

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037621**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.22

(21) Номер заявки
201792078

(22) Дата подачи заявки
2016.03.22

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К ICOS

(31) **62/137,034; 62/147,484; 62/156,588;
62/242,489; 62/255,635**

(32) **2015.03.23; 2015.04.14; 2015.05.04;
2015.10.16; 2015.11.16**

(33) **US**

(43) **2018.02.28**

(86) **PCT/US2016/023524**

(87) **WO 2016/154177 2016.09.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЖАУНС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:
**Сазински Стефен, Майклсон
Дженнифер С., Сатхианараянан
Срирам, Элпек Кутлу Гоксу (US)**

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

(56) PE anti-human/mouse/rat CD278 (ICOS)," BioLegend, Inc. 07 February 2013 (07.02.2014), Pg. 1 of 1. Retrieved from the Internet: <www.biolegend.com/pop_pdf.php?id=2482> on 18 November 2016 (18.11.2016), entire document

US-A1-20130058868

US-A1-20130142783

US-A1-20140086923

US-A1-20130071409

WAHL et al., "Interaction of B7RP-1 with ICOS Negatively Regulates Antigen Presentation by B Cells," Inflammation, 04 August 2003 (04.08.2003), Vol. 27, Pgs. 191-200, entire document

(57) В документе предложены различные варианты реализации, относящиеся к антителам. Некоторые варианты реализации изобретения включают антитела-агонисты, которые связывают ICOS. Такие антитела можно применять в способах лечения, например, ракового заболевания. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое связывает ICOS, причем антитело является агонистом CD4 Т-клеток (таких как CD4 Т-эффекторные (Teff) клетки). В некоторых вариантах реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое связывает ICOS, причем антитело является агонистом CD4 Т-клеток (таких как CD4 Teff-клетки) и истощает Т-регуляторные (Treg) клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое связывает ICOS, причем антитело истощает Treg-клетки, но не истощает Teff-клетки.

037621
B1

037621
B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

В данной заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/137034, поданной 23 марта 2015 г.; 62/147484, поданной 14 апреля 2015 г.; 62/156588 поданной 4 мая 2015 г.; 62/242489, поданной 16 октября 2015 г. и 62/255635, поданной 16 ноября 2015 г., каждая из которых включена в данный документ в полном объеме путем ссылки для любых целей.

Перечень последовательностей

В настоящую заявку включен перечень последовательностей, который был подан в электронной форме в формате ASCII через сеть EFS-Web и тем самым в полном объеме включен в данный документ путем ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 15 марта 2016 г., имеет название 2016-03-22 01140-0001-00PCT_ST25.txt и размер, составляющий 81925 байт.

Область техники

Предложены антитела, которые связываются с индуцибельным костимулятором Т-клеток (ICOS). Предложены также способы лечения, включающие введение анти-ICOS антител.

Уровень техники

ICOS является представителем суперсемейства иммуноглобулинов B7/CD28/CTLA-4 и специфически экспрессируется на Т-клетках. В отличие от CD38, который конститутивно экспрессируется на Т-клетках и обеспечивает костимулирующие сигналы, необходимые для полной активации покоящихся Т-клеток, ICOS экспрессируется только после начальной активации Т-клеток.

ICOS вовлечен в разнообразные аспекты реакций Т-клеток (обзор в Simpson et al., 2010, Curr. Opin. Immunol., 22:326-332). Он играет роль в образовании зародышевых центров, кооперации Т/В-клеток и переключении класса иммуноглобулинов. ICOS-дефицитные мыши демонстрируют нарушение образования зародышевого центра и показывают уменьшенную продукцию интерлейкина IL-10. Данные дефекты специфически связаны с недостаточностью в Т-фолликулярных хелперных клетках.

ICOS также играет роль в развитии и функционировании субпопуляций Т-клеток, включающих Th1, Th2 и Th17.

Примечательно, что ICOS костимулирует пролиферацию Т-клеток и секрецию цитокинов, связанных как с Th1-, так и Th2-клетками. Соответственно, ICOS KO-мыши демонстрируют нарушение развития аутоиммунных фенотипов во множестве моделей заболевания, включая диабет (Th1), воспаление верхних дыхательных путей (Th2) и ЕАЕ нейровоспалительные модели (Th17).

В дополнение к его роли в модуляции функционирования Т-эффекторных (Teff) клеток, ICOS также модулирует Т-регуляторные клетки (Treg). На высоких уровнях ICOS экспрессируется на Treg и вовлечен в гомеостаз и функционирование Treg.

