домены антител, которые были укорочены или содержат N- или C-концевые удлинения так же, как свернутые фрагменты вариабельных доменов, которые сохраняют, по меньшей мере, активность и специфичность связывания полноразмерного домена. Одиночный вариабельный домен является способным связывать антиген или эпитоп независимо от другой вариабельной области или домена. "Доменное антитело" или "dAb(™)" можно рассматривать так же, как "одиночный вариабельный домен". Одиночный вариабельный домен может представлять собой человеческий одиночный вариабельный домен, но также включает одиночные вариабельные домены из других видов, таких как грызуны, акула-нянька и V_{HH} dAb™ верблюдовых. V_{HH} верблюдовых представляют собой полипептиды одиночного вариабельного домена иммуноглобулинов, полученные из видов, включая верблюда, ламу, альпаку, дромадера и гуанако, которые продуцируют тяжелую цепь антитела, естественным образом лишенную легких цепей. Такие домены V_{HH} можно гуманизировать в соответствии со стандартными способами, доступными в данной области, и такие домены рассматривают как являющиеся "одиночными вариабельными доменами". В рамках изобретения V_H включает домены V_{HH} верблюдовых.

Антигенсвязывающий фрагмент можно предоставлять посредством способов аранжировки одной

или нескольких CDR в не относящихся к антителам белковых остовов. "Белковый остов" в рамках изобретения включает, без ограничения, иммуноглобулиновый (Ig) остов, например остов IgG, который может представлять собой антитело из четырех цепей или двух цепей, или который может содержать только область Fc антитела, или который может содержать одну или несколько константных областей антитела, где константные области могут происходить из человека или приматов, или который может представлять собой искусственную химеру константных областей человека и примата.

Белковый остов может представлять собой остов Ig, например остов IgG или остов IgA. Остов IgG может содержать некоторые или все домены антитела (т.е. CH1, CH2, CH3, V_H, V_L). Антигенсвязывающий белок может содержать остов IgG, выбранный из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgG4PE. Например, остов может представлять собой IgG1. Остов может состоять из области Fc антитела или содержать ее, или являться ее частью.

Белковый остов может представлять собой производное остова, выбранного из группы, состоящей из CTLA-4, липокалина, полученных из белка молекул, таких как Z-домен белка (Affibody, SpA), A-домен (Avimer/Maxibody); белки теплового шока, такие как GroEl и GroES; трансферрин (трансантитело); белок с анкириновым повтором (DARPin); пептидный аптамер; лектиновый домен C-типа (тетранектин); γ-кристаллин человека и убиквитин человека (аффилины); домены PDZ; токсин скорпиона, домены ингибиторов протеазы человека типа доменов Куница; и фибронектин/аднектин; которые подвергали модификации белка, чтобы получить связывание с антигеном, таким как ICOS, отличным от природного лиганда.

Антигенсвязывающий участок относится к участку антигенсвязывающего белка, способному специфически связывать антиген, который может представлять собой одиночный вариабельный домен, или может представлять собой спаренные домены V_H/V_L, как можно обнаружить в стандартном антителе. Одноцепочечные домены Fv (ScFv) могут также предоставлять антигенсвязывающие участки. Термин "эпитопсвязывающий домен" относится к домену, который специфически связывается с областью антигена, известной, как эпитоп, независимо от другого домена.

Термин мультиспецифический антигенсвязывающий белок относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим по меньшей мере два различных антигенсвязывающих участка. Каждый из этих антигенсвязывающих участков способен связываться с различным эпитопом, которые могут присутствовать на одном и том же антигене или на различных антигенах. Мультиспецифический антигенсвязывающий белок может обладать специфичностью для более чем одного антигена, например для двух антигенов, или для трех антигенов, или для четырех антигенов.

Примеры мультиспецифических антигенсвязывающих белков включает белки, которые состоят, или в основном состоят из области Fc антитела, или ее части, связанной с каждого конца, напрямую или опосредовано (например, через линкерную последовательность), со связывающим доменом. Такой антигенсвязывающий белок может содержать два связывающих домена, разделенных областью Fc, или ее частью. Под разделением понимают, что связывающие домены не связаны непосредственно друг с другом, и могут быть локализованы на противоположных концах (C- и N-конце) области Fc, или любой другой каркасной области.

Антигенсвязывающий белок может содержать две каркасных области, где каждая связана с двумя связывающими доменами, например, на N- и C-конце каждой каркасной области, либо напрямую, либо опосредовано через линкер. Каждый связывающий домен может связываться с различным антигеном.

В рамках изобретения, термин mAbdAb относится к моноклональному антителу, связанному с дополнительным связывающим доменом, в частности одиночным вариабельным доменом, таким как доменное антитело. mAbdAb обладает по меньшей мере двумя антигенсвязывающими участками, по меньшей мере один из которых происходит из доменного антитела и по меньшей мере один происходит из спаренного домена V_H/V_L.

"Конъюгат dAb™" относится к композиции, содержащей dAb, с которым лекарственное средство химически конъюгировано посредством ковалентной или нековалентной связи.

Предпочтительно dAb и лекарственное средство связаны ковалентно. Такое ковалентное связывание можно проводить через пептидную связь или другими способами, например через модифицированную боковую связь. Нековалентное связывание может являться непосредственным (например, электростатическое взаимодействие, гидрофобное взаимодействие) или опосредованным (например, через нековалентное связывание комплементарных партнеров по связыванию (например, биотина и авидина), где один партнер ковалентно связан с лекарственным средством, и комплементарный партнер по связыванию ковалентно связан с dAb™). Когда используют комплементарных партнеров по связыванию, один из партнеров по связыванию может являться ковалентно связанным с лекарственным средством напрямую или посредством подходящей линкерной группы, и комплементарный партнер по связыванию может являться ковалентно связанным с dAb™ напрямую или посредством подходящей линкерной группы.

В рамках изобретения, "слитый с dAb™ белок" относится к слитому белку, который содержит dAb™ и полипептидное лекарственное средство (которое может представлять собой dAb™ или mAb). dAb™ и полипептидное лекарственное средство присутствуют в качестве отдельных частей (групп) од-

ной непрерывной полипептидной цепи.

В одном варианте осуществления, антигенсвязывающие белки по настоящему описанию проявляют перекрестную реакционную способность между ICOS человека и ICOS из других видов, таких как ICOS яванского макака. В одном варианте осуществления, антигенсвязывающие белки по изобретению специфически связывают ICOS человека и яванского макака. Предоставление лекарственного средства, которое может связывать молекулы человека и обезьян, позволяет тестировать результаты в этой системе и проводить параллельное сравнение данных с использованием одного и того же лекарственного средства. Предусматривают перекрестную реакционную способность между другими видами, используемыми в моделях заболевания, такими как собака или обезьяна, особенно обезьяна.

Конкуренцию между связывающим ICOS белком и эталонным связывающим ICOS белком можно определять посредством анализа конкуренции MSD, ELISA, FMAT или BIAcore. В одном варианте осуществления, анализ конкуренции проводят посредством сравнения связывания связывающего ICOS белка со связыванием лиганда ICOS. Существует несколько возможных причин для этой конкуренции: два белка могут связывать одинаковые или перекрывающиеся эпитопы, может присутствовать стерическое ингибирование или связывание первого белка может индуцировать конформационное изменение антигена, которое предотвращает или уменьшает связывание второго белка.

Термин "нейтрализует", как используют на протяжении настоящего описания, означает, что взаимодействие между ICOS и ICOS-L уменьшено в присутствии антигенсвязывающего белка, как описано в настоящем описании, по сравнению с взаимодействием ICOS и ICOS-L в отсутствие связывающего ICOS белка, in vitro или in vivo. Нейтрализация может происходить из-за одного или нескольких из блокирования связывания ICOS с его лигандом, предотвращения активации ICOS посредством его лиганда, понижающей регуляции ICOS или его рецептора, или влияния на функциональность эффектора. Например, конкуренцию с лигандом за связывание, описанную в примерах 3 и 5, можно использовать для оценки нейтрализующей способности связывающего ICOS белка.

Эффект связывающего ICOS белка на взаимодействие между ICOS и ICOS-L может быть частичным или полным. Нейтрализация связывающего ICOS белка может блокировать взаимодействие ICOS с ICOS-L по меньшей мере на 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% относительно взаимодействий ICOS - ICOS-L в отсутствие связывающего ICOS белка.

Нейтрализацию можно определять или измерять с использованием одного или нескольких анализов, как известно специалисту в данной области или как описано в настоящем описании.

Аффинность представляет собой силу связывания одной молекулы, например антигенсвязывающего белка по изобретению, с другим, например его антигеном-мишенью, в одном участке связывания. Аффинность связывания антигенсвязывающего белка с его мишенью можно определять посредством способов на основании равновесия (например, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или радиоиммунного анализа (RIA)) или анализа кинетики (например, анализа BIACORE™). Например, способы Biacore™, описанные в примере 5, можно использовать для измерения аффинности связывания.

Авидность представляет собой общую сумму силы связывания двух молекул друг с другом в многих участках, например, принимая во внимание валентность взаимодействия.

В одном варианте осуществления, равновесная константа диссоциации (KD) взаимодействия связывающий ICOS белок-ICOS составляет 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, 2 нМ или менее или 1 нМ или менее. Альтернативно, KD может составлять между 5 и 10 нМ; или между 1 и 2 нМ. KD может составлять между 1 и 500 пМ или между 500 пМ и 1 нМ. Специалисту в данной области понятно, что чем меньше числовое значение KD, тем сильнее связывание. Обратная величина KD (т.е. 1/KD) представляет собой равновесную константу связывания (KA), имеющего единицы M^{-1}. Специалисту в данной области понятно, что чем больше числовое значение KA, тем сильнее связывание.

Константа скорости диссоциации (kd) или "скорость диссоциации" описывает стабильность комплекса связывающего ICOS белка с ICOS, т.е. долю комплексов, распадающихся за 1 с.

Например, kd 0,01 c^{-1} эквивалентно 1% комплексов, распадающихся за 1 с. В одном варианте осуществления константа скорости диссоциации (kd) составляет 1×10^{-3} c^{-1} или менее, 1×10^{-4} c^{-1} или менее, 1×10^{-5} c^{-1} или менее или 1×10^{-6} c^{-1} или менее, kd может составлять между 1×10^{-5} c^{-1} и 1×10^{-4} c^{-1} или между 1×10^{-4} c^{-1} и 1×10^{-3} c^{-1}. Константа скорости связывания (ka) или "скорость связывания" описывает скорость формирования комплекса связывающий ICOS белок-ICOS. В одном варианте осуществления константа скорости связывания (ka) составляет приблизительно $1{,}0\times10^{5}$ M^{-1} c^{-1}.

Под "выделенной" подразумевают, что молекула, такая как антигенсвязывающий белок или нуклеиновая кислота, удалена из окружения, в котором ее можно обнаружить в природе. Например, молекула может являться очищенной от веществ, с которыми она в норме может существовать в природе. Например, масса молекулы в образце может составлять 95% от суммарной массы.

Термин "экспрессирующий вектор" в рамках изобретения обозначает выделенную нуклеиновую кислоту, которую можно использовать для введения представляющей интерес нуклеиновой кислоты в клетку, такую как эукариотическая клетка или прокариотическая клетка, или в бесклеточную экспрессирующую систему, где представляющую интерес последовательность нуклеиновой кислоты экспрессиру-

ют в форме пептидной цепи, такой как белок. Такие экспрессирующие векторы могут представлять собой, например, космиды, плазмиды, вирусные последовательности, транспозоны и линейные нуклеиновые кислоты, содержащие представляющую интерес нуклеиновую кислоту. После введения экспрессирующего вектора в клетку или в бесклеточную экспрессирующую систему (например, лизат ретикулоцитов), белок, кодируемый представляющий интерес нуклеиновой кислотой, продуцируется посредством аппарата трнскрипции/трансляции. Экспрессирующие векторы в объеме описания могут предоставлять необходимые элементы для эукариотической или прокариотической экспрессии и включают векторы, управляемые вирусным промотором, такие как векторы, управляемые промотором CMV, например pcDNA3.1, pCEP4, и их производные, бакуловирусные экспрессирующие векторы, экспрессирующие векторы для Drosophila, и экспрессирующие векторы, управляемые промоторами генов млекопитающих, такими как промоторы генов Ig человека. Другие примеры включают прокариотические экспрессирующие векторы, такие как векторы, управляемые промотором T7, например pET41, векторы, управляемые промотором лактозы, и векторы, управляемые промотором арабинозы. Специалисту в данной области известны многие другие пригодные экспрессирующие векторы и экспрессирующие системы.

Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" в рамках изобретения обозначает клетку, содержащую представляющую интерес последовательность нуклеиновой кислоты, которая была выделена перед ее введением в клетку. Например, представляющая интерес последовательность нуклеиновой кислоты может находиться в экспрессирующем векторе, в то время как клетка может являться прокариотической или эукариотической. Иллюстративные эукариотические клетки представляют собой клетки млекопитающих, такие как, но без ограничения, клетки COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, HepG2, 653, SP2/0, NS0, 293, HeLa, миеломы, лимфомы или любое их производное. Наиболее предпочтительно эукариотическая клетка представляет собой клетку HEK293, NS0, SP2/0 или CHO. E. coli представляет собой иллюстративную прокариотическую клетку. Рекомбинантную клетку, в соответствии с описанием, можно получать посредством трансфекции, слияния клеток, иммортализации или других способов, хорошо известных в данной области. Представляющая интерес последовательность нуклеиновой кислоты, такая как экспрессирующий вектор, трансфицированный в клетку, может являться внехромосомной или стабильно интегрированной в хоромосому клетки.

"Химерное антитело" относится к типу сконструированного антитела, которое содержит природные вариабельные области (легкой цепи и тяжелой цепи), полученные из донорного антитела в ассоциации с константными областями легкой и тяжелой цепей, полученными из акцепторного антитела.

"Гуманизированное антитело" относится к типу сконструированного антитела, обладающего CDR, полученными из не относящегося к человеку донорного иммуноглобулина, где оставшиеся полученные из иммуноглобулинов части молекулы получены из одного или нескольких человеческого иммуноглобулина(иммуноглобулинов). Кроме того, каркасные поддерживающие остатки можно изменять для сохранения аффинности связывания (см., например, Queen et al. Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson, et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)). Пригодное человеческое акцепторное антитело может представлять собой антитело, выбранное из общепринятой базы данных, например базы данных KABAT™, базы данных Los Alamos и базы данных Swiss Protein, по гомологии с нуклеотидными и аминокислотными последовательностями донорного антитела.

Человеческое антитело, характеризуемое гомологией с каркасными областями донорного антитела (на основании аминокислот), может являться пригодным для предоставления константной области тяжелой цепи и/или каркасной области вариабельной части тяжелой цепи для вставки донорных CDR. Пригодное акцепторное антитело, способное предоставлять константную область или каркасные области вариабельной части легкой цепи, можно выбирать сходным образом. Следует отметить, что тяжелые и легкие цепи акцепторного антитела не обязательно должны происходить из одного и того же акцепторного антитела. В предшествующей области техники описано несколько способов получения таких гуманизированных антител, см., например, EP-A-0239400 и EP-A-054951.

Термин "полностью человеческое антитело" включает антитела, обладающие вариабельными и константными областями (если присутствуют), полученные из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов. Человеческие последовательности антител по изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими зародышевыми последовательностями иммуноглобулинов (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза in vitro или посредством соматических мутаций in vivo). Полностью человеческие антитела содержат аминокислотные последовательности, кодируемые только посредством полинуклеотидов, в конечном итоге имеющими человеческое происхождение, или аминокислотные последовательности, идентичные таким последовательностям. Как понимают в рамках изобретения, антитела, кодируемые ДНК, кодирующей человеческие иммуноглобулины, вставленной в мышиный геном, продуцированные в трансгенной мыши, являются полностью человеческими антителами, поскольку они кодированы ДНК, в конечном итоге имеющей человеческое происхождение. В этой ситуации, ДНК, кодирующая человеческие иммуноглобулины, может подвергаться реаранжировке (для кодирования антитела) в организме мыши, и могут происходить также соматические мутации. Антитела, кодируемые исходно человеческой ДНК, подвергнутые таким изменениям в организме мыши, являются полностью челове-

ческими антителами, как понимают в рамках изобретения. Применение таких трансгенных мышей обеспечивает возможность отбора полностью человеческих антител против антигена человека. Как понимают в данной области, полностью человеческие антитела можно получать с использованием технологии фагового дисплея, где библиотеку ДНК человека вставляют в фаг для получения антител, содержащих человеческую зародышевую последовательность ДНК.

Термин "донорное антитело" относится к антителу, вносящему вклад аминокислотных последовательностей своих вариабельных областей, CDR или других функциональных фрагментов или их аналогов в первого иммуноглобулинового партнера. Донор, таким образом, обеспечивает измененную кодирующую область иммуноглобулина, и в результате экспрессируется измененное антитело с антигенной специфичностью и нейтрализующей активностью, характерной для донорного антитела.

Термин "акцепторное антитело" относится к антителу, гетерологичному по отношению к донорному антителу, вносящему вклад всех (или любой части) аминокислотных последовательностей, кодирующих каркасные области своей тяжелой и/или легкой цепи и/или константные области своей тяжелой и/или легкой цепи, в первого иммуноглобулинового партнера. Человеческое антитело может являться акцепторным антителом.

Термины "V_H" и "V_L" используют в настоящем описании для обозначения вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи соответственно антигенсвязывающего белка.

"CDR" определяют как аминокислотные последовательности определяющих комплементарность областей антигенсвязывающего белка. Существуют гипервариабельные области тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. Существует три CDR (или области CDR) тяжелой цепи и три CDR (или области CDR) легкой цепи в вариабельной части иммуноглобулина. Таким образом, "CDR" в рамках изобретения относится ко всем трем CDR тяжелой цепи, всем трем CDR легкой цепи, ко всем CDR тяжелой и легкой цепей или по меньшей мере к двум CDR.

На протяжении этого описания, аминокислотные остатки в последовательностях вариабельных доменов и в последовательностях полноразмерных антител пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat. Подобным образом, термины "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3", используемые в примерах, следуют системе нумерации Kabat. Дополнительную информацию см. в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., U.S. Department of Health и Human Services, National Institutes of Health (1991).

Специалисту в данной области очевидно, что существуют альтернативные системы нумерации для аминокислотных остатков в последовательностях вариабельных доменов и в последовательностях полноразмерных антител. Существуют также альтернативные системы нумерации для последовательностей CDR, например системы, описанные в Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883. Структура и сворачивание белка антитела могут означать, что другие остатки следует рассматривать как часть последовательности CDR, и наличие этого может понять специалист в данной области.

Другие системы нумерации для последовательностей CDR, доступные специалисту в данной области, включают способ "AbM" (University of Bath) и "контактный" способ (University College London). Минимальную перекрывающуюся область с использованием по меньшей мере двух из способов Kabat, Chothia, AbM и контактного способа можно определять как предоставляющую "минимальную единицу связывания". Минимальная единица связывания может являться субфрагментом CDR.

В табл. 1 ниже представлено одно определение с использованием каждой системы нумерации для каждой CDR или единицы связывания. Схема нумерации Kabat использована в табл. 1 для нумерации домен аминокислотной последовательности вариабельного домена. Следует отметить, что некоторые из определений CDR могут меняться в зависимости от индивидуальных использованных публикаций.

Таблица 1

	CDR по Kabat	CDR по Chothia	CDR по AbM	Контактная CDR	Минимальная единица связывания
H1	31-35/35A/35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

Соответственно представлены связывающие ICOS белки, содержащие любую одну или комбинацию из следующих CDR:

CDRH1: DYAMH (SEQ ID NO:1)

CDRH2: LISIYSDHTNYNQKFQG (SEQ ID NO:2)

CDRH3: NNYGNYGWYFDV (SEQ ID NO:3)

CDRL1: SASSSVSYMH (SEQ ID NO:4)

CDRL2: DTSKLAS (SEQ ID NO:5)

CDRL3: FQGSGYPYT (SEQ ID NO:6)

В одном варианте осуществления настоящего изобретения связывающий ICOS белок содержит CDRH1 (SEQ ID NO:1), CDRH2 (SEQ ID NO:2) и CDRH3 (SEQ ID NO:3) в вариабельной области тяже-

лой цепи, обладающей аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:7. Связывающие ICOS белки по настоящему изобретению, содержащие гуманизированную вариабельную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO:7, обозначены как "H2". В некоторых вариантах осуществления связывающие ICOS белки по настоящему изобретению содержат вариабельную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO:7. Подходящим образом, связывающие ICOS белки по настоящему изобретению могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, обладающую приблизительно 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO:7.

Вариабельная область (V_H) гуманизированной тяжелой цепи (H2)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DYAMHWVRQ PGQGLEWMGL

ISIYSDHTNY NQKFQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCGRNN

YGNYGWYFDV WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:7)

В одном варианте осуществления настоящего изобретения связывающий ICOS белок содержит CDRL1 (SEQ ID NO:4), CDRL2 (SEQ ID NO:5) и CDRL3 (SEQ ID NO:6) в вариабельной области легкой цепи, обладающей аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:8. Связывающие ICOS белки по настоящему изобретению, содержащие гуманизированную вариабельную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO:8, обозначены как "L5". Таким образом, связывающий ICOS белок по настоящему изобретению, содержащий вариабельную область тяжелой цепи из SEQ ID NO:7 и вариабельную область легкой цепи из SEQ ID NO:8, можно обозначать в настоящем описании как H2L5.

Подходящая лидерная последовательность для конструкций вариабельной тяжелой цепи и легкой цепи показана на фиг. 9 и включает, но без ограничения:

MGWSCIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO:11)

В некоторых вариантах осуществления, связывающие ICOS белки по настоящему изобретению содержат вариабельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:8. Подходящим образом, связывающие ICOS белки по настоящему изобретению могут содержать вариабельную область легкой цепи, обладающую приблизительно 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO:8.

Вариабельная область (V_L) гуманизированной легкой цепи (L5)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSASSSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDT

SKLASGIPAR FSGSGSGTDY TLTISSLEPE DFAVYYCFQG SGYPYTFGQG TKLEIK

(SEQ ID NO:8)

CDR или минимальные единицы связывания можно модифицировать посредством по меньшей мере одной аминокислотной замены, делеции или добавления, где вариант антигенсвязывающего белка в основном сохраняет биологические характеристики немодифицированного белка, такого как мышиное антитело, продуцированное из клона 422.2, или антитело, содержащее SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8.

Следует понимать, что каждую из CDR H1, H2, H3, L1, L2, L3 можно модифицировать отдельно или в комбинации с любой другой CDR, в любой пермутации или комбинации. В одном варианте осуществления CDR является модифицированной посредством замены, делеции или добавления вплоть до 3 аминокислот, например 1 или 2 аминокислот, например 1 аминокислоты. Как правило, модификация представляет собой замену, в частности консервативную замену, например, как показано в табл. 2 ниже.

Таблица 2

Боковая цепь	**Члены**
Гидрофобная	Met, Ala, Val, Leu, Ile
Нейтральная гидрофильная	Cys, Ser, Thr
Кислая	Asp, Glu
Основная	Asn, Gln, His, Lys, Arg
Остатки, влияющие на ориентацию цепи	Gly, Pro
Ароматическая	Trp, Tyr, Phe

Например, в варианте CDR, аминокислотные остатки минимальной единицы связывания могут оставаться такими же, но фланкирующие остатки, содержащиеся в CDR как части определения(определений) Kabat или Chothia, могут быть заменены на консервативный аминокислотный остаток.

Такие антигенсвязывающие белки, содержащие модифицированные CDR или минимальные единицы связывания, как описано выше, можно обозначать в настоящем описании как "функциональные варианты CDR" или "функциональные варианты единицы связывания". Подходящим образом, в одном варианте осуществления представлены связывающие ICOS белки, содержащие одну или несколько CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, указанными в SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5 и/или 6, и/или функциональный вариант их CDR.

Термин "эпитоп" в рамках изобретения относится к той части антигена, которая вступает в контакт с конкретным связывающим доменом антигенсвязывающего белка. Эпитоп может быть линейным или конформационным/не непрерывным. Конформационный или не непрерывный эпитоп содержит аминокислотные остатки, разделенные другими последовательностями, т.е. не в непрерывной последовательности в первичной последовательности антигена. Хотя остатки могут происходить из различных облас-

тей пептидной цепи, они находятся в тесном соседстве в трехмерной структуре антигена. В случае мультимерных антигенов, конформационный или не непрерывный эпитоп может включать в себя остатки из различных пептидных цепей. Конкретные остатки, содержащиеся в эпитопе, можно определять посредством программ для компьютерного моделирования или посредством трехмерных структур, полученных способами, известными в данной области, такими как рентгеновская кристаллография.

CDR L1, L2, L3, H1 и H2 проявляют тенденцию к структурному проявлению одной из ограниченного количества конформаций основной цепи. Конкретный класс канонической структуры CDR определяется как длиной CDR, так и упаковкой петель, определяемых остатками, локализованными как в CDR, так и в каркасных областях (определяющими структуру остатками или SDR). Martin and Thornton (1996; J Mol Biol 263:800-815) разработали автоматизированный способ для определения канонических матриц "ключевых остатков". Кластерный анализ используют для определения канонических классов для наборов CDR, и затем идентифицируют канонические матрицы посредством анализа замаскированных гидрофобных, связывающих водород остатков, и консервативных остатков глицина и пролина. CDR из последовательностей антитела можно приписывать к каноническим классам посредством сравнения последовательностей с матрицами ключевых остатков и оценки каждой матрицы с использованием матриц идентичности или сходства.

Может существовать множество вариантов канонических положений CDR для CDR, для соответствующей CDR, для единицы связывания, для вариабельной области тяжелой или легкой цепи, для тяжелой или легкой цепи и для антигенсвязывающего белка, и таким образом, любая комбинация замен может присутствовать в антигенсвязывающем белке по изобретению, при условии, что сохраняется каноническая структура CDR, так что антигенсвязывающий белок является способным специфически связывать ICOS.

Как обсуждают выше, конкретный класс канонической структуры CDR определяется как длиной CDR, так и упаковкой петель, определяемых остатками, локализованными как в CDR, так и в каркасных областях.

"Процент идентичности" между запрашиваемой последовательностью нуклеиновой кислоты и рассматриваемой последовательностью нуклеиновой кислоты представляет собой значение "идентичности", выраженное как процент, которое рассчитано посредством алгоритма BLASTN, когда рассматриваемая последовательность нуклеиновой кислоты обладает 100% перекрыванием с запрашиваемой последовательностью нуклеиновой кислоты после проведения попарного выравнивания BLASTN. Такие попарные выравнивания BLASTN между запрашиваемой последовательностью нуклеиновой кислоты и рассматриваемой последовательностью нуклеиновой кислоты проводят с использованием параметров по умолчанию алгоритма BLASTN, доступного на веб-сайте National Center for Biotechnology Institute, с отключенным фильтром для областей низкой сложности. Важно, что запрашиваемую последовательность нуклеиновой кислоты можно описать посредством последовательности нуклеиновой кислоты, идентифицированной в одном или нескольких пунктах формулы изобретения в настоящем описании.

"Процент идентичности" между запрашиваемой аминокислотной последовательностью и рассматриваемой аминокислотной последовательностью представляет собой значение "идентичности", выраженное как процент, которое рассчитано посредством алгоритма BLASTP, когда рассматриваемая аминокислотная последовательность обладает 100% перекрыванием с запрашиваемой аминокислотной последовательностью после проведения попарного выравнивания BLASTP. Такие попарные выравнивания BLASTP между запрашиваемой аминокислотной последовательностью и рассматриваемой аминокислотной последовательностью проводят с использованием параметров по умолчанию алгоритма BLASTP, доступного на веб-сайте National Center for Biotechnology Institute, с отключенным фильтром для областей низкой сложности. Важно, что запрашиваемую аминокислотную последовательность можно описать посредством аминокислотной последовательности, идентифицированной в одном или нескольких пунктах формулы изобретения в настоящем описании.

Запрашиваемая последовательность может являться на 100% идентичной рассматриваемой последовательности, или она может включать вплоть до определенного целого количества изменений аминокислот или нуклеотидов по сравнению с рассматриваемой последовательностью, так что % идентичности составляет менее 100%. Например, запрашиваемая последовательность является по меньшей мере на 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной рассматриваемой последовательности. Такие изменения включают делецию, замену (включая консервативную и неконсервативную замену) или вставку по меньшей мере одной аминокислоты, и при этом такие изменения могут происходить в амино- или карбоксиконцевых положениях запрашиваемой последовательности или в любом месте между этими концевыми положениями, могут быть распределены либо индивидуально среди аминокислот или нуклеотидов в запрашиваемой последовательности, либо в одной или нескольких непрерывных группах внутри запрашиваемой последовательности.

% идентичности можно определять на протяжении полной длины запрашиваемой последовательности, включая CDR (несколько CDR). Альтернативно, % идентичности может исключать CDR (несколько CDR), например CDR (несколько CDR) является на 100% идентичной рассматриваемой последовательности, и изменение % идентичности происходит в остальной части запрашиваемой последовательности,

так что последовательность CDR является фиксированной/интактной.

Вариант последовательности, по существу, сохраняет биологические характеристики немодифицированного белка, такого как SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

Последовательность V_H или V_L может представлять собой вариант последовательности с вплоть до 15 замен, добавлений или делеций аминокислот. Например, вариант последовательности может иметь замену(замены), добавление(добавления) или делецию (делеций) вплоть до 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислот.

Вариант последовательности может исключать CDR (несколько CDR), например CDR (несколько CDR) является такой же, как в последовательности V_H или V_L (или HC или LC), и вариант присутствует в остальной части последовательности V_H или V_L (или HC или LC), так что последовательность CDR является фиксированной/интактной.

Специалисту в данной области понятно, что при продукции антигенсвязывающего белка, такого как антитело, в частности, в зависимости от используемой линии клеток и конкретной аминокислотной последовательности антигенсвязывающего белка могут происходить пост-трансляционные модификации. Например, они могут включать в себя отщепление конкретных лидерных последовательностей, добавление различных сахарных групп в различных паттернах гликозилирования и фосфорилирования, дезамидирование, окисление, преобразование дисульфидных связей, изомеризация, отщепление С-концевого лизина и циклизацию N-концевого глутамина. Настоящее изобретение относится к применению антигенсвязывающих белков, которые являются объектом или подвергнуты одной или нескольким пост-трансляционным модификациям. Таким образом, "антигенсвязывающий белок" или "антитело" по изобретению включает "антигенсвязывающий белок" или "антитело" соответственно, как определено ранее, подвергнуты одной или нескольким пост-трансляционным модификациям, таким как описано в настоящем описании.

Дезамидирование представляет собой ферментативную реакцию, в первую очередь превращающую аспарагин (N) в изо-аспарагиновую кислоту и аспарагиновую кислоту (D) в соотношении приблизительно 3:1. В намного меньшей степени, дезамидирование может происходить с остатками глутамина сходным образом.

Дезамидирование в CDR приводит к изменению заряда молекулы, но, как правило, как не приводит к изменению связывания антигена, так и не влияет на PK/PD.

Окисление может происходить в ходе продукции и хранения (т.е. в присутствии окисляющих условий) и приводит к ковалентной модификации белка, индуцированной либо напрямую посредством реакционноспособных видов кислорода, либо опосредованно посредством реакции с вторичными побочными продуктами окислительного стресса. Окисление происходит в первую очередь на остатках метионина, но в редких случаях может происходить на остатках триптофана и свободного цистеина.

Преобразование дисульфидных связей может происходить в ходе продукции и хранения в основных условиях. В конкретных условиях, дисульфидные связи могут разрушаться или формироваться неправильно, что приводит к неспаренным остаткам цистеина (-SH). Эти свободные (неспаренные) сульфгидрилы (-SH) могут стимулировать перетасовку.

Изомеризация как правило, происходит в ходе продукции, очистки и хранения (при кислом pH) и обычно происходит, когда аспарагиновая кислота превращается в изоаспарагиновую кислоту посредством химического процесса.

N-концевой глутамин в тяжелой цепи и/или легкой цепи, вероятно, формирует пироглутамат (pGlu). Большая часть формирования pGlu происходит в биореакторе для продукции, но он может образовываться не ферментативным образом, в зависимости от pH и температуры переработки и условий хранения. Образование pGlu рассматривают как один из принципиальных путей деградации для рекомбинантных mAb.

Отщепление С-концевого лизина представляет собой ферментативную реакцию, катализируемую карбоксипептидазами, и его обычно наблюдают в рекомбинантных mAb. Варианты этого процесса включают удаление лизина из одной или обеих тяжелых цепей. Отщепление лизина, по-видимому, не влияет на биоактивность и не оказывает эффекта на эффекторную функцию mAb.

У человека существуют природные аутоантитела, которые могут связываться с белками. Аутоантитела могут, таким образом, связываться с эндогенными белками (присутствующими у наивных субъектов) так же, как с белками или пептидами, которые вводят субъекту для лечения. Связывающие терапевтический белок аутоантитела и антитела, заново сформированные в ответ на лекарственное средство, вместе называют антителами против лекарственного средства (ADA). Предсуществующие антитела против таких молекул, как терапевтические белки и пептиды, введенные субъекту, могут влиять на их эффективность и могут приводить к реакциям на введение, гиперчувствительности, измененному клиническому ответу у подвергнутых лечению пациентов и измененной биодоступности посредством удержания, уничтожения или нейтрализации молекулы. Может обеспечивать преимущества предоставление для терапии молекулы, содержащей одиночные вариабельные домены или dAb™ человеческого иммуноглобулина (антитела), обладающие уменьшенной иммуногенностью (т.е. уменьшенной способностью связываться с предсуществующими AD) при введении субъекту, в частности субъекту-человеку.

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящего изобретения представлены модифицированные dAb™ с уменьшенной способностью связываться с предсуществующими антителами (ADA) по сравнению с эквивалентной немодифицированной молекулой. Под уменьшенной способностью связывания понимают, что модифицированная молекула связывается с предсуществующими AD с уменьшенной аффинностью или уменьшенной авидностью. Такие модифицированные dAb™ содержат одну или несколько модификаций, выбранных из: (a) С-концевого добавления, удлинения, делеции или присоединения метки, и/или (b) замены одной или нескольких каркасных аминокислот.

Полипептиды и dAb™ по описанию и содержащие их агонисты можно форматировать так, чтобы они имели больший гидродинамический размер, например, посредством присоединения группы PEG, сывороточного альбумина, трансферрина, рецептора трансферрина или, по меньшей мере, его связывающей трансферрин-части, области Fc антитела, или посредством конъюгации с доменом антитела. Например, полипептиды dAb™ и агонисты можно форматировать в форме большего антигенсвязывающего фрагмента антитела или в форме антитела (например, в формате Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$, IgG, scFv).

В рамках изобретения "гидродинамический размер" относится к кажущемуся размеру молекулы (например, антигенсвязывающего белка) на основании диффузии молекулы через водный раствор. Диффузию или движение белка через раствор можно обрабатывать для выведения кажущегося размера белка, где размер получают по "радиусу Стокса" или "гидродинамическому радиусу" частицы белка. "Гидродинамический размер" белка зависит как от массы, так и от формы (конформации), так что два белка, обладающие одинаковой молекулярной массой, могут обладать различными гидродинамическими размерами на основании общей конформации и заряда белка. Увеличение гидродинамического размера может приводить к ассоциированному уменьшению выведения через почки, приводящего к наблюдаемому увеличению времени полужизни ($t_{1/2}$).

Гидродинамический размер антигенсвязывающих белков (например, мономеров и мультимеров доменного антитела) по описанию можно определять с использованием способов, хорошо известных в данной области. Например, гель-фильтрационную хроматографию можно использовать для определения гидродинамического размера антигенсвязывающего белка. Пригодные смолы для гель-фильтрации для определения гидродинамических размеров антигенсвязывающих белков, такие как смолы на основе перекрестно сшитой агарозы, хорошо известны и легко доступны.

Размер антигенсвязывающего белка в определенном формате (например, размер группы PEG, присоединенной к мономеру доменного антитела) можно менять в зависимости от желательного применения. Например, когда антигенсвязывающий белок предназначен, чтобы покидать кровоток и входить в периферические ткани, является желательным сохранять небольшой гидродинамический размер связывающего ICOS белка для облегчения выхода из кровотока. Альтернативно, когда является желательным оставлять антигенсвязывающий белок в системном кровотоке на более длительный период времени, размер антигенсвязывающего белка можно увеличивать, например, посредством получения в формате подобного Ig белка.

Фармацевтические композиции

Антигенсвязывающий белок, как описано в настоящем описании, можно включать в фармацевтические композиции для применения в лечении заболеваний человека, описанных в настоящем описании. В одном варианте осуществления, фармацевтическая композиция содержит антигенсвязывающий белок, необязательно, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями и/или наполнителями.

Такие композиции содержат фармацевтически приемлемый носитель, как известно и необходимо для приемлемой фармацевтической практики.

Фармацевтические композиции можно вводить посредством инъекции или непрерывной инфузии (примеры включают, но без ограничения, внутривенную, внутрибрюшинную, внутрикожную, подкожную, внутримышечную и интрапортальную). В одном варианте осуществления, композиция является пригодной для внутривенного введения. Фармацевтические композиции могут являться пригодными для местного введения (которое включает, но без ограничения, накожное введение, введение посредством ингаляции, интраназальное введение или введение в глаз) или энтеральное введение (которое включает, но без ограничения, пероральное или ректальное введение).

Фармацевтические композиции могут содержать между 0,5 мг и 10 г связывающего ICOS белка, например между 5 мг и 1 г антигенсвязывающего белка. Альтернативно, композиция может содержать между 5 и 500 мг, например между 5 и 50 мг.

Способы получения таких фармацевтических композиций хорошо известны специалистам в данной области. Другие наполнители можно добавлять в композицию, как приемлемо для используемых способа введения и конкретного белка. Примеры различных наполнителей и их применений описаны в Lowe et al., (2011).

Эффективные дозы и режимы лечения для введения антигенсвязывающего белка могут зависеть от таких факторов, как возраст, масса и состояние здоровья пациента, и заболевание, подлежащее лечению. Такие факторы находятся в компетенции лечащего врача. Руководство для выбора подходящих доз мож-

но обнаружить, например, в Bai et al., (2012).

Фармацевтическая композиция может содержать комплект составляющих антигенсвязывающего белка вместе с другими лекарственными средствами, необязательно, с инструкциями для применения. Для удобства, набор может содержать реагенты в предопределенных количествах с инструкциями для применения.

Термины "индивидуум", "субъект" и "пациент" используют в настоящем описании взаимозаменяемо. В одном варианте осуществления, субъект представляет собой млекопитающего, такого как примат, например игрунку или обезьяну. В другом варианте осуществления, субъект представляет собой человека.

Антигенсвязывающий белок, описанный в настоящем описании, можно также использовать в способах лечения. Лечение может являться терапевтическим, профилактическим или предотвращающим. Лечение включает облегчение, уменьшение или предотвращение по меньшей мере одного аспекта или симптома заболевания и включает предотвращение или излечение заболеваний, описанных в настоящем описании.

Связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающую часть, описанные в настоящем описании, используют в эффективном количестве для терапевтического, профилактического или предотвращающего лечения. Терапевтически эффективное количество связывающего ICOS белка или его антигенсвязывающей части, описанных в настоящем описании, представляет собой количество, эффективное для облегчения или уменьшения одного или нескольких симптомов заболевания, или для предотвращения или излечения, заболевания.

Таким образом, в одном варианте осуществления представлены связывающие ICOS белки или их антигенсвязывающие части по настоящему изобретению для применения в терапии. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к связывающим ICOS белкам или их антигенсвязывающим частям по настоящему изобретению для применения в терапии злокачественной опухоли, инфекционного заболевания и/или сепсиса. Настоящее изобретение также относится к применению связывающего ICOS белка или его антигенсвязывающей части по настоящему изобретению в получении лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли, инфекционного заболевания и/или сепсиса.

Таким образом, изобретение относится к выделенным связывающим ICOS белкам или их антигенсвязывающим частям, или фармацевтическим композициям, содержащим указанные выделенные связывающие ICOS белки или их антигенсвязывающие части, для применения в лечении злокачественной опухоли, инфекционного заболевания и/или сепсиса.

Способы получения

Антигенсвязывающие белки можно получать любым из ряда обычных способов. Например, антигенсвязывающие белки можно очищать из клеток, экспрессирующих их естественным образом (например, антитело можно очищать из продуцирующей его гибридомы), или получать в рекомбинантных экспрессирующих системах.

Ряд различных экспрессирующих систем и режимов очистки можно использовать для получения антигенсвязывающего белка по изобретению. Как правило, клетки-хозяева трансформируют рекомбинантным экспрессирующим вектором, кодирующим желательный антигенсвязывающий белок. Можно применять широкий диапазон клеток-хозяев, включая прокариоты (включая грамотрицательные или грамположительные бактерии, например Escherichi coli, виды Bacilli, виды Pseudomonas$_r$ виды Corynebacterium), эукариоты, включая дрожжи (например, Saccharomyces cerevisiae, Pichi pastoris), грибы (например, виды Aspergilus) или высшие эукариоты, включая клетки насекомых и линии клеток, происходящих из млекопитающих (например, CHO, Perc6, HEK293, HeLa).

Клетка-хозяин может представлять собой выделенную клетку-хозяина. Клетка-хозяин, как правило, не является частью многоклеточного организма (например, растения или животного). Клетка-хозяин может представлять собой не относящуюся к человеку клетку-хозяина.

Подходящие клонирующие и экспрессирующие векторы для применения с клеточными хозяевами из бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих и способы клонирования известны в данной области.

Клетки можно культивировать в условиях, способствующих экспрессии антигенсвязывающего белка, и выделять полипептид общепринятыми способами очистки белка. Антигенсвязывающие белки, предусмотренные для применения в настоящем описании, включают, по существу, гомогенные антигенсвязывающие белки, в основном свободные от загрязняющих материалов.

Специалисту в данной области понятно, что при продукции антигенсвязывающего белка могут происходить пост-трансляционные модификации, в частности, в зависимости от используемой линии клеток и конкретной аминокислотной последовательности антигенсвязывающего белка. Они могут включать в себя отщепление конкретных лидерных последовательностей, добавление различных сахарных групп в различных паттернах гликозилирования, дезамидирование (например, остатка аспарагина или глутамина), окисление (например, остатка метионина, триптофана или свободного цистеина), преобразование дисульфидных связей, изомеризацию (например, остатка аспарагиновой кислоты), отщепление С-концевого лизина (например, от одной или обеих тяжелых цепей) и циклизацию N-концевого глутами-

на (например, в тяжелой и/или легкой цепи). Настоящее изобретение относится к применению антител, которые являются объектом или подвергнуты одной или нескольким пост-трансляционным модификациям. Модификациия может присутствовать в CDR, вариабельной каркасной области или константной области. Модификация может приводить к изменению заряда молекулы. Модификация, как правило, как не приводит к изменению связывания антигена, функции, биоактивности, так и не влияет на фармакокинетические (PK) или фармакодинамические (PD) характеристики связывающего ICOS белка.

Термин "эффекторная функция" в рамках изобретения предназначен для обозначения одного или нескольких из ответов антителозависимой опосредованной клетками цитотоксической активности (ADCC), комплементзависимой цитотоксической активности (CDC), опосредованного Fc фагоцитоза или антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и рециклизации антитела посредством рецептора FcRn.

Считают, что взаимодействие между константной областью антигенсвязывающего белка и различными рецепторами Fc (FcR), включая FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), опосредует эффекторные функции антигенсвязывающего белка. Значительные биологические эффекты могут быть следствием эффекторной функциональности. Как правило, способность опосредовать эффекторную функцию требует связывания антигенсвязывающего белка с антигеном, и не все антигенсвязывающие белки могут опосредовать каждую эффекторную функцию.

Эффекторную функцию можно измерять рядом способом, включая, например, связывание с FcγRIII на клетках естественных киллерах или с FcγRI на моноцитах/макрофагах для измерения эффекторной функции ADCC/ADCP. Например, можно оценивать эффекторную функцию в ADCC антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению в анализе клеток естественных киллеров. Практические способы для оценки функции ADCC и /или CDC можно обнаружить в (Kellner C. et al., "Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions", Methods, 1; 65 (1): 105-13 (2014)).