При активации ICOS связанный через дисульфиды гомодимер индуцирует сигнал посредством механизмов PI3K и AKT. Последующие события передачи сигнала приводят к экспрессии линии специфических факторов транскрипции (например, T-bet, GATA-3) и, в свою очередь, влияют на пролиферацию и выживаемость Т-клеток.

Лиганд ICOS (ICOSL; B7-H2; B7RP1; CD275; GL50), также представитель суперсемейства B7, является единственным лигандом для ICOS и экспрессируется на клеточной поверхности В-клеток, макрофагов и дендритных клеток. При своем взаимодействии с ICOS, ICOSL функционирует как нековалентно связанный гомодимер на клеточной поверхности. Сообщали, что ICOSL человека, но не ICOSL мыши, связывается с CD28 и CTLA-4 человека (Yao et al., 2011, Immunity, 34:729-740).

Краткое описание сущности изобретения

В некоторых вариантах реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое связывает ICOS, причем данное антитело является агонистом CD4 Т-клеток (таких как CD4 Т-эффекторные (Teff) клетки). В некоторых вариантах реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое связывает ICOS, причем данное антитело является агонистом CD4 Т-клеток (таких как CD4 Teff-клетки) и истощает Т-регуляторные (Treg) клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое связывает ICOS, причем данное антитело истощает Treg-клетки, но не истощает Teff-клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое связывает ICOS, причем данное антитело индуцирует передачу сигнала pAKT на CD4 Т-клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое связывает ICOS, причем данное антитело индуцирует передачу сигнала pAKT на CD4 Т-клетки и истощает Treg-клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое связывается с ICOS, причем данное антитело содержит:

i) (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; (d) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; (e) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; и (f) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; или

ii) (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; (d) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность

- xii) V_H содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, а V_L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121; или
- xiii) V_H содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, а V_L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131; или
- xiv) V_H содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, а V_L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141; или
- xv) V_H содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150, а V_L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151; или
- xvi) V_H содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160, а V_L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161; или
- xvii) V_H содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 170, а V_L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 171; или
- xviii) V_H содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180, а V_L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой химерное антитело или гуманизованное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из фрагмента Fab, Fab', Fv, scFv или (Fab')₂. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело.

В некоторых вариантах реализации предложено выделенное антитело, которое связывается с ICOS, причем данное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 188, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189.

В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела млекопитающему приводит к увеличению Т-эффекторных (Teff) клеток в организме млекопитающего. В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела млекопитающему приводит к активации Т-эффекторных (Teff) клеток в организме млекопитающего. В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела млекопитающему увеличивает соотношение Teff-клеток к Treg-клеткам. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁻ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁻ Т-клетками и CD8⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD8⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела млекопитающему приводит к уменьшению Т-регуляторных (Treg) клеток в организме млекопитающего. В некоторых вариантах реализации изобретения Treg-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁺ Т-клетками.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое связывается с ICOS человека, причем данное антитело также связывается с ICOS мыши и/или ICOS крысы. В некоторых вариантах реализации изобретения выделенное антитело связывается с ICOS человека с аффинностью (K_D) менее 5 нМ. В некоторых вариантах реализации изобретения выделенное антитело связывается с ICOS крысы с аффинностью (K_D) менее 10 нМ. В некоторых вариантах реализации изобретения аффинность определяют с использованием интерферометрии в биослое (см., например, Abdiche et al., 2008, Anal Biochem, 377:209-217; и система ForteBio Octet®). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело связывается с ICOS человека, ICOS мыши и ICOS крысы. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело связывается с ICOS яванского макака. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой химерное антитело или гуманизованное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из фрагмента Fab, Fab', Fv, scFv или (Fab')₂. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела млекопитающему приводит к увеличению Т-эффекторных (Teff) клеток в организме млекопитающего. В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела млекопитающему приводит к активации Т-эффекторных (Teff) клеток в организме млекопитающего. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁻ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁻ Т-клетками и CD8⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD8⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела млекопитающему приводит к уменьшению Т-регуляторных (Treg) клеток в организме млекопитающего. В некоторых вариантах реализации изобретения Treg-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения млекопитающее выбирают из мыши, крысы, яванского макака и человека.

В некоторых вариантах реализации изобретения после лечения опухолевой ткани легкого с помощью антитела, предложенного в данном документе, уровень хемокина или цитокина, выбранного из GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 и CXCL13 обеспечивает по меньшей мере 2-кратное или по меньшей мере 3-кратное превышение уровня такого хемокина после лечения опухолевой ткани легкого с помощью контрольного антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения данный

уровень представляет собой уровень мРНК. В некоторых вариантах реализации изобретения данный уровень представляет собой уровень белка. В некоторых вариантах реализации изобретения контрольное антитело представляет собой изотипно соответствующее антитело, которое связывается с неродственным антигеном и которое, как предполагается, не обладает влиянием на уровни хемокинов. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень хемокина измеряют через 1, 2, 3, 4, 5 или 6 ч после лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения хемокин представляет собой CXCL11. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень хемокина измеряют через 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 36 или 48 ч после лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень хемокина измеряют через 24 ч после лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения опухолевая ткань легкого представляет собой опухолевую ткань легкого человека.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, предложенное в данном документе, увеличивает уровень по меньшей мере одного хемокина и/или цитокина, выбранного из GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 и CXCL13, в организме млекопитающего, которому ввели антитело, по меньшей мере в 2 раза. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень хемокина измеряют через 1, 2, 3, 4, 5 или 6 ч после введения антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения данный уровень представляет собой уровень мРНК. В некоторых вариантах реализации изобретения данный уровень представляет собой уровень белка. В некоторых вариантах реализации изобретения хемокин представляет собой CXCL11. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень хемокина измеряют через 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 36 или 48 ч после введения антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень хемокина измеряют через 24 ч после введения антитела.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело-агонист, предложенное в данном документе, причем данное антитело увеличивает уровень по меньшей мере одного хемокина и/или цитокина, выбранного из GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 и CXCL13, в организме млекопитающего, которому ввели антитело, по меньшей мере в 2 раза. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело-агонист, предложенное в данном документе, причем данное антитело увеличивает уровень по меньшей мере одного хемокина и/или цитокина, выбранного из GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10 и CXCL11, в организме млекопитающего, которому ввели антитело, по меньшей мере в 2 раза. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень хемокина измеряют через 1, 2, 3, 4, 5 или 6 ч после введения антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения данный уровень представляет собой уровень мРНК. В некоторых вариантах реализации изобретения данный уровень представляет собой уровень белка. В некоторых вариантах реализации изобретения хемокин представляет собой CXCL11. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень хемокина измеряют через 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 36 или 48 ч после введения антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень хемокина измеряют через 24 ч после введения антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения млекопитающее является человеком. В некоторых вариантах реализации изобретения человек болен раковым заболеванием. В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание выбирают из меланомы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), почечноклеточной карциномы (RCC), рака желудка, рака мочевого пузыря, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Ходжкина, рака яичника, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC). В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание выбирают из меланомы, рака желудка, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC).

В некоторых вариантах реализации изобретения предложено антитело, которое связывается с ICOS, причем данное антитело увеличивает уровень лиганда для NKp46 (NKp46-L) на Т-клетках. В некоторых вариантах реализации изобретения увеличенный уровень NKp46-L на Т-клетках определяют с использованием растворимого внеклеточного домена NKp46 в анализе проточной цитометрии. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело увеличивает уровень NKp46-L на Treg-клетках больше, чем антитело увеличивает уровень NKp46-L на Teff-клетках. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело увеличивает сбрасывание CD16 на NK-клетках.

В некоторых вариантах реализации предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, описанное в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения предложен вектор, содержащий данную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка-хозяин содержит предложенный вектор. В некоторых вариантах реализации изобретения предложена клетка-хозяин, которая продуцирует антитело, описанное в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения предложен способ получения анти-ICOS антитела, включающий культивирование клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает выделение антитела, которое продуцируется клеткой-хозяином.

В некоторых вариантах реализации предложена фармацевтическая композиция, содержащая анти-ICOS антитело, описанное в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложены способы лечения ракового заболевания, включающие введение эффективного количества анти-ICOS антитела, описанного в данном доку-

менте, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание выбирают из меланомы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), почечноклеточной карциномы (RCC), рака желудка, рака мочевого пузыря, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Ходжкина, рака яичника, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC). В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание выбирают из меланомы, рака желудка, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC).