Некоторые изотипы человеческих константных областей, в частности изотипы IgG4 и IgG2, обладают уменьшенной функцией a) активации комплемента по классическому пути; и b) антителозависимой клеточной цитотоксичности. Можно осуществлять различные модификации константной области тяжелой цепи антигенсвязывающих белков в зависимости от желательных эффекторных свойств. Отдельно описано, что константные области IgG1, содержащие конкретные мутации, уменьшают связывание с рецепторами Fc и таким образом, уменьшают ADCC и CDC. (Kellner C. et al., "Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions", Methods, 1; 65 (1): 105-13 (2014)).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения представлен антигенсвязывающий белок, содержащий такую константную область, что антигенсвязывающий белок обладает уменьшенной ADCC и/или активацией комплемента, или эффекторной функциональностью. В одном таком варианте осуществления константная область тяжелой цепи может содержать естественным образом лишенную функциональности константную область изотипа IgG2 или IgG4, или мутантную константную область IgG1. Один пример включает замену остатков аланина в положениях 235 и 237 (нумерация по индексу EU).

Подкласс антитела частично определяет вторичные эффекторные функции, такие как активация комплемента или связывание с рецептором Fc (FcR) и антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) (Huber, et al., Nature 229(5284): 419-20 (1971); Brunhouse, et al., Mol Immunol 16(11): 907-17 (1979)). При идентификации оптимального типа антитела для конкретного применения, эффекторные функции антител можно принимать во внимание. Например, антитела hIgG1, обладающие относительно долгим временем полужизни, являются очень эффективными в фиксации комплемента, и они связывают как FcγRI, так и FcγRII. В отличие от этого, человеческие антитела IgG4 обладают более коротким временем полужизни, не фиксируют комплемент и обладают более низкой аффинностью для FcR. Замена серина 228 на пролин (S228P) в области Fc IgG4 уменьшает гетерогенность, наблюдаемую для hIgG4, и продлевает время полужизни в сыворотке (Kabat, et al., "Sequences of proteins of immunological interest" 5.sup.th Edition (1991); Angal, et al., Mol Immunol 30(1): 105-8 (1993)). Вторая мутация, заменяющая лейцин 235 на глутаминовую кислоту (L235E), исключает остаточную активность связывания FcR и связывания комплемента (Alegre, et al., J Immunol 148(11): 3461-8 (1992)). Полученное антитело с обеими мутациями обозначают как IgG4PE. Нумерация аминокислот hIgG4 получена из ссылки на нумерацию EU: Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969). PMID: 5257969. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающие белки для ICOS, содержащие область Fc IgG4, содержащую замены S228P и L235E, могут иметь обозначение IgG4PE. Таким образом, связывающий ICOS белок, обладающий вариабельной областью тяжелой цепи H2 и вариабельной областью легкой цепи L5, и областью Fc IgG4PE, можно обозначать как H2L5 IgG4PE, или синонимично, как H2L5 hIgG4PE.

Усиление ADCC/CDC.

Как известно в данной области, известны различные способы, увеличивающие активность ADCC и/или CDC антитела. Они включают, но без ограничения, различные мутации в области Fc, технологии Complegent и Potelligent. В одном аспекте настоящего изобретения один или несколько способов усиления ADCC/CDC можно применять для связывающих ICOS белков по настоящему изобретению.

Мутация.

Описано также, что человеческие константные области IgG1, содержащие конкретные мутации или измененное гликозилирование остатка Asn297, усиливают связывание с рецепторами Fc. В некоторых случаях, показано также, что эти мутации усиливают ADCC и CDC, см., например, Kellner (2013).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, такие мутации присутствуют в одном или нескольких положениях, выбранных из 239, 332 и 330 (IgG1), или в эквивалентных положениях в других изотипах IgG. Примерами подходящих мутаций являются S239D и I332E, и A330L. В одном варианте осуществления в антигенсвязывающий белок по изобретению, описанный в настоящем описании, вносят мутации в положениях 239 и 332, например S239D и I332E, или в следующем варианте осуществления, в него вносят мутации в трех или более положениях, выбранных из 239 и 332, и 330, например S239D и I332E, и A330L (нумерация по индексу EU).

Complegent.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения представлен антигенсвязывающий белок, содержащий химерную константную область тяжелой цепи, например антигенсвязывающий белок, содержащий химерную константную область тяжелой цепи по меньшей мере с одним доменом CH2 из IgG3, такой, что антигенсвязывающий белок обладает усиленной эффекторной функцией, например, когда он обладает усиленной функцией ADCC или усиленной функцией CDC, или усиленными функциями ADCC и CDC.

В одном таком варианте осуществления, антигенсвязывающий белок может содержать один домен CH2 из IgG3, или оба домена CH2 могут происходить из IgG3.

Представлен также способ получения антигенсвязывающего белка по изобретению, включающий в себя стадии:

a) культивирования рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей экспрессирующий вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем описании, где экспрессирующий вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую домен Fc, обладающий аминокислотными остатками домена Fc как IgG1, так и IgG3; и

b) выделения антигенсвязывающего белка.

Такие способы получения антигенсвязывающих белков можно осуществлять, например, с использованием системы технологий COMPLEGENT™, доступной из BioWa, Inc. (Princeton, NJ) и Kyow Hakko Kogyo (в настоящее время, Kyow Hakko Kirin Co., Ltd.) Co., Ltd., в которой рекомбинантная клетка-хозяин содержит экспрессирующий вектор, в котором последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный домен Fc, обладающий аминокислотными остатками домена Fc как IgG1, так и IgG3, экспрессируется для получения антигенсвязывающего белка, обладающего усиленной активностью комплементзависимой цитотоксичности (CDC), увеличенной по сравнению с идентичным в ином отношении антигенсвязывающим белком, лишенным такого химерного домена Fc. Аспекты системы технологий COMPLEGENT™ описаны в WO2007011041 и US20070148165, содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки. В альтернативном варианте осуществления активность CDC можно увеличивать посредством введения специфических для последовательности мутаций в область Fc цепи IgG. Специалисту в данной области известны также другие подходящие системы.

Potelligent.

Настоящее изобретение также относится к способу получения антигенсвязывающего белка по изобретению, включающему в себя стадии:

a) культивирования рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей экспрессирующий вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем описании, где ген FUT8, кодирующий альфа-1,6-фукозилтрансферазу, инактивирован в рекомбинантной клетке-хозяине; и

b) выделения антигенсвязывающего белка.

Такие способы получения антигенсвязывающих белков можно осуществлять, например, с использованием системы технологий POTELLIGENT™, доступной из BioWa, Inc. (Princeton, NJ), в которой клетки CHOK1SV, лишенные функциональной копии гена FUT8, продуцируют моноклональные антитела, обладающие усиленной активностью антителозависимой опосредованной клетками цитотоксичности (ADCC), увеличенной по сравнению с идентичным моноклональным антителом, продуцированным в клетке с функциональным геном FUT8. Аспекты системы технологий POTELLIGENT™ описаны в US7214775, US6946292, WO0061739 и WO0231240, содержание всех из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Специалисту в данной области известны также другие подходящие системы.

Специалисту в данной области очевидно, что такие модификации можно использовать не только отдельно, но можно использовать в комбинации друг с другом для дополнительного усиления эффекторной функции.

В одном таком варианте осуществления настоящего изобретения представлен антигенсвязывающий белок, содержащий константную область тяжелой цепи, который содержит мутантную и химерную константную область тяжелой цепи, например, где антигенсвязывающий белок содержит по меньшей мере

один домен CH2 из IgG3 и один домен CH2 из IgG1, где домен CH2 IgG1 обладает одной или несколькими мутациями в положениях, выбранных из 239 и 332, и 330 (например, мутации могут быть выбраны из S239D и I332E и A330L), так что антигенсвязывающий белок обладает усиленной эффекторной функцией, например, где он обладает одной или несколькими из следующих функций, усиленной ADCC или усиленной CDC, например где он обладает усиленной ADCC и усиленной CDC. В одном варианте осуществления домен CH2 IgG1 обладает мутациями S239D и I332E.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения представлен антигенсвязывающий белок, который содержит химерную константную область тяжелой цепи и который обладает измененным профилем гликозилирования. В одном таком варианте осуществления константная область тяжелой цепи содержит по меньшей мере один домен CH2 из IgG3 и один домен CH2 из IgG1, и обладает измененным профилем гликозилирования, таким что отношение фукозы к маннозе составляет 0,8:3 или менее, например, где антигенсвязывающий белок является дефукозилированным, так что указанный антигенсвязывающий белок обладает усиленной эффекторной функцией по сравнению с эквивалентным антигенсвязывающим белком с константной областью тяжелой цепи иммуноглобулина, лишенной указанных мутаций и измененного профиля гликозилирования, например, где он обладает одной или несколькими из следующих функций, усиленной ADCC или усиленной CDC, например, где он обладает усиленной ADCC и усиленной CDC В альтернативном варианте осуществления антигенсвязывающий белок обладает по меньшей мере одним доменом CH2 IgG3 и по меньшей мере одним константным доменом тяжелой цепи из IgG1, где в оба домена CH2 IgG внесены мутации в соответствии с ограничениями, описанными в настоящем описании.

В одном аспекте по изобретению представлен способ получения антигенсвязывающего белка по изобретению, описанного в настоящем описании, включающий в себя стадии:

a) культивирования рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей экспрессирующий вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем описании, где указанный экспрессирующий вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты Fc, кодирующую химерный домен Fc, обладающий аминокислотными остатками домена Fc как IgG1, так и IgG3, и где ген FUT8, кодирующий альфа-1,6-фукозилтрансферазу, инактивирован в рекомбинантной клетке-хозяине; и

b) выделения антигенсвязывающего белка.

Такие способы получения антигенсвязывающих белков можно осуществлять, например, с использованием системы технологий ACCRETAMAB™, доступной из BioWa, Inc. (Princeton, NJ), в которой скомбинированы системы технологий POTELLIGENT™ и COMPLEGENT™ для получения антигенсвязывающего белка, обладающего усиленной активностью как ADCC, так и CDC, увеличенной по сравнению с идентичным в ином отношении моноклональным антителом, лишенным химерного домена Fc и обладающим фукозой на олигосахариде.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения представлен антигенсвязывающий белок, содержащий мутантную и химерную константную область тяжелой цепи, где указанный антигенсвязывающий белок обладает измененным профилем гликозилирования, таким что антигенсвязывающий белок обладает усиленной эффекторной функцией, например, где он обладает одной или несколькими из следующих функций, усиленной ADCC или усиленной CDC. В одном варианте осуществления мутации выбраны из положений 239 и 332, и 330, например мутации выбраны из S239D и I332E, и A330L. В следующем варианте осуществления константная область тяжелой цепи содержит по меньшей мере один домен CH2 из IgG3 и один домен Ch2 из IgG1. В одном варианте осуществления константная область тяжелой цепи обладает измененным профилем гликозилирования, таким что отношение фукозы к маннозе составляет 0,8:3 или менее, например антигенсвязывающий белок является дефукозилированным, так что указанный антигенсвязывающий белок обладает усиленной эффекторной функцией по сравнению с эквивалентным нехимерным антигенсвязывающим белком или с константной областью тяжелой цепи иммуноглобулина, лишенной указанных мутаций и измененного профиля гликозилирования.

Опубликовано, что длительное время полужизни антител IgG зависит от его связывания с FcRn. Таким образом, замены, увеличивающие аффинность связывания IgG с FcRn при pH 6,0 при сохранении зависимости взаимодействия от pH посредством конструирования константной области, интенсивно изучали в Kuo and Aveson (2011).

Другие способы модификации антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению включают увеличение времени полужизни таких белков посредством модификации константного домена или связывающего FcRn (неонатальный рецептор Fc) домена иммуноглобулина.

У взрослых млекопитающих, FcRn, известный также как неонатальный рецептор Fc, играет ключевую роль в поддержании уровней антител в сыворотке посредством действия в качестве защитного рецептора, который связывает и спасает антитела изотипа IgG от деградации. Молекулы IgG подвергаются эндоцитозу посредством эндотелиальных клеток, и если они связываются с FcRn, они подвергаются рециклизации в кровоток. В отличие от этого, молекулы IgG, которые не связываются с FcRn, входят в клетки и являются мишенью для лизосомального пути, где они подвергаются деградации.

Считают, что неонатальный рецептор FcRn вовлечен как в выведение антител, так и в трансцитоз антител через ткани, Kuo and Aveson, (2011). Остатки человеческого IgG1, как определено, взаимодействующие непосредственно с FcRn человека, включают Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 и His435. Переключение в одном из этих положений, описанных в этом разделе, может обеспечивать увеличенное время полужизни в сыворотке и/или измененные эффекторные свойства антигенсвязывающих белков по изобретению.

Мутации для увеличения времени полужизни посредством увеличения аффинности для FcRn.

Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению могут обладать модификациями одной или нескольких аминокислот, которые увеличивают аффинность константного домена или его фрагмента для FcRn. Это может приводить к увеличенному времени полужизни этих белков, Kuo and Aveson (2011). Увеличение времени полужизни терапевтических и диагностических IgG и других биоактивных молекул обладает множеством преимуществ, включая уменьшенные количество и/или частоту дозирования этих молекул. В одном варианте осуществления, таким образом, представлен антигенсвязывающий белок по изобретению, представленный в настоящем описании, или слитый белок, содержащий весь или часть (связывающую FcRn часть) константного домена IgG, обладающего одной или несколькими модификациями аминокислот, и не относящуюся к IgG белковую или небелковую молекулу, конъюгированную с таким модифицированным константным доменом IgG, где присутствие модифицированного константного домена IgG увеличивает время полужизни in vivo антигенсвязывающего белка.

Известен ряд способов, которые могут приводить к увеличенному времени полужизни (Kuo and Aveson (2011)), включая модификации аминокислот, которые можно получать способами, включающими в себя аланиновый сканирующий мутагенез, случайный мутагенез и скрининг для оценки связывания с FcRn и/или поведения in vivo. Вычислительные способы после мутагенеза также можно использовать для выбора одной из мутаций аминокислот для введения.

Настоящее изобретение, таким образом, относится к варианту антигенсвязывающего белка с оптимизированным связыванием с FcRn. В предпочтительном варианте осуществления, указанный вариант антигенсвязывающего белка содержит модификацию по меньшей мере одной аминокислоты в области Fc указанного антигенсвязывающего белка, где указанная модификация выбрана из группы, состоящей из 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 и 447 области Fc, по сравнению с указанным исходным полипептидом, где нумерация аминокислот в области Fc представляет собой нумерацию по индексу EU в Kabat.

В следующем аспекте по изобретению модификации представляют собой M252Y/S254T/T256E.

Кроме того, в различных публикациях описаны способы получения физиологически активных молекул, время полужизни которых модифицировано, см., например, Kontermann (2009), либо посредством введения связывающего FcRn полипептида в молекулы, либо посредством слияния молекул с антителами, аффинность связывания которых с FcRn сохранена, но аффинность которых для других рецепторов Fc сильно уменьшена, либо посредством слияния со связывающими FcRn доменами антител.

Способ переключения посредством pH для увеличения времени полужизни.

Хотя замены в константной области способны значительно улучшать функции терапевтических антител IgG, замены в строго консервативной константной области в сумме обладают риском иммуногенности, и замены в высоко разнообразной последовательности вариабельной области могут являться менее иммуногенными. Сообщения относительно вариабельной области включают конструирование остатков CDR для улучшения аффинности связывания с антигеном и конструирование остатков CDR и каркасных остатков для улучшения стабильности и уменьшения риска иммуногенности. Как известно, улучшенной аффинности для антигена можно достигать посредством аффинного созревания с использованием фагового или рибосомного дисплея рандомизированной библиотеки.

Улучшенную стабильность можно достигать рациональным образом посредством рационального дизайна на основе последовательности и структуры. Уменьшенного риска иммуногенности (деиммунизации) можно достигать посредством различных способов гуманизации и удаления Т-клеточных эпитопов, которые можно предсказывать с использованием способов in silico или определять посредством анализов in vitro. Кроме того, были сконструированы вариабельные области для снижения pI. Более длительное время полужизни наблюдали для этих антител по сравнению с антителами дикого типа, несмотря на сравнимое связывание FcRn. Антитела с зависимым от pH связыванием антигена конструируют или отбирают для модификации времени полужизни антитела и/или антигена, например время полужизни антитела IgG2 может быть укорочено, если механизмы опосредованного антигеном выведения в норме осуществляют деградацию антитела при связывании с антигеном. Подобным образом, комплекс антиген:антитело может влиять на время полужизни антигена, либо продлевая время полужизни посредством защиты антигена от типичных процессов деградации, либо сокращая время полужизни посредством опосредованной антителом деградации. Один вариант осуществления относится к антителам с более высо-

кой аффинностью для антигена при pH 7,4 по сравнению с эндосомальным pH (т.е. pH 5,5-6,0), так что отношение KD при pH 5,5/7,4 или при pH 6,0/7,4 составляет 2 или более. Например, для улучшения фармакокинетических (PK) и фармакодинамических (PD) свойств антитела можно модифицировать чувствительное к pH связывание антитела посредством введения остатков гистидина в остатки CDR.

Кроме того, представлены также способы получения антигенсвязывающего белка с уменьшенным биологическим временем полужизни. Вариант IgG, в котором His435 подвергают мутации до аланина, обеспечивает избирательную потерю связывания FcRn и значительно уменьшает время полужизни в сыворотке (см., например, US6165745, где описан способ получения антигенсвязывающего белка с уменьшенным биологическим временем полужизни посредством введения мутации в фрагмент ДНК, кодирующей антигенсвязывающий белок. Мутация включает замену аминокислоты в положении 253, 310, 311, 433 или 434 шарнирного домена Fc.

Линкеры.

Белковые остовы могут являться такими же, как природные последовательности, такие как последовательности Ig, или могут представлять собой фрагменты природных последовательностей, и могут содержать дополнительные последовательности, которые могут являться природными, происходящими из другого источника, или синтетическими, и которые можно добавлять на N- или C-конце остова. Такие дополнительные последовательности можно рассматривать как линкеры, когда они связывают эпитопсвязывающий домен и белковый остов, такие, как определено в настоящем описании.

В другом аспекте антигенсвязывающая конструкция состоит из, или в основном состоит из области Fc антитела, или его части, связанной с каждого конца, напрямую или опосредовано (например, посредством линкерной последовательности), с эпитопсвязывающим доменом. Такая антигенсвязывающая конструкция может содержать 2 эпитопсвязывающих домена, разделенных областью Fc, или ее частью. Под разделением понимают, что эпитопсвязывающие домены не являются напрямую связанными друг с другом, и в одном аспекте локализованы на противоположных концах (C- и N-конце) области Fc, или любой другой каркасной области.

В одном аспекте антигенсвязывающая конструкция содержит 2 каркасных области, где каждая связана с 2 эпитопсвязывающими доменами, например, на N- и C-конце каждой каркасной области, либо напрямую, либо опосредовано через линкер.

Белковые остовы по настоящему изобретению можно связывать с эпитопсвязывающими доменами посредством использования линкеров. Примеры пригодных линкеров включают аминокислотные последовательности, которые могут иметь длину от 1 до 150 аминокислот, или от 1 до 140 аминокислот, например от 1 до 130 аминокислот, или от 1 до 120 аминокислот, или от 1 до 80 аминокислот, или от 1 до 50 аминокислот, или от 1 до 20 аминокислот, или от 1 до 10 аминокислот, или от 5 до 18 аминокислот. Такие последовательности могут обладать своей собственной третичной структурой, например линкер по настоящему изобретению может содержать одиночный вариабельный домен. Размер линкера в одном варианте осуществления является эквивалентным одиночному вариабельному домену. Пригодные линкеры могут иметь размер от 1 до 100 ангстрем, например могут иметь размер от 20 до 80 ангстрем или, например, могут иметь размер от 20 до 60 ангстрем или, например, менее 40 ангстрем, или менее 20 ангстрем, или менее 5 ангстрем в длину.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к связывающим ICOS белкам, содержащим один или несколько из CDRH1, как указано в SEQ ID NO:1; CDRH2, как указано в SEQ ID NO:2; CDRH3, как указано в SEQ ID NO:3; CDRL1, как указано в SEQ ID NO:4; CDRL2, как указано в SEQ ID NO:5, и/или CDRL3, как указано в SEQ ID NO:6 или прямого эквивалента каждой CDR, где прямой эквивалент имеет не более двух замен аминокислот в указанной CDR.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения представленные связывающие ICOS белки, которые специфически связываются с ICOS человека, содержащие домен V_H, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:7, и/или домен V_L, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:8. В одном аспекте связывающие ICOS белки по настоящему изобретению, связывают также ICOS яванского макака. В одном аспекте они не связывают мышиный ICOS.

В одном варианте осуществления связывающие ICOS белки по изобретению являются агонистами ICOS. В одном аспекте связывающие ICOS белки увеличивают продукцию IFN-γ в присутствии T-клеток. В другом аспекте связывающие ICOS белки по настоящему изобретению стимулируют пролиферацию T-клеток.

В одном варианте осуществления связывающий ICOS белок по изобретению связывается с ICOS человека с константой скорости связывания (kon) по меньшей мере 1×10^5 $M^{-1}c^{-1}$ и константой скорости диссоциации (koff) менее 6×10^{-5} c^{-1} или константой диссоциации (Kd) менее 100 нМ, где высокую аффинность измеряют посредством Biacore.

В одном варианте осуществления связывающий ICOS белок содержит CDRH3 (SEQ ID NO:3) или вариант SEQ ID NO. 3. В другом варианте осуществления связывающие ICOS белки содержат один или

несколько из CDRH1 (SEQ ID NO:1); CDRH2 (SEQ ID NO:2); CDRH3 (SEQ ID NO:3); CDRL1 (SEQ ID NO:4); CDRL2 (SEQ ID NO:5) и/или CDRL3 (SEQ ID NO:6). В одном варианте осуществления связывающие ICOS белки содержат CDR тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, и CDR легкой цепи, как указано в SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6.

В одном варианте осуществления связывающие ICOS белки содержат домен V_H, обладающий 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:7; и домен V_L, обладающий 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:8. В одном аспекте связывающие ICOS белки содержат домен V_H, обладающий аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO.7, и домен V_L, содержащий аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO:8. В одном аспекте связывающие ICOS белки содержат вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO:7. В одном аспекте связывающий ICOS белок содержит вариабельный домен легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO:8.

В одном варианте осуществления изобретение относится к связывающему ICOS белку или его антигенсвязывающей части, содержащим домен V_H, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:7; и домен V_L, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO:8, где указанный связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть специфически связывается с ICOS человека. В одном варианте осуществления связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть, содержащие домен V_H, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:7; и домен V_L, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO:8, где указанный связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть, специфически связывающиеся с ICOS человека, дополнительно содержит CDR тяжелой цепи, обладающие аминокислотными последовательностями, указанными в SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, и CDR легкой цепи, обладающие аминокислотными последовательностями, указанными в SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6. В одном аспекте связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть содержит домен V_H, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:7; и домен V_L содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:8. В одном варианте осуществления связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть является агонистом ICOS человека. В одном варианте осуществления связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть дополнительно содержит остов изотипа IgG4 или его вариант. В одном варианте осуществления связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть содержит остов hIgG4PE.

В одном варианте осуществления связывающий ICOS белок по настоящему изобретению представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, содержащее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:23.

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGLISIYSDHTN
YNQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYGWYFDVWGQGTTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSLGK (SEQ ID NO:23)

В одном варианте осуществления связывающий ICOS белок по настоящему изобретению представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, содержащее аминокислотную последовательность легкой цепи, обладающую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:24.

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPA
RFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCFQGSGYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:24)

В одном варианте осуществления связывающий ICOS белок по настоящему изобретению представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, содержащее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO:23, и аминокислотную последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO:24. В одном варианте осуществления связывающий ICOS белок по настоящему изобретению дополнительно содержит остов hIgGPE.

В одном варианте осуществления, представлен связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть, где указанный связывающий ICOS белок представляет собой гуманизированное моноклональное антитело. Настоящее изобретение относится также к фармацевтическим композициям, содержащим связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающую часть в соответствии с формулой изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение относится к способам лечения заболевания, выбранного из злокачественной опухоли, инфекционного заболевания и/или сепсиса у нуждающегося в этом человека, где способ включает стадию введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению указанному человеку. В одном аспекте, способ дополнительно включает введение по меньшей мере одного антинеопластического средства, по меньшей мере одного второго иммуномодулирующего средства и/или по меньшей мере одного иммуностимулирующего адъюванта указанному человеку. В одном аспекте, второе иммуномодулирующее средство выбрано из: антитела против CTLA4 и антитела против PD-1, антитела против PDL1 и антитела против OX40. В одном аспекте антитело против CTLA4 представляет собой ипилимумаб. В одном аспекте, антитело против PD-1 выбрано из пембролизумаба и/или ниволумаба.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли у человека, включающим введение терапевтически приемлемого количества связывающего ICOS белка или его антигенсвязывающей части человеку. В некоторых аспектах злокачественная опухоль выбрана из колоректального рака (CRC), рака пищевода, шейки матки, мочевого пузыря, молочной железы, головы и шеи, яичников, меланомы, почечноклеточного рака (RCC), плоскоклеточной EC, немелкоклеточной карциномы легких, мезотелиомы и рака предстательной железы.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения инфекционного заболевания у человека, включающим введение терапевтически приемлемого количества связывающего ICOS белка или его антигенсвязывающей части человеку. В одном аспекте инфекционное заболевание представляет собой HIV.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения сепсиса у человека, включающим введение терапевтически приемлемого количества связывающего ICOS белка или его антигенсвязывающей части человеку.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам стимуляции пролиферации Т-клеток, включая активацию Т-клеток и/или индукцию продукции цитокинов у человека, включающим введение фармацевтической композиции по изобретению указанному человеку.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающую часть по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим полинуклеотиды, кодирующие связывающие ICOS белки или их антигенсвязывающие части по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также относится к способам получения связывающего ICOS белка или его антигенсвязывающей части, включающим стадии a) культивирования клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, кодирующий связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающую часть по настоящему изобретению, в подходящих условиях для экспрессии указанного связывающего ICOS белка или его антигенсвязывающей части; и b) выделения указанного связывающего ICOS белка или его антигенсвязывающей части.

Настоящее изобретение относится к выделенному гуманизированному моноклональному антителу, содержащему домен V_H, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:7; домен V_L, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:8; и остов hIgG4 или его вариант. В одном аспекте остов hIgG4 представляет собой hIgG4PE.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к связывающим ICOS белкам или их антигенсвязывающим частям, где связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть проявляют перекрестную конкуренцию за связывание с ICOS человека с эталонным антителом или его антигенсвязывающей частью, содержащими домен V_H, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:7; и домен V_L, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:8.

В одном варианте осуществления связывающие ICOS белки по изобретению стимулируют пролиферацию Т-клеток при приведении в контакт с Т-клетками. В одном варианте осуществления связывающие ICOS белки по изобретению индуцируют активацию Т-клеток при приведении в контакт с Т-клетками. Активацию Т-клеток можно измерять по увеличению в процентах уровней экспрессии конкретных маркеров активации, таких как, но без ограничения, CD69, CD25 и/или OX40. В одном варианте осуществления связывающие ICOS белки по настоящему изобретению стимулируют продукцию цитокинов при приведении в контакт с Т-клетками.

Связывающие ICOS белки связываются с FcγRIIb человека, но не связываются с FcγRII человека или с FcγRIIIa человека. Кроме того, связывающие ICOS белки подходящим образом не истощают экспрессирующие ICOS Т-клетки при приведении в контакт с экспрессирующими ICOS Т-клетками. В некоторых аспектах, связывающие ICOS белки перекрестно связывают Т-клетку с второй клеткой при приведении в контакт с указанной Т-клеткой в присутствии второй клетки. Это перекрестное связывание мо-

жет происходить посредством привлечения связывающего ICOS белка с помощью FcγR на второй клетке. Экспрессирующие FcγR клетки включают, но без ограничения, моноциты, В-лимфоциты, фоликулярные дендритные клетки, клетки естественные киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и тучные клетки.

Таким образом, в одном варианте осуществления связывающие ICOS белки можно вводить млекопитающему, где связывающий ICOS белок может действовать как агонист ICOS на Т-клетки и может также привлекать FcγR на второй клетке.

В одном варианте осуществления связывающие ICOS белки содержат остов, выбранный из изотипа IgG1 человека или его варианта и изотипа IgG4 человека или его варианта. Подходящим образом, остов содержит изотип IgG4 человека или его вариант. В одном аспекте остов содержит остов hIgG4PE.

В одном варианте осуществления, связывающий ICOS белок представляет собой моноклональное антитело. Пригодный связывающий ICOS белок представляет собой гуманизированное моноклональное антитело. В одном аспекте моноклональные антитела по настоящему изобретению могут являться полностью человеческими.

В другом аспекте связывающий ICOS белок представляет собой фрагмент, представляющий собой Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, диатело, триотело, тетратело, миниантитело, минитело, выделенный V_H или выделенный V_L. В одном варианте осуществления связывающий ICOS белок представляет собой его антиген-связывающую часть.

В некоторых аспектах связывающий ICOS белок связывается с ICOS человека с аффинностью сильнее чем 0,6 нМ. В одном аспекте аффинность составляет 100 нМ или сильнее. В одном варианте осуществления связывающий ICOS белок обладает KD 100 нМ для ICOS. Подходящим образом, KD связывающего ICOS белка для ICOS составляет 100, 50, 25, 10, 2 или 1 нМ или менее.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированным моноклональным антителам, являющимися агонистами для ICOS человека. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированным моноклональным антителам, содержащим CDR вариабельной области тяжелой цепи, обладающие аминокислотными последовательностями, указанными в SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, и CDR вариабельной области легкой цепи, обладающие аминокислотными последовательностями, указанными в SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6. В одном аспекте гуманизированное моноклональное антитело является способным стимулировать продукцию цитокинов и/или пролиферацию Т-клеток при приведении в контакт с Т-клетками, в то же время не индуцируя комплемент, ADCC или CDC. В одном варианте осуществления гуманизированное моноклональное антитело обладает вариантом области Fc IgG1 человека. В одном варианте осуществления гуманизированное моноклональное антитело обладает областью Fc IgG4 человека или ее вариантом. В одном варианте осуществления гуманизированное моноклональное антитело обладает областью Fc hIgG4PE Fc. В одном аспекте гуманизированное моноклональное антитело содержит домен V_H, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO:7; и домен V_L, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO:8. В одном аспекте, гуманизированное моноклональное антитело содержит домен V_H, содержащий аминокислотную последовательность, указанной в SEQ ID NO:7; и домен V_L, содержащий аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO:8. В одном аспекте гуманизированное моноклональное антитело содержит остов hIgG4PE. Более того, показано, что гуманизированные моноклональные антитела по настоящему изобретению стимулируют пролиферацию Т-клеток при приведении в контакт с CD4+ или CD8+ Т-клетками. Показано, что гуманизированные моноклональные антитела по настоящему изобретению индуцируют активацию Т-клеток и стимулируют продукцию цитокинов.

В одном варианте осуществления гуманизированное моноклональное антитело содержит остов hIgG4PE и содержит V_H домен, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:7 и домен V_L, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:8. Антитела по настоящему изобретению могут стимулировать продукцию цитокинов при приведении в контакт с Т-клетками.

В одном варианте осуществления представлен связывающий ICOS белок, конкурирующий за связывание с ICOS с любым из связывающих ICOS белков по изобретению. Как понятно в данной области и описано в настоящем описании, конкуренцию за связывание можно измерять посредством сравнения конкуренции со связыванием лиганда с ICOS в присутствии одного или нескольких связывающих ICOS белков. Как также известно в данной области, ICOS экспрессируется на CD4+ и CD8+ Т-клетках так же, как на клетках Treг. Связывающие ICOS белки по настоящему изобретению действуют как агонист ICOS на Т-клетки. Они действуют также для блокирования взаимодействия между ICOS-L и ICOS, экспрессированных как на Т-клетках, так и на клетках Treг. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам блокирования взаимодействия ICOS-L с ICOS на клетках Treг. Экспрессирующие ICOS клетки Treг можно обнаружить на различных типах опухолей, включая гемобластозы, такие как лимфома. Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к

способам лечения злокачественных опухолей, включающим введение связывающего ICOS белка по изобретению, где связывающий ICOS белок блокирует взаимодействие ICOS-L с ICOS на клетках Treг.

Кроме того, изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим связывающий ICOS белок или моноклональное антитело, описанные в настоящем описании. В одном аспекте фармацевтическая композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит по меньшей мере одно антинеопластическое средство. В одном аспекте фармацевтическая композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит по меньшей мере одно второе иммуномодулирующее средство. В одном аспекте фармацевтическая композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один иммуностимулирующий адъювант.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли и/или инфекционного заболевания у человека, где указанный способ включает стадию введения фармацевтической композиции по изобретению указанному человеку. В одном варианте осуществления человек имеет злокачественную опухоль. В одном варианте осуществления человек имеет инфекционное заболевание. В одном варианте осуществления человек имеет HIV. В одном аспекте способ дополнительно включает введение по меньшей мере одного антинеопластического средства указанному человеку. В другом аспекте способ дополнительно включает введение по меньшей мере одного второго иммуномодулирующего средства указанному человеку. В другом аспекте способ дополнительно включает введение иммуностимулирующего адъюванта указанному человеку.

В одном аспекте человек имеет солидную опухоль. В одном аспекте опухоль выбрана из рака головы и шеи, рака желудка, меланомы, почечноклеточного рака (RCC), рака пищевода, немелкоклеточной карциномы легких, рака предстательной железы, колоректального рака, рака яичника и рака поджелудочной железы. В одном аспекте человек имеет одно или несколько из следующего: колоректального рака (CRC), рака пищевода, шейки матки, мочевого пузыря, молочной железы, головы и шеи, яичников, меланомы, почечноклеточного рака (RCC), плоскоклеточной EC, немелкоклеточной карциномы легких, мезотелиомы и рака предстательной железы. В другом аспекте человек имеет гемобластоз, такой как диффузная крупноклеточная B-клеточная лимфома (DLBCL), множественная миелома, хронический лимфобластный лейкоз (CLL), фолликулярная лимфома, острый миелоидный лейкоз и хронический миелогенный лейкоз.

Настоящее описание относится также к способу лечения или уменьшения тяжести злокачественной опухоли, выбранной из злокачественных опухолей головного мозга (глиом), глиобластом, синдрома Банаяна-Зонана, болезни Каудена, болезни Лермитта-Дюкло, рака молочной железы, воспалительного рака молочной железы, опухоли Вильмса, саркомы Юинга, рабдомиосаркомы, эпендимомы, медуллобластомы, злокачественных опухолей толстой кишки, головы и шеи, почки, легкого, печени, меланомы, яичника, поджелудочной железы, предстательной железы, саркомы, остеосаркомы, гигантоклеточной опухоли кости, рака щитовидной железы, лимфобластного Т-клеточного лейкоза, хронического миелогенного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, волосатоклеточного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, острого миелогенного лейкоза, хронического нейтрофильного лейкоза, острого лимфобластного Т-клеточного лейкоза, плазмацитомы, иммунобластного крупноклеточного лейкоза, лейкоза из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, мегакариобластного лейкоза, множественной миеломы, острого мегакариобластного лейкоза, промиелоцитарного лейкоза, эритролейкоза, злокачественной лимфомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, лимфобластной Т-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта, фолликулярной лимфомы, нейробластомы, рака мочевого пузыря, уротелиального рака, рака легкого, рака женских наружных половых органов, рака шейки матки, рака эндометрия, рака почки, мезотелиомы, рака пищевода, злокачественной опухоли слюнных желез, печеночноклеточного рака, рака желудка, назофарингеального рака, злокачественной опухоли щеки, злокачественной опухоли ротовой полости, GIST (стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта) и рака яичка.

Под термином "лечение" и его грамматическими вариантами в рамках изобретения понимают терапевтическое лечение. По отношению к конкретному состоянию лечение означает: (1) облегчение или предотвращение состояния или одного или нескольких биологических проявлений состояния, (2) создание помех для (a) одной или нескольких точек в биологическом каскаде, приводящем к состоянию или ответственном за состояние, или (b) одного или нескольких биологических проявлений состояния, (3) облегчение одного или нескольких из симптомов, эффектов или побочных эффектов, ассоциированных с состоянием или его лечением, (4) замедление прогрессирования состояния или одного или нескольких биологических проявлений состояния, и/или (5) излечение указанного состояния или одного или нескольких биологических проявлений состояния посредством прекращения или уменьшения до не поддающихся детекции уровней одного или нескольких биологических проявлений состояния на период времени, рассматриваемый как состояние ремиссии для этого проявления без дополнительного лечения в течение периода ремиссии. Специалисту в данной области понятна продолжительность времени, которое можно рассматривать как ремиссию для конкретного заболевания или состояния. Профилактическое лечение также предусматривают таким образом. Специалисту в данной области понятно, что "предотвращение" не является абсолютным термином. В медицине "предотвращение" понимают как относящееся к профилактическому введению лекарственного средства для значительного уменьшения вероятности или

тяжести состояния или его биологического проявления, или для задержки начала такого состояния или его биологического проявления. Профилактическое лечение является пригодным, например, когда субъекта считают подверженным высокому риску развития злокачественной опухоли, например, когда субъект имеет отягощенный семейный анамнез злокачественных опухолей или когда субъект подвергается воздействию канцерогена.

В рамках изобретения термины "злокачественная опухоль", "неоплазия" и "опухоль" используют взаимозаменяемо и, в форме либо единственного, либо множественного числа, они относятся к клеткам, подвергнутым злокачественной трансформации, что делает их патологическими для организма-хозяина. Первичные клетки злокачественных опухолей можно легко отличать от незлокачественных клеток посредством хорошо разработанных способов, в частности гистологического исследования.

Определение клетки злокачественной опухоли в рамках изобретения включает не только клетку злокачественной опухоли, но и любую клетку, происходящую из предшественника клеток злокачественных опухолей. Они включают метастазирующие клетки злокачественных опухолей и культуры и линии клеток in vitro, происходящие из клеток злокачественных опухолей. По отношению к типу злокачественных опухолей, которые обычно проявляются как солидные опухоли, "поддающаяся клинической детекции" опухоль представляет собой опухоль, которую можно детектировать на основании массы опухоли; например, такими способами, как сканирование компьютерной томографии (CT), магнитно-резонансная томография (MPT), рентгеновский анализ, ультразвуковое исследование или пальпация при физическом обследовании, и/или которую можно детектировать благодаря экспрессии одного или нескольких специфических для злокачественной опухоли антигенов в образце, который можно получать от пациента. Опухоли могут представлять собой гематопоэтические (или гематологические, или связанные с кровью) злокачественные опухоли, например злокачественные опухоли, происходящие из клеток крови или иммуноцитов, которые можно обозначать как "гемобластозы". Конкретные примеры клинических состояний, основанных на гематологических опухолях, включают лейкозы, такие как хронический миелоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз и острый лимфоцитарный лейкоз; злокачественные новообразования плазматических клеток, такие как множественная миелома, MGUS и макроглобулинемия Вальденстрема; лимфомы, такие как неходжскинская лимфома, лимфома Ходжкина; и т.п.

Злокачественная опухоль может представлять собой любую злокачественную опухоль, в которой присутствует аномальное количество бластных клеток или нежелательная пролиферация клеток, или которая диагностирована как гематологическая злокачественная опухоль, включая как лимфоидные, так и миелоидные злокачественные новообразования. Миелоидные злокачественные новообразования включают, но без ограничения, острый миелоидный (или миелоцитарный или миелогенный или миелобластный) лейкоз (недифференцированный или дифференцированный), острый промиелоидный (или промиелоцитарный или промиелогенный или промиелобластный) лейкоз, острый миеломоноцитарный (или миеломонобластный) лейкоз, острый моноцитарный (или монобластный) лейкоз, эритролейкоз и мегакариоцитарный (или мегакариобластный) лейкоз. Эти лейкозы вместе можно обозначать как острый миелоидный (или миелоцитарный, или миелогенный) лейкоз (AML). Миелоидные злокачественные новообразования включают также миелопролиферативные нарушения (MPD), включающие в себя, но без ограничения, хронический миелогенный (или миелоидный) лейкоз (CML), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), эссенциальную тромбоцитемию (или тромбоцитоз) и истинную полицитемию (PCV). Миелоидные злокачественные новообразования включают также миелодисплазию (или миелодиспластический синдром, или MDS), которую можно обозначать как невосприимчивую анемию (RA), невосприимчивую анемию с избытком бластов (RAEB) и невосприимчивую анемию с избытком бластов на стадии трансформации (RAEBT); так же как миелофиброз (MFS) в присутствии или в отсутствие агногенной миелоидной метаплазии.

Гематопоэтические злокачественные опухоли включают также лимфоидные злокачественные новообразования, которые могут поражать лимфатические узлы, селезенку, костный мозг, периферическую кровь и/или экстранодальные участки. Лимфоидные злокачественные опухоли включают В-клеточные злокачественные новообразования, включающие в себя, но без ограничения, В-клеточные неходжскинские лимфомы (B-NHL). B-NHL могут являться индолентными (или обладать низкой степенью злокачественности), обладать промежуточной степенью злокачественности (или являться агрессивными) или обладать высокой степенью злокачественности (являться очень агрессивными). Индолентные В-клеточные лимфомы включают фолликулярную лимфому (FL); мелколимфоцитарную лимфому (SLL); лимфому маргинальной зоны (MZL) включая нодальную MZL, экстранодальную MZL, MZL селезенки и MZL селезенки с ворсинчатыми лимфоцитами; лимфоплазматическую лимфому (LPL) и лимфому лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой (MALT или экстранодальную лимфому маргинальной зоны). B-NHL промежуточной степени злокачественности включают лимфому из клеток мантийной зоны (MCL) с вовлечением или без вовлечения лейкоза, диффузную крупноклеточную лимфому (DLBCL), фолликулярную крупноклеточную лимфому (или лимфому степени 3 или степени 3B) и первичную медиастинальную лимфому (PML). B-NHL высокой степени злокачественности включают лимфому Беркитта (BL), лимфому, подобную лимфоме Беркитта, мелкоклеточную лимфому с нерассечен-

ными ядрами (SNCCL) и лимфобластную лимфому. Другие B-NHL включают иммунобластную лимфому (или иммуноцитому), первичную выпотную лимфому, ассоциированные с HIV (или связанные со СПИД) лимфомы, и посттрансплантационное лимфопролиферативное нарушение (PTLD) или лимфому. В-клеточные злокачественные новообразования включают также, но без ограничения, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), пролимфоцитарный лейкоз (PLL), макроглобулинемию Вальденстрема (WM), волосатоклеточный лейкоз (HCL), лейкоз больших гранулярных лейкоцитов (LGL), острый лимфоидный (или лимфоцитарный или лимфобластный) лейкоз и болезнь Кастлмана. NHL могут включать в себя также Т-клеточные неходжскинские лимфомы (T-NHL), которые включают, но без ограничения, неуточненную Т-клеточную неходжскинскую лимфому (NOS), периферическую Т-клеточную лимфому (PTCL), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL), ангиоиммунобластное лимфоидное нарушение (AILD), лимфому клеток естественных киллеров (NK)/Т-клеток носовой полости, лимфому гамма/дельта-Т-клеток, Т-клеточную лимфому кожи, фунгоидный микоз и синдром Сезари.

Гематопоэтические злокачественные опухоли включают также лимфому (или болезнь) Ходжкина, включая классическую лимфому Ходжкина, нодулярную склерозирующую лимфому Ходжкина, смешанно-клеточную лимфому Ходжкина, лимфому Ходжкина с преобладанием лимфоцитов (LP), нодулярную LP лимфому Ходжкина и лимфому Ходжкина с лимфоидным истощением. Гематопоэтические злокачественные опухоли включают также заболевания или злокачественные опухоли плазматических клеток, такие как множественная миелома (MM), включая вялотекущую MM, моноклональная гаммопатия неопределенного (или неизвестного, или неясного) генеза (MGUS), плазмацитома (кости, экстрамедуллярную), лимфоплазматическая лимфома (LPL), макроглобулинемия Вальденстрема, лейкоз плазматических клеток и первичный амилоидоз (AL). Гематопоэтические злокачественные опухоли могут включать в себя также другие злокачественные опухоли дополнительных гематопоэтических клеток, включая полиморфноядерные лейкоциты (или нейтрофилы), базофилы, эозинофилы, дендритные клетки, тромбоциты, эритроциты и клетки естественные киллеры. Ткани, включающие гематопоэтические клетки, обозначенные в настоящем описании как "ткани гематопоэтических клеток", включают костный мозг; периферическую кровь; тимус; и периферические лимфоидные ткани, такие как ткани селезенки, лимфатические узлы, лимфоидные ткани, ассоциированные со слизистыми оболочками (такие как лимфоидные ткани, ассоциированные с кишечником), ткани миндалин, пейеровых бляшек и аппендикса, и лимфоидные ткани, ассоциированные с другими слизистыми оболочками, например выстилкой бронхов.

Связывающие ICOS белки, антитела и антигенсвязывающие фрагменты по изобретению можно также использовать для излечения, предотвращения или лечения инфекций и инфекционных заболеваний. Связывающие ICOS белки можно использовать отдельно или в комбинации с вакцинами, для стимуляции иммунного ответа на патогены, токсины и собственные антигены. Связывающие ICOS белки по настоящему изобретению можно использовать для стимуляции иммунного ответа на вирусы, инфекционные для человека, такие как, но без ограничения, вирусы иммунодефицита человека, вирусы гепатита класса A, B и C, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус человека, вирусы папилломы человека, вирусы герпеса. Связывающие ICOS белки по настоящему изобретению можно использовать для стимуляции иммунного ответа на инфекции бактериальными или грибковыми паразитами и другими патогенами. Подходящим образом, настоящее изобретение относится к способам лечения людей, подвергшихся воздействию конкретных токсинов или патогенов. Соответственно другой аспект изобретения относится к способу лечения инфекционного заболевания у субъекта, включающему в себя введение субъекту связывающего ICOS белка или его антигенсвязывающей части.

Примеры инфекционного заболевания, при котором можно использовать связывающие ICOS белки по настоящему изобретению, включают, но без ограничения, HIV, гепатит (A, B, и C), грипп, герпес, инфекцию жиардия, малярию, инфекцию Leishmania, Staphylococcus aureus, Pseudomonas Aeruginosa. Некоторые примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, которые можно лечить способами по изобретению, включают HIV, гепатит (A, B или C), вирус герпеса (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, и CMV, вирус Эпштейна-Барр), аденовирус, вирус гриппа, флавивирусы, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, коронавирус, респираторно-синцитиальный вирус, вирус свинки, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус осповакцины, вирус HTLV, вирус Денге, папилломавирус, вирус моллюска, вирус полиомиелита, вирус бешенства, вирус JC и вирус арбовирусного энцефалита.

Некоторые примеры патогенных бактерий, вызывающих инфекции, которые можно лечить способами по изобретению, включают хламидии, риккетсиозные бактерии, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и гонококки, клебсиеллу, протей, серратию, псевдомонады, легионеллы, бактерии, вызывающие дифтерию, сальмонеллы, бациллы, бактерии, вызывающие холеру, столбняк, ботулизм, сибирскую язву, чуму, лептоспироз и болезнь Лайма.

Некоторые примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, которые можно лечить способами по изобретению, включают Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis и т.д.), Cryptococcus neoformans, Aspergillus (fumigatus, niger и т.д.), род Mucorales (mucor, absidia, rhizophus), Sporothrix schenkii, Blastomyces dermatitidis, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis и Histoplasm capsulatum.

Некоторые примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, которые можно лечить способами по изобретению, включают Entamoeba histolytica, Balantidium coli, Naegleriafowleri, виды Acan-

thamoeba, Giardia lambia, виды Cryptosporidium, Pneumocystis carinii, Plasmodium vivax, Babesia microti, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani, Toxoplasma gondi и Nippostrongylus brasiliensis.

Сепсис представляет собой потенциально смертельное медицинское состояние, характеризующееся воспалительным состоянием всего организма (называемым синдромом системного воспалительного ответа или SIRS) и присутствием известной или предполагаемой инфекции. Организм посредством иммунной системы может развивать этот воспалительный ответ на микроорганизмы в крови, моче, легких, коже или других тканях. Просторечным термином для сепсиса является заражение крови, более точно соответствующее септицемии, ниже. Тяжелый сепсис представляет собой системный воспалительный ответ, плюс инфекция, плюс присутствие дисфункции органов.

Септицемия является родственным медицинским термином, относящимся к присутствию патогенных организмов в кровотоке, приводящему к сепсису. Термин не является строго определенным.

Сепсис и злокачественная опухоль разделяют сходные иммуносупрессивные механизмы, включая увеличение количества регуляторных Т-клеток, увеличение количества супрессорных клеток миелоидного происхождения, увеличение экспрессии молекул для отрицательной костимуляции, уменьшение экспрессии HLA-DR на моноцитах/макрофагах. Сепсис и злокачественная опухоль являются прототипическими нарушениями для хронического воспаления. Chronic inflammation stimulates potent and sustained immunoregulatory responses, including expansion of T regulatory клетки and up-regulation of PD-1 and other negative regulators on effector клетки. Barouch D.H. and Deeks S.G.; Immunologic strategies for HIV-1 remission and eradication. Science 345:169-174 2014. Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения представлены способы лечения сепсиса у нуждающегося в этом человека, включающие в себя введение терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего белка для ICOS по настоящему изобретению указанному человеку; Boomer, et al. JAM 306:2594-2605 (2011); Meisel, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. Am J Respir Crit Care Med 180:640-648 (2009) и Hall, et al. Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. Intensive Care Med 37:525-532 (2011).

Связывающие ICOS белки по изобретению можно использовать в сочетании с другими рекомбинантными белками и/или пептидами (такими как антигены опухолей или клетки злокачественных опухолей) для увеличения иммунного ответа на эти белки (т.е. в протоколе вакцинации).

Например, связывающие ICOS белки можно использовать для стимуляции антигенспецифических иммунных ответов посредством совместного введения по меньшей мере одного связывающего ICOS белка с представляющим интерес антигеном (например, вакциной).

Соответственно в другом аспекте изобретение относится к способу усиления иммунного ответа на антиген у субъекта, включающему в себя введение субъекту: (i) антигена и (ii) связывающего ICOS белка по изобретению, так что иммунный ответ на антиген у субъекта усиливается. Антиген может представлять собой, например, антиген опухоли, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген из патоген. Неограничивающие примеры таких антигенов включают, без ограничения, антигены опухолей или антигены из вирусов, бактерий или других патогенов.

Основной трудностью для уничтожения HIV является сохранение латентно инфицированных клеток, не экспрессирующих вирусные антигены, и избегающих иммунного надзора. Современный способ уничтожения латентных вирусных резервуаров, обозначенный как способ "разбудить и уничтожить", имеет целью реактивировать экспрессию гена HIV ("разбудить"), поскольку активация клеток приводит к реактивации HIV, и вывести реактивированные клетки ("уничтожить"). Активация клеток управляется равновесием положительных и отрицательных регуляторов, экспрессированных на поверхности Т-клеток. Изменение этого равновесия посредством агонизма положительных регуляторов и антагонизма отрицательных регуляторов может облегчать реактивацию HIV.

Индуцируемый костимулятор Т-клеток (ICOS) является положительным регулятором, экспрессия которого увеличивается на CD4 Т-клетках после стимуляции. ICOS функционирует для стимуляции пролиферации Т-клеток, продукции цитокинов и дифференцировки Т-клеток. Одной важной подгруппой Т-клеток, которые экспрессируют высокие уровни PD-1 и ICOS, являются фолликулярные Т-клетки-помощники (Tfh). Клетки Tfh помогают В-клеткам подвергаться дифференцировке, переключению классов, соматической гипермутации, и являются необходимыми для формирования зародышевого центра. Клетки Tfh значительно размножаются после инфекции HIV/SIV, и их дисрегуляция в ходе хронической лентивирусной инфекции вносит вклад в нарушенный В-клеточный иммунитет. Показано, что отсортированные клетки Tfh содержат более высокие уровни ДНК HIV, чем другие лимфоидные подгруппы CD4, и наблюдают увеличение количества вируса после стимуляции. Клетки Tfh содержатся в зародышевых центрах и подвергаются воздействию вирионов HIV, удерживаемых на фолликулярных дендритных клетках, которые могут облегчать их инфекцию. Кроме того, CD8 Т-клетки имеют ограниченный доступ к зародышевым центрам, и фолликулярные CD8 клетки часто обладают уменьшенной цитотоксичностью, таким образом, оберегая клетки Tfh от противовирусного надзора. Таким образом, клетки Tfh являются важным защищенным резервуаром HIV, и способы, нацеленные на PD-1 и ICOS, могут избира-

тельно нацеливаться на клетки Tfh и являются полезными в качестве части режима лечения HIV. Подходящим образом, представлены способы лечения человека, инфицированного HIV, включающие в себя введение связывающего ICOS белка или его антигенсвязывающей части по настоящему изобретению.

В рамках изобретения "антигены опухолей" представляют собой белки, продуцируемые клетками опухолей, вызывающие иммунный ответ, в частности опосредованные Т-клетками иммунные ответы. Термин "антиген опухоли" в рамках изобретения включает как опухолеспецифические антигены и опухолеассоциированные антигены. Опухолеспецифические антигены являются уникальными для клеток опухолей и не встречаются на других клетках организма. Опухолеассоциированные антигены не являются уникальными для клеток опухоли, и вместо этого, экспрессируются также на нормальных клетках в условиях, которые не могут индуцировать состояние иммунологической толерантности к антигену. Экспрессия антигена на опухоли может происходить в условиях, позволяющих иммунной системе отвечать на антиген. Опухолеассоциированные антигены могут представлять собой антигены, экспрессируемые на нормальных клетках в ходе развития плода, когда иммунная система является незрелой и неспособной отвечать, или они могут представлять собой антигены, которые в норме присутствуют на необычайно низких уровнях на нормальных клетках, но которые экспрессируются на намного более высоких уровнях на клетках опухолей.

Неограничивающие примеры антигенов опухолей включают следующие: антигены дифференцировки, такие как MART-1/Melan (MART-I), gp100 (Pmel 17), тирозиназа, TRP-1, TRP-2 и опухолеспецифические мультилинейные антигены, такие как антигены семейства MAGE, включая, но без ограничения, MAGE1, MAGE3, MAGE10, MAGE11, MAGE12, MAGEA2, MAGEA3, MAGEA4, MAGEA6, MAGEA8, MAGEA9, MAGEB18, MAGEB6, MABEC1, MAGED2, MAGEE1, MAGEH1, MAGEL2, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; MEL4, ассоциированный с меланомой антиген 100+, антиген меланомы gp100, NRIP3, NYS48, OCIAD1, OFA-iLRP, OIP5, ассоциированный с карциномой яичников антиген (OV632), PAGE4, PARP9, PATE, пластин L, PRAME, простатспецифический антиген, протеаза 3, простеин, Reg3a, RHAMM, R0PN1, SART2, SDCCAG8, SEL1L, SEPT1, SLC45A2, SPANX, SSX5, STXGALNAC1, STEAP4, сурвивин, TBC1D2, TEM1, TRP1, антигены опухолей эпителиального происхождения, XAGE1, XAGE2, WT-1; сверхэкспрессированные эмбриональные антигены, такие как CEA; сверхэкспрессированные онкогены и мутантные гены супрессоров опухолей, такие как p53, Ras, HER-2/neu; уникальные антигены опухолей, возникающие в результате хромосомных транслокаций; такие как BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; и вирусные антигены, такие как антигены вируса Эпштейна-Барр EBV и антигены E6 и E7 папилломавируса человека (HPV).

Другие антигены опухолей включают, но без ограничения, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, C 19-9, C 72-4, CAM 17,1, NuMa, K-ras, бета-катенин, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, альфа-фетопротеин, бета-HCG, BCA225, BTAA, C 125, C 15-3/C 27,29/BCAA, C 195, C 242, CA-50, CAM43, CD68/P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733/EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, M0V18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90/связывающий Mac-2 белок/ассоциированный с циклофилином C белок, TAAL6, TAG72, TLP, TPS, ассоциированный с глиомой антиген, β-субъединицу хорионического гонадотропина человека, альфафетопротеин (AFP), реакционноспособный по отношению к лектину AFP, тиреоглобулин, RAGE-1, MN-C IX, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2 (AS), карбоксилэстеразу кишечника, mut hsp70-2, M-CSF, простазу, простатспецифический антиген (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, простеин, PSMA, Her2/neu, сурвивин и теломеразу, антиген-1 опухоли карциномы предстательной железы (PCTA-1), ELF2M, эластазу нейтрофилов, эфрин B2, CD19, CD20, CD22, ROR1, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, гликолипид F77, EGFRvIII, GD-2, инсулиновый фактор роста (IGF)-I, IGF-II, рецептор IGF-I и мезотелин.

Как правило, любое антинеопластическое средство, обладающее активностью против чувствительной опухоли, подвергаемой лечению, можно вводить совместно при лечении злокачественной опухоли по настоящему изобретению. Примеры таких средств можно обнаружить в Cancer Principles and Practice of Oncology by V.T. Devita and S. Hellman (editors), 6th edition (February 15, 2001), Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Специалист в данной области способен различать, какие комбинации средств можно использовать на основании конкретных характеристик рассматриваемых лекарственных средств и злокачественных опухолей. Типичные антинеопластические средства, который можно использовать по настоящему изобретению, включают, но без ограничения, средства против микротрубочек, такие как дитерпеноиды и алкалоиды барвинка; координационные комплексы платины; алкилирующие средства, такие как азотистые иприты, оксазафосфорины, алкилсульфонаты, нитрозомочевина и триазены; средства антибиотики, такие как антрациклины, актиномицины и блеомицины; ингибиторы топоизомеразы II, такие как эпиподофиллотоксины; антиметаболиты, такие как аналоги пурина и пиримидина и антифолатные соединения; ингибиторы топоизомеразы I, такие как камптотецины; гормоны и аналоги гормонов; ингибиторы путей передачи сигнала; ингибиторы связанных с ангиогенезом нерецепторных тирозинкиназ; иммунотерапевтические средства; проапоптотические средства; и ингибиторы передачи сигналов клеточного цикла.

Примерами дополнительного активного ингредиента или ингредиентов для применения в комбина-

ции или для совместного введения с настоящим связывающим ICOS белком являются антинеопластические средства, включая любые химиотерапевтические средства, иммуномодулирующие средства или иммуномодуляторы и иммуностимулирующие адъюванты.

Средства против микротрубочек или антимитотические средства представляют собой специфические для фазы средства, активные против микротрубочек клеток опухолей в ходе фазы М или фазы митоза клеточного цикла. Примеры средств против микротрубочек включают, но без ограничения, дитерпеноиды и алкалоиды барвинка.

Дитерпеноиды, происходящие из природных источников, представляют собой специфические для фазы противораковые средства, действующие в фазах G_2/M клеточного цикла. Считают, что дитерпеноиды стабилизируют β-субъединицу тубулина микротрубочек посредством связывания с этим белком. Затем разборка белка, по-видимому, ингибируется с арестом митоза и последующей гибелью клеток. Примеры дитерпеноидов включают, но без ограничения, паклитаксел и его аналог доцетаксел.

Паклитаксел, 5β, 20-эпокси-1, 2α, 4, 7β, 10β, 13α-гекса-гидрокситакс-11-ен-9-он-4,10-диацетат-2-бензоат-13-эфир с (2R,3S)-N-бензоил-3-фенилизосерином, представляет собой природный дитерпеновый продукт, выделенный из тиса тихоокеанского Taxus brevifoli, и является коммерчески доступным в форме пригодного для инъекций раствора ТАКСОЛ®. Он является членом таксанового семейства терпенов. Он впервые выделен в 1971 г. Wani et al. J. Am. Chem, Soc, 93:2325, 1971, охарактеризовавшими его структуру химическими и рентгенокристаллографическими способами. Один из механизмов для его активности относится к способности паклитаксела связывать тубулин, таким образом ингибируя рост клеток злокачественных опухолей; Schiff et al., Proc. Natl, Acad, Sci. USA, 77:1561-1565 (1980); Schiff et al., Nature, 277:665-667 (1979); Kumar, J. Biol, Chem, 256: 10435-10441 (1981). Обзор синтеза и противораковой активности некоторых производных паклитаксела см. в D.G.I. Kingston et al., Studies in Organic Chemistry vol. 26, озаглавленной "New trends in Natural Products Chemistry 1986", Attaur-Rahman, P.W. Le Quesne, Eds. (Elsevier, Amsterdam, 1986) pp 219-235.

Паклитаксел одобрен для клинического применения для лечения невосприимчивого рака яичника в Соединенных Штатах (Markm et al., Yale Journal of Biology and Medicine, 64:583, 1991; McGuire et al., Ann. Intern, Med., 111:273, 1989) и для лечения рака молочной железы (Holmes et al., J. Nat. Cancer Inst., 83:1797, 1991). Он является потенциальным кандидатом для лечения неоплазий кожи (Einzig et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 20:46) и карцином головы и шеи (Forastire et al., Sem. Oncol., 20:56, 1990). Для соединения показан также потенциал для лечения поликистоза почек (Woo et al., Nature, 368:750, 1994, рака легкого и малярии. Лечение пациентов паклитакселом приводит к подавлению костного мозга (множество линий клеток, Ignoff, R.J. et al., Cancer Chemotherapy Pocket Guide, 1998), связанной с продолжительностью дозирования выше пороговой концентрации (50 нМ) (Kearns, C.M. et al., Seminars in Oncology, 3(6), p. 16-23, 1995).

Доцетаксел, (2R,3S)-N-карбокси-3-фенилизосерин, N-трет-бутиловый эфир, 13-эфир с 5β-20-эпокси-1,2α, 4, 7β, 10β, 13α-гексагидрокситакс-11-ен-9-он-4-ацетат-2-бензоатом, тригидратом, является коммерчески доступным в форме пригодного для инъекций раствора как ТАКСОТЕР®. Доцетаксел рекомендован для лечения рака молочной железы. Доцетаксел является полусинтетическим производным паклитаксела q.v., полученного с использованием природного предшественника, 10-деацетил-баккатина III, экстрагированного из игл европейского тиса. Ограничивающая дозу токсичность доцетаксела представляет собой нейтропению.

Алкалоиды барвинка представляют собой специфические для фазы антинеопластические средства, полученные из растения барвинка. Алкалоиды барвинка действуют в фазе М (митоза) клеточного цикла посредством специфического связывания с тубулином. Следовательно, связанная молекула тубулина неспособна полимеризоваться в микротрубочки. Считают, что происходит арест митоза в метафазе с последующей гибелью клеток. Примеры алкалоидов барвинка включают, но без ограничения, винбластин, винкристин и винорелбин.

Винбластин, сульфат винкалейкобластина, является коммерчески доступным как ВЕЛБАН® в форме пригодного для инъекций раствора. Хотя для него возможны рекомендации в качестве терапии второй линии для различных солидных опухолей, он в первую очередь рекомендован для лечения рака яичка и различных лимфом, включая болезнь Ходжкина; и лимфоцитарную и гистиоцитарную лимфомы. Миелосупрессия является ограничивающим дозу побочным эффектом винбластина.

Винкристин, винкалейкобластин, 22-оксо-, сульфат, является коммерчески доступным как ОНКОВИН® в форме пригодного для инъекций раствора. Винкристин рекомендован для лечения острых лейкозов и также находит применение в режимах лечения злокачественной лимфомы Ходжкина и неходжскинских злокачественных лимфом. Алопеция и неврологические эффекты являются наиболее распространенным побочным эффектом винкристина, и в меньшей степени встречаются эффекты миелосупрессии и мукозита желудочно-кишечного тракта.

Винорелбин, 3',4'-дидегидро-4'-дезокси-C'-норвинкалейкобластина [R-(R*,R*)-2,3-дигидроксибутандиоат (1:2)(соль)], коммерчески доступный в форме пригодного для инъекций раствора тартрата винорелбина (НАВЕЛБИН®), представляет собой полусинтетический алкалоид барвинка. Винорелбин

рекомендован в качестве отдельного средства или в комбинации с другими химиотерапевтическими средствами, такими как цисплатин, для лечения различных солидных опухолей, в частности немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы на поздних стадиях и невосприимчивого к гормонам рака предстательной железы. Миелосупрессия является наиболее распространенным ограничивающим дозу побочным эффектом винорелбина.

Координационные комплексы платины являются не специфическими для фазы противораковыми средствами, взаимодействующими с ДНК. Комплексы платины входят в клетки опухолей, подвергаются гидратации и формируют внутри- и межцепьевые поперечные сшивки с ДНК, вызывающие неблагоприятные для опухоли биологические эффекты. Примеры координационных комплексов платины включают, но без ограничения, цисплатин и карбоплатин.

Цисплатин, цис-диаминдихлорплатина, является коммерчески доступным как ПЛАТИНОЛ® в форме пригодного для инъекций раствора. Цисплатин в первую очередь рекомендован для лечения метастазирующего рака яичка и рака яичника, и рака мочевого пузыря на поздних стадиях. Важнейшими ограничивающими дозу побочными эффектами цисплатина являются нефротоксичность, которую можно контролировать посредством гидратации и диуреза, и ототоксичность.

Карбоплатин, диамин[1,1-циклобутан-дикарбоксилат(2-)-O,O'] платины, является коммерчески доступным как ПАРАПЛАТИН® в форме пригодного для инъекций раствора. Карбоплатин в первую очередь рекомендован для терапии первой и второй линий карциномы яичников на поздней стадии. Подавление костного мозга представляет собой ограничивающую дозу токсичность карбоплатина.

Алкилирующие средства представляют собой не специфические для фазы противораковые средства и сильные электрофилы. Как правило, алкилирующие средства формируют ковалентные связи посредством алкилирования с ДНК через нуклеофильные группы молекулы ДНК, такие как фосфатная группа, аминогруппа, сульфгидрильная, гидроксильная, карбоксильная и имидазольная группы. Такое алкилирование нарушает функцию нуклеиновой кислоты, приводя к гибели клеток. Примеры алкилирующих средств включают, но без ограничения, азотистые иприты, такие как циклофосфамид, мелфалан и хлорамбуцил; алкилсульфонаты, такие как бусульфан; нитрозомочевины, такие как кармустин; и триазены, такие как декарбазин.

Циклофосфамид, моногидрат 2-оксида 2-[бис-(2-хлорэтил)амино]тетрагидро-2H-1,3,2-оксазафосфорина, является коммерчески доступным в форме пригодного для инъекций раствора или таблеток как ЦИТОКСАН®. Циклофосфамид рекомендован в качестве отдельного средства или в комбинации с другими химиотерапевтическими средствами, для лечения злокачественных лимфом, множественной миеломы и лейкозов. Алопеция, тошнота, рвота и лейкопения являются наиболее распространенными ограничивающими дозу побочными эффектами циклофосфамида.

Мелфалан, 4-[бис-(2-хлорэтил)амино]-L-фенилаланин, является коммерчески доступным в форме пригодного для инъекций раствора или таблеток как АЛКЕРАН®. Мелфалан рекомендован для паллиативного лечения множественной миеломы и неоперабельной эпителиальной карциномы яичников. Подавление костного мозга является наиболее распространенным ограничивающим дозу побочным эффектом мелфалана.

Хлорамбуцил, 4-[бис-(2-хлорэтил)амино]бензолбутановая кислота, является коммерчески доступным как таблетки ЛЕЙКЕРАН®. Хлорамбуцил рекомендован для паллиативного лечения хронического лимфатического лейкоза, и злокачественных лимфом, таких как лимфосаркома, гигантоклеточная фолликулярная лимфома и болезнь Ходжкина. Подавление костного мозга является наиболее распространенным ограничивающим дозу побочным эффектом хлорамбуцила.

Бусульфан, 1,4-бутандиолдиметансульфонат, является коммерчески доступным как таблетки МИЛЕРАН®. Бусульфан рекомендован для паллиативного лечения хронического миелогенного лейкоза. Подавление костного мозга является наиболее распространенным ограничивающим дозу побочным эффектом бусульфана.

Кармустин, 1,3-[бис-(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевина, является коммерчески доступным в форме отдельных ампул с лиофилизированным материалом как BiCNU®. Кармустин рекомендован для паллиативного лечения в качестве отдельного средства или в комбинации с другими средствами при опухолях мозга, множественной миеломе, болезни Ходжкина и неходжскинских лимфом. Отсроченная миелосупрессия является наиболее распространенным ограничивающим дозу побочным эффектом кармустина.

Декарбазин, 5-(3,3-диметил-1-триазено)имидазол-4-карбоксамид, является коммерчески доступным в форме отдельных ампул с материалом как DTIC-Dome®. Декарбазин рекомендован для лечения метастазирующей злокачественная меланома и в комбинации с другими средствами для терапии второй линии болезни Ходжкина.

Тошнота, рвота, и анорексия являются наиболее распространенными ограничивающими дозу побочными эффектами декарбазина.

Антинеопластические антибиотики являются не специфическими для фазы средствами, связывающими ДНК или интеркалирующими в ДНК. Как правило, такое действие приводит к образованию стабильных комплексов ДНК или к разрыву цепи, что нарушает обычное функционирование нуклеиновых

кислот, приводя к гибели клеток. Примеры антинеопластических антибиотических средств включают, но без ограничения, актиномицины, такие как дактиномицин, антрациклины, такие как даунорубицин и доксорубицин; и блеомицины.

Дактиномицин, известный также как актиномицин D, является коммерчески доступным в пригодной для инъекций форме как КОСМЕГЕН®. Дактиномицин рекомендован для лечения опухоли Вильмса и рабдомиосаркомы. Тошнота, рвота и анорексия являются наиболее распространенными ограничивающими дозу побочными эффектами дактиномицина.

Даунорубицин, гидрохлорид (8S-цис-)-8-ацетил-10-[(3-амино-2,3,6-тридезокси-α-L-ликсогексапиранозил)окси]-7,8,9,10-тетрагидро-6,8,11-тригидрокси-1-метокси-5,12-нафтацендиона, является коммерчески доступным в липосомной пригодной для инъекций форме как ДАУНОКСОМ® или в пригодной для инъекций форме как ЦЕРУБИДИН®. Даунорубицин рекомендован для индукции ремиссии при лечении острого нелимфоцитарного лейкоза и ассоциированной с HIV саркомы Капоши на поздних стадиях. Миелосупрессия является наиболее распространенным ограничивающим дозу побочным эффектом даунорубицина.

Доксорубицин, гидрохлорид (8S,10S)-10-[(3-амино-2,3,6-тридезокси-α-L-ликсогексапиранозил)окси]-8-гликолоил-7,8,9,10-тетрагидро-6,8,11-тригидрокси-1-метокси-5,12-нафтацендиона, является коммерчески доступным в пригодной для инъекций форме как РУБЕКС® или АДРИАМИЦИН RDF®. Доксорубицин в первую очередь рекомендован для лечения острого лимфобластного лейкоза и острого миелобластного лейкоза, но является также полезным компонентом лечения некоторых солидных опухолей и лимфом.

Миелосупрессия является наиболее распространенным ограничивающим дозу побочным эффектом доксорубицина.

Блеомицин, смесь цитотоксических гликопептидных антибиотиков, выделенных из штамма Streptomyces verticillus, является коммерчески доступным как БЛЕНОКСАН®. Блеомицин рекомендован для паллиативного лечения в качестве отдельного средства или в комбинации с другими средствами при плоскоклеточной карциноме, лимфомах и карциномах яичка. Легочная и кожная токсичность являются наиболее распространенными ограничивающими дозу побочными эффектами блеомицина.

Ингибиторы топоизомеразы II включают, но без ограничения, эпиподофиллотоксины.

Эпиподофиллотоксины представляют собой специфические для фазы антинеопластические средства, полученные из растения мандрагоры. Эпиподофиллотоксины, как правило, поражают клетки в фазах S и G_2 клеточного цикла посредством формирования тройного комплекса с топоизомеразой II и ДНК, вызывая разрывы цепей ДНК. Разрывы цепей накапливаются, и за этим следует гибель клеток. Примеры эпиподофиллотоксинов включают, но без ограничения, этопозид и тенипозид.

Этопозид, 4'-деметилэпиподофиллотоксин-9[4,6-0-(R)-этилиден-β-D-глюкопиранозид], является коммерчески доступным в форме пригодного для инъекций раствора или капсул как Вепезид® и является общеизвестным как VP-16. Этопозид рекомендован в качестве отдельного средства или в комбинации с другими химиотерапевтическими средствами для лечения рака яичка и немелкоклеточного рака легкого. Миелосупрессия является наиболее распространенным побочным эффектом этопозида. Заболеваемость лейкопенией проявляет тенденцию к большей тяжести, чем тромбоцитопенией.

Тенипозид, 4'-деметилэпиподофиллотоксин-9[4,6-0-(R)-тенилиден-β-D-глюкопиранозид], является коммерчески доступным в форме пригодного для инъекций раствора как ВУМОН® и является общеизвестным как VM-26. Тенипозид рекомендован в качестве отдельного средства или в комбинации с другими химиотерапевтическими средствами для лечения острого лейкоза у детей. Миелосупрессия является наиболее распространенным ограничивающим дозу побочным эффектом тенипозида. Тенипозид может индуцировать как лейкопению, так и тромбоцитопению.

Антиметаболитные антинеопластические средства представляют собой специфические для фазы антинеопластические средства, которые действуют в фазе S (синтеза ДНК) клеточного цикла посредством ингибирования синтеза ДНК или посредством ингибирования синтеза пуриновых или пиримидиновых оснований и таким образом, ограничивают синтез ДНК. Следовательно, отсутствует прохождение фазы S, и за этим следует гибель клеток. Примеры антиметаболитных антинеопластических средств включают, но без ограничения, фторурацил, метотрексат, цитарабин, меркаптопурин, тиогуанин и гемцитабин.

5-Фторурацил, 5-фтор-2,4-(1H,3H) пиримидиндион, является коммерчески доступным как фторурацил. Введение 5-фторурацила приводит к ингибированию синтеза тимидилата, и он также включается как в РНК, так и в ДНК. Результатом, как правило, является гибель клеток. 5-фторурацил рекомендован в качестве отдельного средства или в комбинации с другими химиотерапевтическими средствами для лечения карцином молочной железы, толстой кишки, прямой кишки, желудка и поджелудочной железы. Миелосупрессия и мукозит являются ограничивающими дозу побочными эффектами 5-фторурацила. Другие аналоги фторпиримидина включают 5-фтор дезоксиуридин (флоксуридин) и монофосфат 5-фтордезоксиуридина.

Цитарабин, 4-амино-1-β-D-арабинофуранозил-2-(1H)-пиримидинон, является коммерчески доступ-

ным как ЦИТОЗАР-U® и является общеизвестным как Ara-C. Считают, что цитарабин проявляет специфичность для фазы клеток в S-фазе посредством ингибирования элонгации цепи ДНК посредством терминирующего включения цитарабина в растущую цепь ДНК. Цитарабин рекомендован в качестве отдельного средства или в комбинации с другими химиотерапевтическими средствами для лечения острого лейкоза. Другие аналоги цитидина включают 5-азацитидин и 2',2'-дифтордезоксицитидин (гемцитабин). Цитарабин индуцирует лейкопению, тромбоцитопению и мукозит.

Меркаптопурин, моногидрат 1,7-дигидро-6H-пурин-6-тиона, является коммерчески доступным как ПУРИНТОЛ®. Меркаптопурин проявляет специфичность для фазы клеток в S-фазе посредством ингибирования синтеза ДНК по одному из еще не установленных механизмов. Меркаптопурин рекомендован в качестве отдельного средства или в комбинации с другими химиотерапевтическими средствами для лечения острого лейкоза. Миелосупрессия и желудочно-кишечный мукозит являются ожидаемыми побочными эффектами меркаптопурина в высоких дозах. Полезным аналогом меркаптопурина является азатиоприн.

Тиогуанин, 2-амино-1,7-дигидро-6H-пурин-6-тион, является коммерчески доступным как TABLOID®. Тиогуанин проявляет специфичность для фазы клеток в S-фазе посредством ингибирования синтеза ДНК по одному из еще не установленных механизмов. Тиогуанин рекомендован в качестве отдельного средства или в комбинации с другими химиотерапевтическими средствами для лечения острого лейкоза. Миелосупрессия, включая лейкопению, тромбоцитопению и анемию, является наиболее распространенным ограничивающим дозу побочным эффектом введения тиогуанина. Однако возникают побочные эффекты на желудочно-кишечный тракт, и они могут являться ограничивающими дозу. Другие аналоги пурина включают пентостатин, эритрогидроксиниладенин, фосфат флударабина и кладрибин.

Гемцитабин, моногидрохлорид 2'-дезокси-2',2'-дифторцитидина (β-изомер), является коммерчески доступным как ГЕМЗАР®. Гемцитабин проявляет специфичность для фазы клеток в S-фазе посредством блокирования прохождения клетками границы G1/S. Гемцитабин рекомендован в комбинации с цисплатином для лечения местнораспространенного немелкоклеточного рака легкого и отдельно для лечения местнораспространенного рака поджелудочной железы. Миелосупрессия, включая лейкопению, тромбоцитопению и анемию, является наиболее распространенным ограничивающим дозу побочным эффектом введения гемцитабина.

Метотрексат, N-[4[[(2,4-диамино-6-птеридинил)метил]метиламино]бензоил]-L-глутаминовая кислота, является коммерчески доступным как метотрексат натрия. Метотрексат оказывает эффекты на фазу клеток, специфически в S-фазе, посредством ингибирования синтеза, репарации и/или репликации ДНК посредством ингибирования редуктазы дигидрофолиевой кислоты, необходимой для синтеза пуриновых нуклеотидов и тимидилата. Метотрексат рекомендован в качестве отдельного средства или в комбинации с другими химиотерапевтическими средствами для лечения хориокарциномы, менингеального лейкоза, неходжскинской лимфомы и карцином молочной железы, головы, шеи, яичников и мочевого пузыря. Миелосупрессия (лейкопения, тромбоцитопения и анемия) и мукозит являются ожидаемыми побочными эффектами введения метотрексата.

Камптотецины, включая камптотецин и производные камптотецина, доступны или находятся в разработке как ингибиторы топоизомеразы I. Считают, что цитотоксическая активность камптотецинов связана с их активностью ингибирования топоизомеразы I. Примеры камптотецинов включают, но без ограничения, иринотекан, топотекан и различные оптические формы 7-(4-метилпиперазинометилен)-10,11-этилендиокси-20-камптотецина, описанные ниже.

Иринотекан HCl, гидрохлорид (4S)-4,11-диэтил-4-гидрокси-9-[(4-пиперидинопиперидино)карбонилокси]-1H-пирано [3',4',6,7]индолизино [1,2-b]хинолин-3,14-(4H,12H)диона, является коммерчески доступным в форме пригодного для инъекций раствора КАМПТОСАР®.

Иринотекан представляет собой производное камптотецина, которое связывается, наряду со своим активным метаболитом SN-38, с комплексом топоизомераза I - ДНК. Считают, что цитотоксичность возникает в результате неподдающихся репарации двухцепочечных разрывов, вызванных взаимодействием тройного комплекса топоизомераза I: ДНК: иринотекан или SN-38 с ферментами репликации. Иринотекан рекомендован для лечения метастазирующих злокачественных опухолей толстой или прямой кишки.

Ограничивающими дозу побочными эффектами иринотекана HCl являются миелосупрессия, включая нейтропению, и эффекты на ЖКТ, включая диарею.

Топотекан HCl, моногидрохлорид (S)-10-[(диметиламино)метил]-4-этил-4,9-дигидрокси-1H-пирано [3',4',6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-3,14-(4H,12H)диона, является коммерчески доступным в форме пригодного для инъекций раствора ГИКАМТИН®. Топотекан представляет собой производное камптотецина, которое связывается с комплексом топоизомераза I-ДНК и предотвращает повторное лигирование одноцепочечных разрывов, вызванных топоизомеразой I в ответ на скручивающее усилие по отношению к молекуле ДНК. Топотекан рекомендован для терапии второй линии для метастазирующей карциномы яичников и мелкоклеточного рака легкого. Ограничивающим дозу побочным эффектом топотекана HCl является миелосупрессия, в первую очередь нейтропения.

Ритуксимаб представляет собой химерное моноклональное антитело, продаваемое как

РИТУКСАН® и МАБТЕРА®. Ритуксимаб связывается с CD20 на В-клетках и вызывает апоптоз клеток. Ритуксимаб вводят внутривенно, и он одобрен для лечения ревматоидного артрита и В-клеточной неходжскинской лимфомы.

Офатумумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело, продаваемое как АРЗЕРРА®. Офатумумаб связывается с CD20 на В-клетках, и его используют для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза CLL (типа злокачественной опухоли лейкоцитов) у взрослых, невосприимчивых к лечению флударабином (Флудара) и алемтузумабом (Кампат).

Трастузумаб (ГЕРЦЕПТИН®) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, которое связывается с рецептором HER2. Исходным показанием для него является положительный по HER2 рак молочной железы.

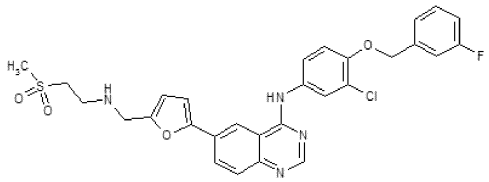
Цетуксимаб (ЭРБИТУКС®) представляет собой химерное мышиное-человеческое антитело, которое ингибирует рецептор эпидермального фактора роста (EGFR).

Ингибиторы mTOR включают, но без ограничения, рапамицин (FK506) и рапалоги, RAD001 или эверолимус (Афинитор), CCI-779 или темсиролимус, AP23573, AZD8055, WYE-354, WYE-600, WYE-687 и Pp121.

Бексаротен продают как Таргретин®, и он является членом подкласса ретиноидов, избирательно активирующих рецепторы ретиноида X (RXR). Эти рецепторы ретиноида обладают биологической активностью, отличной от активности рецепторов ретиноевой кислоты (RAR). Химическим наименованием является 4-[1-(5,6,7,8-тетрагидро-3,5,5,8,8-пентаметил-2-нафталенил)этенил]бензойная кислота. Бексаротен используют для лечения Т-клеточной лимфомы кожи CTCL (типа рака кожи) у людей, заболевание которых невозможно было успешно лечить с использованием по меньшей мере одного другого лекарственного средства.

Сорафениб, поставляемый на рынок как Нексавар®, представляет собой класс лекарственных средств, называемых мультикиназными ингибиторами. Его химическим наименованием является 4-[4-[[4-хлор-3-(трифторметил) фенил] карбамоиламино]феноксн]-N-метилпиридин-2-карбоксамид. Сорафениб используют для лечения почечноклеточного рака на поздних стадиях (типа злокачественной опухоли, возникающей в почках). Сорафениб используют также для лечения неоперабельной печеночноклеточной карциномы (типа рака печени, который невозможно вылечить с помощью хирургии).

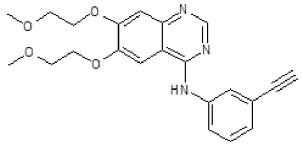
Примеры ингибиторов erbB включают лапатиниб, эрлотиниб и гефитиниб. Лапатиниб, N-(3-хлор-4-{[(3-фторфенил)метил]окси}фенил)-65-({[2-(метилсульфонил)этил]амино}метил)-2-фуранил]-4-хиназолинамин (представленный формулой II, как проиллюстрировано), представляет собой активный, вводимый перорально, низкомолекулярный, двойной ингибитор тирозинкиназ erbB-1 и erbB-2 (EGFR и HER2), одобренный в комбинации с капецитабином для лечения положительного по HER2-метастазирующего рака молочной железы.



II

Свободное основание, соли с HCl и дитозилатные соли соединения формулы (II) можно получать в соответствии со способом, описанным в WO 99/35146, опубликованной 15 июля 1999 г.; и WO 02/02552, опубликованной 10 января 2002 г.

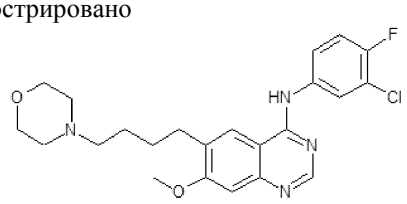
Эрлотиниб, N-(3-этинилфенил)-6,7-бис-{[2-(метилокси)этил]окси}-4-хиназолинамин, коммерчески доступный под торговым наименованием Тарцева), представлен формулой III, как проиллюстрировано



III

Свободное основание и соль с HCl эрлотиниба можно получать, например, в соответствии с U.S. 5747498, пример 20.

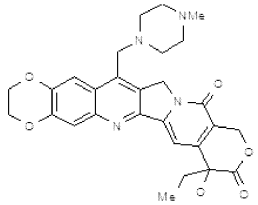
Гефитиниб, 4-хиназолинамин,N-(3-хлор-4-фторфенил)-7-метокси-6-[3-4-морфолин)пропокси] представлен формулой IV, как проиллюстрировано



IV

Гефитиниб, который является коммерчески доступным под торговым наименованием ИРЕССА® (Astra-Zenenca), представляет собой ингибитор erbB-1, рекомендованный в качестве монотерапии для лечения пациентов с местнораспространенным или метастазирующим немелкоклеточным раком легкого после неудачного применения как химиотерапевтических средств на основе платины и доцетаксела. Свободное основание, соли с HCl и соли с diHCl гефитиниба можно получать в соответствии со способами из Международной патентной заявки No. PCT/GB96/00961, поданной 23 апреля 1996 г., и опубликованной как WO 96/33980 31 октября 1996 г.

Представляет интерес также производное камптотецина следующей формулы A, находящееся в настоящее время в разработке, включая форму рацемической смеси (R,S) так же, как энантиомеры R и S:



A

известное под химическим наименованием "7-(4-метилпиперазинометилен)-10,11-этилендиокси-20(R,S)-камптотецин (рацемическая смесь) или "7-(4-метилпиперазинометилен)-10,11-этилендиокси-20(R)-камптотецин (R энантиомер) или "7-(4-метилпиперазинометилен)-10,11-этилендиокси-20(S)-камптотецин (S энантиомер). Такое соединение так же, как родственные соединения, описаны, включая способы получения, в патентах США No. 6063923; 5342947; 5559235; 5491237 и в рассматриваемой патентной заявке США No. 08/977217, поданной 24 ноября 1997 г.

Гормоны и аналоги гормонов являются полезными соединениями для лечения злокачественных опухолей, для которых существует связь между гормоном(гормонами) и ростом и/или отсутствием роста злокачественной опухоли. Примеры гормонов и аналогов гормонов, которые можно использовать для лечения злокачественных опухолей, включают, но без ограничения, адренокортикостероиды, такие как преднизон и преднизолон, которые можно использовать в лечении злокачественной лимфомы и острого лейкоза у детей; аминоглутетимид и другие ингибиторы ароматазы, такие как анастрозол, летразол, воразол и экземестан, которые можно использовать для лечения адренокортикальной карциномы и гормонзависимой карциномы молочной железы, содержащей рецепторы эстрогенов; прогестрины, такие как ацетат мегестрола, который можно использовать для лечения гормонзависимого рака молочной железы и карциномы эндометрия; эстрогены, андрогены и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, ацетат ципротерона и 5α-редуктазы, такие как финастерид и дутастерид, который можно использовать для лечения карциномы предстательной железы и доброкачественной гипертрофии предстательной железы; антиэстрогены, такие как тамоксифен, торемифен, ралоксифен, дролоксифен, иодоксифен, так же как избирательные модуляторы рецепторов эстрогена (SERMS), такие как описанные в патентах США No. 5681835, 5877219 и 6207716, которые можно использовать для лечения гормонзависимой карциномы молочной железы и других чувствительных злокачественных опухолей; и высвобождающий гонадотропин гормон (GnRH) и его аналоги, которые стимулируют высвобождение лютеинизирующего гормона (LH) и/или фолликулостимулирующий гормон (FSH) для лечения карциномы предстательной железы, например агонисты и антагонисты LHRH, такие как ацетат гозерелина и лейпролид.

Ингибиторы путей передачи сигнала представляют собой ингибиторы, которые блокируют или ингибируют химический процесс, вызывающий внутриклеточное изменение, в рамках изобретения это изменение представляет собой пролиферацию или дифференцировку клеток. Ингибиторы передачи сигнала, которые можно использовать по настоящему изобретению, включают ингибиторы рецепторных тирозинкиназ, нерецепторных тирозинкиназ, блокаторы домена SH2/SH3, серин/треонинкиназы, фосфотидилинозитол-3-киназы, передачи сигналов миоинозитола и онкогенов Ras.

Несколько протеинтирозинкиназ катализируют фосфорилирование специфических остатков тирозила в различных белках, вовлеченых в регуляцию клеточного роста. Такие протеинтирозинкиназы можно в широком смысле классифицировать как рецепторные или нерецепторные киназы.

Рецепторные тирозинкиназы представляют собой трансмембранные белки, обладающие внеклеточным лигандсвязвающим доменом, трансмембранным доменом и тирозинкиназным доменом. Рецепторные тирозинкиназы вовлечены в регуляцию роста клеток, и их в общем называют рецепторами факторов

роста. Показано, что неприемлемая или неконтролируемая активация многих из этих киназ, т.е. аномальная активность рецепторной киназы фактора роста, например, посредством сверхэкспрессии или мутации приводит к неконтролируемому росту клеток. Соответственно аномальная активность таких киназ связана с ростом злокачественной ткани. Следовательно, ингибиторы таких киназ могут обеспечивать способы лечения злокачественных опухолей. Рецепторы факторов роста включают, например, рецептор эпидермального фактора роста (EGFr), рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFr), erbB2, erbB4, рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFr), тирозинкиназа с доменами, гомологичными иммуноглобулиноподобному и эпидермальному фактору роста (TIE-2), рецептор инсулинового фактора роста-I (IGFI), рецепторы макрофагального колониестимулирующего фактора Cfms), BTK, ckit, cmet, фактора роста фибробластов (FGF), рецепторы Trk (TrkA, TrkB, и TrkC), рецепторы эфрина (eph) и протоонкоген RET. Некоторые ингибиторы рецепторов роста находятся в разработке и включают антагонисты лигандов, антитела, ингибиторы тирозинкиназы и антисмысловые олигонуклеотиды. Рецепторы факторов роста и средства, ингибирующие функцию рецепторов факторов роста, описаны, например, в Kath, John C., Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(6): 803-818; Shawver et al. DDT Vol. 2, No. 2 February 1997 и Lofts, F.J. et al., "Growth factor receptors as targets", New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy, ed. Workman, Paul and Kerr, David, CRC press 1994, London.