В некоторых вариантах реализации изобретения предложен способ увеличения количества Т-эффекторных (Teff) клеток в организме млекопитающего, включающий введение эффективного количества анти-ICOS антитела, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает активацию Teff-клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения предложен способ активации Т-эффекторных (Teff) клеток в организме млекопитающего, включающий введение эффективного количества анти-ICOS антитела, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения предложен способ увеличения соотношения Teff-клеток к Treg-клеткам в организме млекопитающего, включающий введение эффективного количества анти-ICOS антитела, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁻ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁻ Т-клетками и CD8⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD8⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает уменьшение количества Т-регуляторных (Treg) клеток.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложен способ уменьшения количества Т-регуляторных (Treg) клеток в организме млекопитающего, включающий введение эффективного количества анти-ICOS антитела, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения Treg-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁺ Т-клетками.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложен способ увеличения уровня по меньшей мере одного хемокина и/или цитокина, выбранного из GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 и CXCL13, в организме млекопитающего, включающий введение млекопитающему антитела, предложенного в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень по меньшей мере одного хемокина увеличивается по меньшей мере в 2 раза или по меньшей мере в 3 раза. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень хемокина измеряют через 1, 2, 3, 4, 5 или 6 ч после введения антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения данный уровень представляет собой уровень мРНК. В некоторых вариантах реализации изобретения данный уровень представляет собой уровень белка. В некоторых вариантах реализации изобретения хемокин представляет собой CXCL11. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень хемокина измеряют через 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 36 или 48 ч после введения антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень хемокина измеряют через 24 ч после введения антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения млекопитающее является человеком. В некоторых вариантах реализации человек болен раковым заболеванием. В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание выбирают из меланомы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), почечноклеточной карциномы (RCC), рака желудка, рака мочевого пузыря, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Ходжкина, рака яичника, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC). В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание выбирают из меланомы, рака желудка, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC).

В некоторых вариантах реализации изобретения млекопитающее является человеком.

В некоторых вариантах реализации изобретения млекопитающему вводят по меньшей мере одно дополнительное лекарственное средство. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительное лекарственное средство вводят одновременно или последовательно с анти-ICOS антителом. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительное лекарственное средство представляет собой терапию PD-1. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительное лекарственное средство выбирают из анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят с ниволумабом. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят с пембролизумабом. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят с атезолизумабом. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят с авелумабом. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят с дурвалумабом.

В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительное лекарственное средство представ-

ляет собой противораковую вакцину. В некоторых таких вариантах реализации изобретения противораковую вакцину разрабатывают с использованием неоантигена. В некоторых вариантах реализации изобретения противораковая вакцина представляет собой ДНК-вакцину. В некоторых вариантах реализации изобретения противораковая вакцина представляет собой сконструированный вирус, содержащий раковый антиген, такой как PROSTVAC (рилимоген галвацирепвек/рилимоген глафоливек). В некоторых вариантах реализации изобретения противораковая вакцина содержит сконструированные опухолевые клетки, такие как GVAX.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят с анти-OX40 антителом-агонистом. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят с анти-CTLA4 антителом. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят с ипилимумабом.

В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительное лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое средство. Неограничивающие типовые химиотерапевтические средства включают капецитабин, циклофосфамид, дакарбазин, темозоломид, циклофосфамид, доцетаксел, доксорубин, даунорубин, цисплатин, карбоплатин, эпирубин, эрибулин, 5-ФУ, гемцитабин, иринотекан, иксабепилон, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел, наб-паклитаксел, ABRAXANE® (связанный с белком паклитаксел), пеметрексед, винорелбин и винкристин. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят с ABRAXANE® (Celgene). В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят по меньшей мере с одним ингибитором киназ. Неограничивающие типовые ингибиторы киназ включают эрлотиниб, афатиниб, gefитиниб, кризотиниб, дабрафениб, траметиниб, вемурафениб и кобиметаниб.

В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительное лекарственное средство представляет собой ингибитор IDO. Неограничивающие типовые ингибиторы IDO включают индоксимод (New Link Genetics), INCB024360 (Incyte Corp), 1-метил-D-триптофан (New Link Genetics) и GDC-0919 (Genentech). В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительное лекарственное средство представляет иммуномодулирующее средство. Неограничивающие типовые IMiD включают талидомид, леналидомид и помалидомид.