Тирозинкиназы, не являющиеся рецепторными киназами факторов роста, названы нерецепторными тирозинкиназами. Нерецепторные тирозинкиназы, которые можно использовать по настоящему изобретению, которые являются мишенями или потенциальными мишенями противораковых лекарственных средств, включают cSrc, Lck, Fyn, Yes, Jak, cAbl, FAK (киназу фокальной адгезии), тирозинкиназу Брутона и Bcr-Abl. Такие нерецепторные киназы и средства, ингибирующие функцию нерецепторных тирозинкиназ, описаны в Sinn, S. and Corey, S.J., (1999) Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research 8 (5): 465-80 и Bolen, J.B., Brugge, J.S., (1997) Annual review of Immunology. 15: 371-404.

Блокаторы доменов SH2/SH3 представляют собой средства, нарушающие связывание домена SH2 или SH3 во множестве ферментов или адаптерных белков, включая субъединицу p85 PI3-K, киназы семейства Src, адаптерные молекулы (She, Crk, Nek, Grb2) и Ras-GAP. Домены SH2/SH3 в качестве мишеней для противораковых лекарственных средств обсуждают в Smithgall, T.E. (1995), Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 34(3) 125-32.

Ингибиторы серин/треонинкиназ, включая блокаторы каскада киназы MAP, включают блокаторы киназы Raf (rafk), регулируемых митогенами или внеклеточными стимулами киназ (MEK) и регулируемых внеклеточными стимулами киназ (ERK); и блокаторы членов семейства протеинкиназы C, включая блокаторы PKC (альфа, бета, гамма, эпсилон, мю, лямбда, йота, зета), киназы семейства IkB (IKKa, IKKb), киназы семейства PKB, члены семейства киназы AKT и рецепторные киназы TGF-бета. Такие серин/треонинкиназы и их ингибиторы описаны в Yamamoto, T., Taya, S., Kaibuchi, K., (1999), Journal of Biochemistry. 126 (5) 799-803; Brodt, P., Samani, A., and Navab, R. (2000), Biochemical Pharmacology, 60, 1101-1107; Massague, J., Weis-Garcia, F. (1996) Cancer Surveys. 27:41-64; Philip, P.A., and Harris, A.L. (1995), Cancer Treatment and Research. 78: 3-27, Lackey, K. et al. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, (10), 2000, 223-226; патент США No. 6268391 и Martinez-Iacaci, L., et al., Int. J. Cancer (2000), 88(1), 44-52.

Ингибиторы членов семейства фосфотидилинозитол-3-киназы, включая блокаторы PI3-киназы, ATM, ДНК-PK и Ku, также можно использовать по настоящему изобретению. Такие киназы обсуждают в Abraham, R.T. (1996), Current Opinion in Immunology. 8 (3) 412-8; Canman, C.E., Lim, D.S. (1998), Oncogene 17 (25) 3301-3308; Jackson, S.P. (1997), International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 29 (7): 935-8 и Zhong, H. et al., Cancer res, (2000) 60(6), 1541-1545.

По настоящему изобретению можно использовать также ингибиторы передачи сигналов посредством миоинозитола, такие как блокаторы фосфолипазы C и аналоги миоинозитола. Такие ингибиторы передачи сигналов описаны в Powis, G., and Kozikowski A., (1994 New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy ed., Paul Workman and David Kerr, CRC press 1994, London).

Другую группу ингибиторов путей передачи сигнала представляют собой ингибиторы онкогена Ras. Такие ингибиторы включают ингибиторы фарнезилтрансферазы, геранил-геранилтрансферазы и протеазы CAAX так же, как антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы и иммунотерапевтические средства. Показано, что такие ингибиторы блокируют активацию ras в клетках, содержащих мутантный ras и ras дикого типа, таким образом действуя как антипролиферативные средства.

Ингибирование онкогена Ras обсуждают в Scharovsky, O.G., Rozados, V.R., Gervasoni, S.I. Matar, P. (2000), Journal of Biomedical Science. 7(4 292-8; Ashby, M.N. (1998), Current Opinion in Lipidology. 9 (2) 99-102; и Bennett, C.F. и Cowsert, L.M. BioChim. Biophys. Acta, (1999) 1489 (1):19-30.

Как упомянуто выше, антитела - антагонисты связывания лиганда рецепторной киназы могут также служить ингибиторами передачи сигнала. Эта группа ингибиторов пути передачи сигнала включает применение гуманизированных антител против внеклеточного лигандсвязывающего домена рецепторных тирозинкиназ. Например, специфическое для EGFR антитело Imclone C225 (см. Green, M.C. et al., Monoclonal Antibody Therapy for Solid Tumors, Cancer Treat. Rev., (2000), 26(4, 269-286); антитело против erbB2 Герцептин® (см. Tyrosine Kinase Signalling in Breast cancer:erbB Family Receptor Tyrosine Kniases, Breast cancer Res., 2000, 2(3), 176-183); и специфическое для VEGFR2 антитело 2CB (см. Brekken, R.A. et al.,

Selective Inhibition of VEGFR2 Activity by a monoclonal Anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice, Cancer Res. (2000) 60, 5117-5124.

Ингибиторы связанных с ангиогенезом нерецепторных тирозинкиназ также могут находить применение по настоящему изобретению. Ингибиторы связанных с ангиогенезом VEGFR и TIE2 обсуждают выше в отношении ингибиторов передачи сигнала (оба рецептора являются рецепторными тирозинкиназами). Ангиогенез в общем связан с передачей сигнала erbB2/EGFR, поскольку показано, что ингибиторы erbB2 и EGFR ингибируют ангиогенез, в первую очередь экспрессию VEGF. Таким образом, имеет смысл комбинация ингибитора erbB2/EGFR с ингибитором ангиогенеза. Соответственно ингибиторы нерецепторных тирозинкиназ можно использовать в комбинации с ингибиторами EGFR/erbB2 по настоящему изобретению. Например, для антител против VEGF, которые не узнают VEGFR (рецепторную тирозинкиназу), но связываются с лигандом; низкомолекулярных ингибиторов интегрина (альфа$_v$ beta$_3$), которые могут ингибировать ангиогенез; эндостатина и ангиостатина (не-RTK), можно также доказать полезность применения в комбинации с описанными ингибиторами семейства erb (см. Bruns C.J. et al. (2000), Cancer Res., 60: 2926-2935; Schreiber A.B., Winkler M.E., and Derynck R. (1986), Science, 232: 1250-1253; Yen L et al. (2000), Oncogene 19: 3460-3469).

Средства, применяемые в режимах иммунотерапии, также можно использовать в комбинации с соединениями формулы (I). Существует ряд иммунологических способов для получения иммунного ответа против erbB2 или EGFR. Эти способы в основном относятся к области вакцинации против опухолей. Эффективность иммунологических способов можно сильно увеличить посредством комбинированного ингибирования путей передачи сигнала erbB2/EGFR с использованием низкомолекулярного ингибитора. Обсуждение иммунологического способа/способа вакцинации против опухолей против erbB2/EGFR обнаружено в Reilly R.T. et al. (2000), Cancer Res. 60: 3569-3576 и Chen Y., Hu D., Eling D.J., Robbins J., and Kipps T.J. (1998), Cancer Res. 58: 1965-1971.

Средства, используемые в проапоптотических режимах (например, антисмысловые олигонуклеотиды против bcl-2), также можно использовать в комбинации по настоящему изобретению. Члены семейства белков Bcl-2 блокируют апоптоз. Повышающая регуляция bcl-2, таким образом, связана с устойчивостью к химическим средствам. Исследования показали, что эпидермальный фактор роста (EGF) стимулирует антиапоптотических членов семейства bcl-2 (т.е. mcl-1). Таким образом, для способов, разработанных для понижающей регуляции экспрессии bcl-2 в опухолях, показано клиническое преимущество, и они в настоящее время проходят исследования фазы II/III, а именно антисмысловой олигонуклеотид для bcl-2 G3139 от Genta. Такие проапоптотические способы с использованием способа антисмысловых олигонуклеотидов для bcl-2 обсуждают в Water J.S. et al. (2000), J. Clin. Oncol. 18: 1812-1823 и Kitada S. et al. (1994, Antisense Res. Dev. 4: 71-79).

Трастузумаб (ГЕРЦЕПТИН®) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, которое связывается с рецептором HER2. Исходным показанием для него является положительный по HER2 рак молочной железы.

Трастузумаб эмтанзин (торговое наименование кадсила) представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из моноклонального антитела трастузумаба (герцептина), связанного с цитотоксическим средством мертанзином (DM1). Трастузумаб отдельно останавливает рост клеток злокачественных опухолей посредством связывания с рецептором HER2/neu, в то время как мертанзин входит в клетки и разрушает их посредством связывания с тубулином. Поскольку моноклональное антитело нацелено на HER2, и HER2 сверхэкспрессирован только в клетках злокачественных опухолей, конъюгат доставляет токсин специфически к клеткам опухолей. Конъюгат кратко обозначают как T-DM1.

Цетуксимаб (ЭРБИТУКС®) представляет собой химерное мышиное-человеческое антитело, ингибирующее рецептор эпидермального фактора роста (EGFR).

Пертузумаб (называемый также 2C4, торговое наименование Омнитарг) представляет собой моноклональное антитело, первое из его класса в линии средств, называемых "ингибиторами димеризации HER". Посредством связывания с HER2, он ингибирует димеризацию HER2 с другими рецепторами HER, что по выдвинутой гипотезе приводит к замедлению роста опухолей. Пертузумаб описан в WO01/00245, опубликованной 4 января 2001 г.

Ритуксимаб представляет собой химерное моноклональное антитело, продаваемое как РИТУКСАН® и МАБТЕРА®. Ритуксимаб связывается с CD20 на B-клетках и вызывает апоптоз клеток. Ритуксимаб вводят внутривенно, и он одобрен для лечения ревматоидного артрита и B-клеточной неходжскинской лимфомы.

Офатумумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело, продаваемое как АРЗЕРРА®. Офатумумаб связывается с CD20 на B-клетках и его используют для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL; типа злокачественной опухоли лейкоцитов) у взрослых, невосприимчивых к лечению флударабином (флудара) и алемтузумабом (кампат).

Ингибиторы передачи сигналов клеточного цикла ингибируют молекулы, вовлеченные в контроль клеточного цикла. Семейство протеинкиназ, называемых циклинзависимыми киназами (CDK), и его вза-

имодействие с семейством белков, называемых циклинами, контролирует продвижение по эукариотическому клеточному циклу. Координация активации и инактивации различных комплексов циклин/CDK является необходимой для нормального продвижения по клеточному циклу. Несколько ингибиторов передачи сигналов клеточного цикла находятся в разработке. Например, примеры циклинзависимых киназ, включая CDK2, CDK4 и CDK6, и их ингибиторы, описаны, например, в Rosani et al., Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10 (2):215-230.

В рамках изобретения "иммуномодуляторы" относятся к любому веществу, включая моноклональные антитела, которое действует на иммунную систему. Связывающие ICOS белки по настоящему изобретению можно рассматривать как иммуномодуляторы.

Иммуномодуляторы можно использовать в качестве антинеопластических средств для лечения злокачественных опухолей. Например, иммуномодуляторы включают, но без ограничения, антитела против CTLA-4, такие как ипилимумаб (ЕРВОЙ) и антитела против PD-1 (опдиво/ниволумаб и кейтруда/пембролизумаб). Другие иммуномодуляторы включают, но без ограничения, антитела против OX-40, антитела против PD-L1, антитела против LAG3, антитела против TIM-3, антитела против 41BB и антитела против GITR.

Ервой (ипилимумаб) представляет собой полностью человеческое антитело против CTLA-4, поставляемое на рынок Bristol Myers Squibb. Белковая структура ипилимумаба и способы его применения описаны в патентах США No. 6984720 и 7605238.

Опдиво/ниволумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело, поставляемое на рынок Bristol Myers Squibb, нацеленное против осуществляющего отрицательную иммунорегуляцию рецептора PD-1 поверхности клеток человека (белка-1 программируемой гибели или белка-1 программируемой гибели клеток/PCD-1), с иммуностимулирующей активностью. Ниволумаб связывается с PD-1 и блокирует активацию PD-1, трансмембранного белка суперсемейства Ig, посредством его лигандов PD-L1 и PD-L2, что приводит к активации Т-клеток и опосредованным клетками иммунным ответам против клеток опухолей или патогенов. Активированный PD-1 осуществляет отрицательную регуляцию активации Т-клеток и эффекторной функции посредством супрессии активации пути P13k/Akt. Другие наименования для ниволумаба включают BMS-936558, MDX-1106 и ONO-4538. Аминокислотная последовательность ниволумаба и способы его применения и получения описаны в патенте США No. US 8008449.

КЕЙТРУДА/пембролизумаб представляет собой антитело против PD-1, поставляемое на рынок Merck для лечения рака легкого, аминокислотная последовательность пембролизумаба и способы его применения описаны в патенте США No. 8168757.

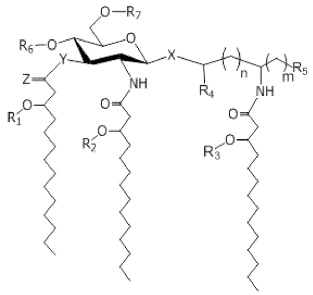
CD134, известный также как OX40, является членом суперсемейства рецепторов TNFR, который конститутивно не экспрессируется на покоящихся наивных Т-клетках, в отличие от CD28. OX40 представляет собой вторичную костимулирующую молекулу, экспрессирующуюся через 24-72 ч после активации; его лиганд, OX40L, также не экспрессируется на покоящихся антигенпредставляющих клетках, но экспрессируется после их активации. Экспрессия OX40 зависит от полной активации Т-клеток; без CD28, экспрессия OX40 замедляется и происходит в четыре раза более низком уровне. Антитела против OX-40, слитые с OX-40 белки и способы их применения описаны в патентах США No US 7504101; US 7758852; US 7858765; US 7550140; US 7960515; WO2012027328; WO2013028231.

Антитела против PD-L1 (обозначенные также как CD274 или B7-H1) и способы их применения описаны в патенте США No. 7943743; патенте США No. 8383796; US20130034559, WO2014055897, патенте США No. 8168179 и патенте США No. 7595048. Антитела против PD-L1 находятся в разработке как иммуномодулирующие средства для лечения злокачественных опухолей.

В рамках изобретения "иммуностимулирующее средство" относится к любому средству, которое может стимулировать иммунную систему. В рамках изобретения иммуностимулирующие средства включают, но без ограничения, адъюванты для вакцин.

Известно, что аминоалкилглюкозаминидфосфаты (AGP) можно использовать в качестве адъювантов для вакцин и иммуностимулирующих средств для стимуляции продукции цитокинов, активации макрофагов, стимуляции врожденного иммунного ответа, и усиления продукции антител у иммунизированных животных. Аминоалкилглюкозаминидфосфаты (AGP) являются синтетическими лигандами Toll-подобного рецептора 4 (TLR4). AGP и их иммуномодулирующие эффекты посредством TLR4 описаны в патентных публикациях, таких как WO 2006/016997, WO 2001/090129, и/или в патенте США No. 6113918 и опубликованы в литературу. Дополнительные производные AGP описаны в патенте США No. 7129219, патенте США No. 6525028 и патенте США No 6911434. Конкретные AGP действуют как агонисты TLR4, в то время как другие известны как антагонисты TLR4.

Соединения аминоалкилглюкозаминидфосфата, применяемые по настоящему изобретению, обладают структурой, указанной в следующей формуле 1:



(Формула 1)

где m составляет от 0 до 6;

n составляет от 0 до 4;

X представляет собой O или S, предпочтительно O;

Y представляет собой O или NH;

Z представляет собой O или H;

каждый из R_1, R_2, R_3 независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-20} ацила и C_{1-20} алкила;

R_4 представляет собой H или Me;

R_5 независимо выбран из группы, состоящей из -H, -OH, -(C_1-C_4) алкокси, $-PO_3R_8R_9$, $-OPO_3R_8R_9$, $-SO_3R_8$, $-OSO_3R_8$, $-NR_8R_9$, $-SR_8$, -CN, $-NO_2$, -CHO, $-CO_2R_8$ и $-CONR_8R_9$, где каждый из R_8 и R_9 независимо выбран из H и (C_1-C_4) алкила; и

каждый из R_6 и R_7 независимо представляет собой H или PO_3H_2.

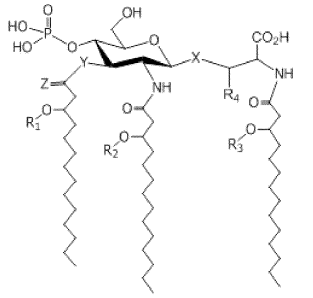
В формуле 1 конфигурация 3'-стереогенных центров, к которым в норме присоединены остатки жирного ацила (то есть остатки вторичного ацилокси или алкокси, например R_1O, R_2O и R_3O), представляет собой R или S, предпочтительно R (как обозначено по правилам старшинства Кана-Ингольда-Прелога). Конфигурация агликоновых стереогенных центров, к которым присоединены R_4 и R_5, может представлять собой R или S. Все стереоизомеры, как энантиомеры, так и диастереомеры и их смеси, считают входящими в объем настоящего изобретения.

Количество атомов углерода между гетероатомом X и агликоновым атомом азота определяют по меняющемуся "n", который может представлять собой целое число от 0 до 4, предпочтительно собой целое число от 0 до 2.

Длина цепи нормальных жирных кислот R_1, R_2 и R_3 может составлять от приблизительно 6 до приблизительно 16 атомов углерода, предпочтительно от приблизительно 9 до приблизительно 14 атомов углерода. Длина цепей может являться одинаковой или различной. Некоторые предпочтительные варианты осуществления включают длину цепей, где R_1, R_2 и R_3 составляют 6 или 10 или 12 или 14.

Формула 1 включает L/D-сериловые, -треониловые, цистеиниловые эфирные и сложноэфирные липидные AGP, как агонисты, так и антагонисты, и их гомологи (n=1-4), так же как различные биоизостеры карбоновой кислоты (т.е. R_5 представляет собой кислую группу, способную формировать соль; фосфат может находиться либо в 4-, либо в 6-положении глюкозаминового звена, но предпочтительно находится в 4-положении).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения с использованием соединения AGP формулы 1 n составляет 0, R_5 представляет собой CO_2H, R_6 представляет собой PO_3H_2 и R_7 представляет собой H. Это предпочтительное соединение AGP указано как структура в следующей формуле 1a:



(Формула 1a)

где X представляет собой O или S;

Y представляет собой O или NH;

Z представляет собой O или H;

каждый из R_1, R_2, R_3 независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-20} ацила и C_{1-20} алкила; и

R_4 представляет собой H или метил.

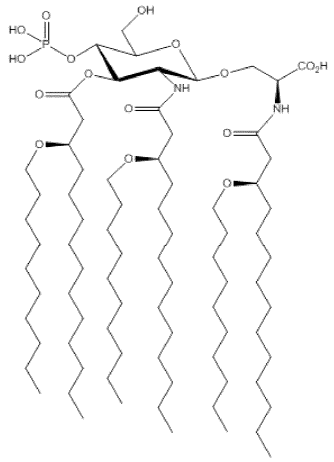
В формуле 1a конфигурация 3'-стереогенных центров, к которым в норме присоединены остатки

жирного ацила (то есть остатки вторичного ацилокси или алкокси, например R_1O, R_2O, и R_3O), представляет собой R или S, предпочтительно R (как обозначено по правилам старшинства Кана-Ингольда-Прелога). Конфигурация агликоновых стереогенных центров, к которым присоединены R_4 и CO_2H, может представлять собой R или S. Все стереоизомеры, как энантиомеры, так и диастереомеры и их смеси, считают входящими в объем настоящего изобретения.

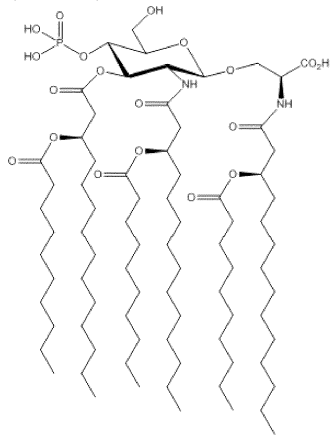
Формула 1a включает L/D-сериловые, -треониловые, цистеиниловые эфирные или сложноэфирные липидные AGP, как агонисты, так и антагонисты.

В формуле 1 и формуле 1a Z представляет собой O, присоединенный посредством двойной связи, или два атома водорода, каждый из которых присоединен посредством одинарной связи. То есть соединение обладает сложноэфирной связью, когда Z=Y=O; амидной связью, когда Z=O и Y=NH; и эфирной связью, когда Z=H/H и Y=0.

Особенно предпочтительные соединения формулы 1 обозначены как CRX-601 и CRX-527. Их структуры указаны следующим образом:



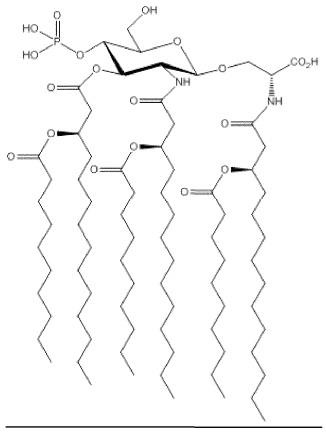
(CRX-601)



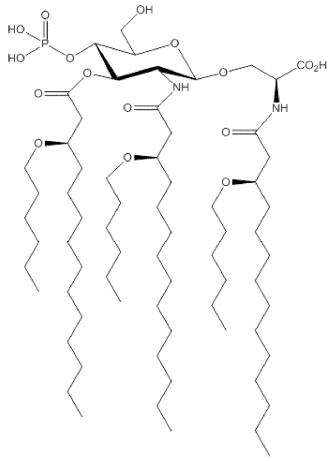
(CRX-527)

Кроме того, в другом предпочтительном варианте осуществления применяют CRX 547, обладающие показанной структурой.

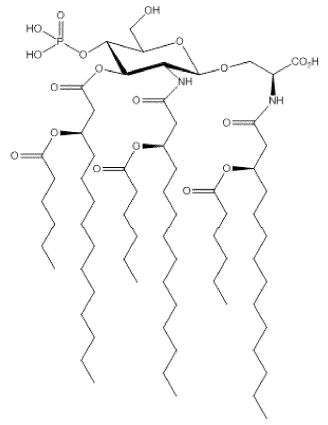
CRX 547



Другие варианты осуществления включают такие AGP, как CRX 602 или CRX 526, обеспечивающие увеличенную стабильность AGP, обладающих более короткими цепями вторичного ацила или алкила.



CRX 602



CRX-526

В одном варианте осуществления представлены способы лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом млекопитающего, включающие в себя введение такому млекопитающему терапевтически эффективного количества:

связывающего ICOS белка по настоящему изобретению и

b) по меньшей мере одного антинеопластического средства.

В одном варианте осуществления представлены способы лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом млекопитающего, включающие в себя: введение такому млекопитающему терапевтически эффективного количества:

связывающего ICOS белка по настоящему изобретению и

b) по меньшей мере одного второго иммуномодулирующего средства.

В одном варианте осуществления указанное второе иммуномодулирующее средство выбрано из группы из антитела против CTLA4, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против OX40, антитела против GITR и антитела против 41BB, антитела против LAG3 и антитела против TIM3.

В одном варианте осуществления представлены способы лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом млекопитающего, включающие в себя введение такому млекопитающему терапевтически эффективного количества:

связывающего ICOS белка по настоящему изобретению и

b) по меньшей мере одного иммуностимулирующего средства.

В одном варианте осуществления иммуностимулирующее средство представляет собой агонист TLR4. В одном варианте осуществления иммуностимулирующее средство представляет собой AGP. В одном аспекте иммуностимулирующее средство представляет собой соединение формулы I. В одном аспекте оно представляет собой соединение формулы 1a. В одном аспекте иммуностимулирующее средство выбрано из группы, состоящей из CRX-601, CRX-547, CRX-602, CRX-527 и CRX-526.

Примеры

Следующие примеры иллюстрируют различные неограничивающие аспекты этого изобретения.

Пример 1. Экспрессия ICOS в злокачественных опухолях.

Как правило, солидные опухоли, по-видимому, обладают низкими уровнями инфильтрующих $ICOS^+$ Т-клеток, что согласуется с теорией, что ICOS опосредует противоопухолевые иммунные ответы.

Разработаны анализы экспрессии ICOS для различных видов гистологии опухолей с использованием публично доступных наборов данных экспрессии мРНК из The Cancer Genome Atlas (TCGA) и других баз данных. В табл. 3 показан относительный процент опухолей для каждого вида гистологии, для которых показан некоторый поддающийся детекции уровень экспрессии мРНК ICOS. Этот анализ идентифицирует виды гистологии опухолей, как известно, чувствительных к другим способам иммунотерапии злокачественных опухолей (меланома, RCC, NSCLC), как обладающие относительно высоким процентом опухолей (>10%), обладающим поддающимся детекции количеством $ICOS^+$ инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL), в то время как типы опухолей, как известно, слабо иммуногенные (опухоли предстательной железы, яичников и поджелудочной железы), обладают относительно более низким процентом опухолей, обладающих $ICOS^+$ TIL (<10%) (табл. 3). Интересно, что типы опухолей, как известно, ассоциированные с вирусной инфекцией и/или хроническим воспалением (опухоли головы и шеи, желудка, пищевода и шейки матки), находились среди типов опухолей, для которых показан наивысший процент $ICOS^+$ TIL. Что является неясным из этих анализов экспрессии мРНК, это субпопуляция TIL, которая экспрессирует ICOS в каждом соответствующем типе опухолей. В некоторых случаях ICOS может предпочтительно экспрессироваться на инфильтрующих опухоль $T_{рег}$, в то время как в других случаях он может указывать на уровень инфильтрации $ICOS^+$ эффекторных Т-клеток.

Таблица 3

Экспрессия мРНК ICOS в различных типах опухолей

Тип опухоли	Суммарное N	ICOS+(N)	ICOS+ (процент)
головы и шеи	426	157	36,9%
желудка	285	75	26,3%
пищевода	70	17	24,3%
меланома (M)	295	69	23,4%
NSCLC(AD)	501	112	22,4%
NSCLC(SCC)	489	85	17,4%
шейки матки	185	32	17,3%
молочной железы	1048	162	15,5%
мочевого пузыря	244	35	14,3%
RCC	522	64	12,3%
меланома (P)	82	7	8,5%
поджелудочной железы	85	7	8,2%
толстой кишки	446	34	7,6%
щитовидной железы	498	34	6,8%
HCC	191	11	5,8%
саркома	103	4	3,9%
яичников	412	13	3,2%
предстательной железы	336	10	3,0%
эндометриальная	532	15	2,8%
прямой кишки	163	4	2,5%
GBM	156	0	0,0%

Анализ экспрессии ICOS посредством иммуногистохимии (IHC) при первичной немелкоклеточной карциноме легких (NSCLC) человека, трижды отрицательном раке молочной железы (TNBC), колоректальном раке (CRC), раке предстательной железы, поджелудочной железы, яичников, почечноклеточном раке (RCC) и меланоме проводили для лучшего понимания того, какие подгруппы TIL ассоциированы с экспрессией ICOS в различных типах опухолей (табл. 4). Подобно тому, что наблюдали в анализе экспрессии мРНК, количество $ICOS^+$ TIL являлось относительно низким, даже в индивидуальных опухолях, где в ином случае присутствовало большое количество $CD4^+$, $CD8^+$ и/или $FoxP3^+$ TIL. И снова, гистологические образцы меланомы, почечноклеточного рака (RCC) и немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC) обладали наивысшим процентом опухолей с некоторым поддающимся детекции уровнем $ICOS^+$ инфильтрата (табл. 4, столбец 2). И наоборот, для опухолей предстательной железы, яичников и поджелудочной железы почти не показано $ICOS^+$ TIL (табл. 4). Эти анализ ясно показывают, что солидные опухоли обладают низкими исходными уровнями $ICOS^+$ TIL, и можно получать преимущество от размножения и функциональной индукции этой популяции клеток. Дальнейшие исследования с исполь-

зованием проточной цитометрии и двухцветной иммуногистохимии для анализа первичных опухолей человека могут помочь определить, какие подгруппы специфических Т-клеток экспрессируют ICOS.

Таблица 4

Объект	Количество образцов	ICOS	Среднее количество положительных клеток (диапазон)				
			ICOS	CD3	CD4	CD8	FOXp3
NSCLC (плоскоклеточная)	n=17	-	0	11 (0-74)	2 (0-9)	20 (0-147)	10 (0-28)
	n=23	+	3 (0-25)	38 (2-143)	8 (0-26)	39 (5-188)	18 (0-75)
NSCLC (аденокарцинома)	n=15	-	0	36 (0-157)	4 (0-20)	71 (5-238)	10 (1-41)
	n=25	+	2 (0-7)	56 (0-181)	6 (0-39)	69 (10-201)	19 (0-55)
TNBC	n=24	-	0	14 (0-91)	9 (0-132)	17 (0-95)	6 (0-25)
	n=11	+	5 (0-20)	85 (3-259)	13 (0-45)	113 (2-393)	30 (2-81)
CRC	n=22	-	0	12 (0-47)	14 (0-44)	20 (0-83)	14 (2-52)
	n=23	+	2 (0-13)	31 (5-101)	22 (5-48)	53 (4-151)	24 (5-43)
Рак предстательной железы	n=29	-	0	10 (0-78)	17 (1-96)	23 (1-176)	5 (0-25)
	n=1	+	1	30	48	55	11
Рак поджелудочной железы	n=11	-	0	15 (1-32)	17 (3-71)	20 (3-81)	6 (0-21)
	n=4	+	0 (0-1)	31 (7-85)	17 (6-31)	17 (2-51)	4 (0-9)
Рак яичников	n=15	-	0	13 (0-105)	14 (1-78)	13 (0-83)	2 (0-12)
	n=5	+	1 (0-3)	19 (6-35)	13 (6-19)	32 (10-76)	7 (4-13)
RCC	n=3	-	0	50 (14-104)	58 (38-85)	56 (24-119)	4 (0-9)
	n=7	+	5 (1-16)	45 (10-130)	65 (26-164)	71 (12-232)	15 (3-28)
Меланома	n=7	-	0	42 (1-155)	12 (1-31)	35 (0-156)	5 (0-10)
	n=12	+	7 (0-21)	84 (13-222)	32 (13-70)	89(28-179)	19 (6-40)

Пример 2. Скрининг агонистических антител против ICOS.

Выделение первичных PBMC человека.

Свежую кровь получали от доноров крови и разводили 1:1 не содержащей фенола красного 10% средой RPMI1640. Среды с градиентом плотности в 50 мл конической пробирке Uni-Sep Max и центрифугировали при 400×g в течение 20 мин при комнатной температуре с отключенным тормозом. Полученный слой белых мононуклеарных клеток (лейкоцитарную пленку) осторожно переносили в новую 50-мл коническую пробирку через клеточное сито 100 мкм. Равный объем не содержащей фенола красного 10% среды RPMI1640 добавляли к лейкоцитарной пленке и центрифугировали при 300×g в течение 10 мин при комнатной температуре. Осадок клеток ресуспендировали в 10 мл раствора для лизиса эритроцитов (Sigma Aldrich) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Клетки промывали один раз средой и центрифугировали, как описано ранее. Объем доводили до 40 мл с использованием не содержащей фенола красного 10% среды RPMI1640, и клетки подсчитывали с использованием счетчика клеток и анализатора жизнеспособности Vicell (Beckman Coulter).

Выделение первичных CD4+CD25- эффекторных Т-клеток человека.

Клетки CD4+CD25 человека дополнительно очищали из PBMC посредством двухстадийного способа выделения на основе магнитных бусин с использованием набора для выделения CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток человека (Miltenyi Biotec). Сначала клетки PBMC инкубировали с со смесью биотина-антитела при 4°C в течение 5 мин и затем инкубировали с микробусинами против биотина в течение 10 мин. Эту стадию проводили для мечения не относящихся к CD4+ Т-клеток. Затем клетки пропускали через колонку LD в магнитном поле сепаратора MidiMACS. Эффлюент, представляющий собой немеченную предварительнно обогащенную фракцию CD4+ клеток, собирали и инкубировали с бусинами CD25 MicroBeads при 4°C в течение 15 мин. Меченые клетки пропускали через колонку MS в магнитном поле сепаратора MiniMACS. Проскок, содержащий немеченные CD4-CD25- эффекторные Т-клетки, собирали для анализов нижестоящей активации.

Выделение первичных CD4+ Т-клеток человека непосредственно из крови.

CD4+ Т-клетки человека выделяли непосредственно из свежей крови человека с использованием смеси для обогащения CD4+ Т-клеток человека (Stem Cell Technologies). Смесь для обогащения CD4+ Т-клеток человека RosetteSep (50 мкл/мл) добавляли к цельной крови и хорошо перемешивали. После 20 мин инкубации при комнатной температуре, равный объем PBS+2% FBS добавляли с осторожным перемешиванием. Разведенный образец наслаивали поверх среды с градиентом плотности и центрифугировали в течение 20 мин при 1200×g при комнатной температуре с отключенным тормозом. Обогащенные клетки с границы раздела среда с градиентом плотности: плазма осторожно переливали в новую коническую пробирку. Затем эритроциты лизировали с использованием буфера для лизиса эритроцитов (Sigma Aldrich), и обогащенные клетки промывали с использованием PBS+2% FBS дважды. CD4+ Т-клетки ресуспендировали в 40 мл PBS+2% FBS и подсчитывали в счетчике клеток Vi-Cell.

Экспериментальные способы.

Анализ активации in vitro CD4+CD25- эффекторных Т-клеток человека - анализ в связанном формате.

Не обработанные для культивирования клеток 96-луночные плоскодонные планшеты покрывали с использованием 100 мкл/лунку буфера для покрытия (Biolegend), содержащего 1 мкг/мл антитела против CD3 человека (eBioscience) и различные тестируемые антитела, в течение ночи. На следующие сутки, предварительно покрытые планшеты промывали три раза содержащей 10% FBS средой RPMI-1640. CD4+CD25- эффекторные Т-клетки человека выделяли и метили с использованием CFSE, как описано, и рассевали в планшеты. После инкубации при 37°C в течение 2,5 суток, клетки собирали и анализировали посредством проточной цитометрии по экспрессии маркеров пролиферации и активации. Супернатанты культур клеток также собирали для мультиплексного измерения цитокинов посредством Meso Scale Discovery (MSD).

Анализ пролиферации CFSE.

Клетки, подлежащие мечению, ресуспендировали в 1 мл предварительно нагретого PBS при конечной концентрации вплоть до 1E7 клеток/мл в 15 мл конической пробирке. Один микролитр 2 мМ исходного раствора CFSE (Life Technologies) добавляли непосредственно к клеткам с последующим немедленным перемешиванием на встряхивателе для обеспечения равномерного мечения. После инкубации при комнатной температуре в течение 5 мин, окрашивание останавливали добавлением 14 мл ледяной среды для культивирования клеток. Меченые клетки промывали три раза ледяной средой. Клетки подсчитывали и доводили до 4E6 клеток/мл в RPMI1640+10% FBS, дополненной 100 МЕ/мл IL-2 (PeproTech) и рассевали в планшеты, покрытые антителами против CD3 и тестируемыми антителами. После активации Т-клеток клетки собирали и промывали PBS+0,5% BSA один раз до перехода к стадии многоцветного окрашивания для анализа проточной цитометрии.

Многоцветная проточная цитометрия.

Активированные Т-клетки собирали и промывали PBS. Клетки сначала окрашивали с использованием чувствительного к жизнеспособности клеток фиксируемого красителя дальнего красного спектра LIVE/DEAD (Life Technologies), в соответствии с протоколом поставщика. После отмывки красителя антитела для детекции, конъюгированные с различными красителями, инкубировали с клетками при 4°C в течение 30 мин. Окрашенные клетки промывали один раз ледяным буфером для окрашивания FACS (PBS+0,5% BSA) перед обработкой на проточном цитометре FACS Canto или FACS Canto II. Рабочие характеристики цитометра проверяли ежесуточно с использованием бусин для установки и проверки цитометра (BD Biosciences), и масштабирование напряжения PMT и площади проводили на основании неокрашенных клеток. Компенсацию выполняли с использованием бусин OneComp или UltraComp (eBioscience), индивидуально окрашенных с использованием антител для детекции, конъюгированных с флуорохромом.

Анализ цитокинов MSD.

Уровень цитокинов IFN-γ, IL-10, IL-2 и TNF-α в супернатанте культуры клеток определяли с использованием изготовленного на заказ набора MSD human V-Plex. Образцы сначала разводили 1:200 в разбавителе 2. Калибратор также подготавливали в разбавителе 2 в соответствии с инструкцией к набору. Разведенные образцы и калибраторы добавляли в черный планшет MSD, который затем герметично закрывали клейкой пленкой для планшетов и инкубировали при комнатной температуре с встряхиванием в течение 2 ч. После добавления 25 мкл раствора антитела для детекции, свежеприготовленного в разбавителе 2, в каждую лунку, планшет снова герметично закрывали и инкубировали при комнатной температуре с встряхиванием в течение следующих 2 ч. Планшеты промывали 3 раза с использованием 150 мкл/лунку PBS плюс 0,05% Tween-20 перед добавлением 150 мкл/лунку свежеразведенного 2× буфера для считывания, и немедленно считывали на считывателе MESO QuickPlex. Данные анализировали с использованием программного обеспечения MSD Workbench.

Анализ активации CD4+ Т-клеток человека in vitro - в связанном и растворимом формате.

Свежевыделенные CD4+ Т-клетки человека подвергали предварительной стимуляции в 24-луночных планшетах с использованием антител против CD3 (1 мкг/мл) и антител против CD28 (3

мкг/мл) в течение 48 ч. Клетки собирали, промывали и смешивали с DynaBeads против CD3 (Life Technologies) в соотношении 1:1 в среде AIM-V, дополненной 100 МЕ/мл IL-2 (PeproTech). Затем смесь клеток/бусин рассевали при 100000 на лунку в 96-луночные плоскодонные планшеты, либо без покрытия (для растворимого формата), либо с покрытием H2L5 hIgG4PE (для связанного формата). Для растворимого формата H2L5 hIgG4PE добавляли в лунки на время рассева клеток. После инкубации при 37°C в течение 3,5 суток супернатанты культур клеток собирали для мультиплексного измерения цитокинов посредством MSD.

Анализ in vitro активации PBMC человека в растворе.

Свежевыделенные PBMC человека подвергали предварительной стимуляции в 24-луночных планшетах, покрытых антителами против CD3 (1 мкг/мл) и антителами против CD28 (5 мкг/мл) в течение 48 ч. Окрашенные CFSE клетки получали и смешивали с DynaBeads против CD3 (Life Technologies) в соотношении 1:1 в среде AIM-V, дополненной 100 МЕ/мл IL-2 (PeproTech). Затем смесь клеток/бусин рассевали при 200000 на лунку в 96-луночные плоскодонные планшеты, предварительно покрытые 1 мкг/мл антитела против CD3. H2L5 hIgG4PE и контрольное антитело добавляли непосредственно в лунки в их растворимой форме. После инкубации при 37°C в течение 3,5 суток супернатанты культур клеток собирали для мультиплексного измерения цитокинов посредством MSD, и клетки собирали для анализа пролиферации и экспрессии маркеров посредством проточной цитометрии.

Анализ данных.

Анализ данных проточной цитометрии.

Данные проточной цитометрии анализировали посредством программного обеспечения FlowJo (FlowJo LLC). Сначала мертвые клетки отбирали на основании окрашивания чувствительным к жизнеспособности клеток красителем LIVE/DEAD. Дублеты отсекали на диаграмме рассеяния FSC-H: FSC-W. Полученные в результате живые отдельные клетки анализировали по экспрессии маркеров активации в различных субпопуляциях Т-клеток, таких как CD4+ или CD8+ Т-клетки, и выражали как процент от исходной популяции или медианную интенсивность флуоресценции (MFI).

Анализ пролиферации CFSE.

Данные CFSE анализировали также посредством Flowjo. После исключения мертвых клеток и дублетов, окно "пролиферировавших клеток" определяли на основании неактивированных Т-клеток. Любые клетки, попавшие в это окно в любом данном образце, считали пролиферировавшими клетками. Данные регистрировали как процент пролиферации.

Анализ истощения клеток посредством FACS.

Истощение клеток анализировали посредством FlowJo. Сначала окно для живых клеток определяли на основании окрашивания чувствительным к жизнеспособности клеток красителем LIVE/DEAD. Затем дублеты отсекали, как описано ранее. Проценты субпопуляций живых CD4+ или CD8+ Т-клеток рассчитывали в качестве показателя истощения клеток.

Анализ подбора кривой ответа в зависимости от дозы антител

Данные ответа в зависимости от дозы импортировали в программное обеспечение GraphPad Prism и трансформировали в логарифмической шкале. Ответ в зависимости от дозы агониста в моделях с различным углом наклона кривой использовали для подбора кривой, соответствующей данным, и получения значений EC50. Формула подбора приведена ниже

Y=нижнее+(верхнее-нижнее)/(1+10^((LogEC50-X)*угол наклона))

Результаты

Идентификация наилучших мышиных антител против ICOS человека.

Проводили скрининг четырнадцати мышиных mAb по связыванию ICOS человека и яванского макака и агонистической активности. Двенадцать было возможно переклонировать, секвенировать, вырастить и очистить в достаточных количествах для функциональных исследований. Все тестировали по характеристикам связывания с использованием BIAcore. Обнаружили, что два связывались очень слабо/не связывались. Десять очищенных mAb тестировали посредством функционального анализа "агонизма". Четыре наилучших агониста mAb (обозначенные как 422.2, 279.1, 314.8 и 88.2 в табл. 5 ниже), на основании их способности индуцировать пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокина IFN-γ у множества здоровых доноров-людей, отбирали и получали в форме химер с человеческими IgG1. Последовательности CDR для 314.8, 88.2, 92.17, 145.1 и 53.3 показаны вместе с другими mAb против ICOS в PCT/EP2012/055735 (WO 2012/131004).

Вариабельная область тяжелой цепи для клона 88.2 представлена ниже как SEQ ID NO:13

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSFTSYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSYTN

YNQMFKDKATLTVDKSSNTAYMQLTSPTSEDSAVYYCTRWNLSYYFDNNYYLDYWGQGTTLTVS

S (SEQ ID NO:13)

Вариабельная область легкой цепи для клона 88.2 представлена ниже как SEQ ID NO:14

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPG

VPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYNNHLVFGGGTKLTVL (SEQ ID

NO:14)

Таблица 5

Связывание и конкуренция mAb против ICOS

Клон # mAb против ICOS	Biacore для человека (нМ)	Biacore для яванского макака (нМ)	Реакционноспособные по отношению к CD28/CTLA4	Ингибирование связывания ICOS-L	Конкуренция против 314.8	Конкуренция против 121.4
53.3	30.4	19.7	-	++	+	+
88.2	31	23	-	+	+	+
92.17	27.5	18.8	-	++	+	+
145.1	49.5	43.5	-	++	+	+
314.8	17	9.3	-	+++	+	+
121.4	15	58	-	-	-/+	-/+
202.24	46	19	-	+	+	+
279.1	39	33	-	+	+	+
293.1	7.6	10	-	++	+	+
422.2	5.7	4.46	-	++	++	+

Восемь из лучших связывающих ICOS клонов тестировали по продукции IFN-γ и пролиферации Т-клеток с использованием анализа на основе клеток в дизайне повышения дозы по сравнению с контрольными мышиными IgG1 и EPR7114. На основании этих анализов, клон, обозначенный 422.2, выбран для гуманизации; см. фиг. 1 и 2.

Пример 3. Гуманизация антител.

Экспериментальный способ(ы).

Выделение вариабельных генов антитела из мРНК и получение химерного антитела с Fc дикого типа.

Тотальную РНК очищали из осадка клеток гибридомы 422.2, подвергали обратной транскрипции для получения кДНК, из которой продукты вариабельных генов, приблизительно 400 п.о., выделяли посредством ПЦР и очищали посредством электрофореза в агарозном геле.

Очищенные фрагменты вариабельной области клонировали в векторы pTT5, содержащие либо константную область IgG1 человека, либо константную область каппа человека, и трансформировали ими компетентные клетки DH5a. Колонии отбирали и использовали для инокуляции L-среды, содержащей ампициллин. Плазмидную ДНК выделяли из культур с использованием набора для выделения в минимасштабе QuickLyse. Гены вариабельной тяжелой и легкой цепей секвенировали, и данные о последовательности выравнивали способами информатики для идентификации последовательностей генов вариабельной тяжелой и легкой цепей.

Клонирование химерных антител 422.2 с оптимизацией кодонного состава.

Зрелые белковые последовательности мышиной вариабельной области подвергали обратной трансляции в ДНК, затем оптимизации кодонного состава. Затем последовательности V_H и V_L модифицировали для включения предпочтительной пять-штрих-нетранслируемой области и предпочтительных участков для клонирования с любого конца. Адаптированную последовательность V_H конструировали de novo с использованием способа на основе ПЦР, и затем перекрывающиеся олигонуклеотиды прививали в IgG1 человека с Fc дикого типа или в hIgG1 с инактивированным Fc (L235A, G237A), или в hIgG4 со стабилизированной шарнирной областью (S228P, L235E) (IgG4PE), присутствующие в векторах pTT. Адаптированную последовательность V_L конструировали de novo с использованием способа на основе ПЦР, и затем перекрывающиеся олигонуклеотиды прививали в kappa константную область каппа, присутствующую в векторе pTT5.

Полученные плазмиды pTT использовали для трансфекций HEK для получения химерных антител.

Гуманизация вариабельных доменов 422.2.

Матрицы вариабельных (V) генов выбирали для гуманизации 422.2 посредством поиска в подходящих базах данных собственной разработки для зародышевой тяжелой и легкой цепей с использованием V областей 422.2 с замаскированными CDR с использованием BLASTP. IGHV1-69 и IGKV3-11 выбрали из наилучших совпадений в BLASTP в качестве матриц каркасной области V гена для гуманизации 422.2. Человеческие зародышевые соединительные (J) гены IGHJ6 и IGKJ2 выбраны для гуманизации 422.2.

Различия остатков между человеческих зародышевыми генами и последовательности 422.2 идентифицировали, чтобы способствовать выбору обратных мутаций (мутаций, введенных для изменения специфического остатка человеческой каркасной области на мышиный остаток). Шесть гуманизированных вариантов VH и шесть гуманизированных вариантов V_L разработали, подвергли оптимизации кодонного состава и затем модифицировали для включения предпочтительных 5'- и 3'-удлинений. Адаптированные последовательности вариабельной области конструировали de novo с использованием способа на основе ПЦР, и затем перекрывающиеся олигонуклеотиды соответственно клонировали в векторы pTT.

Полученные плазмиды pTT использовали в трансфекциях HEK для получения гуманизированных антител. Клетки HEK2936E в суспензии подсчитывали и разводили до $1{,}5\times10^6$ клеток/мл - 2×10^6 клеток/мл с использованием среды для экспрессии 293 Freestyle, дополненной 0,05% генетицином, и для некоторых экспериментов, дополненной 1% плюроником F68. ДНК и реагент для трансфекции (Gemini или 293-Fectin) добавляли к OptiMEM и осторожно гомогенизировали перед инкубацией в течение 20-30

мин при комнатной температуре. Затем ДНК-липидные комплексы объединяли с суспензиями клеток, и трансфицированные клетки инкубировали при 37°C, 5% CO2, 125 об/мин. Для некоторых трансфекций питательную среду с триптоном (среду для экспрессии 293 Freestyle, дополненную 1% плюроником F68 и 20% мас./об. казеинового триптона) добавляли в среду для трансфекции через 24-48 ч после трансфекции. Суспензии трансфицированных клеток инкубировали в течение 5-8 суток, пока количество жизнеспособных клеток не падало ниже 60%, затем центрифугировали (в зависимости от конструкции). Супернатанты собирали и фильтровали.

Антитела очищали посредством пропускания супернатантов через 1 мл колонку HiTrap HP с белком A для обеспечения связывания антитела, промывки колонки посредством 10 мл PBS и элюции с использованием 5 мл IgG Elute (Pierce, 21009). Очищенный белок подвергали обмену буфера на PBS с использованием фильтрующих центрифугируемых единиц Millipore Centricon® (отсечение 30000) и оценивали количественно на спектрофотометре Nandrop.

Результаты

Сконструированные экспрессирующие плазмиды.

Последовательности вариабельного гена мышиного антитела из клона гибридомы 422.2 успешно выделяли, и последовательности показаны ниже как SEQ ID NO: 19 и 20 соответственно так же, как на фиг. 8.

422 HC

QVQLQQSGPELVRPGESVKISCMGSGYTFTDYAMHWVKQSHAKSLEWIGLISIYSDHTN

YNQKFQGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCGRNNYGNYGWYFDVWGAGTTVTVSS

(SEQ ID NO:19)

422 LC

ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSITSPKLWIYDTSKLASGVPG

RFSGSGSGNSYSLTISSMEAEDVATYYCFQGSGYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:20)

Клонирование выделенных вариабельных областей в избранные векторы pTT5 привело в результате к получению плазмид, кодирующих последовательность химерной легкой цепи 422.2 и последовательности химерной тяжелой цепи в hIgG1 с Fc дикого типа, hIgG1 с инактивированным Fc (L235A/G237A, нумерация по EU) или в hIgG4 PE (S228P/L235E, нумерация EU). Химерные антитела использовали для подтверждения функциональности клонированных мышиных областей V и для идентификации наиболее пригодного изотипа.

Конструирование экспрессирующих плазмид pTT для млекопитающих, кодирующих тяжелые и легкие цепи различных гуманизированных вариантов 422.2, проведено успешно.

Экспрессия, очистка и идентификация H2L5 hIgG4PE.

Последовательности зрелого белка H2L5 hIgG4PE включены в фиг. 9 с дополнительными обозначениями. Последовательности ДНК кодирующих областей тяжелых и легких цепей H2L5 hIgG4PE включены в фиг. 10 и 11.

Пример 4. Функциональный анализ H2L5.

Связывание рецептора Fc.

Гуманизированное антитело H2L5 модифицировали от изотипа IgG1 человека до модифицированного изотипа IgG4 человека, включающего мутации S228P, L235E (нумерация EU) для предотвращения обмена антигенсвязывающими фрагментами (Fab). IgG4PE человека выбран вместо IgG1 человека, поскольку он уменьшает связывание mAb с активирующими рецепторами Fcγ и C1q, таким образом, уменьшая потенциал mAb индуцировать истощение положительных по ICOS клеток посредством антителозависимой цитотоксичности (ADCC) или комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Кроме того, IgG4PE человека (S228P, L235E) сохраняет связывание с FcγRIIb (ингибирующим рецептором Fcγ).

Взаимодействие с FcγRIIb может быть критическим для агонистической активности антител против ICOS посредством обеспечения перекрестного связывания антител. Показано, что взаимодействие с FcγRIIb является критическим для агонистической активности других иммуномодулирующих антител, нацеленных на рецепторы семейства TNF-α, так же, как на CD28 (Bartholomaeus P. et al., "Cell contact-dependent priming and Fc interaction with CD32+ immune cells contribute to the TGN1412-triggered cytokine response". J. Immunol., 192(5); 2091-8 (2014)).

Кроме того, показано, что IgG4PE человека уменьшает связывание mAb с активирующими рецепторами Fcγ (FcγRI, FcγRIIa и FcγRIIIa) и C1q, таким образом уменьшая потенциал mAb индуцировать истощение положительных по ICOS клеток посредством антителозависимой цитотоксичности (ADCC) или комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Кроме того, IgG4PE (S228P, L235E) человека сохраняет связывание с FcγRIIb (ингибирующим рецептором Fcγ) (табл. 6).

В табл. 6 ниже показана репрезентативная аффинность связывания с рецепторами Fcγ человека наилучшего H2L5 в форме антитела либо hIgG1, либо hIgG4PE.

Таблица 6

Репрезентативная аффинность наилучшего гуманизированного антитела

против ICOS, в форме либо hIgG1, либо hIgG4PE, для рецепторов Fcγ человека

Антитела	FcγR I	FcγR IIa H131	FcγR IIa R131	FcγR IIb	FcγR IIIa V158	FcγR IIIa F158
	KD (нМ)	KD (нМ)	KD (нМ)	KD (нМ)	KD (нМ)	KD (нМ)
422 H2L5 IgG1 WT	60,8	405	662	1340	281	862
422 H2L5 hIgG4PE (H2L5 IgG4PE)	645	NB	2500	1470	NB	NB

NB=отсутствие связывания.

Экспериментальный способ.

Функциональная оценка гуманизированных вариантов 422.2.

Для гуманизации четырех кандидатов на агонистические антитела против ICOS, получали мышиные-человеческие химеры, представляющие собой слитые белки из мышиной области V и части Fc IgG1 человека. Эти четыре химерных антитела тестировали в анализе активации суммарных PBMC человека в связанной с планшетом форме. Для химеры 422.2 против ICOS показана наилучшая агонистическая активность в анализе активации связанных PBMC. По объединенным данным связывания и биофизическим свойствам клон 422.2 выбрали для гуманизации. Четыре гуманизированных варианта 422.2 выбрали на основании связывания с ICOS и биофизических характеристик (422.2 H2L0, H2L5, H5L0 и H5L5) и тестировали в анализах активации связанных PBMC. Для варианта H2L5 показали сравнимую или лучшую активацию Т-клеток, как измерено по продукции цитокинов, относительно других вариантов (фиг. 3).

Вариабельная область тяжелой цепи (V_H) и зрелая тяжелая цепь для варианта H5 представлены ниже как SEQ ID NO:15 и 16 соответственно.

H5 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQGLEWIGLISIYSDHTN

YNQKFQGRATMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYGWYFDVWGQGTTVTVSS

(SEQ ID NO:15)

Зрелая тяжелая цепь H5

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQGLEWIGLISIYSDHTN

YNQKFQGRATMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYGWYFDVWGQGTTVTVSSAS

TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS

SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP

KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ

DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS

DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK

SLSLSPGK (SEQ ID NO:16)

Вариабельная область легкой цепи (V_L) и зрелая легкая цепь для варианта L0 представлены ниже как SEQ ID NO:17 и 18 соответственно.

L0 V_L

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPA

RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCFQGSGYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:17)

Зрелая легкая цепь L0

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPA

RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCFQGSGYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ

LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK

HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:18)

Выбор IqG4[PE] в качестве изотипа.

Затем 422 H2L5 IgG1 тестировали в различных анализах активации суммарных PBMC в растворимой форме. Этот растворимый формат, по-видимому, более соответствует состоянию in vivo, поскольку в анализах суммарных PBMC лимфоциты, моноциты и другие иммуноциты содержатся в одной и той же лунке. Однако для 422 H2L5 IgG1 mAb постоянно показывали уменьшенную жизнеспособность популяций Т-клеток, напоминающую истощение Т-клеток. Этот результат наблюдали в различной степени для 11 здоровых доноров, которых тестировали, и он был более выражен для CD4+ Т-клеток, чем для CD8+ Т-клеток. В отличие от этого, для антитела 422 H2L5 не показано значительного уменьшения жизнеспособности Т-клеток при экспрессии в форме либо изотипа IgG4[PE], либо изотипа с инактивированным Fc, что позволяет предполагать, что уменьшенная жизнеспособность может быть обусловлена опосредованной FcγR антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) (фиг. 4).

Зависимый от дозы H2L5 hIqG4PE ответ в анализе активации CD4+ Т-клеток.

Для количественной оценки эффектов активации Т-клеток посредством H2L5 hIgG4PE первичные CD4+ Т-клетки человека сначала подвергали предварительной стимуляции посредством связанного с

планшетом антитела против CD3 (1 мкг/мл)/антитела против CD28 (3 мкг/мл) в течение 48 ч для повышения уровня рецептора ICOS на поверхности популяций эффекторных Т-клеток, с последующей повторной стимуляцией с использованием DynaBeads против CD3 и H2L5 hIgG4PE. 10-Точечную кривую зависимости ответа от дозы получали посредством обработки предварительно стимулированных CD4+ Т-клеток с использованием серийных концентраций связанного или растворимого H2L5 hIgG4PE в присутствии DynaBeads против CD3. Результаты показали, что как связанное, так и растворимое H2L5 hIgG4PE увеличивало продукцию цитокинов IFN-γ и TNF-α зависимым от дозы образом у двух отдельных здоровых доноров-людей (фиг. 5). Анализ подбора кривой ответа в зависимости от дозы проводили для получения значений EC50. Интересно, что обработка H2L5 hIgG4PE приводила к значительно большему диапазону индукции цитокинов, когда антитело являлось фиксированным на планшете, в отличие от добавления в форме растворимого белка в супернатант культур Т-клеток.

Функциональное тестирование H2L5 hIqG4PE в анализе активации PBMC человека в растворе.

Для тестирования функции H2L5 hIgG4PE в культуре суммарных PBMC человека ex vivo PBMC от здоровых доноров-людей подготавливали с помощью связанных с планшетом антител против CD3 и антител против CD28 в течение 48 ч, с последующей обработкой растворимым H2L5 hIgG4PE в присутствии dynabeads против CD3 (соотношение бусины:клетки=1:1) в течение 3,5 суток. Продукцию цитокинов и экспрессию гранзима B Т-клетками проверяли в качестве функциональных показателей функции Т-клеток. Результаты от 3 доноров обобщены на фиг. 6, предоставляя доказательство для предположения, что H2L5 hIgG4PE индуцирует пролиферацию, продукцию цитокинов и увеличенный цитотоксический потенциал в активированных PBMC от здоровых доноров-людей (фиг. 6).

Активность mAb против ICOS по отношению к предварительно стимулированным PBMC человека.

Активность H2L5 hIgG4PE оценивали в анализе предварительной стимуляции PBMC, в котором PBMC подвергали предварительной стимуляции посредством связанного с планшетом антитела против CD3 (клон OKT3, 1 мкг/мл) и антитела против CD28 (клон CD28.2, 3 мкг/мл) в течение 48 ч. Затем, для идентификации оптимальных условий предварительной стимуляции, Dynabeads CD3 и Dynabeads CD3/CD28 для человека (ThermoFisher) в различных соотношениях бусин к клеткам использовали для предварительной стимуляции PBMC. После 48 час предварительной стимуляции, клетки собирали, и бусины удаляли с помощью магнита перед повторной стимуляцией с использованием Dynabeads против CD3 (соотношение бусин к клеткам=1:1) в присутствии или в отсутствие растворимого mAb против ICOS. Агонистическое mAb против ICOS H2L5 hIgG4PE приводило к индукции IFNγ по сравнению с контролем для изотипа во всех тестированных условиях предварительной стимуляции; однако диапазон продукции IFNγ обратно коррелировал с силой предварительной стимуляции.

Пример 5. Маркеры активации Т-клеток.

Способы.

Зависимые от концентрации изменения функциональных конечных точек оценивали посредством обработки PBMC здоровых людей иммобилизованным H2L5 hIgG4PE в диапазоне концентраций от 0,1 до 100 мкг/мл параллельно с обработкой антителом против CD3 при 0,6 мкг/мл. Изменения экспрессии поверхностных маркеров активации Т-клеток CD69, OX40 и CD25 оценивали посредством проточной цитометрии и рассматривали как измерение активации Т-клеток. Пролиферацию Т-клеток измеряли по изменению окрашивания ядер Ki67. Изменение уровней различных цитокинов Th1, Th2 и Th17 оценивали на платформе MSD в ответ на обработку H2L5 hIgG4PE в присутствии обработки CD3. Временные точки через 24 и 48 ч после обработки выбирали для обеспечения фиксации ранних изменений уровней цитокинов так же, как изменений пролиферации, которые преимущественно отмечают в более поздних временных точках.

Экспериментальный препарат(ы).

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека.

Цельную кровь отбирали у здоровых доноров с использованием шприцов, покрытых жидким гепарином натрия (Sagent, конечная концентрация 10 МЕ/мл), и затем разводили 1:1 фосфатно-солевым буфером (PBS). Разведенную кровь (35 мл) наслаивали поверх 15 мл среды с градиентом плотности фиколла (GE Healthcare) и центрифугировали 1200×g в течение 20 мин при комнатной температуре (RT) с отключенным тормозом. Слой белых мононуклеарных клеток осторожно переносили в новую 50-мл пробирку. Равный объем PBS добавляли в пробирку и центрифугировали при 400×g в течение 5 мин при RT. PBMC промывали один раз с использованием PBS и центрифугировали, как описано ранее. PBMC ресуспендировали в 50 мл среды AIM-V. Клетки подсчитывали с использованием счетчика клеток и анализатора жизнеспособности Vi-Cell (BeckmanCoulter).

Покрытие антителом.

Антитело против CD3 человека разводили в буфере для покрытия до конечной концентрации 0,6 мкг/мл. С использованием 100 мкл разведенного антитела покрывали 96-луночный, плоскодонный планшет в течение ночи при 4°C. На следующие сутки, исходные растворы 10,1 мг H2L5 hIgG4PE и 7,9 мг антитела против RSV, контрольного для изотипа IgG4 PE, серийно разводили 1:2 в буфере для покрытия для получения конечных концентраций антитела в диапазоне от 100 до 0,1 мкг/мл. С использованием

100 мкл разведенных антител покрывали планшет, покрытый антителом против CD3 в течение 4 ч при комнатной температуре.

Экспериментальный способ(ы).

Анализ активации PBMC человека.

H2L5 hIgG4PE тестировали в анализе активации PBMC человека, где привлечение TCR посредством антитела против CD3 и костимуляция ICOS с H2L5 hIgG4PE происходит одновременно, и эффекты активации мониторировали через 24 и 48 ч после активации. Этот эксперимент повторяли четыре раза (n=4) с кровью от четырех различных доноров. 200 мкл PBMC (1×10^6 клеток/мл) в среде AIM-V добавляли в покрытые антителом против CD3 лунки с различными концентрациями H2L5 hIgG4PE или контроля для изотипа IgG4. Три технических повтора включали для каждых условий анализа. PBMC культивировали при 37°C и 5% CO_2 в течение различных периодов времени, как указано выше. Супернатанты собирали во временных точках 24 и 48 ч и затем сохраняли при -80°C для анализа секретированных цитокинов на платформе MSD.

Клетки переносили в 96-луночный планшет с глубокими лунками через 24 и 48 ч и промывали дважды с использованием 1-мл буфера для окрашивания для FACS, окрашенного с использованием конъюгированных с флуорофором антител или контроля для изотипов.

Окрашивание поверхности клеток.

Клетки сначала окрашивали 100 мкл фиксируемого красителя для определения жизнеспособности eFluor 506, предварительно разведенного 1:1000 в PBS в течение 30 мин в темноте при 4°C. Клетки промывали и затем инкубировали с антителами для детекции поверхностных маркеров клеток, конъюгированными с различными флуорофорами, на льду в течение 30 мин. После окрашивания антителами против клеточной поверхности образцы, не подлежащие окрашиванию по маркерам интернализации, промывали один раз ледяным буфером для окрашивания для FACS перед анализом на проточном цитометре FACS Canto II.

Рабочие характеристики цитометра проверяли ежесуточно с использованием бусин для установки и проверки цитометра. Компенсацию выполняли с использованием набора бусин AbC против антител мыши, индивидуально окрашенных антителами для детекции, конъюгированными с каждым флуорохромом. Образцы анализировали, и данные, полученные после установки подходящей компенсации, подтверждали с использованием смеси бусин, упомянутых выше.

Внутриклеточное окрашивание Foxp3 и Ki67.

После поверхностного окрашивания клеток, клетки фиксировали и пермеабилизировали для окрашивания внутриклеточных маркеров. С использованием набора буферов для факторов транскрипции буфер для фиксации/пермеабилизации подготавливали посредством его разведения 1:3 в буфере-разбавителе. Буфер для пермеабилизации/промывки подготавливали посредством разведения 5X исходного раствора буфера для пермеабилизации/промывки в деионизированной воде. 1 мл буфера для фиксации/пермеабилизации добавляли к каждому образцу, и планшеты немедленно перемешивали с встряхиванием на встряхивателе. Планшеты инкубировали в темноте при 4°C в течение 45 мин. После центрифугирования, добавляли 1 мл буфера для пермеабилизации/промывки, и содержимое планшетов перемешивали, и планшеты центрифугировали в течение всего двух промывок. Получали смесь для интернализации с маркерными антителами. 100 мкл антител для интернализации добавляли к соответствующим образцам, и планшеты инкубировали в темноте при 4°C в течение 30 мин. Образцы промывали дважды с использованием 1 мл буфера для пермеабилизации/промывки, ресуспендировали в 250 мкл буфера для проточной цитометрии и анализировали в проточном цитометре FACS Canto II.

Разработанный на заказ 9-плексный анализ цитокинов человека Уровни цитокинов измеряли с использованием разработанного на заказ 9-плексного набора MSD для человека. Образцы и калибраторы разводили в разбавителе 43. Образцы, разведенные 1:10 для 9-плексного анализа и 1:200 для описанного анализа IFNγ, в 0,250 мкл разбавителя, добавляли к каждой из двух панелей калибраторов. После встряхивания калибраторы инкубировали на льду в течение по меньшей мере 5 мин. 200 мкл каждой панели калибраторов добавляли к 400 мкл разбавителя для получения наивысшей концентрации калибратора, и серийное разведение 1:4 использовали для получения 6 дополнительных разведений калибраторов. Разбавитель 43 использовали в качестве фона для планшета. 50 мкл разведенных образцов (в трех повторах) и калибраторов (в двух повторах) добавляли в планшет MSD. Планшеты герметично закрывали и инкубировали при RT с встряхиванием в течение 2 ч. Планшеты промывали 3 раза с использованием 150 мкл разведенного буфера для промывки из набора MSD. Для каждого планшета, раствор антитела для детекции получали посредством объединения 60 мкл каждого из 9 антител для детекции, доведенных до 3 мл разбавителем 3. После добавления 25 мкл раствора антитела для детекции, планшеты герметично закрывали и инкубировали при комнатной температуре, в темноте, с встряхиванием в течение 2 ч. Планшеты промывали, как выше. 150 мкл 2× буфера для считывания добавляли в планшеты, и их считывали в QuickPlex.

Анализ цитокина IFNγ человека.

Образцы и калибраторы разводили в разбавителе 2. 1 мл разбавителя добавляли к калибратору. По-

сле встряхивания, калибратор инкубировали на льду в течение 5 мин. Это представляло собой калибратор 1. Серийное разведение 1:4 использовали для получения 6 дополнительных разведений калибраторов. Разбавитель 2 использовали в качестве фона для планшета. Пятьдесят (50) мкл разведенных образцов (в трех повторах) и калибраторов (в двух повторах) добавляли в планшет MSD. Планшеты герметично закрывали и инкубировали при RT с встряхиванием в течение 2 ч. Планшеты промывали 3 раза с использованием 150 мкл разведенного буфера для промывки из набора MSD. Раствор антитела для детекции получали в разбавителе 3. Для каждого планшета, 60 мкл каждого из антител для детекции добавляли к разбавителю для получения всего 3 мл реагента для детекции. После добавления 25 мкл антител для детекции, планшеты герметично закрывали и инкубировали при комнатной температуре, в темноте, с встряхиванием в течение 2 ч. Планшеты промывали 3 раза. Буфер для считывания добавляли в планшеты, и их считывали в QuickPlex.

Анализ данных.

Анализ данных анализа цитокинов и проточной цитометрии Результаты анализа цитокинов MSD assay анализировали с использованием программного обеспечения MSD Discovery Workbench, версии 4.0 (Meso-Scale), Microsoft Excel и Graphpad Prism. Данные проточной цитометрии анализировали посредством DIVA, и количества наносили на график в программном обеспечении GraphPad Prism.

Анализ подбора кривой ответа в зависимости от дозы антител.

Данные ответа в зависимости от дозы импортировали в программное обеспечение GraphPad Prism и трансформировали в логарифмической шкале. Ответ в зависимости от дозы агониста в моделях с различным углом наклона кривой использовали для анализа данных и получения значений EC50. Формула подбора приведена ниже

```
Y=          нижнее+(верхнее-нижнее)/(1+10^((LogEC50-X)*угол
наклона))
```

Статистические анализы.

Статистическую значимость различий между значениями для H2L5 hIgG4PE и контрольного антитела для изотипа в анализе пролиферации анализировали посредством двустороннего t-критерия Стьюдента.

Результаты.

Оценка изменений уровня цитокинов с использованием H2L5 hIqG4PE.

Обработка PBMC иммобилизованным H2L5 hIgG4PE в присутствии антитела против CD3 индуцировала секрецию, до различной степени, цитокинов Th1, таких как IFNγ, TNFα, цитокинов Th2, IL-6 и IL-10, так же как цитокина Th17 IL-17a зависимым от концентрации образом. Для других измеренных цитокинов, таких как IL-4, IL-5 и IL-13, показана также меньшая степень зависимого от концентрации ответа на стимуляцию H2L5 hIgG4PE. Результаты для четырех отдельных доноров обобщены в табл. 7.

Функциональная оценка активности H2L5 hIqG4PE по отношению к поверхностным маркерам активации Т-клеток посредством проточной цитометрии.

Обработка H2L5 hIgG4PE с параллельной стимуляцией CD3 в неактивированных PBMC человека (n=4 донора) индуцировала значимые изменения маркеров активации Т-клеток (табл. 7 и 8)). Сильное увеличение CD4 и CD8 Т-клеток, положительных по CD25 и OX40, наблюдали в обработанных H2L5 hIgG4PE образцах по сравнению с образцами, контрольными для изотипа IgG4 человека. Процент CD4 и CD8 Т-клеток, положительных по CD69, также увеличивался во временных точках 24 и 48 ч зависимым от концентрации образом.

Характеризация эффекта H2L5 hIgG4PE на пролиферацию Т-клеток.

Обработка иммобилизованным H2L5 hIgG4PE с параллельной активацией CD3 приводила к зависимому от концентрации увеличению пролиферации как CD4, так и CD8 Т-клеток (n=6 доноров), как измеряли посредством окрашивания внутриклеточного Ki67 (табл. 8). H2L5 hIgG4PE усиливало также пролиферацию регуляторных CD4+CD25+Foxp3+ Т-клеток зависимым от концентрации образом, но в меньшей степени, чем наблюдали для суммарных CD4 и CD8 Т-клеток. Усиление пролиферации Т-клеток посредством H2L5 hIgG4PE наблюдали только во временной точке 48 ч. Усиление пролиферации регуляторных Т-клеток не являлось значимым, в то время как зависимое от концентрации усиление пролиферации CD4+ клеток ($p< 0,05$ для концентрации более 0,4 мкг/мл H2L5 hIgG4PE) и CD8+ Т-клеток ($p < 0,05$ для концентраций между 0,2 и 1,6 мкг/мл) являлось значимым (см. табл. 7).

Таблица 7

Значения EC50 (мкг/мл) для всех функциональных конечных точек для H2L5 hIgG4PE в анализе активации PBMC человека

	Donor_1136F50		Donor_185M45		Donor_1124F36		Donor_1149M52	
	24 час	48 час	24 час	48 час	24 час	48 час	24 час	48 час
IL-10	1,7	1,3	0,7	0,8	0,7	0,6	0,5	0,6
IFN-γ	0,4	1,5	0,3	0,7	0,3	0,5	0,2	0,6
IL-17a	1,4	1,6	0,8	1,1	0,6	0,8	0,7	1,0
IL-6	0,7	1,1	0,7	0,8	NA	NA	0,2	0,3
TNF-α	NA	0,3	NA	0,5	NA	0,3	NA	0,2
CD4+CD69+	0,5	0,4	0,8	NA	1,1	1,1	0,5	0,4
CD4+CD25+	0,3	0,6	2,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,4
CD4+OX40+	0,2	0,4	1,6	NA	0,6	1,2	0,6	0,4
CD8+CD69+	0,5	0,6	1,2	0,5	0,8	1,1	0,6	0,4
CD8+CD25+	0,4	0,7	2	0,5	0,6	0,5	1,0	0,4
CD8+OX40+	0,3	0,5	1,6	NA	2,4	0,5	1,5	0,3
CD4+Ki67+	NT	NT	NA	0,6	NA	0,8	NA	0,5
CD8+Ki67+	NT	NT	NA	0,4	NA	0,7	NA	0,3

NA=не анализировали (значения EC50 неточные из-за плохого соответствия кривых).
NT=не тестировали.

Таблица 8

Процент CD4 или CD8 Т-клеток, положительных по CD25, Foxp3 и Ki67, в PBMC человека после стимуляции H2L5 hIgG4PE в присутствии антител против CD3 в течение 48 ч

	Концентрация антитела	H2LA hIgG4PE (% от CD4 или CD8 Т-клеток)			Контроль для изотипа (% CD4 или CD8 Т-клеток)			Т-критерий
	мкг/мл	Донор 185M45	Донор 1124F36	Донор 1149M52	Донор 185M45	Донор 1124F36	Донор 1149M52	(значение *p*)
%Treг CD4 Т-клеток	0	10,2	3,8	6,1	10,2	3,8	6,1	0,415
	0,1	12,4	4,2	7,6	8,6	3,6	6,6	0,220
	0,2	11,8	4,5	9,8	8,5	3,2	7,1	0,054
	0,4	14,3	5,2	11,3	8,6	3,4	7,4	0,076
	0,8	18,6	6,9	14,3	8,4	3,4	7,3	0,069
	1,6	21,4	7,5	15,9	7,7	3,8	7,2	0,095
	3,1	20,8	7,9	15,0	10,4	3,9	7,1	0,058
	6,3	18,7	8,3	14,7	10,3	3,6	8,3	***0,026***
	12,5	20,2	7,6	15,1	9,6	4,0	8,1	0,072
	25	19,5	7,6	13,9	11,5	5,1	8,3	0,079
	50	20,0	7,9	13,3	9,6	5,0	9,7	0,143
	100	18,7	7,9	13,3	11,5	5,6	8,8	0,080
% Ki67+ CD4 Т-клеток	0	7,2	1,2	2,3	7,2	1,2	2,3	0,693
	0,1	9,6	1,5	2,9	6,1	0,9	2,1	0,219
	0,2	9,0	2,1	4,4	5,0	0,9	2,4	0,098
	0,4	11,9	3,9	7,5	6,8	1,0	2,7	***0,025***
	0,8	18,2	7,1	12,4	7,6	1,3	2,5	***0,028***
	1,6	19,5	8,9	15,9	5,4	0,8	3,2	***0,024***
	3,1	21,1	10,7	14,4	9,1	1,2	2,9	***0,005***
	6,3	18,7	12,6	17,1	8,1	1,1	3,2	***0,007***
	12,5	22,2	12,2	16,5	7,4	1,5	3,4	***0,008***
	25	20,7	11,6	16,1	9,3	1,7	5,2	***0,002***
	50	21,2	12,8	14,3	7,5	2,4	7,3	***0,034***
	100	21,8	12,0	14,0	9,4	2,8	4,7	***0,010***
% Ki67+ CD8 Т-клеток	0	11,0	4,4	2,7	11,0	4,4	2,7	0,841
	0,1	15,2	8,3	4,8	9,6	5,3	2,3	0,061
	0,2	13,5	10,9	7,8	8,2	3,8	2,9	***0,014***
	0,4	17,4	14,4	11,3	10,1	3,4	4,3	***0,023***
	0,8	20,7	19,6	13,8	14,2	4,5	2,0	***0,047***
	1,6	22,2	22,8	16,1	10,7	4,0	3,7	***0,025***
	3,1	21,8	26,7	13,6	14,5	4,4	3,0	0,099
	6,3	20,2	29,8	16,0	10,8	3,3	5,0	0,103
	12,5	21,7	29,6	15,6	10,7	4,1	3,4	0,074
	25	20,0	28,7	14,6	10,4	6,1	5,0	0,084
	50	19,0	31,4	13,5	7,6	5,1	5,5	0,114
	100	19,2	27,4	13,4	7,9	7,1	3,5	0,051
%Ki67+ Treг клеток	0	29,7	10,2	11,3	29,7	10,2	11,3	0,920
	0,1	32,8	12,5	14,4	32,4	10,0	12,3	0,127
	0,2	33,0	14,8	19,0	30,3	8,3	13,4	0,051
	0,4	33,6	22,2	22,2	28,4	10,8	14,1	***0,044***
	0,8	37,0	26,3	26,3	36,7	8,5	14,4	0,191
	1,6	35,0	27,7	28,4	26,8	7,7	16,3	0,061
	3,1	38,3	30,2	27,2	33,9	9,6	17,4	0,135
	6,3	33,9	32,5	26,1	36,7	8,7	16,5	0,315
	12,5	37,3	36,8	26,2	31,2	15,1	17,2	0,125
	25	36,3	33,0	28,6	33,3	13,7	28,1	0,326
	50	37,7	33,6	24,2	32,9	21,1	29,5	0,518
	100	40,1	35,8	28,6	36,3	21,5	26,4	0,216

Обсуждение.

Хорошо известно, что ICOS является важным для активации Т-клеток и индукции как Th1, так и Th2 цитокинов. В этом исследовании показана активность in vitro H2L5 hIgG4PE (агонистического антитела против ICOS) с различными измерениями активации Т-клеток и индукции цитокинов. Все измеренные маркеры активации Т-клеток, CD25 (альфа-цепь рецептора IL-2), CD69 (ранний маркер активации) и OX-40 (маркер костимуляции) подвергались повышающей регуляции при обработке H2L5 hIgG4PE в сочетании со стимуляцией CD3. Среди мониторированных маркеров активации процент Т-клеток, экспрессирующих CD69 и OX40, сильно увеличивался посредством обработки H2L5 hIgG4PE. CD69 представляет собой ранний маркер активации, и таким образом эффекты преобладали в образцах через 24 ч. Количество CD25, другого важного маркера активации Т-клеток, увеличивалось при обработке H2L5 hIgG4PE в обеих временных точках, что позволяет предполагать, что H2L5 hIgG4PE играет важную роль в поддержании активации Т-клеток. Ki67 представляет собой ядерный белок, ассоциированный с пролиферацией клеток. Данные проточной цитометрии с внутриклеточным окрашиванием Ki67 показали, что иммобилизованный H2L5 hIgG4PE значимо усиливал пролиферацию как CD4, так и CD8 Т-клеток в контексте привлечения TCR. Хотя пролиферация регуляторных Т-клеток также увеличивалась посредством H2L5 hIgG4PE, изменения не были статистически значимыми.

Th17 клетки человека играют ключевую роль в регуляции противоопухолевого иммунитета [Nunez, S., et al., T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. Immunology 2013; 139: 61-71]. Исследования показали, что ICOS вовлечен в развитие и функционирование Th17 человека [Kimura, A., et al., Regulator of Treg/Th17 balance. Eur. J. Immunol. 2010; 40: 1830-1835; Paulos C.M. et al. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human Th17 cells. Sci Transl Med. (2010) 2(55); 55ra78; Nelson, M.H., et al. The inducible costimulator augments Tc17 cell responses to self and tumor tissue. J Immunol, 2015; 194: 1737-1747]. При настоящей функциональной оценке H2L5 hIgG4PE большинство цитокинов, связанных с воспалительными и иммунными ответами, измеряли в супернатанте культур клеток после стимуляции антителами против CD3 и H2L5 hIgG4PE. H2L5 hIgG4PE сильно индуцирует секрецию цитокинов Th1, IFN-γ и TNF-α, и цитокина Th17, IL-17a, в PBMC человека, что позволяет предполагать, что H2L5 hIgG4PE обладает потенциалом играть важную роль в противоопухолевых ответах. IL-6, вместе с TGF-β, является важным цитокином для индукции развития клеток Th17 из наивных Т-клеток. В отличие от этого, IL-6 ингибирует дифференцировку Treg, индуцированную TGF-β [Kimura, A., 2010; Korn, T., et al., IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. PNAS, 2008; 105: 18460-18465]. В этом исследовании обнаружено, что H2L5 hIgG4PE увеличивает секрецию IL-6, которая может дальше усиливать развитие Th17-клеток. Показано, что агонистические антитела против Т-клеточных рецепторов, таких как CD28 и члены семейства рецепторов TNF, образуют колоколообразную кривую зависимости ответа от дозы [White, A.L., et al., Conformation of the Human Immunoglobulin G2 Hinge Imparts Superagonistic Properties to Immunostimulatory Anticancer Antibodies. Cancer Cell, 2015, 27: 138-148; Luhder, F., et al., Topological Requirements and Signaling Properties of T Cell-activating, Anti-CD28 Antibody Superagonists. J. Exp. Med. 2003: 955-966; Stebbings, R., et al., "Cytokine Storm" in the Phase I Trial of Monoclonal Antibody TGN1412: Better Understanding the Causes to Improve PreClinical Testing of Immunotherapeutics J. Immunol., 2007, 179: 3325-3331; Rogers P.R. and Croft M., CD28, Ox-40, LFA-1, and CD4 Modulation of Th1/Th2 Differentiation Is Directly Dependent on the Dose of Antigen. J Immunol 2000 164:2955-2963; doi:10,4049/jimaunol.164,6,2955]. Для H2L5 hIgG4PE также показана сходная гиперболическая кривая функционального ответа. Эта информация является важным компонентом обеспечения наилучшего диапазона доз подлежащего использованию антитела для оптимального фармакодинамического ответа.

В общем, показано, что H2L5 hIgG4PE, в сочетании со стимуляцией CD3, усиливает активацию, пролиферацию Т-клеток и индукцию провоспалительных цитокинов наряду с его ролью в качестве сильного активатора костимулирующего рецептора Т-клеток.

Пример 6. Связывание антител против ICOS.

Способом гуманизации (пример 3) получили 36 вариантов тяжелой и легкой цепей, для которых провели скрининг по связыванию с ICOS человека и яванского макака, в то же время убеждаясь также, что они не связываются с CD28 или CTLA-4 человека. Вариант H2L5 идентифицирован как обладающий высокой аффинностью для ICOS человека и яванского макака (1,34 и 0,95 нМ соответственно), в то же время содержащий минимальное количество обратных мутаций.

Изменение изотипа 422 H2L5 от IgG1 до IgG4PE не влияет на связывание антигена антителом, поскольку H2L5 hIgG4PE обладает аффинностью 1,3 нМ для ICOS человека. Зависимое от концентрации ингибирование связывания ICOS/ICOS-L посредством H2L5 hIgG4PE показано на фиг. 7.

Экспериментальные способы.

Связывание H2L5 hIgG4PE с ICOS человека.

Кинетику аффинности связывания гуманизированного антитела H2L5 hIgG4PE определяли с использованием BIAcore T200 с антителом против ICOS H2L5 hIgG4PE, связанным на поверхности с антителом против IgG человека в Fc2 чипа CM5. Поверхность с антителами против IgG человека блокировали

с использованием 0,1 мг/мл контрольного hIgG1 для предотвращения неспецифического связывания Fc кролика. ICOS человека и яванского макака (Fc кролика) пропускали над связанными антителами при 256, 64, 16, 4 и 1 нМ. Буфер отдельно использовали для кривых связывания с двойным контролем. $MgCl_2$ использовали для регенерации поверхности. Анализ проводили при 25°C. Данные подгоняли под модель 1:1 с использованием программного обеспечения T200 для оценки. Концентрация антитела: 2,5 мкг/мл.

Результаты.

Связывание H2L5 hIqG4PE с ICOS человека и яванского макака.

Кинетику аффинности связывания гуманизированного антитела H2L5 hIgG4PE определяли с использованием BIAcore T200.

Данные связывания ICOS подгоняли под модель кинетики 1:1 с использованием программного обеспечения T200 для анализа данных.

Аффинность связывания H2L5 hIgG4PE для ICOS человека составляет 1,34 нМ, и для ICOS яванского макака составляет 0,95 нМ (см. табл. 9). Эти значения являются сравнимыми и показывают, как ожидалось, что изменение в области Fc молекулы не влияет на связывание с антигеном ICOS.

В табл. 9 показаны Ka/Kd/KD для связывания гуманизированного 422 (H2L5) IgG4PE с ICOS человека и яванского макака.

Таблица 9

Связывание с ICOS человека

Образец	Мишень	Ka(1/Mc)	Kd (1/c)	KD (M)
422 H2L5 IgG4PE	ICOS человека -Fc	2,97E+05	3,96E-04	1,34E-09
422 H2L5 IgG4PE	ICOS яванского макака -Fc	3,91E+05	3,71E-04	9,49E-10

Обсуждение.

Как показано в примере 1, мышиный клон 422-2 идентифицировали как наилучшее мышиное антитело против ICOS человека. При гуманизации этого антитела получили 36 вариантов тяжелой и легкой цепей, для которых провели скрининг по связыванию с ICOS человека и яванского макака, в то же время убеждаясь также, что они не связываются с CD28 или CTLA-4 человека. Вариант H2L5 идентифицирован как обладающий высокой аффинностью для ICOS человека и яванского макака (1,34 и 0,95 нМ соответственно), в то же время содержащий минимальное количество обратных мутаций.

Изменение изотипа от IgG1 до IgG4PE не влияет на связывание антитела с ICOS.

Пример 7. Связывание H2L5 hIqG4PE с активированными Т-клетками человека.

Способы.

Экспериментальный препарат(ы).

Выделение с отрицательным отбором по CD3.

CD3+ Т-клетки выделяли с отрицательным отбором посредством набора для обогащения Т-клеток человека Stemcell Rosette Sep.

Обогащение Т-клеток человека посредством Rosette Sep: 100 мл свежей, цельной крови отбирали с использованием шприцов, покрытых жидким гепарином натрия (Sagent, конечная концентрация 10 МЕ/мл). Кровь из каждой пробирки для сбора переносили в пробирку, куда 50 мкл смеси для обогащения Т-клеток человека Rosette Sep добавляли на 1 мл крови (5 мл/100 мл крови доноров).

Цельную кровь/смесь антител Rosette Sep инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре (RT). Затем кровь/смесь антител Rosette Sep разводили 1:1 1× фосфатно-солевым буфером (PBS)+2% FBS(эмбриональная бычья сыворотка) до конечного объема 200 мл. Затем 25 мл разведенной крови/смеси антител наслаивали поверх 15 мл градиента фиколла в пробирках Sepmate (всего 8 пробирок для каждого донора). Затем загруженные пробирки Sepmate центрифугировали при 1200×g в течение 20 мин при RT с включенным тормозом. Верхний слой плазмы ниже границы раздела с мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) отбирали с помощью пипетки и отбрасывали. Оставшуюся плазму и границу раздела с лейкоцитарной пленкой декантировали из пробирок Sepmate в 50 мл конические пробирки для центрифугирования (всего 4 пробирки). Пробирки дополняли до 50 мл с использованием PBS+2% FBS. Клетки центрифугировали при 400×g в течение 10 мин при RT. Супернатанты отбрасывали. Затем осадки для каждого донора объединяли в одну 50-мл коническую пробирку, ресуспендировали осадки в суммарном объеме 50 мл PBS+2% FBS. Клетки центрифугировали при 400×g в течение 5 мин при RT. Супернатанты отбрасывали, и осадки клеток ресуспендировали в 2 мл полной среды RPMI (RPMI 1640+10% FCS+1 мМ пируват натрия+2 мМ L-глутамин+пенициллин 100 Ед./мл+стрептомицин 100 мкг/мл). Выделенные CD3 клетки подсчитывали в устройстве ViCell и дополнительно разводили до $1,2\times10^6$ клеток/мл. 1×10^6 выделенных клеток окрашивали по CD3 PE-Cy7 для подтверждения качества выделения Т-клеток.

CD3+ Т-клетки выделяли с отрицательным отбором посредством набора для выделения интактных Т-клеток от Invitrogen.

Выделение PBMC.

Кратко, 100 мл свежей, цельной крови отбирали от каждого донора с использованием шприцов, покрытых жидким гепарином натрия (Sagent, конечная концентрация 10 МЕ/мл). Кровь разводили (1:1) до конечного объема 200 мл с использованием PBS с 2%FBS. 25 мл разведенной крови наслаивали поверх 15 мл градиента фиколла в пробирках Sepmate (всего 8 пробирок для каждого донора). Затем загруженные пробирки Sepmate центрифугировали при 1200×g в течение 20 мин при RT с включенным тормозом. Верхний слой плазмы ниже границы раздела с PBMC отбирали с помощью пипетки и отбрасывали. Оставшуюся плазму и границу раздела с лейкоцитарной пленкой декантировали из пробирок Sepmate в 50 мл конические пробирки для центрифугирования (всего 4 пробирки). Пробирки дополняли до 50 мл с использованием PBS + 2% FBS. Клетки центрифугировали при 400×g в течение 10 мин при RT. Супернатанты отбрасывали. Затем осадки для каждого донора объединяли в одну 50-мл коническую пробирку и ресуспендировали осадки в суммарном объеме 50 мл PBS + 2% FBS. Клетки центрифугировали при 400×g в течение 5 мин при RT. Супернатанты отбрасывали, и осадки клеток ресуспендировали в произвольном объеме буфера для выделения (в зависимости от размера осадка клеток), представленного в наборе для выделения интактных Т-клеток от Invitrogen. Затем выделенные PBMC подсчитывали в устройстве ViCell и доводили до конечной концентрации 1×10^8 клеток/мл в буфере для выделения.