В некоторых вариантах реализации изобретения млекопитающее получает терапию CAR-T в дополнение к введению анти-ICOS антитела, описанного в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения млекопитающее подвергают хирургическому вмешательству и/или радиационной терапии дополнительно к введению анти-ICOS антитела, описанного в данном документе, с дополнительным лекарственным средством или без него. В некоторых вариантах реализации изобретения млекопитающее подвергают радиационной терапии дополнительно к введению анти-ICOS антитела, описанного в данном документе, с дополнительным лекарственным средством или без него.

В некоторых вариантах реализации изобретения применение антитела, описанного в данном документе, предусмотрено для производства лекарственного средства для лечения ракового заболевания. В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание выбирают из меланомы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), почечноклеточной карциномы (RCC), рака желудка, рака мочевого пузыря, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Ходжкина, рака яичника, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC). В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание выбирают из меланомы, рака желудка, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC). В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственное средство предназначается для введения по меньшей мере с одним дополнительным лекарственным средством. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительное лекарственное средство выбирают из анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела.

В некоторых вариантах реализации изобретения применение антитела, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе, предусмотрено для лечения ракового заболевания. В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание выбирают из меланомы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), почечноклеточной карциномы (RCC), рака желудка, рака мочевого пузыря, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Ходжкина, рака яичника, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC). В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание выбирают из меланомы, рака желудка, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC).

В некоторых вариантах реализации изобретения для лечения ракового заболевания предусмотрено применение антитела, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе, и по меньшей мере одного дополнительного лекарственного средства. В некоторых

вариантах реализации изобретения дополнительное лекарственное средство выбирают из анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание выбирают из меланомы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), почечноклеточной карциномы (RCC), рака желудка, рака мочевого пузыря, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Ходжкина, рака яичника, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC). В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание выбирают из меланомы, рака желудка, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC).

В некоторых вариантах реализации изобретения предусмотрено применение антитела, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе, для лечения ракового заболевания. В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание выбирают из меланомы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), почечноклеточной карциномы (RCC), рака желудка, рака мочевого пузыря, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Ходжкина, рака яичника, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC). В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание выбирают из меланомы, рака желудка, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC).

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А-В - уровни мРНК ICOS, определенные среди множества опухолей человека. А) На диаграмму нанесены средняя интенсивность и 75% доверительные интервалы нормализованных уровней мРНК ICOS при различных показаниях. Отмечены (точками) образцы с интенсивностями, выходящими за пределы 75% доверительного интервала. В) Процентное значение каждого отмеченного типа опухоли, демонстрирующее окрашивание ICOS 0, 1+, 2+ или 3+ методом иммуногистохимии (ИГХ).

Фиг. 2 - корреляция экспрессии ICOS с инфильтрацией Т-клеток. Уровни мРНК ICOS из ~450 опухолей HNSCC сравнивали с 12 генным показателем хемокиновой сигнатуры, связанной с Т-клетками или уровнями мРНК FoxP3. Уровни нормализованной хемокиновой сигнатуры или мРНК FoxP3 для каждой опухоли откладывали на Y-оси, а уровни мРНК ICOS откладывали на X-оси. Корреляция взаимосвязи Спирмана (R) показана на графике [Corr(S)]. Корреляция >0,75 (R Спирмана) показана как отсечение для сильной корреляции.

Фиг. 3 - экспрессию мРНК ICOS сравнивали для ~450 опухолей HNSCC с использованием данных секвенирования TCGA РНК (NCI). Уровни нормализованной мРНК CTLA-4, или PD-1, или PD-L1 для каждой опухоли откладывали на Y-оси, а уровни мРНК ICOS откладывали на X-оси. Корреляция взаимосвязи Спирмана (R) показана на графике [Corr(S)]. Уровни экспрессии ICOS значимо коррелировали с экспрессией молекул контрольных точек CTLA-4, PD-1. Наблюдалась слабая корреляция между ICOS и PD-L1. Корреляция >0,75 (R Спирмана) показана как отсечение для сильной корреляции.

Фиг. 4 - репрезентативные изображения различающихся интенсивностей окрашивания ICOS в опухоли NSCLC человека.

Фиг. 5 - распределение плотности клеток ICOS в опухолях человека. Плотность клеток ICOS определяли в каждой из опухолей человека и среднюю плотность ICOS из каждого типа опухоли откладывали на Y-оси [NSCLC (N=100); HNSCC (N=102); рак молочной железы, все основные подтипы (N=94); трижды негативный подтип рака молочной железы, TNBC (N=95); рак яичника (N=94)]. Статистический анализ проводили с использованием дисперсионного анализа ANOVA.