Выделение интактных Т-клеток человека на Dynabead от Invitrogen.

2×10^8 выделенных PBMC (2 мл), 400 мкл FBS и затем 400 мкл смеси антител из набора для выделения интактных Т-клеток от Invitrogen добавляли в каждую 15 мл пробирку и инкубировали в течение 20 мин при 4°C. Клетки промывали с использованием 10 мл буфера для выделения и центрифугировали при 350×g в течение 8 мин при 4°C. Супернатанты отбрасывали, и осадки ресуспендировали в 2 мл буфера для выделения. Затем 2 мл предварительно промытых Dynabeads для истощения добавляли в каждую пробирку. Клетки инкубировали с бусинами в течение 15 мин при комнатной температуре с осторожным покачиванием и вращением. После инкубации бусин, добавляли 10 мл буфера для выделения, и суспензии клеток/бусин пипетировали вверх и вниз 10 раз. Пробирки помещали на магнит на 2 минуты при комнатной температуре. Не затрагивая намагниченные бусины, супернатанты, содержащие интактные Т-клетки собирали. Бусины промывали 1 раз с использованием 10 мл буфера для выделения и снова помещали на магнит на 2 минуты при комнатной температуре, и очищенный от бусин буфер собирали. Собранные клетки центрифугировали при 400×g в течение 5 мин при RT. Супернатанты отбрасывали, и осадки клеток ресуспендировали в произвольном объеме полной среды RPMI, в зависимости от размера осадка клеток (2-35 мл). Затем выделенные CD3+ клетки подсчитывали в ViCell и доводили до концентрации $1,2\times10^6$ клеток/мл в полной среде RPMI.

Подтверждающее окрашивание CD3.

1×10^6 выделенных клеток окрашивали с использованием 5 мкл антител против CD3 с PE-Cy7 или 5 мкл антител против изотипа IgG1 с Pe-Cy7 в течение 40 мин при 4°C в темноте. Затем клетки промывали дважды ледяным PBS с 0,1% Tween 20, центрифугируя при 400×g в течение 5 мин при 4°C. Окрашенные клетки ресуспендировали в 1% формальдегиде и инкубировали при 4°C в течение 20 мин в темноте. Затем клетки промывали дважды ледяным PBS с 0,1% Tween 20, центрифугируя при 400×g в течение 5 мин при 4°C, и ресуспендировали в 275 мкл PBS с 0,1% Tween 20. Фиксированные клетки сохраняли при 4°C в темноте до проведения проточной цитометрии для подтверждения качества выделения Т-клеток.

Активация выделенных Т-клеток человека.

Флаконы T75 покрывали с использованием 4 мл 1 мкг/мл CD3/CD28 в PBS в течение 2 ч при 37°C. Флаконы промывали дважды с использованием 12 мл PBS. 30×10^6 клеток в 25 мл полной среды RPMI добавляли на флакон T75. Клетки инкубировали в течение 48 ч при 37°C, 5% CO_2, чтобы обеспечить возникновение активации.

Связывание антитела против ICOS (H2L5 hIqG4PE).

Связывание H2L5 hIgG4PE оценивали как для наивных, так и для активированных CD3+ Т-клеток. Использовали 8-точечное титрование от 0,00128 до 100 мкг/мл H2L5 hIgG4PE с 5-кратными разведениями.

Наивные и/или активированные CD3+ Т-клетки ресуспендировали в PBS с 0,1% BSA (буфер для FACS), содержащем блокирующий раствор для FcR человека при 2×10^6 клеток/мл (5 мкл блокирующего раствора для FcR+950 мкл буфера для FACS на 1 мл). В концентрации 2×10^5 клеток/лунку, 100 мкл клеток высевали в 2 мл 96-луночные блоки для анализа и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Во время инкубации раститровку связывающих антител антитела против ICOS (H2L5 hIgG4PE) или контрольного антитела для изотипа IgG4 подготавливали в 2× концентрации. После инкубации с блокирующим раствором для FcR, 100 мкл на лунку 2× концентрированных связывающих антител добавляли к 100 мкл Т-клеток с блокированным Fc на лунку для достижения конечной 1× концентрации антитела против ICOS (H2L5 hIgG4PE) или контрольного антитела для изотипа IgG4 от 0,00128 до 100 мкг/мл. Клетки инкубировали с антителами в течение 20 мин при комнатной температуре. После инкубации для связывания клетки промывали дважды в 1 мл буфер для FACS, центрифугируя при 400×g в

течение 5 мин при комнатной температуре.

Окрашивание наивных или активированных Т-клеток после связывания антитела против ICOS (H2L5 hIgG4PE).

Клетки окрашивали для проточной цитометрии с использованием следующих смесей.

Смесь для окрашивания.

Антитело	Объем на лунку (мкл)	Объем на 110 (мкл)
Антитело мыши против CD4 человека с PE	5	550
Антитело мыши против CD8 человека с APC	5	550
Антитело козы против легкой цепи каппа IgG человека с FITC	10	1100

Смесь для изотипов.

Антитело	Объем на лунку (мкл)	Объем на 110 (мкл)
Антитело мыши против CD4 человека с PE	5	550
Антитело мыши против CD8 человека с APC	5	550
Контрольное антитело для изотипа каппа IgG1 с FITC	10	1100

Наивные или активированные, Т-клетки с блокированным Fc ресуспендировали в 80 мкл буфера для FACS после инкубации для связывания с антителами H2L5 hIgG4PE или контрольными антителами. В лунку добавляли 20 мкл на лунку либо смеси для окрашивания, либо смеси для изотипов. Клетки окрашивали в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. После инкубации для окрашивания клетки промывали дважды в 1 мл буфера для FACS, центрифугируя при 400×g в течение 5 мин при комнатной температуре.

Фиксация окрашенных клеток.

Клетки ресуспендировали в 500 мкл 1% формальдегида (10 мл 16× концентрированного формальдегида+150 мл 1× PBS) и инкубировали при комнатной температуре 20 мин. Затем клетки промывали дважды с использованием 1 мл буфера для FACS, центрифугируя при 400×g в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем осадки ресуспендировали в 265 мкл буфера для FACS и переносили в 96-луночный круглодонный планшет. Клетки сохраняли при 4°C в темноте до анализа посредством проточной цитометрии.

Проточная цитометрия.

Проточную цитометрию проводили либо в либо в FACS Fortessa X20, либо в FACS Canto II с использованием программного обеспечения FACSDiva (версии 8.0). Компенсацию выполняли во время сбора данных с использованием бусин eBioscience Ultracomp с одним красителем и программного обеспечения для компенсации в FACSDiva.

Анализ данных.

Сбор данных и компенсацию проводили в устройствах для FACS BD, LSR Fortessa X-20 или FACS Canto II с использованием программного обеспечения BD Diva (вер. 8.0). Для анализа данных использовали программное обеспечение Flow Jo (вер. 10.0.8r1). Результаты регистрировали как MFI (медианную интенсивность флуоресценции) и процент клеток, положительных по окрашиванию FITC легкой цепи каппа IgG человека из общего количества жизнеспособных клеток или соответствующей исходной популяции. EC50 определяли с использованием программного обеспечения Graphpad Prism 5 (вер. 5.04) с нелинейной регрессией трансформированных данных (X=(log(X)) с использованием изменяемого наклона кривой с 4 параметрами (log(агонист) против ответа - изменяемый наклон кривой).

Результаты.

Выделение Т-клеток из свежей, цельной крови человека с использованием либо набора для обогащения по CD3 Rosette Sep, либо наборов для выделения интактных Т-клеток с Dynabead подтверждали посредством окрашивания с использованием антител против CD3 с PeCy7. Образцы доноров лежали в диапазоне между 68 и 97% положительных по CD3 клеток. Для популяций CD4+ и CD8 + клеток, активированных антителом против CD3/антителом против CD28, получали кривые зависимости от концентрации H2L5 hIgG4PE при оценке окрашивания антителом против легкой цепи каппа IgG1 человека с FITC. Кривые связывания H2L5 hIgG4PE представлены в форме процента клеток, положительных по антителам против легкой цепи каппа IgG1 человека с FITC и в форме медианной интенсивности флуоресценции (MFI) FITC. Для Т-клеток, инкубированных с контрольным антителом для изотипа IgG4, не получено кривых зависимости от концентрации при оценке по окрашиванию антителам против легкой цепи каппа IgG1 человека с FITC. Для наивных CD4+ или CD8+ клеток не получено полных кривых; однако наблюдали зависимое от концентрации увеличение от 0,1 до 100 мкг/мл.

Медианы (диапазоны) значений EC50 составляли 1,04 мкг/мл (0,628-1,31 мкг/мл) для CD4+ FITC MFI и 0,652 мкг/мл (0,27-0,74 мкг/мл) для CD8+FITC MFI соответственно. Медианы (диапазоны) значений EC50 составляли 0,834 мкг/мл (0,45-0,965 мкг/мл) для процента CD4+, положительных по антителам против легкой цепи каппа IgG с FITC, и 0,583 мкг/мл (0,371-1,23 мкг/мл) для процента CD8+, положительных по антителам против легкой цепи каппа IgG с FITC (табл. 10).

Таблица 10

Обобщение значений EC50 для связывания 422 H2L5 hIgG4PE с активированными Т-клетками человека

	Активированные CD4 Т-клетки		Активированные CD8 Т-клетки	
Донор #	MFI	Процент положительных	MFI	Процент положительных
1124F36	0,628	0,45	0,564	0,619
1149M52	1,31	0,882	0,74	0,547
1173F42	0,636	0,612	0,27	0,371
1123F59	1,04	0,853	Не проводили	Не проводили
1141F45	1,27	0,965	Не проводили	Не проводили
2100M39	Не подобрана кривая	0,814	Не подобрана кривая	1,23
191F39	Не подобрана кривая	Не подобрана кривая	Не подобрана кривая	Не подобрана кривая
1155F49	Не подобрана кривая	Не подобрана кривая	Не проводили	Не проводили
1156F64	Не подобрана кривая	Не подобрана кривая	Не проводили	Не проводили
Медиана	**1,04**	**0,834**	**0,652**	**0,583**
Среднее	**0,977**	**0,763**	**0,525**	**0,692**
Станд. откл.	**0,331**	**0,193**	**0,237**	**0,374**

Обсуждение.

В этом исследовании показано, что H2L5 hIgG4PE (агонистическое антитело против ICOS) связывалось с рецептором ICOS на активированных Т-клетках от здоровых доноров-людей. Связывание H2L5 hIgG4PE с клеточной поверхностью Т-клеток детектировали с использованием антитела против легкой цепи каппа IgG человека, меченного FITC.

Успешное выделение CD3+ Т-клеток подтверждали посредством проточной цитометрии с окрашиванием антителом против CD3 с Pe-Cy7. Для девяти из десяти доноров получили более 89% CD3+ Т-клеток после выделения. Однако для донора # 2100M39 получено только 68,6% CD3+ после выделения. Причина этой сниженной чистоты выделения Т-клеток для донора # 2100M39 неизвестна. Значения EC50, полученные для ограниченных по CD4+ и CD8+ популяций от донора # 2100M39, не выглядят аномальными и включены в обобщенные медианные значения.

EC50 для связывания определяли для H2L5 hIgG4PE на выделенных с отрицательным отбором Т-клетках человека. Кривые связывания получали, когда выделенные Т-клетки активировали посредством 48 ч воздействия связанных с планшетом при 1 мкг/мл антител против CD3/CD28. Как процент положительных по окрашиванию FITC легкой цепи каппа IgG человека, так и данные MFI FITC для активированных CD4+ и CD8+ Т-клеток рассматривали в статистических анализах. Медианные значения EC50 для CD4+ являлись сходными при расчете в форме процента положительных по FITC клеток или MFI FITC, 1,04 и 0,834 мкг/мл соответственно. Медианные значения EC50 для CD8+ также являлись сходными при расчете в форме процента положительных по FITC клеток или MFI FITC, 0,652 и 0,583 мкг/мл соответственно.

Для Т-клеток, инкубированных с контрольным антителом для изотипа IgG4 с PE, не получили зависимого от концентрации увеличения связывания антител против легкой цепи каппа IgG человека с FITC, независимо от применяемого способа анализа, по MFI или проценту положительных клеток.

Полных кривых не удалось получить для наивных или неактивированных, выделенных с отрицательным отбором Т-клеток в тестированном диапазоне 0,00128-100 мкг/мл H2L5 hIgG4PE. Однако зависимое от концентрации увеличение связывания наблюдали у доноров для 0,1-100 мкг/мл H2L5 hIgG4PE. EC50 невозможно было рассчитать, поскольку кривые для наивных Т-клеток являлись неполными. Неспособность H2L5 hIgG4PE связываться в низких концентрациях с наивными или неактивированными клетками являлась ожидаемой, поскольку ICOS только слабо экспрессируется на покоящихся Th17 клетках, фолликулярных Т-клетках-помощниках (TFH) и регуляторных Т-клетках (Treg). Привлечение и активация TCR необходимы для индукции экспрессии ICOS. Таким образом, вероятно, присутствовало очень небольшое количество рецептора ICOS, экспрессированного на наивных или неактивированных клетках, и следовательно, минимальное связывание H2L5 hIgG4PE.

Пример 8. Результаты TK/PD из исследования по подбору диапазона доз (DRF) у яванского макака.

Для оценки характеристик in vivo H2L5 hIgG4PE в соответствующих по мишени видах исследование по подбору диапазона доз проводили на яванских макаках. В исследовании тестировали 3 уровня доз (0,3, 3 и 30 мг/кг) в дополнение к контрольной когорте носителя. Дозирование было повторяющимся, где вторую дозу вводили через 14 суток после первой. Тестировали одного самца и одну самку на когорту. Для H2L5 hIgG4PE показано зависимое от дозы увеличение $C_{макс}$ (мкг/мл) и AUC (мкг·ч/мл) для 3 различных тестированных доз. При всех трех уровнях доз антитело детектировали в плазме в течение двух недель после первой дозы (фиг. 12A). Антитела против H2L5 hIgG4PE детектировали у 3 обезьян после однократной дозы, для обоих животных после дозы 0,3 мг/кг, так же, как для самки после дозы 3 мг/кг. Антитела против H2L5 hIgG4PE коррелировали с уменьшенными концентрациями в плазме после введения второй дозы этим животным (фиг. 12B). Через 48 ч после второй дозы всех животных умерщвляли

для сбора тканей для анализа фармакодинамической активности и гистопатологического анализа.

Занятость рецептора H2L5 hIgG4PE (RO) измеряли на CD4+ Т-клетках из селезенки и подмышечных лимфатических узлов всех животных в исследовании. Зависимое от дозы увеличение связывания H2L5 hIgG4PE наблюдали для тестированных уровней доз в обеих тканях (фиг. 13).

Занятость рецептора измеряли также на CD4+ Т-клетках из периферической крови обезьян в исследовании. Кровь отбирали в 5 временных точках (сутки 1 (перед дозированием), сутки 3, сутки 8, сутки 15 (перед вторым дозированием) и сутки 17). Два различных показателя использовали в этом анализе для определения RO. Первый представляет собой формат анализа "свободного рецептора", в котором связывание mAb против ICOS, использованного для детекции при проточной цитометрии, определяли в присутствии или в отсутствие H2L5 hIgG4PE, как показано, конкурирующего за связывание с ICOS. Таким образом, отсутствие сигнала антител против ICOS в FACS являлось суррогатным для занятости рецептора H2L5 hIgG54PE, и наоборот, положительность по антителам против ICOS указывала на "свободный рецептор", не связанный с H2L5 hIgG4PE. На фиг. 14-A показано, что количество свободного рецептора ICOS уменьшалось зависимым от дозы и зависимым от времени образом. Для двух обезьян (250 и 300) показаны сигналы "свободного рецептора", которые невозможно объяснить, и которые могут быть обусловлены продукцией антител против H2L5 hIgG4PE у этих обезьян. Кроме того, RO также измеряли в CD4+ клетках периферической крови посредством того же самого анализа, который использовали для селезенки и лимфатических узлов, описанного выше. Как можно было ожидать, для дозы 0 мг/кг не показано RO при этом считывании (фиг. 14-B). Интересно, что для некоторых обезьян при уровнях доз 3,0 и 30 мг/кг показано зависимое от времени увеличение количества CD4+ клеток со связанным H2L5 hIgG4PE на протяжении периода времени обработки. В частности, для животного 350 показано увеличение (в >5 раз) связанных с лекарственным средством циркулирующих CD4+ клеток между сутками 3 и 17 (фиг. 14-B). Возможно, что это увеличение количества CD4+ICOS+ клеток может быть обусловлено индуцированной H2L5 hIgG4PE пролиферацией этой популяции.

Пример 9. H2L5 hIqG4PE индуцирует изменение внутриклеточной передачи сигналов в ответ на связывание.

Экспериментальный препарат(ы).

Линии клеток.

Клетки Ba/F3-ICOS получали из INSERM (Paris, France). Клетки культивировали в подходящей культуральной среде, дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 10 нг/мл рекомбинантным мышиным IL-3 (R&D Systems, Minneapolis, MN) и 1 мг/мл генетицина (ThermoFisher, Waltham, MA) при 37°C в увлажненных инкубаторах под 5% CO_2.

Экспериментальный способ(ы).

Массив антител для внутриклеточной передачи сигналов.

Белковые лизаты анализировали с использованием набора с массивом для внутриклеточной передачи сигналов PathScan® (Cell Signaling Technologies) в соответствии с инструкциями изготовителя. Кратко, лизаты клеток Ba/F3-ICOS, обработанные IgG4-PE (20 мкг/мл) или H2L5 hIgG4PE (0,2, 2, или 20 мкг/мл) в течение 1, 6, 24, и 48 ч, разводили до 1 мкг/мкл в буфере-разбавителе для массива и инкубировали в течение ночи на массивах антител при 4°C. Изображения массивов получали с использованием программного обеспечения для получения изображений (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) фосфо-AKT.

Фосфорилирование AKT измеряли с использованием Meso Scale Discovery (MSD) с набором для анализа фосфо(Ser473)/общего Akt в лизате цельных клеток и набором для анализа фосфо-Akt (Thr308) в лизате цельных клеток в соответствии с инструкциями изготовителя. Клетки высевали при плотности клеток $0{,}25\times10^6$ клеток/лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном (BD Falcon) в подходящей культуральной среде (100 мкл/лунку). Клетки обрабатывали в течение 1, 2, 4, 6, 24 или 48 ч контрольным антителом (IgG4 PE), IgG1 против ICOS с инактивированным Fc или H2L5 hIgG4PE в 7 различных концентрациях с использованием схемы 3-кратного разведения (диапазон доз: 20,0-0,03 мкг/мл) в двух повторах лунок. Для одного эксперимента с использованием набора для анализа фосфо-AKT (Thr308) в лизате цельных клеток клетки обрабатывали одной концентрацией всех трех антител (10 мкг/мл) в трех повторах лунок. Нижний ряд каждого 96-луночного планшета содержал контроль без клеток (две пустых лунки в двух повторах) и клетки, оставленные без обработки каким-либо антителом. После обработки клетки лизировали с использованием 30 мкл ледяного буфера для лизиса, содержащего ингибиторы протеазы и фосфатазы, инкубировали на льду в течение 30 мин и затем 25 мкл лизата переносили в планшет для ELISA для инкубации в течение ночи при 4°C.

Анализ данных.

Денситометрический анализ массива антител для внутриклеточной передачи сигналов.

Денситометрический анализ проводили для расчета уровней интегральной интенсивности пятен в массиве антител. Интенсивность для каждого пятна нормализовали по среднему для положительного контроля в массиве (формула=лунка с образцом/среднее для положительного контроля) и наносили на график с использованием GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA).

Анализ данных MSD ELISA.

Процент фосфобелка рассчитывали для каждой лунки с использованием следующего расчета: % фосфобелка=((2×сигнал фосфобелка)/(сигнал фосфобелка+сигнал общего белка))×100.

Затем это значение нормализовали по значению для необработанных клеток в каждой временной точке и наносили на график как "% от контроля" в Microsoft Excel 2007.

Результаты.

Предшествующие исследования показали, что обработка H2L5 hIgG4PE увеличивала уровни фосфо-AKT (S473) в клетках Ba/F3-ICOS, где максимальный ответ наблюдали через 30-40 мин после воздействия антитела. В настоящем исследовании уровни фосфо-AKT измеряли в более поздних временных точках, чтобы наблюдать, сохраняются ли увеличенные уровни фосфорилирования через несколько суток. Кроме того, оценивали регуляцию других событий внутриклеточной передачи сигналов посредством активации ICOS. В клетках Ba/F3-ICOS, уровни фосфо-AKT (S473) увеличивались при обработке H2L5 HIGG4PE по сравнению с клетками, обработанными контрольным антителом для изотипа IgG4-PE, после 1 и 6 ч обработки, но этот эффект был утрачен через 24 ч (фиг. 15). Интересно, что сходный эффект наблюдали, когда клетки обрабатывали антителом против ICOS, когда область Fc антитела инактивирована. Увеличенные уровни фосфо-AKT (T308) также наблюдали в клетках, обработанных H2L5 hIgG4PE и антителом IgG1 против ICOS с инактивированным Fc, по сравнению с клетками, обработанными контрольным антителом для изотипа IgG4-PE (фиг. 15), после 1 ч обработки, и он сохранялся вплоть до 48 ч, представляющих собой последнюю измеренную временную точку. Количество других фосфобелков ниже AKT, киназы 3 альфа гликогенсинтазы (GSK3a) и рибосомального белка S6 также умеренно увеличивались при активации ICOS, но эффекты не были настолько сильными, как наблюдаемые для фосфо-AKT. Белковые лизаты анализировали также с использованием массива антител, измеряющих фосфорилирование или расщепление 18 белков, вовлеченных в внутриклеточную передача сигналов. С использованием этого способа только для трех белков показано небольшое увеличение фосфорилирования при активации ICOS: фосфо-AKT (S473), фосфо S6 (S235/236) и фосфо-SAPK/JNK (T183/Y185).

Для измерения изменений фосфорилирования AKT с использованием формата анализа, позволяющего прямое количественное определение, клетки Ba/F3-ICOS обрабатывали с использованием диапазона доз контрольного антитела (IgG4 PE), антитела IgG1 против ICOS с инактивированным Fc или H2L5 hIgG4PE с течением времени и мониторировали посредством ELISA. Увеличенные уровни фосфо-AKT (S473) являлись как зависимыми от дозы, так и зависимыми от времени, в клетках, обработанных антителом IgG1 против ICOS с инактивированным Fc, или обработанных H2L5 hIgG4PE. Как описано ранее, максимальная активация фосфо-AKT (S473) происходила после 1 ч обработки. Сигнал фосфорилирования немного уменьшался через 2 ч и сохранялся вплоть до 6 ч, однако в конечном счете был утрачен через 24 ч. Проводили также тесты ELISA, измеряющего уровни фосфо-AKT (T308), однако невозможно было наблюдать воспроизводимой активации с использованием этого набора для ELISA.

Обсуждение.

Каскад передачи сигнала AKT можно активировать посредством рецепторов тирозинкиназ, интегринов, B- и T-клеточных рецепторов, рецепторов цитокинов, сопряженных с G-белком рецепторов и других стимулов, индуцирующих продукцию фосфатидилинозитол(3,4,5)трифосфатов (PIP3) посредством PI3K [Carnero, 2008]. Эти липиды служили участками причаливания на плазматической мембране для Akt и его вышестоящего активатора PDK1. На мембране, PDK1 фосфорилирует AKT на Thr308, приводя к частичной активации Akt [Alessi, 1996]. Фосфорилирование Akt на Ser473 посредством mTORC2 стимулирует полную ферментативную активность [Sarbassov, 2005].

ICOS играет ключевую роль в функционировании активированных эффекторных и регуляторных CD4+ T-клеток посредством стимуляции выживаемости, пролиферации и памяти T-клеток. Благодаря его роли в длительной активации и эффекторных функциях T-клеток, нацеливание на ICOS с использованием агонистического антитела может являться оправданным способом усиления противоопухолевого иммунитета. В этом исследовании авторы настоящего изобретения наблюдали, что активация ICOS посредством H2L5 hIgG4PE вызывала изменения фосфорилирования AKT в клетках Ba/F3-ICOS. Следовательно, белки ниже AKT, такие как GSK3α (непосредственный субстрат AKT) и рибосмальный белок S6 также являлись фосфорилированными. Эти данные согласуются с исследованием, проведенным недавно в этой модельной системе, и наряду с данными, опубликованными для внешнего использования [Fos, 2008].

Пример 10. Функциональные эффекты растворимого H2L5 hIqG4PE отдельно и в комбинации с антителом против PD1 и антителом против CTLA-4 в анализе PBMC человека.

Экспериментальный препарат(ы).

Выделение первичных PBMC человека.

Свежую кровь получали от доноров крови GSK Health Center и разводили 1:1 не содержащей фенола красного 10% средой RPMI1640. Среды с градиентом плотности в 50-мл конической пробирке Uni-Sep Max и центрифугировали при 400×g в течение 20 мин при комнатной температуре с отключенным тормозом. Полученный слой белых мононуклеарных клеток (лейкоцитарную пленку) осторожно переносили

в новую 50-мл коническую пробирку через клеточное сито 100 мкм. Равный объем, не содержащей фенола красного 10% среды RPMI1640, добавляли к лейкоцитарной пленке и центрифугировали при 300×g в течение 10 мин при комнатной температуре. Осадок клеток ресуспендировали в 10 мл раствора для лизиса эритроцитов (Sigma Aldrich) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Клетки промывали один раз средой и центрифугировали, как описано ранее. Объем доводили до 40 мл с использованием не содержащей фенола красного 10% среды RPMI1640, и клетки подсчитывали с использованием счетчика клеток и анализатора жизнеспособности Vicell (Beckman Coulter).

Индукция незрелых дендритных клеток моноцитарного происхождения (iDC).

Моноциты человека выделяли с использованием способа адгезии к пластику. Кратко, 20 млн свежевыделенных PBMC культивировали в флаконе T-75 для культвирования клеток в среде AIM-V (Thermo Fisher) в течение 3 ч. Клетки, которые не связываются с пластиком, отмывали. Адгерентные моноциты культивировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO_2 в среде AIM-V, дополненной 1000 ед./мл GM-CSF человека (кат.#300-03, PeproTech) и 500 ед./мл IL-4 человека (кат. #200-04). Через 7-10 суток клетки iDC собирали для совместного культивирования с Т-клетками от другого донора в анализе реакций в аллогенной смешанной культуре лимфоцитов.

Выделение первичных Т-клеток человека непосредственно из крови.

Т-клетки человека выделяли непосредственно из свежей крови человека с использованием смеси для обогащения Т-клеток человека (Stem Cell Technologies). Смесь для обогащения Т-клеток человека RosetteSep (50 мкл/мл) добавляли к цельной крови и хорошо перемешивали. После 20 мин инкубации при комнатной температуре равный объем PBS+2% FBS добавляли с осторожным перемешиванием. Разведенный образец наслаивали поверх среды с градиентом плотности и центрифугировали в течение 20 мин при 1200×g при комнатной температуре с отключенным тормозом. Обогащенные клетки с границы раздела среда с градиентом плотности:плазма осторожно переливали в новую коническую пробирку. Затем эритроциты лизировали с использованием буфера для лизиса эритроцитов (Sigma Aldrich), и обогащенные клетки промывали с использованием PBS+2% FBS дважды. Затем Т-клетки ресуспендировали в 40 мл PBS+2% FBS и подсчитывали в счетчике клеток Vi-Cell.

Экспериментальные способы.

Анализ предварительной стимуляции PBMC человека.

Свежевыделенные PBMC человека подвергали предварительной стимуляции с использованием увеличивающих объем Т-клеток DynaBeads CD3/CD28 в соотношении бусин к клеткам 1:20 в флаконе T-75 для культивирования клеток в среде AIM-V, дополненной 100 нг/мл MCSF и 100 МЕ/мл IL-2 (PeproTech) при 37°C. Через 48 ч бусины для предварительной стимуляции удаляли с помощью магнитного поля, и клетки промывали, подсчитывали и повторно стимулировали с использованием DynaBeads против CD3 и терапевтических антител в среде AIM-V, дополненной 100 МЕ/мл IL-2 (PeproTech) в 96-луночном круглодонном планшете, не обработанном для культивирования клеток. Плотность рассева составляла 100000 клеток на 100 мкл среды на лунку. После инкубации при 37°C в течение 3,5 суток супернатанты культур клеток собирали для мультиплексного измерения цитокинов посредством MSD.

Анализ активации MLR человека.

iDC моноцитарного происхождения от здорового добровольца-человека смешивали в соотношении 1:10 (iDC: T) со свежевыделенными Т-клетками человека от другого донора и предварительно инкубировали при 37°C в среде AIM-V в присутствии 0,02 мкг/мл смеси пептидов CEFT в течение 24 ч. Различные группы антител для обработки добавляли непосредственно в лунки, перемешивали и далее инкубировали в течение дополнительных 4 суток. Супернатанты культур клеток собирали для мультиплексного измерения цитокинов посредством анализа MSD.

Анализ цитокинов MSD.

Уровни цитокинов IFN-γ, IL-10, IL-2 и TNF-α в супернатанте культур клеток определяли с использованием сконструированных на заказ наборов для MSD V-Plex человека. Образцы сначала разводили 1:200 в разбавителе 2. Калибраторы также подготавливали в разбавителе 2, следуя рекомендациям изготовителя. Разведенные образцы и калибраторы добавляли в черные планшеты MSD, которые затем герметично закрывали с использованием адгезивной пленки для планшетов и инкубировали при комнатной температуре с встряхиванием в течение 2 ч. После добавления 25 мкл раствора антитела для детекции, свежеприготовленного в разбавителе 2, в каждую лунку, планшет повторно закрывали и инкубировали при комнатной температуре с встряхиванием в течение других 2 ч. Планшеты промывали 3 раза с использованием 150 мкл/лунку PBS плюс 0,05% Tween-20 перед добавлением 150 мкл/лунку свежеразведенного 2× буфера для считывания и немедленно считывали в считывателе MESO QuickPlex. Данные анализировали с использованием программного обеспечения MSD Workbench.

Анализ данных.

Анализ данных MSD.

Данные MSD анализировали с использованием программного обеспечения Discovery Workbench (MSD, версии 4.0.9). Калибраторы из набора изготовителя включали в каждый планшет для MSD для получения специфических для планшетов стандартных кривых с значением R^2 более 0,99 во всех случа-

ях. Количество детектированных цитокинов определяли посредством обратных вычислений на основании стандартной кривой, и среднее и стандартное отклонение для трех биологических повторов использовали для получения графиков.

Статистический анализ.

Однофакторный ANOVA проводили для логарифмически преобразованных данных изменения кратности по сравнению с собственным контролем изотипа для каждого антитела для обработки. Тест множественного сравнения Даннетта проводили для сравнения обоих видов монотерапии по сравнению с комбинацией для различных доноров. $P<0,05$ считали статистически значимым.

Результаты.

Разработка анализа предварительной стимуляции PBMC и теста комбинированной активности H2L5 hIgG4PE с ипилимумабом и пембролизумабом.

Для определения оптимальных условий для предварительной стимуляции, Dynabeads против CD3 человека и Dynabeads против CD3/CD28 человека (Thermo Fisher) тестировали при различном соотношении бусин к клеткам. После 48 ч предварительной стимуляции, клетки собирали, и бусины удаляли посредством магнитного поля перед стимуляцией с использованием Dynabeads против CD3 (соотношение бусин к клеткам=1:1) вместе с антителом против ICOS отдельно или в комбинации с антителом против CTLA-4 или антителом против PD1. Монотерапия H2L5 hIgG4PE приводила к индукции IFN-γ по сравнению с контролем для изотипа во всех тестированных условиях предварительной стимуляции. Диапазон уровня IFN-γ, индуцированный посредством H2L5 hIgG4PE, обратно коррелировал с силой предварительной стимуляции. Для комбинации H2L5 hIgG4PE вместе с ипилимумабом показана увеличенная продукция цитокинов по сравнению либо с H2L5 HIGG4PE, либо с ипилимумабом отдельно, в PBMC, которые слабо подвергались предварительной стимуляции. Комбинированный эффект был утрачен в условиях предварительной стимуляции связанными с планшетом антителами против CD3/антителами против CD28, что рассматривали как более сильные условия предварительной стимуляции. На основании этих результатов условия предварительной стимуляции с использованием бусин с антителами против CD3/антителами против CD28 в соотношении бусин к клеткам 1:20 выбраны для всех будущих анализов PBMC. Результаты для четырех индивидуальных доноров обобщены для комбинации антител против CTLA-4 на фиг. 16 и для комбинации с антителом против PD-1 на фиг. 17.

H2L5 hIqG4PE приводит к зависимой от дозы индукции цитокинов в анализе предварительной стимуляции PBMC.

Зависимую от дозы активность H2L5 hIgG4PE оценивали в PBMC человека, подвергнутых предварительной стимуляции с использованием бусин с антителами против CD3/антителами против CD28 в предопределенном соотношении бусин к клеткам 1:20. Антитело против RSV IgG4PE и IgG1 422.2 против ICOS с инактивированным Fc включали в качестве контроля. Тестировали восемь концентраций H2L5 HIGG4PE (100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 и 0,03 мкг/мл). IFN-γ, IL-10 и TNF-α оценивали посредством MSD в культуральных супернатантов образцов PBMC. H2L5 hIgG4PE, но не контроль для изотипа IgG4 или 422.2 с инактивированным Fc, индуцировало продукцию IFN-γ, IL-10 и TNF-α зависимым от дозы образом. Эти результаты использовали для определения концентрации H2L5 hIgG4PE для использования в комбинационных исследованиях.

Разработка анализа MLR человека.

В попытке оптимизировать анализ MLR человека, в дополнение к совместному культивированию Т-клеток человека и незрелых DC моноцитарного происхождения от другого донора, бусины с антителами против CD3 также добавляли в лунки для обеспечения фоновой стимуляции TCR, чтобы способствовать примированию клеток. Результаты показали, что бусины с антителами против CD3 сильно увеличивали диапазон индукции IFN-γ. Хотя ипилимумаб отдельно может индуцировать продукцию IFN-γ в отсутствие бусин с антителами против CD3, для H2L5 hIgG4PE отдельно или для комбинации H2L5 HIGG4PE/ипилимумаба показана увеличенная продукция IFN-γ по сравнению с соответствующим контролем только в присутствии бусин с антителами против CD3.

Комбинированная активность H2L5 HIGG4PE и ипилимумаба в анализе MLR человека.

Иммуностимулирующую активность H2L5 hIgG4PE отдельно или в комбинации с ипилимумабом тестировали в аллогенном анализе MLR человека, в котором Т-клетки предварительно инкубировали с незрелыми DC моноцитарного происхождения от несовпадающего донора в присутствии 0,02 мкг/мл пептидов CEFT в течение 1 суток. Комбинация H2L5 hIgG4PE/ипилимумаба приводила к значимому увеличению продукции IFN-γ по сравнению с любым из средств отдельно. Результаты согласовывались среди трех тестированных пар доноров; однако наблюдали умеренную изменчивость между донорами (фиг. 18).

Комбинированная активность H2L5 hIqG4PE и пембролизумаба в анализе MLR.

Комбинацию H2L5 hIgG4PE и пембролизумаба тестировали также в аллогенном анализе MLR человека, описанном выше. H2L5 hIg G4PE тестировали отдельно и в комбинации с пембролизумабом при 10 мкг/мл. Комбинация H2L5 hIg G4PE и пембролизумаба приводила к увеличению продукции IFN-γ по сравнению с любым из средств отдельно. Однако статистической значимости не достигали из-за измен-

чивости между донорами и значительной активности монотерапии антителом против PD-1 у некоторых доноров (фиг. 19).

Обсуждение.

ICOS представляет собой костимулирующий рецептор, который слабо экспрессируется на наивных Т-клетках и быстро подвергается повышающей регуляции в активированных CD4+ и CD8+ Т-клетках. Лигандом для ICOS является ICOS-L (B7h, B7RP-1, CD275), который экспрессируется профессиональными APC и периферическими эпителиальными и эндотелиальными клетками после стимуляции TNF-α. Путь ICOS:ICOS-L предоставляет ключевой костимулирующий сигнал для пролиферации и функционирования Т-клеток. Благодаря его роли в длительной активации и эффекторных функциях Т-клеток, нацеливание на ICOS с использованием агонистических антител может являться оправданным способом усиления противоопухолевого иммунитета.

Исследования показали увеличение частоты $ICOS^{выс}$ CD4 + эффекторных Т-клеток после блокирования CTLA-4 посредством ипилимумаба в нескольких моделях злокачественных опухолей. Кроме того, после блокирования CTLA-4, эта популяция клеток продуцировала более высокие уровни INF-γ, чем $ICOS^{низ}$ CD4+ Т-клетки. Фактически, увеличение частоты ICOS+ CD4 Т-клеток идентифицировано в качестве фармакодинамического биомаркера для лечения ипилимумабом пациентов со злокачественными опухолями. Исследования у мышей C57BL/6 дикого типа, показали 80-90% отторжение опухоли после терапии с блокированием CTLA-4; однако у мышей с нокаутом ICOS или ICOSL эффективность уменьшалась до менее 50%. Важная роль, которую ICOS играет в эффективности блокирования CLTA-4, позволяет предполагать, что стимуляция пути ICOS в ходе терапии антителом против CTLA-4 может увеличивать терапевтическую эффективность. Таким образом, авторы настоящего изобретения разработали оценку комбинированной активности H2L5 hIgG4PE и ипилимумаба.

В 2000 г. опубликовано, что белок-1 программируемой гибели клеток (PD-1) является другой молекулой иммунной контрольной точки. Экспрессию PD-L1 (B7-H1), который является одним из лигандов PD-1, можно обнаружить на множестве типов клеток, включая Т-клетки, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки и клетки опухолей. Во множестве типов опухолей показаны также клинические ответы на антитела, нацеленные против оси PD-1/PD-L1. В FDA недавно одобрены пембролизумаб и ниволумаб в качестве второго поколения блокаторов иммунных контрольных точек для лечения злокачественных опухолей. Показано, что пембролизумаб от Merck приводит к частоте ответов ~37-38% у пациентов с меланомой на поздних стадиях, где в последующем исследовании опубликована общая частота ответов 26% у пациентов, имеющих прогрессирующее заболевание после предшествующей терапии ипилимумабом. Для ниволумаба антитела против PD-1 от BMS, также показано клиническое преимущество для пациентов с метастазирующей меланомой с частотой ответов 40% и частотой общей выживаемости 72,9% за 1 год. Кроме того, ниволумаб также одобрен FDA при находящемся на поздних стадиях или метастазирующем немелкоклеточном раке легкого. Поскольку антитела против PD-1, блокирующие контрольную точку, становятся преобладающей иммунотерапией злокачественных опухолей в клинике, может являться важной оценка H2L5 hIgG4PE в комбинации с антителом против PD-1 по их комбинированной противоопухолевой активности.

Ранее, анализ активации PBMC разработали и использовали для оценки активности стимуляции Т-клеток для панели агонистических антител против ICOS. Данные, полученные в этих исследованиях, поддерживают отбор клона 422.2 в качестве кандидата с изотипом IgG4PE в форме H2L5 hIgG4PE. В предшествующем анализе, клетки PBMC подвергали предварительной стимуляции с использованием связанных с планшетом антитела против CD3 при 1 мкг/мл и антитела против CD28 при 3 мкг/мл в течение 48 ч перед тем, как их собирали и повторно стимулировали с использованием антител против CD3 и растворимых антител против ICOS, которые исследовали. Показано, что H2L5 hIgG4PE индуцировало продукцию IFN-γ зависимым от дозы образом. Для определения оптимальных условий для предварительной стимуляции, Dynabeads против CD3 человека и Dynabeads против CD3/CD28 человека (Thermo Fisher) тестировали при различном соотношении бусин к клеткам. Стимуляцию посредством бусин считают более физиологической, и силу стимуляции можно более просто контролировать посредством разработки различного соотношения бусин к клеткам. После 48 ч предварительной стимуляции, клетки собирали, и бусины удаляли посредством магнитного поля перед стимуляцией с использованием Dynabeads против CD3 (соотношение бусин к клеткам=1:1) вместе с антителом против ICOS отдельно или в комбинации с антителом против CTLA-4. Результаты показали, что монотерапия H2L5 hIgG4PE приводила к индукции IFN-γ по сравнению с контролем для изотипа во всех тестированных условиях предварительной стимуляции. Диапазон уровня IFN-γ, индуцированный посредством H2L5 hIgG4PE, обратно коррелировал с силой предварительной стимуляции. Для комбинации H2L5 hIgG4PE вместе с ипилимумабом показана увеличенная продукция цитокинов по сравнению либо с H2L5 hIgG4PE, либо с ипилимумабом отдельно, в PBMC, которые слабо подвергались предварительной стимуляции. Комбинированный эффект был утрачен в условиях предварительной стимуляции связанными с планшетом антителами против CD3/антителами против CD28, что рассматривали как более сильные условия предварительной стимуляции. На основании этих результатов условия предварительной стимуляции с использованием

бусин с антителами против CD3/антителами против CD28 в соотношении бусин к клеткам 1:20 выбраны для всех будущих анализов PBMC. Для комбинации H2L5 hIgG4PE и ипилимумаба показано статистически значимое увеличение продукции IFN-γ по сравнению с обработкой любым из антител отдельно.

В попытке оптимизировать анализ с соотношением бусин к клеткам при стимуляции антителами против CD3/антителами против CD28, фиксированным на 1:20, количество бусин с антителами против CD3, используемых на стадии повторной стимуляции, титровали с понижением соотношения бусин к клеткам от 1:1 до 1:3 и 1:10. Результаты показали, что снижение силы повторной стимуляции приводило к снижению индукции IFN-γ посредством H2L5 hIgG4PE. Комбинированный эффект H2L5 hIgG4PE и ипилимумаба был полностью утрачен при повторной стимуляции с соотношением бусин к клеткам 1:3 и 1:10. Таким образом, для повторной стимуляции антителами против CD3 соотношение бусин к клеткам 1:1 сохраняли для будущих экспериментов.

С оптимизированными условиями предварительной стимуляции и повторной стимуляции этот анализ использовали для оценки ответа в зависимости от дозы H2L5 hIgG4PE. Всего тестировали 8 концентраций антител, которые составляли 100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 и 0,03 мкг/мл. Антитело против RSV IgG4PE и IgG1 против ICOS 422.2 с инактивированным Fc, вариант H2L5 hIgG4PE с инактивированным Fc, использовали в качестве контроля. Результаты показали, что H2L5 hIgG4PE, но не контроль для изотипа IgG4 или 422.2 с инактивированным Fc, индуцировало продукцию IFN-γ, IL-10 и TNF-α зависимым от дозы образом. Интересно, что для варианта H2L5 hIg G4PE с инактивированным Fc показан ограниченный ответ индукции цитокинов, указывающий на то, что привлечение рецептора Fc является критическим для агонистической функции H2L5 hIg G4PE по отношению к Т-клеткам. Эти результаты использовали также для определения дозы H2L5 hIg G4PE для комбинированных исследований.

Анализ реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR) также разработали для оценки комбинированного эффекта H2L5 hIg G4PE и блокирующих контрольную точку антител. Анализ MLR представляет собой иммунный анализ клеток ex vivo, в котором первичные незрелые дендритные клетки (iDC) моноцитарного происхождения смешивали с Т-клетками, выделенными от другого донора. Несовпадение молекул главного комплекса гистосовместимости (MHC) на поверхности клеток iDC может инициировать стимуляцию Т-клеток в аллогенных условиях. В клинике, анализ MLR хорошо известен для идентификации совместимости трансплантатов тканей между донорами и реципиентами.

Для разработки анализа MLR свежие моноциты человека культивировали в среде, дополненной рекомбинантными GM-CSF и IL-4 человека в течение недели для индукции фенотипа незрелых DC. Затем свежие Т-клетки человека от другого донора выделяли и смешивали с клетками iDC в соотношении 10:1 (T:iDC). Монотерапевтическую обработку или комбинированную обработку H2L5 hIg G4PE и ипилимумабом добавляли к совместному культивированию Т-клеток/iDC в присутствии или в отсутствие бусин с антителами против CD3. Предназначением бусин с антителами против CD3 являлось обеспечение фонового стимула TCR, чтобы способствовать примированию Т-клеток. Результаты показали, что бусины с антителами против CD3 сильно увеличивали диапазон индукции IFN-γ в анализе. Хотя ипилимумаб отдельно может индуцировать продукцию IFN-γ в отсутствие бусин с антителами против CD3, для H2L5 hIgG4PE отдельно или для комбинации H2L5 hIgG4PE/ипилимумаба показано увеличение продукции IFN-γ по сравнению с соответствующим контролем в присутствии бусин с антителами против CD3. Этот результат позволяет предполагать, что в этом анализе, стимуляция TCR только посредством клеток DC может являться недостаточной для индукции экспрессии ICOS на поверхности покоящихся Т-клеток, свежевыделенных из PBMC. Для улучшения ситуации, стадию 24-часовой предварительной инкубации с iDC и Т-клетками добавляли перед добавлением терапевтических антител. Смесь пептидов CEFT также добавляли к процедуре анализа для лучшего примирования Т-клеток и для стимуляции антигенспецифического ответа. Пул пептидов CEFT состоит из 27 пептидов, выбранных из рестрицированных по определенным HLA классов I и II Т-клеточных эпитопов из цитомегаловируса человека (HHV-5; CMV), вируса Эпштейна-Барр (HHV-4; EBV), вируса гриппа A и Clostridium tetani. Принимая во внимание высокую частоту вакцинации против гриппа и Clostridium tetani, и высокую встречаемость CMV и EBV в общей популяции, повторные ответы на антиген являлись ожидаемыми для большинства образцов человека. Результаты показали, что увеличенную продукцию IFN-γ наблюдали, когда Т-клетки предварительно инкубировали с клетками iDC в течение 24 ч, и продукция IFN-γ дополнительно увеличивалась, когда пептиды CEFT добавляли в систему совместного культивирования. Иммуностимулирующую активность H2L5 hIgG4PE отдельно или в комбинации с ипилимумабом тестировали в аллогенном анализе MLR человека, в котором Т-клетки предварительно инкубировали с незрелыми DC моноцитарного происхождения от несовпадающего донора в присутствии 0,02 мкг/мл пептидов CEFT в течение 1 суток. Комбинация H2L5 hIgG4PE/ипилимумаба приводила к значимому увеличению продукции IFN-γ production по сравнению с любым из средств отдельно. Результаты согласовывались среди трех тестированных пар доноров; однако наблюдали умеренную изменчивость между донорами.

Подобным образом, комбинацию H2L5 hIgG4PE и пембролизумаба тестировали также в аллогенном анализе MLR человека, описанном выше. H2L5 hIgG4PE тестировали отдельно и в комбинации с пембролизумабом при 10 мкг/мл. Комбинация H2L5 hIgG4PE и пембролизумаба приводила к увеличе-

нию уровня IFN-γ по сравнению с любым из средств отдельно. Однако статистическая значимость не была достигнута из-за высокой изменчивости между донорами и значительной активности монотерапии антителом против PD-1 у некоторых доноров.

В общем, эти исследования показали превосходную комбинированную активность H2L5 hIgG4PE с двумя одобренными FDA-ингибиторами контрольных точек, ипилимумабом и пембролизумабом, по сравнению с монотерапией в двух анализах на основе иммуноцитов человека. В исследованиях, опубликованных в настоящем описании, показано, что H2L5 hIgG4PE стимулирует активацию Т-клеток и сдвиг в сторону T_H1 (например, продукцию IFN-γ), которые являются характерными для продуктивных противоопухолевых иммунных ответов.

Пример 11. Функциональная активность H2L5 hIqG4PE отдельно и в комбинации с антителами против PD1 и против CTLA-4 In vivo.

Модель опухоли PBMC человека на мышах.

Способы.

Экспериментальные препараты.

Все процедуры на животных проверены и одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных GSK до начала протокола исследований.

Получение линий клеток.

A2058 размножали в соответствии с протоколом ATCC.

Материалы:

линия клеток меланомы человека A2058: ATCC, кат. # CRL-11147, партия #59349362,

DPBS: ATCC, кат. #30-2200, партия #63357436.

Модифицированная по способу Дульбекко среда Игла: ATCC, кат. # 30-2002, партия # 62596471, истечение срока действия: октябрь 2015 г.

Эмбриональная бычья сыворотка: Sigma-Aldrich, кат. #12176c-1000 ml, партия # 13G180R0H1, истечение срока действия: July-2018.

0,25% (мас./об.) Трипсин-0,53 мМ ЭДТА: ATCC, кат. #30-2102, партия #62420300.

Антибиотик-противогрибковое средство (100X): Life, Technologies, кат. # 15240-062.

Флакон для культивирования клеток T175: Greiner bio-one, кат. # 661175.

Флакон для культивирования клеток T75: Greiner bio-one, кат. # 658175.

Среда.

Полная среда для роста A2058: модифицированная по способу Дульбекко среда Игла+10% FBS. Условия культивирования: атмосфера: воздух, 95%; 5% диоксид углерода (CO2); температура: 37°C.

При получении клеток:

предварительно нагреть полную среду при 37°C,

быстро разморозить клетки при 37°C в водяной бане. Протереть пробирку 70% этанолом и перенести клетки в 15-мл пробирку, заполненную предварительно нагретой полной средой,

центрифугировать при 1200 об/мин в течение 5 мин для сбора осадка клеток,

перенести клетки обратно в T75 флакон, заполненный предварительно нагретой полной средой, и инкубировать при 37°C.

Субкультивирование клеток.

Объемы приведены для флакона 75 $см^2$ (для флакона T175 $см^2$, пропорционально изменить количество необходимой среды для диссоциации и культивирования).

Удалить и отбросить культуральную среду.

Быстро промыть слой клеток DPBS для удаления всех следов сыворотки, содержащей ингибитор трипсина.

Добавить 2,0-3,0 мл раствора трипсина-ЭДТА на флакон и наблюдать клетки под инвертированным микроскопом до диспергирования слоя клеток (2-3 мин).

Примечание: чтобы избежать слипания, не перемешивать клетки постукиванием или встряхиванием флакона во время ожидания открепления клеток. Клетки, которые трудно открепить, можно помещать при 37°C для облегчения диспергирования.

Добавить 10 мл полной среды для роста и отобрать клетки осторожным пипетированием.

Центрифугировать при 1200 об/мин в течение 5 мин для сбора осадка клеток, добавить 10 мл полной среды для роста.

Добавить соответствующие аликвоты суспензии клеток в новые культуральные флаконы. Инкубировать культуры при 37°C.

Обновление среды: каждые 2-3 суток.

Подготовка клеток опухолей для инокуляции мышам.

Промыть клетки 1X DPBS, добавить 3 мл 1X трипсина на 2-3 мин.

Добавить полную среду для роста и собрать суспензию клеток в стерильные конические пробирки для центрифугирования в ламинарном шкафу для культивирования клеток.

Центрифугировать клетки при 1200 об/мин в течение 5 мин для получения осадка клеток.

Промыть клетки 1X раствором DPBS, центрифугировать при 1200 об/мин в течение 5 мин для получения осадка клеток. Повторить промывку 2 раза.

Подсчитать клетки посредством гемоцитометра для определения количества и жизнеспособности клеток.

Ресуспендировать клетки в ледяном PBS в концентрации для инокуляции in vivo (A2058, 2,5e7/мл, 2,5e6/100 мкл/мышь).

Инокуляция линии клеток опухоли мышам NSG.

Материалы.

Мыши: NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ. The Jackson Laboratory, исходная колония: 005557, самки в возрасте 6 недель.

Шприцы с 1 мл туберкулина с присоединенной иглой 25 G 5/8: Becton Dickinson, кат. # 305554.

Спиртовые салфетки PDI™: Professional Disposables, кат. # B339.

Салфетки с повидоном-иодом PDI™: Professional Disposables, кат. # B40600.

Подготовка мышей.

Возраст мышей должен составлять 6 недель.

Обеспечить период акклиматизации 3-5 суток после прибытия мышей.

Побрить нижнюю часть правого бока мышей.

Подготовка инъекции.

Очистить и стерилизовать область инокуляции у мышей с использованием салфетки с иодом, затем салфетки с этанолом.

Использовать шприц 1 $см^3$ и иглу 25 калибра.

Вынуть поршень, перемешать клетки и добавить 100 мкл клеток в заднюю часть шприца, осторожно вставить поршень.

Инъецировать клетки подкожно (s.c.) into the нижнюю часть правого бока мышей.

Оценка роста опухолей.

Для измерения опухоли увлажнить мех 70% этанолом, чтобы упростить обнаружение границ опухоли. Измерять размер опухоли и массу тела каждые 2-3 суток.

Размер опухоли измеряют с использованием цифрового штангенциркуля, и объем определяют следующим образом: объем опухоли ($мм^3$)=(длина)×(ширина)^2/2.

Внутривенное введение PBMC человека.

Введение PBMC человека можно начинать через 1 неделю после того, как опухоли достигнут среднего размера приблизительно 100 $мм^3$.

Материалы.

Свежие PBMC человека: Allcells, кат. # C-PB102-3B2.

Шприцы с 1 мл туберкулина с присоединенной иглой 25 G 5/8: Becton Dickinson, кат. # 305554.

Спиртовые салфетки PDI™: Professional Disposables, кат. # B339.

Салфетки с повидоном-иодом PDI™: Professional Disposables, кат. # B40600.

Марлевые тампоны: Covidien, кат. # 441211.

Фиксатор хвоста мышей с подсветкой: Braintree scientific, cat#MTI STD.

Подготовка PBMC.

Свежие PBMC человека закупают в Allcells с доставкой в течение ночи.

Центрифугировать клетки при 1400 об/мин в течение 5 мин для получения осадка клеток.

Промыть клетки 1X раствором DPBS, центрифугировать при 1400 об/мин в течение 5 мин для получения осадка клеток.

Ресуспендировать клетки в ледяном PBS в концентрации для инокуляции in vivo (20e7/мл).

Использовать шприц 1 $см^3$ и иглу 25 калибра.

Вынуть поршень, перемешать клетки и добавить 100 мкл клеток в заднюю часть шприца, осторожно вставить поршень.

Сохранять клетки на льду.

Инъекция в хвостовую вену.

Согреть мышей с помощью лампы накаливания 5 мин.

Фиксировать мышей с использованием фиксатора хвоста мышей с подсветкой.

Медленно поворачивать хвост для визуализации вены.

Очистить и стерилизовать область инъекции с использованием салфетки с иодом, затем салфетки с этанолом.

Вставить иглу в вену под небольшим углом и инъецировать клетки.

Удалить иглу и приложить осторожное нажатие с использованием марлевого тампона до остановки кровотечения.

Вернуть животных в их клетки и наблюдать в течение 5-10 мин, чтобы убедиться, что кровотечение не возобновилось.

Введение терапевтического антитела.

Через 1-3 суток после инъекции PBMC человека мышам вводили антитела посредством внутрибрюшинной инъекции.

Материалы.

Контроль изотипа для полностью человеческого IgG1: Eureka therapeutics, кат. #ET-901 (квалификации для доклинических исследований) партия #15-726, истечение срока действия: февраль 2017 г.

Ипилимумаб (ервой): Bristol-Myers Squibb NDC 0003-2327-11, партия #921873, истечение срока действия: апрель 2015 г.; партия #4H69490, истечение срока действия: май 2016 г.

Контроль изотипа для полностью человеческого IgG4: Eureka therapeutics, кат. #ET-904(квалификации для доклинических исследований) партия #15-726 истечение срока действия: февраль 2017 г.

Антиитело против ICOS человека H2L5 hIgG4PE.

Пембролизумаб (кейтруда): Merck, NDC 0006-3026-02, партия # L010592, истечение срока действия: 26 апреля 2016 г.

Внутрибрюшинная инъекция.

Набрать, в шприц и иглу, 100 мкл подлежащего введению материала.

Выровнять скос иглы со шкалой шприца.

Достаточно сильно фиксировать животное своей не ведущей рукой.

Ввести кончик иглы: провести воображаемую линию поперек живота непосредственно над коленями, иглу следует вводить по этой линии с правой стороны животного и близко к средней линии. Поскольку это самка, можно видеть, что точка ввода находится по направлению к голове и немного к середине от последнего соска.

Наклонить мышь головой немного к полу, чтобы ее голова была ниже ее крестца.

Вставить иглу в брюшную полость под углом приблизительно 30°.

Стержень иглы должен войти на глубину приблизительно полсантиметра.

После инъекции, извлечь иглу и вернуть мышь в ее клетку.

Отбор образцов крови и опухоли.

Материалы.

Microvette CB300 (для сыворотки): Braintree Scientific, кат. # MV-CB300 16440.

Microvette CB300 (для гематологии/ЭДТА калия): Braintree Scientific, кат. # MV-CB300 16444.

Кровь.

У мышей отбирали кровь из хвостовой вены один раз в неделю.

30 мкл крови собирали в Microvette CB300 (для гематологии/ЭДТА калия) для анализа проточной цитометрии.

Другие 30 мкл крови собирали в Microvette CB300 для сыворотки и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре для обеспечения свертывания крови с последующим центрифугированием при 2000×g для сбора сыворотки. Сыворотку сохраняли при -20° до дальнейшего анализа.

Опухоль.

Мышей подвергали эвтаназии, когда размер опухоли достигал 2000 мм^3. Опухоли собирали и перерабатывали следующим способом.

Дизайн эксперимента.

Все исследования подготавливали в соответствии со способами, перечисленными выше.

Ответ в зависимости от дозы H2L5 hIqG4PE.

Это исследование разработано для определения зависимой от дозы активности H2L5 hIgG4PE у мышей NSG с трансплантацией PBMC человека, с имплантацией опухолей меланомы A2058. 9 групп из 10 мышей на группу и 1 контрольную группу (только опухоль без PBMC) из 7 мышей назначали для каждого исследования. Обобщение режима обработки для ответа в зависимости от дозы с использованием PBMC человека от донора #7129 представлено в табл. 11. H2L5 hIgG4PE вводили в дозах 0,04, 0,4, 1,2 и 4 мг/кг. Ипилимумаб вводили в дозе 3 мг/кг, и вариант агонистического антитела против ICOS с инактивированным Fc тестировали при 1 мг/кг. Тестируемые группы оценивали относительно контрольных групп носителя и совпадающих по изотипу контрольных групп. Анализ выживаемости проводили на сутки 49 при завершении исследования.

Таблица 11

Обобщение режима обработки для ответа в зависимости от дозы H2L5 hIgG4PE у мышей

Группы	Обработка 1	Обработка 2	# мышей/ группу	Дозирование
1	Опухоль+huPBMC (донор #7129)	Носитель	10	Дважды в неделю в течение 3 недель
2	Опухоль+huPBMC (донор #7129)	IgG1 человека Isotype (3мг/кг)	10	Дважды в неделю в течение 3 недель
3	Опухоль+huPBMC (донор #7129)	Ипилимумаб(3мг/кг)	10	Дважды в неделю в течение 3 недель
4	Опухоль+huPBMC (донор #7129)	IgG4 человека (4 мг/кг)	10	Дважды в неделю в течение 3 недель
5	Опухоль+huPBMC (донор #7129)	H2L5 hIgG4PE (0,04 мг/кг)	10	Дважды в неделю в течение 3 недель
6	Опухоль+huPBMC (донор #7129)	H2L5 hIgG4PE (0,4 мг/кг)	10	Дважды в неделю в течение 3 недель
7	Опухоль+huPBMC (донор #7129)	H2L5 hIgG4PE (1,2 мг/кг)	10	Дважды в неделю в течение 3 недель
8	Опухоль+huPBMC (донор #7129)	H2L5 hIgG4PE (4 мг/кг)	10	Дважды в неделю в течение 3 недель
9	Опухоль+huPBMC (донор #7129)	Антитела против ICOS с инактивированным Fc (1мг/кг)	10	Дважды в неделю в течение 3 недель
10	Опухоль (no PBMC) (донор #7129)	Без обработки	7	Дважды в неделю в течение 3 недель

Исследование эффективности и фармакодинамической (PD) активности с использованием H2L5 hIqG4PE в комбинации с ипилимумабом и пембролизумабом.

Цели исследования.

Оценка противоопухолевой активности монотерапии H2L5 hIgG4PE, введенной в дозах 0,04 и 0,4 мг/кг.

Для оценки противоопухолевой активности вводили дозы H2L5 hIgG4PE в комбинации с ипилимумабом или пембролизумабом с совпадающим по изотипу контролем.

Сбор ткани для дальнейшего исследования фармакодинамической активности H2L5 hIgG4PE. Всего 22 группы обработки из 10 мышей на группу назначали для этого исследования. Группы 1-16 представляли собой когорты эффективности и 17-22 представляли собой когорты фармакодинамической активности.

Для комбинированной обработки вводили дозы H2L5 hIgG4PE (0,04 или 0,4 мг/кг) и ипилимумаба или IgG1 (3 мг/кг), или H2L5 hIgG4PE (0,04 или 0,4 мг/кг) и пембролизумаба или IgG4 (5 мг/кг). Дозы H2L5 hIgG4PE и ипилимумаба так же, как совпадающего по изотипу контроля, вводили дважды в неделю до 6 доз, дозы пембролизумаба и контроля для изотипа вводили каждые 5 суток до окончания дозирования H2L5 hIgG4PE. В когортах сбора тканей для фармакодинамического исследования H2L5 hIgG4PE вводили в дозах 0,004, 0,04, 0,4 и 1,2 мг/кг. Группы обработки оценивали относительно контрольных групп носителя и совпадающих по изотипу контрольных групп. Группы обработки для носителя, изотипов и H2L5 hIgG4PE, отдельно и в комбинации с ипилимумабом и пембролизумабом с использованием PBMC человека от донора номер #6711 показаны в табл. 12. Анализ завершали на сутки 59 при завершении исследования.

Таблица 12

Группы обработки мышей в модели опухоли меланомы A2058

Группа	Обработка 1	Обработка 2	# мышей/ группу	Дозирование
1	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	Носитель	10	Дважды в неделю до 6 доз
2	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	Контроль для изотипа (IgG1 3 мг/кг+IgG4 5 мг/кг)	10	IgG1 дважды в неделю до 6 доз. IgG4 каждые 5 суток до окончания дозирования ICOS
3	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	Ипилимумаб 3 мг/кг+IgG4 5 мг/кг	10	Дважды в неделю до 6 доз IgG4 каждые 5 суток до окончания дозирования ICOS
4	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	Пембролизумаб 5 мг/кг +IgG1 3 мг/кг	10	IgG1 дважды в неделю до 6 доз. Пембролизумаб каждые 5 суток до окончания дозирования ICOS
5	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,04 мг/кг +IgG1 3 мг/кг	10	IgG1 и ICOS Дважды в неделю до 6 доз
6	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,4 мг/кг+IgG1 3 мг/кг	10	IgG1 и ICOS дважды в неделю до 6 доз
7	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	Ипилимумаб 3 мг/кг +пембролизумаб 5 мг/кг	10	Ипилимумаб дважды в неделю до 6 доз. Пембролизумаб каждые 5 суток до окончания дозирования ICOS
8	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,04 мг/кг+Ипилимумаб 3 мг/кг	10	Ипилимумаб и ICOS дважды в неделю до 6 доз
9	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,4 мг/кг+ипилимумаб 3 мг/кг	10	Ипилимумаб и ICOS дважды в неделю до 6 доз
10	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,04 мг/кг+пембролизумаб 5 мг/кг	10	ICOS дважды в неделю до 6 доз. Пембролизумаб каждые 5 суток до окончания дозирования ICOS
11	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,4 мг/кг +пембролизумаб 5 мг/кг	10	ICOS дважды в неделю до 6 доз. Пембролизумаб каждые 5 суток до окончания дозирования ICOS
12	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	IgG4 5мг/кг	10	Дважды в неделю до 6 доз
13	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	Пембролизумаб 2,5 мг/кг	10	Пембролизумаб каждые 5 суток до окончания дозирования ICOS
14	Опухоль+huPBMC	Пембролизумаб 5	10	Пембролизумаб каждые 5

	(донор #6711)	мг/кг		суток до окончания дозирования ICOS
15	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,4 мг/кг	10	ICOS дважды в неделю до 6 доз
16	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,4 мг/кг+пембролизумаб 5 мг/кг+Ipi	10	ICOS дважды в неделю до 6 доз. Пембролизумаб каждые 5 суток до окончания дозирования ICOS
17	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	Носитель	10	Дважды в неделю для оценки фармакодинамической активности, образцы от 5 мышей собирали через 24 час после 2-й дозы, и образцы от 5 мышей собирали через 24 час после 4-й дозы
18	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	Контроль для изотипа (IgG4) 1,2 мг/кг	10	Дважды в неделю для оценки фармакодинамической активности, образцы от 5 мышей собирали через 24 час после 2-й дозы, и образцы от 5 мышей собирали через 24 час после 4-й дозы
19	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,004 мг/кг	10	Дважды в неделю для оценки фармакодинамической активности, образцы от 5 мышей собирали через 24 час после 2-й дозы, и образцы от 5 мышей собирали через 24 час после 4-й дозы
20	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,04 мг/кг	10	Дважды в неделю для оценки фармакодинамической активности, образцы от 5 мышей собирали через 24 час после 2-й дозы, и образцы от 5 мышей собирали через 24 час после 4-й дозы
21	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,4 мг/кг	10	Дважды в неделю для оценки фармакодинамической активности, образцы от 5 мышей собирали через 24 час после 2-й дозы, и образцы от 5 мышей собирали через 24 час после 4-й дозы
22	Опухоль+huPBMC (донор #6711)	H2L5 hIgG4PE 1,2 мг/кг	10	Дважды в неделю для оценки фармакодинамической активности, образцы от 5 мышей собирали через 24 час после 2-й дозы, и образцы от 5 мышей собирали через 24 час после 4-й дозы

Исследование эффективности, оценивающее H2L5 hIqG4PE, дозированное в комбинации с ипилимумабом или пембролизумабом.

Это исследование разработано для оценки противоопухолевой эффективности H2L5 hIgG4PE (введенного в дозах 0,01 и 0,04 мг/кг) в комбинации с ипилимумабом или пембролизумабом с совпадающим по изотипу контролем, у мышей NSG с трансплантацией PBMC человека с использованием модели опухоли меланомы A2058. Всего 13 групп из 10 мышей на группу назначали для этого исследования. Группа 2 представляла собой комбинированный контроль изотипа для гуманизированных IgG1 и IgG4. H2L5 hIgG4PE вводили в дозах 0,01 мг/кг (группа 12) и 0,04 мг/кг (группа 13) в качестве монотерапии. Для комбинированной обработки вводили дозы H2L5 hIgG4PE (0,01 и 0,04 мг/кг) и ипилимумаба или IgG1 (3 мг/кг) или H2L5 hIgG4PE (0,01 и 0,04 мг/кг) и пембролизумаба или IgG4 (5 мг/кг). Дозы H2L5 hIgG4PE и ипилимумаба так же, как совпадающего по изотипу контроля, вводили дважды в неделю до 6 доз, дозы пембролизумаба и контроля для изотипа вводили каждые 5 суток до окончания дозирования H2L5 hIgG4PE. Обобщение групп обработки с использованием PBMC человека от донора # 4568 представлено в табл. 13. Группы обработки оценивали относительно контрольных групп носителя и контрольных групп для изотипа. Анализ выживаемости проводили на сутки 33 при завершении исследования.

Таблица 13

Группы обработки мышей в модели опухоли меланомы A2058

Группа	Обработка 1	Обработка 2	# мышей/ группу	Дозирование
1	Опухоль+huPBMC (донор #4568)	Носитель	10	Дважды в неделю до 6 доз
2	Опухоль+huPBMC (донор #4568)	Контроль для изотипа (IgG1 3 мг/кг+ IgG4 5 мг/кг)	10	IgG1 дважды в неделю до 6 доз. IgG4 каждые 5 суток до окончания дозирования ICOS
3	Опухоль+huPBMC (донор #4568)	Ипилимумаб 3мг/кг+IgG4 5 мг/кг	10	Дважды в неделю до 6 доз. IgG4 каждые 5 суток до окончания дозирования ICOS
4	Опухоль+huPBMC (донор #4568)	Пембролизумаб 5 мг/кг+IgG1 3 мг/кг	10	IgG1 дважды в неделю до 6 доз. Пембролизумаб каждые 5 суток до окончания дозирования ICOS
5	Опухоль+huPBMC (донор #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,01 мг/кг+IgG1 3мг/кг	10	IgG1 и ICOS дважды в неделю до 6 доз
6	Опухоль+huPBMC (донор #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,04 мг/кг+IgG1 3 мг/кг	10	IgG1 и ICOS дважды в неделю до 6 доз
7	Опухоль+huPBMC (донор #4568)	Ипилимумаб 3 мг/кг+пембролизумаб 5 мг/кг	10	Ипилимумаб дважды в неделю до 6 доз. Пембролизумаб каждые 5 суток до окончания дозирования ICOS
8	Опухоль+huPBMC (донор #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,01 мг/кг+ипилимумаб 3мг/кг	10	Ипилимумаб и ICOS дважды в неделю до 6 доз
9	Опухоль+huPBMC (донор #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,04 мг/кг+ипилимумаб 3 мг/кг	10	Ипилимумаб и ICOS дважды в неделю до 6 доз
10	Опухоль+huPBMC (донор #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,01 мг/кг+пембролизумаб 5 мг/кг	10	ICOS Дважды в неделю до 6 доз. Пембролизумаб каждые 5 суток до окончания дозирования ICOS
11	Опухоль+huPBMC (донор #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,04 мг/кг+пембролизумаб 5 мг/кг	10	ICOS дважды в неделю до 6 доз. Пембролизумаб каждые 5 суток до окончания дозирования ICOS
12	Опухоль+huPBMC (донор #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,01 мг/кг	10	Дважды в неделю до 6 доз
13	Опухоль+huPBMC (донор #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,04 мг/кг	10	Дважды в неделю до 6 доз

Статистический анализ.

Событием для анализа выживаемости являлось объем опухоли >2000 мм^3, изъязвление опухоли, потеря массы тела мыши > 20%, агония или обнаружение мертвой, в зависимости от того, что наступало раньше. Точное время для отсекаемого объема определяли посредством подбора линейного графика между log объема опухоли и сутками двух наблюдений, первого наблюдения, где превышен отсекаемый объем, и одного наблюдения, непосредственно предшествующего отсекаемому объему. Способ Каплана-Мейера (KM) осуществляли для оценки вероятности выживаемости в различных группах обработки на данное время. Регистрировали медианное время до конечной точки и соответствующий ему 95% доверительный интервал. Затем тестировали, существуют или нет статистические различия кривых выживаемости KM между любыми двумя группами, посредством логарифмического рангового критерия.

Данные объема опухолей за последние сутки, на которые присутствовало 10 животных на группу (т.е. до эвтаназии каких-либо животных), использовали для проведения сравнений объема опухолей между различными группами обработки. Перед анализом объем опухоли преобразовывали в натуральный логарифм из-за непропорциональности изменчивости в различных группах обработки. Затем проводили ANOVA с последующим попарным сравнением для подвергнутых логарифмическому преобразованию данных.

Программное обеспечение Graphpad Prism использовали для нанесения на график данных роста опухолей и массы тела.

Результаты.

Ответ в зависимости от дозы H2L5 hIgG4PE (фиг. 20A).

Ингибирование роста опухолей.

Контрольная группа.

Для PBMC человека (донор 7129) не показано эффекта на рост опухолей A2058 у мышей NSG. У мышей, несущих опухоль A2058 в присутствии или в отсутствие PBMC человека, у мышей, несущих опухоль A2058 в присутствии PBMC человека, обработанных носителем и контрольными для изотипа антителами, развивались опухоли, которые прогрессировали, как ожидалось (группа #1 по сравнению с группой #10, группа #1 по сравнению с группой #2, группа #1 по сравнению с группой #4, P=1).

Для обработки ипилимумабом при 3 мг/кг (группа #3) показано значимое ингибирование роста опухолей ($p<0,03$) по сравнению с контрольной группой носителя #1, однако статистическая значимость утрачивалась ($p<0,22$) при сравнении с контрольной для изотипа группой #2. Это указывает на то, что изотип антитела может влиять на рост опухоли.

Для обработки H2L5 hIgG4PE при 0,4 мг/кг показана тенденция к ингибированию роста опухолей и увеличенной выживаемости мышей по сравнению с другими дозами, хотя эффекты не являлись статистически значимыми при сравнении либо с контролем-носителем, либо с контролем для изотипа.

Клинические наблюдения.

В ходе исследования наблюдали потерю массы тела у мышей, которая составляла приблизительно 20% при окончании исследования. Опубликовано, что как GvHD, так и опухолевая нагрузка может приводить к падению массы тела у мышей, хотя в этом исследовании потеря массы тела, по-видимому, была больше связана с опухолью A2058, поскольку для мышей, несущих опухоль, без трансплантации PBMC (группа #10), показана такая же тенденция. Изъязвление опухоли наблюдали для множества опухолей в ходе исследования, включая контрольную группу для изотипа.

Исходы для мышей.

Большинство мышей удаляли по достижению объемов опухолей >2000 $мм^3$. Трех мышей подвергли эвтаназии из-за изъязвления опухолей, и трех мышей подвергли эвтаназии из-за потери массы тела >20%. Девять мышей обнаружены мертвыми со случайным распределением между группами, включая двух в группе носителя и всего трех в контрольных группах для изотипа. Эти смерти приписали чувствительности модели к состоянию реакции трансплантат против хозяина, и не связывали с обработкой, поскольку не наблюдали паттерна для групп обработки по сравнению с контрольными группами носителя или с контрольными группами для изотипа.

Исследование эффективности для H2L5 hIgG4PE в комбинации с ипилимумабом и пембролизумабом (фиг. 20B).

Ингибирование роста опухолей.

Контрольная группа.

У мышей, несущих опухоль A2058 в присутствии PBMC человека, обработанных носителем и контрольными для изотипа антителами, развивались опухоли, которые росли, как ожидалось.

Монотерапия.

Обработка ипилимумабом при 3 мг/кг в комбинации с IgG4 (группа #3) приводила к значимому ингибированию роста опухолей ($p<0,04$) по сравнению с контрольной группой носителя #1. Однако при сравнении с контрольной для изотипа группой #2 статистическая значимость утрачивалась ($p<0,23$).

Для обработки пембролизумабом отдельно при 2,5 или 5 мг/кг (группа #13, 14) показано поддающееся наблюдению ингибирование роста опухолей без статистической значимости при сравнении с контрольной группой носителя или с контрольной для изотипа группой #12. Для пембролизумаба в комбинации с IgG1 (группа #4) показано поддающееся наблюдению ингибирование роста опухолей без статистической значимости, однако наблюдали значимое увеличение выживаемости ($p<0,04$) по сравнению с контрольной группой носителя #1. Статистическая значимость утрачивалась ($p<0,4$) при сравнении с контрольной для изотипа группой #2.

Для обработки H2L5 hIgG4PE отдельно при 0,4 мг/кг (группа #15) показано поддающееся наблюдению ингибирование роста опухолей без статистической значимости по сравнению с носителем или с контрольной для изотипа группой #12. Для H2L5 hIgG4PE при 0,04 или 0,4 мг/кг в комбинации с IgG1 (группа #5 и 6) показано поддающееся наблюдению замедление прогрессирования опухолей и продление выживаемости мышей, но это не достигало статистической значимости.

Комбинированная обработка.

Для комбинации H2L5 hIgG4PE (0,04 или 0,4 мг/кг) с ипилимумабом (3 мг/кг) в группах #8 и #9 не показано дополнительное ингибирование роста опухолей по сравнению с ипилимумабом отдельно (группа #3). Для комбинации H2L5 hIgG4PE (0,04 или 0,4 мг/кг) с пембролизумабом (5 мг/кг) в группах #10 и #11 показано умеренное, но не значимое ингибирование роста опухолей и увеличение выживаемости мышей по сравнению с монотерапией пембролизумабом, группа #4, или с монотерапией H2L5 hIgG4PE, группы #5 и #6.

Клинические наблюдения.

Потеря массы тела у мышей, наблюдаемая в ходе исследования, составляла приблизительно 20%. Изъязвление опухоли наблюдали для множества опухолей в ходе исследования в большинстве групп.

Исходы для мышей.

Всего 100 из 160 мышей подвергли эвтаназии, когда объемы опухолей достигли >2000 мм^3. 29 подвергли эвтаназии из-за изъязвления опухолей, 18 мышей обнаружены мертвыми, 12 мышей подвергли эвтаназии из-за потери массы тела >20% и одну мышь подвергли эвтаназии из-за агонии. Мышей обнаруживали мертвыми среди групп, включая контрольную группу для изотипа #2. Эти смерти приписали чувствительности модели к состоянию реакции трансплантат против хозяина, и не связывали с обработкой, поскольку не наблюдали паттерна для групп обработки по сравнению с контрольной группой для изотипа.

Исследование эффективности, оценивающее H2L5 hIgG4PE, дозированное в комбинации с ипилимумабом или пембролизумабом (фиг. 20C).

Замедление роста опухолей.

Контрольная группа: У мышей, несущих опухоль A2058 в присутствии PBMC человека, обработанных носителем или контрольными для изотипа антителами, развивались опухоли, которые росли, как ожидалось.

Монотерапия.

Для обработки ипилимумабом при 3 мг/кг в комбинации с IgG4 (группа #3) показано значимое ингибирование роста опухолей ($p<0,02$) и значимое увеличение выживаемости ($p<0,01$) по сравнению с контрольной группой носителя #1. Однако при сравнении с контрольной для изотипа группой #2, ингибирование роста опухолей не достигало значимости ($p<0,13$), в то время как значимое увеличение выживаемости мышей сохранялось ($p<0,04$).

Для обработки пембролизумабом при 5 мг/кг в комбинации с IgG1 (группа #4) показано ингибирование роста опухолей без статистической значимости по сравнению с носителем или с контрольной для изотипа группой #2.

Для обработки H2L5 hIgG4PE отдельно при 0,01 или 0,04 мг/кг (группа #12 и #13) показано значимое ингибирование роста опухолей ($p<0,03$) по сравнению с контрольной группой носителя #1. Для H2L5 hIgG4PE, введенного в дозе 0,04 мг/кг, также показано значимое увеличение выживаемости мышей ($p<0,048$) по сравнению с контрольной группой носителя #1. Однако по сравнению с контрольной для изотипа группой #2 ингибирование роста опухолей и увеличение выживаемости не достигали статистической значимости для групп #12 и #13. Для H2L5 hIgG4PE при 0,01 мг/кг в комбинации с IgG1 (группа #5) показано значимое ингибирование роста опухолей ($p<0,03$) и увеличение выживаемости мышей ($p<0,03$) по сравнению с контрольной группой носителя #1. Однако по сравнению с контрольной для изотипа группой #2 замедление роста опухолей и увеличение выживаемости не достигали статистической значимости. Для H2L5 hIgG4PE при 0,04 мг/кг в комбинации с IgG1 (группа #6) показано поддающееся наблюдению ингибирование роста опухолей и увеличение выживаемости мышей, но это не достигало статистической значимости.

Комбинированная обработка.

Для комбинации H2L5 hIgG4PE с ипилимумабом (0,01 мг/кг плюс ипилимумаб 3 мг/кг; группа #8) показано поддающееся наблюдению ингибирование роста опухолей и увеличение выживаемости мышей, но это не достигало статистической значимости. Для комбинации H2L5 hIgG4PE с ипилимумабом (0,04 мг/кг плюс ипилимумаб 3 мг/кг; группа #9) показано значимое ингибирование роста опухолей ($p<0,00$) и значимое увеличение выживаемости мышей ($p<0,04$) по сравнению с контрольной группой носителя #1 или с контрольной для изотипа группой #2 ($p<0,02$). Однако по сравнению с контролем для изотипа увеличение выживаемости не достигало статистической значимости. Комбинированная активность не достигала значимости по сравнению с монотерапией ипилимумабом, группа #3, или с группами монотерапии H2L5 hIgG4PE.

Для комбинации H2L5 hIgG4PE (0,01 или 0,04 мг/кг) с пембролизумабом (5 мг/кг), группы #10 и #11, показано значимое ингибирование роста опухолей ($p\leq 0,03$) и наблюдали значимое увеличение выживаемости мышей ($p<0,03$) по сравнению с контрольной группой носителя #1. При сравнении с контрольной для изотипа группой #2 значимость ингибирования роста опухолей сохранялась в комбинации 0,04 мг/кг H2L5 hIgG4PE с пембролизумабом ($p<0,03$). Однако преимущество для выживаемости не достигало статистической значимости. Для комбинации не достигали статистической значимости по сравнению с любой из групп монотерапии пембролизумабом, группа #3, или H2L5 hIgG4PE, группы #5 или #6. Таким образом, для H2L5 hIgG4PE в комбинации с пембролизумабом (0,01 или 0,04 мг/кг плюс пембролизумаб 5 мг/кг) показано увеличение ингибирования роста опухолей и выживаемости мышей, но это не достигало статистической значимости при сравнении с контролем для изотипа или видами монотерапии.

Клинические наблюдения.

Потеря массы тела у мышей, наблюдаемая в ходе исследования, составляла приблизительно 20%. Изъязвление опухоли наблюдали в большинстве групп в ходе исследования.

Исходы для мышей.

Всего 91 мышь подвергли эвтаназии из-за объемов опухолей >2000 мм^3, 34 мыши подвергли эвтаназии из-за изъязвления опухолей и 5 мышей обнаружены мертвыми. Эти смерти приписали чувствительности модели к состоянию реакции трансплантат против хозяина.

Обсуждение.

Эффективность H2L5 hIgG4PE в качестве монотерапии и в комбинации с пембролизумабом так же, как с ипилимумабом, оценивали в модели опухолей меланомы A2058 на мышах NSG с трансплантацией PBMC человека. Эта модель, где PBMC человека внутривенно инъецируют взрослым иммунодефицитным мышам NSG (NOD/SCID/IL-2Rγnull), известна как модель Hu-PBMC NSG. Она индуцирует реакцию трансплантат против хозяина (GvHD), и ее используют для исследования активности эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти. В модели Hu-PBMC NSG подкожно имплантировали линию клеток злокачественной опухоли человека A2058 для исследования эффекта человеческих иммунотерапевтических антител на рост опухолей. Ограничения этой модели включают начало симптомов GvHD, потерю массы тела и частое изъязвление опухолей, не позволяющие мониторирование выживаемости в течение более длительного периода времени, как это возможно для моделей сингенных опухолей на мышах.

Первоначальные исследования, оценивающие H2L5 hIgG4PE в дозах, лежащих в диапазоне от 0,04 до 4 мг/кг, показали, что для доз в более низком диапазоне показано умеренное ингибирование роста опухолей. Замедление прогрессирования опухолей и увеличение выживаемости мышей наблюдали в группах доз в диапазоне от 0,04 до 0,4 мг/кг, хотя это не являлось статистически значимым при сравнении с контрольными для изотипа группами. На основании этих исследований дозы H2L5 hIgG4PE 0,04-0,4 мг/кг выбраны для дальнейшей оценки, отдельно и в комбинации с пембролизумабом и ипилимумабом, в двух исследованиях с трансплантацией PBMC от двух различных доноров (доноров номер 4568 и 6711). Умеренные ответы для монотерапии H2L5 hIgG4PE и комбинации с пембролизумабом наблюдали в одном из двух проведенных комбинированных исследованиях. В комбинированном исследовании с использованием PBMC донора 4568 (табл. 13, фиг. 20C) показана противоопухолевая активность монотерапии и комбинации, в то время как в исследовании с использованием PBMC донора 6711 (табл. 12, фиг. 20B) не показано значимого противоопухолевого эффекта, что, вероятно, являлось результатом различий PBMC доноров между исследованиями, которые отражают изменчивость ответов пациентов, которую можно наблюдать в клинике. В этом втором комбинированном исследовании с PBMC донора 4568 увеличение ингибирования роста опухолей и увеличенную выживаемость мышей наблюдали в комбинированной группе при сравнении с любым средством отдельно, хотя это различие не являлось статистически значимым. Однако наблюдали синергизм для комбинаций, поскольку H2L5 hIgG4PE в дозе 0,04 мг/кг в комбинации с пембролизумабом при 5 мг/кг приводили к статистически значимому уменьшению объема опухоли через десять суток после первой дозы и к увеличенной выживаемости по сравнению с контрольной для изотипа группой ($p \leq 0,05$), в то время как монотерапия не приводила к этому. Фактически 50% мышей в группе комбинации H2L5 hIgG4PE и пембролизумаба оставались в исследовании на сутки 33, но были удалены из-за изъязвления опухолей. Только четыре мыши были удалены из исследования из-за объемов опухолей в этой комбинированной группе, в то время как от 8 до 9 мышей были удалены из исследования в группах пембролизумаба и контроля изотипа.

Для терапии антителом против PD1 не показано статистически значимой активности в этой модели, как наблюдали по ограниченному изменению роста опухолей и выживаемости, наблюдаемых в когорте обработки пембролизумабом по сравнению с когортой обработки контролем для изотипа. Для монотерапии ипилимумабом показана тенденция к умеренно лучшему ингибированию роста опухолей, чем для пембролизумаба, в обоих исследованиях, и показано статистически значимое увеличение выживаемости по сравнению с контролем для изотипа во втором комбинированном исследовании с использованием способного к ответу донора PBMC 4568 ($p \leq 0,04$). Для H2L5 hIgG4PE в дозе 0,01 мг/кг в комбинации с ипилимумабом при 3 мг/кг показано значимое увеличение выживаемости по сравнению с ипилимумабом ($p \leq 0,02$), но не по сравнению с монотерапией H2L5 hIgG4PE. Не присутствовало дополнительных значимых эффектов на объем опухоли, наблюдаемых для комбинации H2L5 hIgG4PE и ипилимумаба в этой модели по сравнению с любым средством отдельно. Мышей из всех групп обработки, включая группы носителя и группы контроля для изотипа, обнаруживали мертвыми, как зарегистрировано в таблицах исходов. Эти смерти приписали чувствительности модели к состоянию реакции трансплантат против хозяина и не связывали с обработкой.

Пример 12. Функциональная активность агонистического антитела против ICOS мыши отдельно и в комбинации с антителами против PD1 и против CTLA-4 in vivo.

CT26 и EMT6 - модели сингенных опухолей на мышах.

CT26 - модель мышиной карциномы толстой кишки на мышах.

Способы.

Это исследование проводили по протоколу, одобренному Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных GSK до начала исследований.

Животные.

В это исследование включены 164 самки машей BALB/c mice из Harlan Sprague Dawley. Мыши находились в возрасте 6-8 недель на начало исследования, когда их подвергали инокуляции.

Культура клеток и инокуляция.

Один флакон клеток CT-26 (ATCC: CRL-2638) (3×10^6 клеток; P-11) размораживали от -140°C и рас-

севали в RPMI с 10% FBS. Клетки субкультивировали 3 раза в течение 10 суток. Трипсин/ЭДТА использовали для облегчения открепления клеток от культурального флакона в ходе субкультивирования. Клетки собирали, промывали дважды и ресуспендировали в RPMI без FBS при 5×10^5 клеток/мл. Мышам инокулировали подкожно 0,1 мл клеток (5×10^4 клеток/мышь) в нижнюю часть правого бока.

На сутки сбора клеток и инокуляции подсчет клеток выполняли в Beckman Coulter Vi-cell XR и проверяли посредством гемоцитометра. Клетки открепляли от флакона с использованием трипсина/ЭДТА и промывали дважды, первый раз с использованием RPMI+10%FBS и второй раз с использованием только RPMI, и ресуспедировали в 10 мл RPMI. 178×10^6 клеток с 98,8% жизнеспособностью собирали в 20 мл RPMI. 1,685 мл суспензии клеток (всего 15×10^6 клеток) добавляли к 28,315 мл RPMI.

15×10^6 клеток/30 мл среды=5×10^5 клеток/мл. Это эквивалентно 5×10^4 клеток/100 мкл.

Составление и подготовка антител.

Антитела разводили из флаконов с источником антител для хранения до желательных концентраций в стерильном 0,9% солевом растворе на сутки дозирования. Клон C398.4 агонистического антитела против ICOS тестировали при 0,05 и 0,5 мг/кг. Каждую дозу тестировали также с антителом против PD1 при 10 мг/кг и с антителом против CTLA-4 при 1 мг/кг.

Экспериментальный способ(ы).

Мониторирование опухолей и дозирование.