Фиг. 6 - разнообразие плотности клеток ICOS в образцах NSCLC. А) Плотность экспрессии ICOS оценивали в наборе образцов опухолей легкого (N=98) и опухоли ранжировали на основе плотности ICOS+ позитивных клеток/мм². В) Разнообразие экспрессии ICOS во второй независимой когорте клинических образцов NSCLC (N=204).

Фиг. 7 - распределение плотности клеток ICOS в различных субпопуляциях Т-клеток из раковых образований человека. А) Репрезентативное изображение, отображающее окрашивание ICOS в различных компартаментах Т-клеток. Стрелки указывают на ICOS+ FOXP3+ Treg-клетки или ICOS+ CD8- CD4 эффекторы. В) Плотность клеток ICOS из отдельных опухолей анализировали в FoxP3-позитивных CD4 Treg-клетках или CD8-позитивных Т-клетках или CD8-негативных и FoxP3-негативных CD4 eff-клетках. Отмечены средняя плотность ICOS и стандартное отклонение для каждого из этих типов опухолей. [Рак легкого (N=100); HNSCC (N=102); трижды негативный подтип рака молочной железы, TNBC (N=95); рак яичника (N=94)].

Фиг. 8А-В - высокую экспрессию ICOS наблюдали в опухолях NSCLC с высоким уровнем PD-L1. С помощью использования PD-L1/ICOS/PD-1 мультиплексного анализа ИГХ авторы оценивали уровни ICOS и PD-L1 в наборе аденокарциномы из NSCLC (n=150). А) Репрезентативные изображения опухоли с высоким уровнем PD-L1 (левое изображение) или низким уровнем PD-L1 (правое изображение), окрашенных ICOS, PD-1 и PD-L1. В) Количественное определение плотности клеток ICOS в клетках с высоким уровнем PD-L1 (>5% клеток позитивные по PD-L1) или с низким уровнем PD-L1 (<5% клеток позитивные по PD-L1) плоскоклеточной карциномы (левое изображение) и аденокарциномы (правое изображение).

Фиг. 9А-С - ТП-анализ опухолей человека показывает экспрессию ICOS в Treg-клетках и CD4-эффекторах. А) Репрезентативные контурные графики экспрессии PD-1 и ICOS в различных субпопуляциях Т-клеток от пациентов с HNSCC (N=4). В) Показана частота встречаемости клеток, позитивных только по ICOS, или ICOS PD-1 дважды позитивных клеток в компартменте Т-клеток (HNSCC N=4; NSCLC N=3; яичник N=4). С) Сравнение уровней ICOS в CD4 Treg-клетках и CD4 Teff-клетках. На графике отложена интенсивность окрашивания ICOS, измеренная по средней интенсивности флуоресценции (MFI; или среднее геометрическое ICOS) в субпопуляциях CD4 Т-клеток из образцов опухолей пациентов.

Фиг. 10А-С - А) Показано влияние анти-ICOS антител на пролиферацию первичных CD4+ Т-клеток человека в связанной с планшетом форме в присутствии субоптимальной концентрации анти-CD3. На графике отмечен процент делящихся клеток. В) Показано влияние анти-ICOS антител на пролиферацию CD4+ Т-клеток человека в растворенной форме в присутствии субоптимальной концентрации PMA. На графике отмечен процент делящихся клеток. С) Влияние анти-ICOS антитела 37A10S713-hlgG1 на пролиферацию первичных CD4+ Т-клеток человека в связанной с планшетом форме в присутствии субоптимальной концентрации анти-CD3.

Фиг. 11А-В - показана оценка анти-ICOS антител в анализе по репортерному гену NF-κB. На графиках показаны процентные содержания клеток GFP+.

Фиг. 12 - показана оценка растворимых анти-ICOS антител в анализе с использованием PBMC со стимуляцией суперантигеном (SEB). Считанные данные представляют собой продукцию IFNγ.

Фиг. 13 - оценивали анти-ICOS антитела на потенциальный суперагонизм в анализе пролиферации Т-клеток человека в отсутствие анти-CD3. Считанные в этом анализе данные представляют собой процентное значение пролиферации.