Мышей подвергали инокуляции на сутки 0. На сутки 11 измеряли массу тела и объем опухолей. Мышей случайным образом распределяли на 12 групп исследования, показанных в табл. 14, по 10 мышей/группу на основании размера опухолей. Случайное распределение проводили с использованием программного обеспечения Studylog Study Director. Мышам вводили дозы на основании графика дизайна исследования дважды в неделю, начиная на сутки случайного распределения и продолжая всего до 6 доз. Дозирование было внутрибрюшинным (IP) в объеме 100 мкл носителя - 0,9% солевого раствора. Объем опухолей и массу тела измеряли 3 раза в неделю на протяжении исследования.

Конечные точки.

Мышей удаляли из исследования из-за опухолевой нагрузки, когда объем опухоли превышал 2000 $мм^3$. Объем опухоли рассчитывали с применением измерений штангенциркулем длины и ширины по следующей формуле: $TV=0{,}52\cdot L\cdot W^2$.

Кроме того, мышей удаляли из исследования, когда в опухолях развивались открытые изъязвления. Изъязвления наблюдали на протяжении эксперимента, однако только зарубцевавшиеся изъязвления не являлись конечной точкой, если они не формировали открытых отверстий.

Хотя это не было применимо ни к одной мыши в этом исследовании, третьей конечной точкой, установленной в начале исследования, являлось уменьшение массы тела на 20%.

Лекарственные средства и материалы.

Антитело	Поставщик	Каталожный #	Партия	Клон
ICOS	Biolegend	93108	B205973	C398,4
PD1	BioXcell	BE0146	5792-10/0815B	RMP1-14
CTLA-4	BioXcell	BE0164	5632-4/0715	9D9
IgG2b мыши	BioXcell	BE0086	4700/1014	MCP-11
IgG2a крысы	BioXcell	BE0089	5679-6/0815	2A3
IgG хомяка	Biolegend	92257	B205974	HTK888

Все антитела разводили до желательной концентрации в 0,9% солевом растворе, и солевой раствор использовали в качестве контроля-носителя.

Анализ данных.

Событием для анализа выживаемости являлись объем опухоли 2000 $мм^3$ или изъязвление опухоли в зависимости от того, что наступало раньше. Точное время для отсекаемого объема определяли посредством подбора линейного графика между log объема опухоли и сутками двух наблюдений, первого наблюдения, где превышен отсекаемый объем, и одного наблюдения, непосредственно предшествующего отсекаемому объему. Способ Каплана-Мейера (KM) осуществляли для оценки вероятности выживаемости в различных группах обработки на данное время. Регистрировали медианное время до конечной точки и соответствующий ему 95% доверительный интервал. Затем тестировали, существуют или нет статистические различия кривых выживаемости KM между любыми двумя группами, посредством логарифмического рангового критерия.

Объемы опухолей через 17 суток после начала дозирования сравнивали между различными группами обработки. Перед анализом объем опухоли преобразовывали в натуральный логарифм из-за непропорциональности изменчивости в различных группах обработки. Затем проводили ANOVA с последующим попарным сравнением для подвергнутых логарифмическому преобразованию данных.

Таблица 14

Группы исследований

No. группы	Обработка
1	Солевой раствор
2	IgG2b мыши 20 мкг+IgG хомяка 10 мкг
3	IgG2a крысы 200 мкг+IgG хомяка 10 мкг
4	IgG хомяка 10 мкг
5	ICOS 1мкг
6	ICOS 10 мкг
7	CTLA-4 20 мкг
8	PD1 200 мкг
9	ICOS 1 мкг+CTLA-4 20 мкг
10	ICOS 10 мкг+CTLA-4 20 мкг
11	ICOS 1 мкг+PD1 200 мкг
12	ICOS 10 мкг+PD1 200 мкг

Необработанное значение p так же, как значения p с коррекцией по уровню ложноположительных результатов (FDR) для сравнений суток до событий в анализе выживаемости и сравнений логарифмически преобразованного объема опухолей на сутки 10 между группами обработки показаны в вышеуказанной таблице. Сравнения с использованием значений p с коррекцией по FDR ≤ 0,05 объявляли статистически значимыми.

Результаты.

Отслеживание исходов для мышей показало, что ряд мышей удаляли из исследования из-за опухолевой нагрузки и изъязвления опухоли. Все оставшиеся мыши были свободными от опухолей на сутки исследования 61, за исключением 1 мыши в G7, обладающей объемом опухоли 579,16 мм^3.

Для выживаемости (времени до конечных точек) для групп 9 и 12 показано значимое увеличение выживаемости по сравнению с контрольной группой носителя (p=0,008 и p=0,001 соответственно). Для группы 12 показано статистически значимое увеличение выживаемости по сравнению с группами 2, 4 и 5 (p=0,006, 0,001, 0,02). Однако ни для каких комбинированных групп не показано статистически значимого увеличения выживаемости (p<0,05) по сравнению с какой-либо монотерапией (фиг. 21).

Обсуждение.

Для групп комбинированной терапии, в частности, с высокой дозой комбинации антител против ICOS и антител против PD1 (группа 12) показано ингибирование роста опухолей и увеличенная выживаемость по сравнению с группами монотерапии и контроля для изотип, хотя статистической значимости не достигали на сутки 61. Контроль для изотипа для группы 12 представлял собой IgG2a крысы+IgG хомяка из группы 3. Группы монотерапии для сравнения представляют собой ICOS 10 мкг (группа 6) и PD1 200 мкг (группа 8). Всего 5 мышей оставались свободными от опухолей в группе 12 по сравнению с 1 в группе 3, 1 в группе 6 и 1 в группе 8. Преимущество для выживаемости оценивали количественно посредством получения суток, на которые каждая мышь достигала любой из предопределенных конечных точек исследования. Ряд мышей удаляли из исследования из-за открытых изъязвлений опухолей, а не из-за опухолевой нагрузки.

В группе с высокой дозой комбинации ICOS+CTLA-4 (группа 10) увеличенное количество мышей удаляли из-за изъязвления опухолей на сутки 31, что, вероятно, маскировало выживаемость и противоопухолевые преимущества, обеспечиваемые этой комбинацией. В этой группе 5 мышей удаляли из-за изъязвления опухолей и только 2 из-за опухолевой нагрузки, достигшей 2000 мм^3. Все опухоли, удаленные из-за изъязвления опухолей, все еще имели умеренный размер при удалении из исследования, и ожидали, что изъязвление опухоли может являться результатом индуцированного терапией противоопухолевого иммунного ответа у этих мышей. Три мыши оставались свободными от опухолей в этой группе на сутки 61. 2 мыши, удаленные из-за опухолевой нагрузки, составляли самое низкое количество мышей, удаленных из-за опухолевой нагрузки из всех групп.

Модель на мышах опухоли карциномы молочной железы EMT6.

Экспериментальный способ(ы).

Все процедуры и критерии эвтаназии, описанные в этом документе, соответствуют протоколу IACUC AUP0606. Животных взвешивали и инокулировали в правую заднюю часть 100 мкл 1×10^5 клеток опухолей EMT6 на мышь. Количество инокулированных мышей эквивалентно по меньшей мере 130% от количества, необходимого для исследования. Принимая 30% неудач (либо слишком большой, либо слишком маленький размер на время начала исследования), целью являлось наличие n=10 для каждой группы. После инокуляции клеток опухоли рост опухолей и общую массу тела измеряли 3 раза в неделю с использованием цифрового штангенциркуля Fowler "ProMax" в течение 4 недель или дольше. Антитела получали от коммерческого поставщика и разводили до желательной концентрации в 0,9% солевом растворе. Дозирование (i.p.) проводили два раза в неделю, всего до 6 доз и начинали на сутки случайного распределения, обозначенные как сутки 0, когда средний объем опухоли приближался к 100 мм^3, приблизительно через 7-8 суток после инокуляции. Случайное распределение проводили с использованием программного обеспечения Studylog Study Director Suite. Длину и ширину опухолей измеряли для определения объема опухолей с использованием формулы (объема опухоли=$L\cdot W^2\cdot 0{,}52$). Измерение опухоли

более 2000 мм^3 для индивидуального животного приводило к удалению из исследования. Мышей могли также удалять из исследования из-за потери массы (>20%), изъязвления опухолей или любого другого очевидного подавления нормальной активности мышей из-за осложнений.

В этом исследовании, всего 191 животным инокулировали клетки EMT6 для получения достаточного количества мышей с опухолями в желательном диапазоне размеров для 13 групп из 10 мышей, как показано в табл. 15. Группа мышей с инъекцией носителя-солевого раствора и группа для контроля изотипа служили в качестве контроля для мышей, обработанных mAb против ICOS, PD1 и CTLA-4. Контроль изотипа для ICOS (IgG хомяка) вводили в дозах 10 мкг отдельно и в комбинации с изотипом для CTLA-4 (IgG2b мыши) или PD-1 (IgG2a крысы). В группах монотерапевтической обработки антитело против CTLA-4 (9D9) и антитело против PD-1 (RMP1-14) вводили в дозах 20 и 200 мкг на мышь соответственно и оценивали в комбинации с контролем изотипа для ICOS. Клон C398.4 агониста ICOS вводили в дозах 10 и 1 мкг на мышь. Эффективность агониста ICOS оценивали также в дозах 10 и 1 мкг на мышь в комбинации с антителом против CTLA-4 или антителом против PD-1. Дополнительную группу PD-1 и CTLA-4 в предопределенных концентрациях включали в качестве сравнительной группы положительного контроля. Статистический анализ объема опухолей проводили на сутки 13 после случайного распределения. В анализ жизнеспособности включали мышей, находящихся в исследовании до суток 60.

Таблица 15

Группы исследования

Дозирование	Обработка 1	Обработка 2	n=
Группа 1: 1×10^5 клеток	солевой раствор		10
Группа 2: 1×10^5 клеток	IgG хомяка 10 мкг	mIgG2b 20 мкг	10
Группа 3: 1×10^5 клеток	IgG хомяка 10 мкг	rIgG2a 200 мкг	10
Группа 4: 1×10^5 клеток	IgG хомяка 10 мкг		10
Группа 5: 1×10^5 клеток	ICOS 10 мкг		10
Группа 6: 1×10^5 клеток	ICOS 1 мкг		10
Группа 7: 1×10^5 клеток	CTLA4 20 мкг	IgG хомяка 10 мкг	10
Группа 8: 1×10^5 клеток	PD-1 200 мкг	IgG хомяка 10 мкг	10
Группа 9: 1×10^5 клеток	ICOS 10 мкг	CTLA4 20 мкг	10
Группа 10: 1×10^5 клеток	ICOS 1 мкг	CTLA4 20 мкг	10
Группа 11: 1×10^5 клеток	ICOS 10 мкг	PD-1 200 мкг	10
Группа 12: 1×10^5 клеток	ICOS 1 мкг	PD-1 200 мкг	10
Группа 13: 1×10^5 клеток	CTLA4 20 мкг	PD-1 200 мкг	10

Лекарственные средства и материалы.

Животные.

Самок мышей Balb/c в возрасте от 6 до 8 недель получали из Harlan Sprague Dawley и содержали в соответствии со стандартами IACUC.

Клетки EMT6.

Клетки EMT6 размораживали и культивировали в культуральных флаконах в течение восьми суток до инокуляции. Клетки пассировали 3 раза за это время. На сутки инокуляции клетки собирали из флакона в полной среде. Клетки центрифугировали и ресуспендировали в среде Веймаута (с 15% FBS). Эту стадию повторяли 3 раза в среде Веймаута без FBS. Плотность и жизнеспособность клеток проверяли посредством исключения трипанового синего. Затем клетки разводили до желательной плотности (1×10^6 клеток на 1 мл).

Иммунотерапевтические средства.

Все лекарственные средства разводили до желательной концентрации в 0,9% хлориде натрия на сутки дозирования и инъецировали i.p. с использованием иглы 30 G. Разведения лекарственных средств и контроля представлены ниже в табл. 16.

Таблица 16

Разведения лекарственных средств

Rx	исходная конц., мг/мл	желательная конц., мг/мл	разведение 1:	доза/мышь, мг	количество мышей	необходимый объем, мл	добавленный исходный раствор, мл	общее количество разбавителя, мл	общий объем, мл
IgG2b мыши	4,46	0,1	44,6	0,02	10	2	0,10	4,36	4,46
IgG2a крысы	6,92	1	6,92	0,2	10	2	0,40	2,37	2,77
IgG хомяка	1,47	0,05	29,4	0,01	50	10	0,40	11,36	11,76
CTLA4	6,1	0,1	61	0,02	40	8	0,15	9	9,15
PD-1	7,44	1	7,44	0,2	40	8	1,30	8,372	9,672
ICOS	5	0,05	100	0,01	30	6	0,10	9,9	10
ICOS	0,05	0,005	10	0,001	30	6	1,00	9	10

Анализ данных.

Статистический анализ.

Событием для анализа выживаемости являлись объем опухоли 2000 мм^3 или изъязвление опухоли,

в зависимости от того, что наступало раньше. Точное время для отсекаемого объема определяли посредством подбора линейного графика между log объема опухоли и сутками двух наблюдений, первого наблюдения, где превышен отсекаемый объем, и одного наблюдения, непосредственно предшествующего отсекаемому объему. Способ Каплана-Мейера (KM) осуществляли для оценки вероятности выживаемости в различных группах обработки на данное время. Регистрировали медианное время до конечной точки и соответствующий ему 95% доверительный интервал. Затем тестировали, существуют или нет статистические различия кривых выживаемости KM между любыми двумя группами посредством логарифмического рангового критерия.

Объемы опухолей через 13 суток после начала дозирования сравнивали между различными группами обработки. Перед анализом объем опухоли преобразовывали в натуральный логарифм из-за непропорциональности изменчивости в различных группах обработки. Затем проводили ANOVA с последующим попарным сравнением для подвергнутых логарифмическому преобразованию данных.

Использовали программное обеспечение для анализа SAS 9.3 и R 3.0.2.

Результаты.

Мышей Balb/c подвергали инокуляции и случайным образом распределяли на группы по десять на основании режима лечения через 8 суток. Введение лекарственных средств или контроля начинали на сутки случайного распределения (сутки 0) и продолжали дважды в неделю в течение 3 недель.

В группе обработки солевым раствором опухоли росли с ожидаемой скоростью относительно предшествующих исследований EMT-6. Всех мышей в группе носителя - солевого раствора подвергали эвтаназии из-за размера или изъязвлений опухолей на сутки 30. Обработка с использованием IgG хомяка отдельно или в комбинации с IgG2a крысы или IgG2b мыши не приводила к статистически значимому изменению среднего роста опухоли или выживаемости по сравнению с группой носителя - солевого раствора.

Через 13 суток после случайного распределения в группах монотерапии против ICOS показано небольшое поддающееся наблюдению изменение среднего роста опухоли по сравнению с контролем для изотипа. Однако в группе обработки высокой дозой ICOS (10 мкг) показана очевидная тенденция к большему ингибированию роста опухолей, чем в группе низкой дозы. Наблюдали эффект, сравнимый с активностью монотерапии против CTLA-4. Обработка монотерапией mAb против PD-1 также приводила к поддающемуся наблюдению до некоторой степени, но статистически не значимому уменьшению среднего объема опухолей на сутки 13. Однако как и для монотерапии против ICOS и CTLA-4, это не приводило к увеличению выживаемости по сравнению с группами соответствующих изотипов. Обработка с использованием комбинации антитела против PD-1 и антитела против ICOS клона C398.4 в дозе 10 мкг приводила к существенному ингибированию роста опухолей по сравнению с группами обработки контроля и монотерапии (фиг. 22). Для трех мышей в этой комбинированной группе достигли полной регрессии опухолей, существенного улучшения по сравнению с группами обработки контроля или монотерапии. Однако из-за использованных статистических критериев, статистически значимого улучшения выживаемости не достигали. Комбинация антитела против PD-1 с 1 мкг агонистического антитела против ICOS клона C398.4 приводила к статистически значимому уменьшению среднего роста опухолей на сутки 13 по сравнению с контрольной группой носителя - солевого раствора ($p<0,05$) и группой монотерапии ICOS ($p<0,05$) при 1 и 10 мкг. Для четырех мышей для этого режима обработки достигли полной регрессии опухолей, что привело к значительной тенденции к увеличению выживаемости, не достигшей статистической значимости.

Для антитела против ICOS в обеих дозах в комбинации с антителом против CTLA-4 показано небольшое поддающееся наблюдению преимущество ингибирования роста опухолей или увеличения выживаемости по сравнению с монотерапевтической обработкой любым антителом.

Обсуждение.

В то время как контроль для изотипа не приводил к очевидным изменениям среднего объема опухолей или общей выживаемости при сравнении с группой носителя - солевого раствора, присутствовали индивидуальные животные в группе IgG хомяка (группа 4) и в группе IgG хомяка и IgG2a крысы (группа 3), для которых показано замедление роста опухолей. В группе изотипа IgG хомяка и IgG2a крысы одна из мышей выжила дольше последней мыши в группе носителя - солевого раствора, ее подвергли умерщвлению на сутки 36 из-за изъязвления, с опухолью, объем которой измерен как 1156,56 $мм^3$. Две мыши в группе IgG хомяка выжили дольше, чем в группе солевого раствора. Одно животное подвергли эвтаназии из-за размера опухоли на сутки 36, и второе - на сутки 41 из-за изъязвления с измерением 1899,28 $мм^3$.

Режим дозирования антитела против PD-1 с 10 мкг агонистического антитела против ICOS приводил к поддающемуся наблюдению ингибированию роста опухолей, приведшему к уменьшению объема опухолей на сутки 13 по сравнению с контролем для изотипа, хотя это различие являлось менее очевидным по сравнению с монотерапией антителом против PD-1. Однако комбинация приводила к присутствию всего пяти животных, выживших дольше любого животного в группе монотерапии антителом против PD-1, где три мыши испытывали полную регрессию опухолей по сравнению с отсутствием таких мышей в группе монотерапии антителом против PD-1.

Сочетание антитела против PD-1 с дозой 1 мкг агонистического антитела против ICOS приводило к поддающемуся наблюдению уменьшению среднего размера опухолей на сутки 13 по сравнению с контрольными группами для изотипов и соответствующими группами монотерапии. Это уменьшение являлось статистически значимым по сравнению с контрольной группой носителя - солевого раствора ($p<0,05$) и группой монотерапии 1 мкг ICOS ($p<0,05$). Четыре мыши испытывали полную регрессию опухолей и выжили дольше любого животного в группе монотерапии PD-1.

Преимущество для выживаемости, наблюдаемое для группы комбинации ICOS+PD1, не достигло статистической значимости по сравнению с контролем на сутки 60. Однако ингибирование роста опухолей и преимущество для выживаемости в группе комбинированной обработки ICOS+PD1 являлись сравнимыми с активностью, наблюдаемой для группы комбинации PD1+CTLA-4, которую рассматривали в качестве положительного контроля для противоопухолевой активности в этом исследовании. Это позволяет предполагать, что комбинация антител против ICOS и PD1 может обеспечивать преимущество, подобно комбинациям CTLA-4 и PD1, для которых показана значительная клиническая активность в некоторых типах опухолей.

Из 130 мышей, включенных в это исследование, 12 оставались живыми на сутки 60, где 11 достигли полной регрессии опухолей. Из 118 мышей, достигших конечных точек для удаления из исследования, 111 удалили из-за достижения размера опухоли 2000 $мм^3$. Остальных семь мышей подвергали эвтаназии из-за изъязвления опухолей. Встречаемость изъязвления была распределена среди групп. Группы 1 (солевого раствора), 3 (IgG хомяка и IgG2a крысы), 4 (IgG хомяка), 6 (1 мкг ICOS) и 10 (CTLA-4 с 1 мкг ICOS) все содержали по одному животному, удаленному из-за изъязвления. В группе 13 (CTLA-4 + PD-1) показаны два животных, умерщвленных из-за изъязвления. Остальные группы не содержали животных, удаленных из-за изъязвления.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающий индуцируемый костимулятор Т-клеток (ICOS) белок или его антигенсвязывающая часть, содержащие CDRH1, как указано в SEQ ID NO:1; CDRH2, как указано в SEQ ID NO:2; CDRH3, как указано в SEQ ID NO:3; CDRL1, как указано в SEQ ID NO:4; CDRL2, как указано в SEQ ID NO:5; и CDRL3, как указано в SEQ ID NO:6.

2. Связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть по п.1, содержащие домен V_H, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:7, и/или домен V_L, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:8, где указанный связывающий ICOS белок специфически связывается с ICOS человека.

3. Связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть по п.1 или 2, где указанный связывающий ICOS белок является агонистом ICOS.

4. Связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-3, где указанный связывающий ICOS белок связывается с ICOS человека с:

(i) константой скорости связывания (k_{on}) по меньшей мере 1×10^5 $M^{-1}c^{-1}$ и константой скорости диссоциации (k_{off}) менее 6×10^{-5} c^{-1} или

(ii) константой диссоциации (K_D) менее приблизительно 100 нМ,

где аффинность измеряют посредством BIAcore.

5. Связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-4, где связывающий ICOS белок содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, и где указанный связывающий ICOS белок содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6.

6. Связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-5, содержащие домен V_H, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, и домен V_L, содержащий аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO:8.

7. Связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-6, где указанный связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть содержит каркасную область, выбранную из изотипа IgG1 человека или его варианта и изотипа IgG4 человека или его варианта.

8. Связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-7, где указанный связывающий ICOS белок или его антигенсвязывающая часть содержит каркасную область hIgG4PE.

9. Связывающий ICOS белок по любому из пп.1-8, где указанный связывающий ICOS белок представляет собой моноклональное антитело.

10. Моноклональное антитело по п.9, где моноклональное антитело является гуманизированным.

11. Моноклональное антитело по п.9, где моноклональное антитело является полностью человеческим.

12. Моноклональное антитело по пп.9-11, содержащее CDR тяжелой цепи, обладающие аминокислотными последовательностями, указанными в SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, и CDR лег-

кой цепи, обладающие аминокислотными последовательностями, указанными в SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6.

13. Моноклональное антитело по любому из пп.9-12, которое является агонистом ICOS человека и содержит каркасную область изотипа IgG4 или его варианта.

14. Моноклональное антитело по п.13, где указанное антитело содержит каркасную область hIgG4PE.

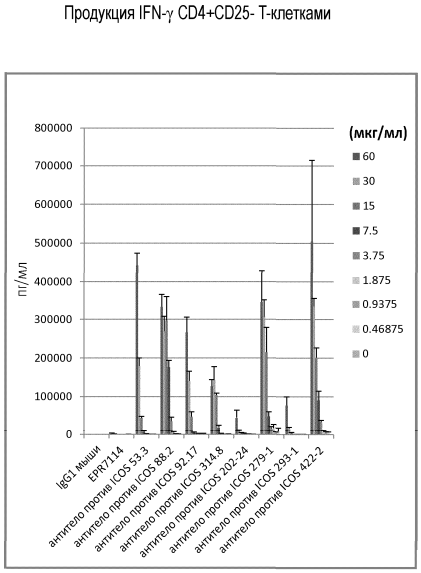
15. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественной опухоли, инфекционного заболевания и/или сепсиса, содержащая связывающий ICOS белок или моноклональное антитело по любому из пп.1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Способ лечения заболевания, выбранного из злокачественной опухоли, инфекционного заболевания или сепсиса, у человека, включающий стадию введения фармацевтической композиции по п.15 указанному человеку.

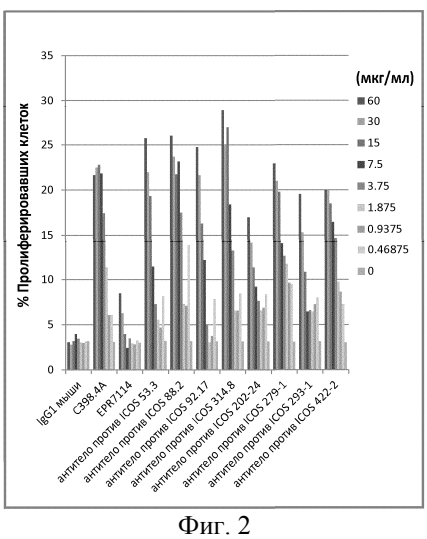
17. Способ по п.16, дополнительно включающий введение по меньшей мере одного антинеопластического средства, по меньшей мере одного второго иммуномодулирующего средства и/или по меньшей мере одного иммуностимулирующего адъюванта указанному человеку.

18. Способ по п.17, где указанное второе иммуномодулирующее средство выбрано из антитела к CTLA4, антитела к PD-1, антитела к PDL1 и антитела к OX40.

19. Применение фармацевтической композиции по п.15 для лечения злокачественной опухоли, инфекционного заболевания и/или сепсиса у человека.

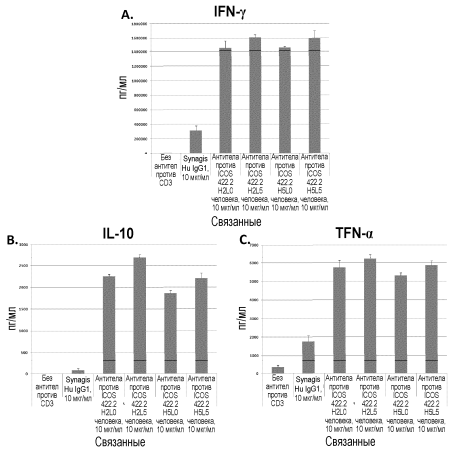


Фиг. 1



Фиг. 2

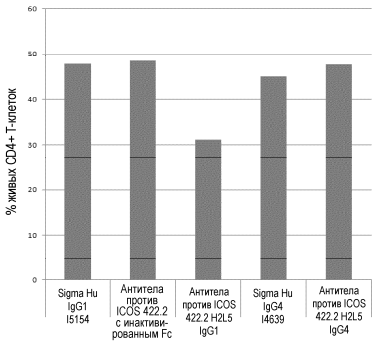
Для гуманизированного варианта H2L5 антитела против ICOS 422.2 показана лучшая продукция цитокинов в клетках PBMC



BMC человека являлись свежевыделенными от здорового донора-человека и активированными на планшетах, предварительно покрытых антителом против CD3 (OKT3) и каждым из четырех растворимых гуманизированных вариантов антитела против ICOS 422.2. После обработки в течение 2,5 суток, количества IFN-γ (A), IL-10 (B) и TFN-α (C) в супернатанте измеряли посредством MSD.

Фиг. 3

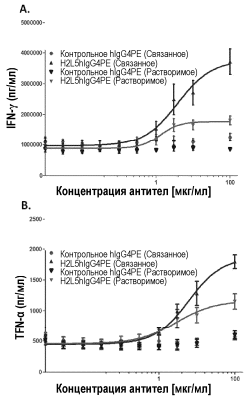
422 H2L5 IgG1 индуцировало уменьшенную жизнеспособность Т-клеток, чего не наблюдали для изотипа с инактивированным Fc или изотипа hIgG4PE



PBMC человека являлись свежеактивированными на планшетах, предварительно покрытых антителом против CD3 (OKT3) и растворимым гуманизированным антителом против ICOS 422.2 с различными изотипами Fc. После обработки в течение 2,5 суток, проценты живых CD4+ Т-клеток измеряли посредством проточной цитометрии

Фиг. 4

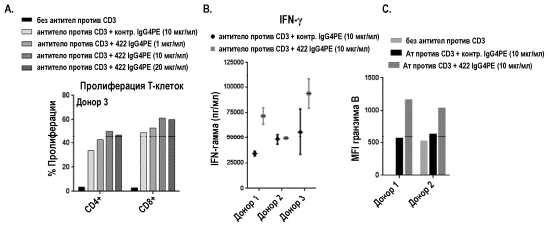
Зависимый от дозы ответ индуцированной H2L5 hIgG4PE индукции провоспалительных цитокинов в CD4+ Т-клетках человека



CD4+ Т-клетки от здорового донора-человека, предварительно стимулированные с использованием антител против CD3/CD28 в течение 2 суток, повторно стимулировали посредством антитела против CD3 (OKT3) плюс серийные концентрации контрольного антитела для изотипа (Synagis IgG4PE) или mAb H2L5 hIgG4PE в связанном с планшетом или растворимом формате. Концентрацию (A) IFN-γ и (B) TFN-α измеряли в супернатантах посредством MSD через 3,5 суток обработки

Фиг. 5

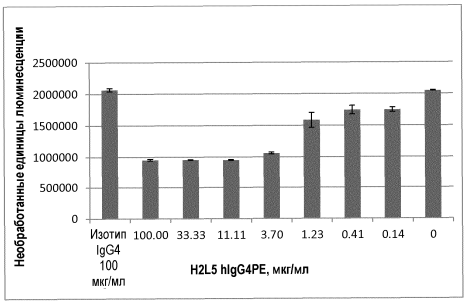
H2L5 hIgG4PE индуцирует пролиферацию, продукцию цитокинов и увеличивает цитотоксический потенциал в активированных PBMC от здоровых доноров-людей



Клетки PBMC человека, предварительно стимулированные с использованием антител против CD3/CD28 в течение 2 суток, повторно стимулировали посредством антитела против CD3 (OKT3) плюс растворимое mAb H2L5 hIgG4PE или контроль для изотипа. Через 2,5 суток обработки, пролиферацию Т-клеток измеряли посредством анализа CFSE FACS (A). Концентрацию IFN-γ в супернатантах измеряли посредством MSD (B). Внутриклеточную экспрессию гранзима B в CD4+ Т-клетках измеряли посредством проточной цитометрии

Фиг. 6

Анализ Meso Scale Discovery (MSD), показывающий ингибирование связывания ICOS-L с ICOS посредством H2L5 hIgG4PE, показывающее, что оно связывается с тем же самым эпитопом на ICOS, что и ICOS-L, и конкурирует за связывание



Фиг. 7

Выделенные гены VH и VL антитела из РНК клона гибридомы 422.2

422 HC

QVQLQQSGPELVRPGESVKISCMGSGYTFTDYAMHWVKQSHAKSLEWIGLISIYSDHTNYNQKFQGKATMTVDKS
SSTAYMELARLTSEDSAIYYCGRNNYGNYGWYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:19)

422 LC

ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSITSPKLWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTIS
SMEAEDVATYYCFQGSGYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:20)

Фиг. 8

Белковые последовательности тяжелых и легких цепей H2L5 hIgG4PE
с сигнальной последовательностью

Тяжелая цепь

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGLISIYSD
HTNYNQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYGWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP
LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV
DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:9)

Легкая цепь

MGWSCIILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASG
IPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCFQGSGYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC (SEQ ID NO:12)

Сигнальная последовательность выделена двойным подчеркиванием

Последовательности CDR подчеркнуты

Замены в IgG4 S228P, L235E (нумерация EU)

Мышиные остатки, включенные в каркас вариабельной области тяжелой цепи (нумерация по Kabat G27Y, S30T, A93G)

Мышиные остатки, включенные в каркас вариабельной области легкой цепи (нумерация по Kabat F71Y)

Фиг. 9

Последовательность ДНК кодирующей области тяжелой цепи H2L5 hIgG4PE
с сигнальной последовательностью

Тяжелая цепь

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCACAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAG
AGCGGAGCCGAGGTGAAAAAGCCCGGCTCAAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGAC
TACGCTATGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCCTGATCAGCATCTACAGCGAC
CACACCAACTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAGGGTGACCATCACCGCCGATAAGAGCACCAGCACAGCCTACATG
GAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAAGACACCGCCGTGTACTATTGCGGCAGGAACAACTACGGCAACTACGGCTGG
TACTTCGACGTGTGGGGCCAGGGAACCACTGTCACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCC
CTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG
CCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGC
GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTG
GACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCCTGCCCT
GCCCCCGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGG
ACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGATCCCGAGGTCCAGTTCAATTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTG
CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGC
TCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAG
GAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTC
CTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAG
GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAG (SEQ ID NO:21)

Лидерная последовательность указана двойным подчеркиванием

Фиг. 10

Последовательность ДНК кодирующей области легкой цепи H2L5 hIgG4PE
с сигнальной последовательностью

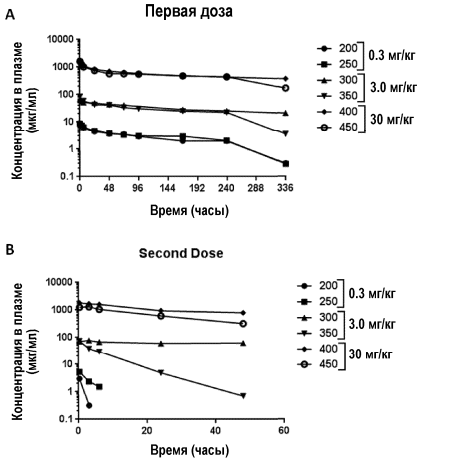
Легкая цепь

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCACAGCGAGATTGTGCTGACCCAG
AGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGAAAGGGCAACCCTCAGCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGAGCTAC
ATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCTAGGCTGCTGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCAGCGGC
ATCCCAGCCAGGTTCTCAGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTATACTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGCCCGAGGAC
TTCGCCGTGTACTACTGCTTCCAGGGAAGCGGCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
CGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTG
GTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGC
AACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGC
AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO:22)

Лидерная последовательность указана двойным подчеркиванием

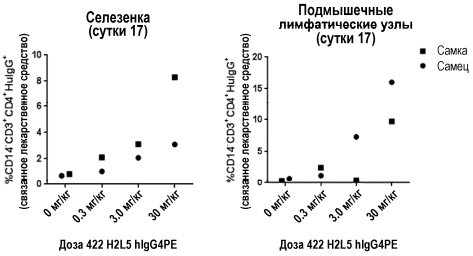
Фиг. 11

Концентрации H2L5 hIgG4PE в плазме яванских макаков. Концентрации определяли после (A) первой или (B) второй дозы (сутки 15) H2L5 hIgG4PE. Животных умерщвляли через 48 часов после второй дозы для сбора образцов ткани и гистопатологического анализа



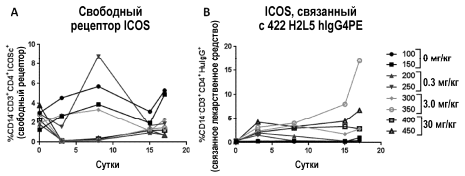
Фиг. 12

Детекция связывания H2L5 hIgG4PE с CD4+ Т-клетками из селезенки и подмышечных лимфатических узлов обезьян. Ткань собирали через 48 часов после второй дозы (сутки 17)



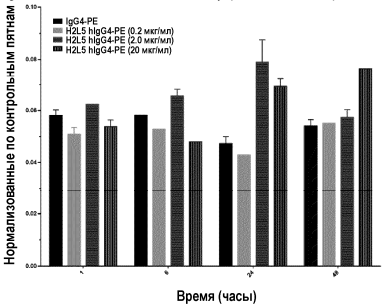
Фиг. 13

Занятость рецепторов H2L5 hIgG4PE в CD4+ Т-клетках крови яванских макаков.
(A) «Свободный рецептор» ICOS, как измерено по положительному связыванию флуоресцентно меченного антитела против ICOS, использованного для проточной цитометрии, которое связывается, только когда H2L5 hIgG4PE не присутствует.
(B) Рецептор, связанный с H2L5 hIgG4PE на CD4+ клетках периферической крови, как измерено по флуоресцентно меченному антителу против IgG человека



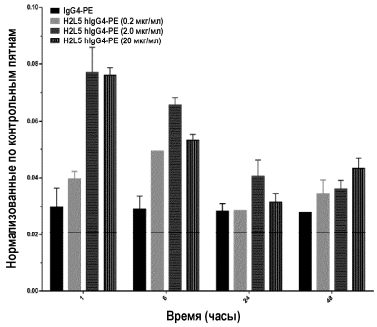
Фиг. 14

Уровни экспрессии фосфо-AKT (T308) в клетках Ba/F3-ICOS, обработанных H2L5 hIgG4PE - Массив антител для внутриклеточной передачи сигналов



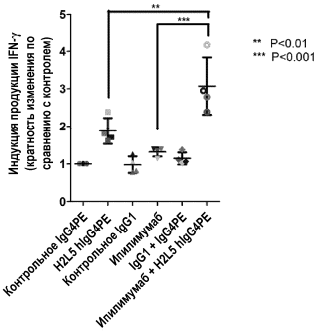
Фиг. 15(a)

Уровни экспрессии фосфо-AKT (S473) в клетках Ba/F3-ICOS, обработанных H2L5 hIgG4PE - Массив антител для внутриклеточной передачи сигналов



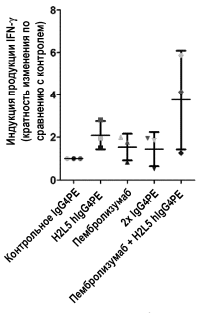
Фиг. 15(b)

H2L5 hIgG4PE в комбинации с ипилимумабом приводит к увеличенной продукции провоспалительных цитокинов по сравнению с обработкой одиночным антителом в анализе предварительной стимуляции PBMC



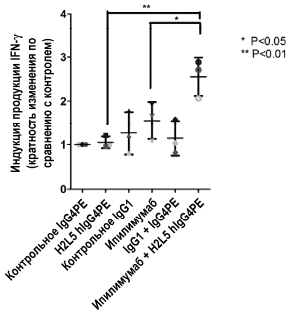
Фиг. 16

H2L5 hIgG4PE в комбинации с пембролизумабом приводит к увеличенной продукции провоспалительных цитокинов по сравнению с лечением одиночным антителом в анализе предварительной стимуляции PBMC



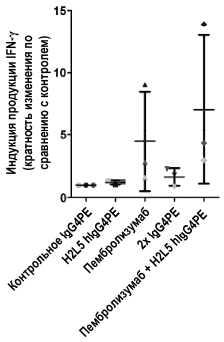
Фиг. 17

Комбинация H2L5 hIgG4PE плюс ипилимумаб индуцирует увеличенную продукцию провоспалительных цитокинов в модифицированном анализе MLR с использованием пептида CEFT и предварительной инкубации



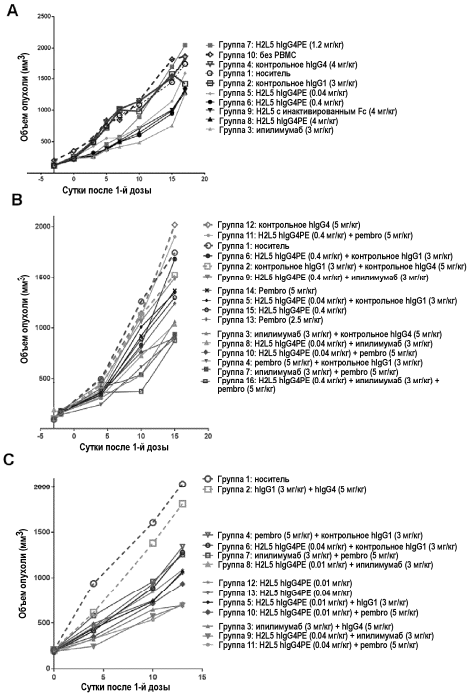
Фиг. 18

Комбинация H2L5 hIgG4PE плюс пембролизумаб индуцирует увеличенную продукцию провоспалительных цитокинов в модифицированном анализе MLR с использованием пептида CEFT и предварительной инкубации



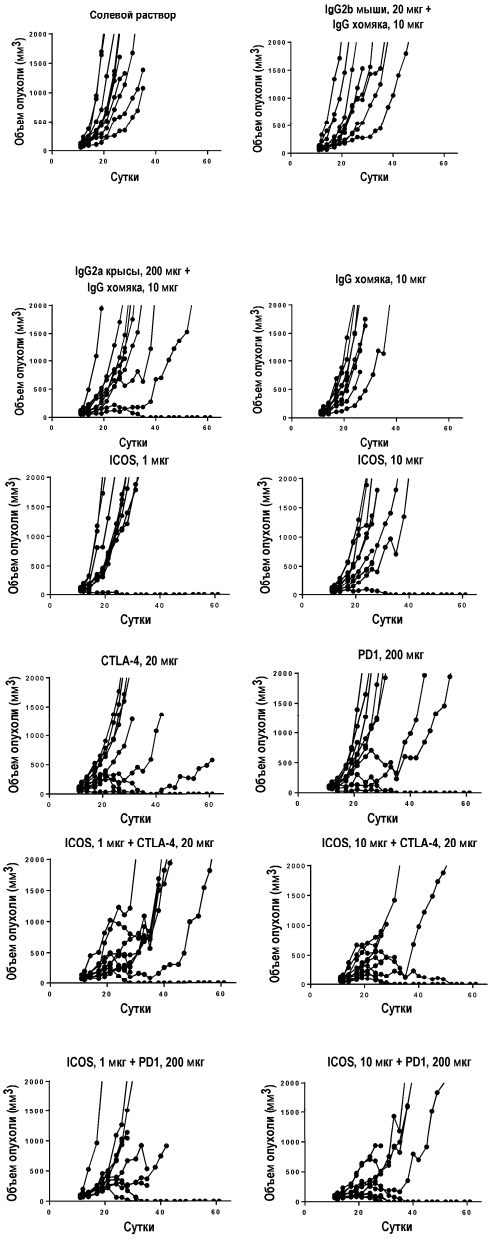
Фиг. 19

Агонистическое mAb против ICOS H2L5 hIgG4PE отдельно и в комбинации с пембролизумабом приводит к ингибированию роста опухолей в модели опухоли меланомы PBMC A2058 человека на мышах

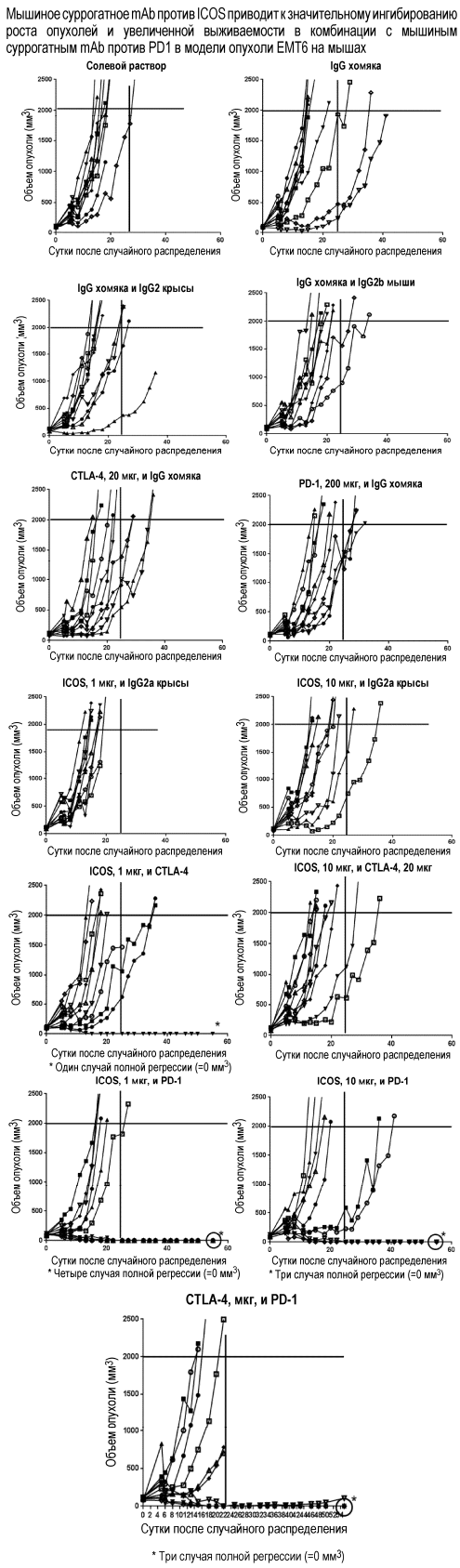


Фиг. 20

Мышиное суррогатное mAb против ICOS приводит к значительному ингибированию роста опухолей и увеличенной выживаемости в комбинации с мышиным суррогатным mAb против PD1 в модели опухоли CT26 на мышах



Фиг. 21


Мышиное суррогатное mAb против ICOS приводит к значительному ингибированию роста опухолей и увеличенной выживаемости в комбинации с мышиным суррогатным mAb против PD1 в модели опухоли EMT6 на мышах
Солевой раствор
IgG хомяка
IgG хомяка и IgG2 крысы
IgG хомяка и IgG2b мыши
CTLA-4, 20 мкг, и IgG хомяка
PD-1, 200 мкг, и IgG хомяка
ICOS, 1 мкг, и IgG2a крысы
ICOS, 10 мкг, и IgG2a крысы
ICOS, 1 мкг, и CTLA-4
ICOS, 10 мкг, и CTLA-4, 20 мкг
ICOS, 1 мкг, и PD-1
ICOS, 10 мкг, и PD-1
CTLA-4, мкг, и PD-1
Объем опухоли (мм3)
Сутки после случайного распределения
* Один случай полной регрессии (=0 мм3)
* Четыре случая полной регрессии (=0 мм3)
* Три случая полной регрессии (=0 мм3)

Фиг. 22