Фиг. 14А-В - оценка анти-ICOS антитела в анализе фосфо-АКТ (pАКТ) в присутствии или отсутствие вторичного кросс-линкера. Считанные данные представляют собой процент CD4 Т-клеток, являющихся pАКТ-позитивными. А) Результаты в отсутствие вторичного кросс-линкера. В) Результаты в присутствии вторичного кросс-линкера.

Фиг. 15А-В - оценивали анти-ICOS антитела в синергической модели Sa1/N фибросаркомы. Величина роста опухоли отложена на у-оси. А) Пунктирные линии указывают рост опухоли у отдельных мышей; сплошная линия указывает кривую среднего роста для данной группы. Указано количество безопухолевых мышей на группу. В) Средний объем опухоли в каждой группе лечения.

Фиг. 16 - безопухолевым мышам, которым предварительно вводили анти-ICOS 7F12, повторно имплантировали опухоли Sa1/N. Величина роста опухоли отмечена на у-оси.

Фиг. 17 - влияние анти-ICOS антитела хомячка 37A10 с Fc mG1 и mG2a на рост опухолей Sa1/N. Пунктирные линии указывают индивидуальный рост опухоли у отдельных мышей; сплошная линия указывает кривую среднего роста для данной группы. Указано количество безопухолевых мышей на группу.

Фиг. 18 - оценка анти-ICOS антител в качестве единственных средств или в комбинации с анти-PD1 в синергической модели опухоли CT26. Пунктирные линии указывают отдельных мышей; сплошная линия указывает кривую среднего роста для данной группы. Указано количество безопухолевых мышей на группу.

Фиг. 19 - истощение FoxP3+ Treg в опухолях Sa1/N при лечении анти-ICOS антителом. Показана частота встречаемости CD8, CD4 Teff- и Treg-клеток в селезенке и опухоли и количество Treg на 1 мг опухоли. Каждый значок показывает отдельную мышь.

Фиг. 20 - истощение Treg и активация в Teff-клеток в опухолях Sa1/N при лечении анти-ICOS антителом. Верхний ряд: частота встречаемости CD8, CD4 Teff- и Treg-клеток, соотношение CD8 и Treg и частота встречаемости анти-ICOS антитела хомячка 37A10 с Fc mG1 и mG2a на рост опухолей Sa1/N. Пунктирные линии указывают индивидуальный рост опухоли у отдельных мышей; сплошная линия указывает кривую среднего роста для данной группы. Указано количество безопухолевых мышей на группу.

Фиг. 21 - оценка анти-ICOS антитела в модели опухоли Sa1/N после истощения Т-клеток. На графике отложен рост опухоли с течением времени. Указано количество безопухолевых мышей.

Фиг. 22А-В - А) Уменьшение Treg-клеток в анализе с использованием PBMC при лечении гуманизированным анти-ICOS антителом. В) Treg- и Teff-клетки экспрессируют сходные уровни ICOS после пяти дней лечения IL-2.

Фиг. 23 - повторное имплантирование опухолей после лечения анти-ICOS антителом. Левое изображение показывает объем опухоли у мышей после введения одной из двух доз анти-ICOS антитела. Правое изображение показывает объем опухоли у контрольных мышей или мышей, которые были безопухолевыми после анти-ICOS антитела, с последующим повторным имплантированием опухолей.

Фиг. 24А-В - увеличение экспрессии ICOSL у несущих опухоли Sa1/N мышей (А) и яванских макаков (В), которым вводили анти-ICOS антитело.

Фиг. 25 - изменение экспрессии хемокина Th-11 и цитокинов после лечения ткани опухоли легкого анти-ICOS антителом (правые изображения) или анти-PD-1 антителом (левые изображения), через 6 ч (верхние изображения) или 24 ч (нижние изображения).

Фиг. 26 - уровни лигандов NKp46 на Teff-клетках (А, С, Е) и Treg-клетках (В, D, F) от трех различ-

ных доноров, после лечения агонистическим и антагонистическим анти-ICOS антителом.

Фиг. 27 - потеря CD16 (сбрасывание CD16) с NK-клеток, обработанных анти-ICOS антителом-агонистом.

Подробное описание некоторых вариантов реализации изобретения

Предложены антитела, которые связывают ICOS. Предложены также тяжелые цепи и легкие цепи антител, которые способны образовывать антитела, связывающие ICOS. В дополнение к этому предложены антитела, тяжелые цепи и легкие цепи, содержащие один или более конкретных определяющих комплементарность участков (CDR). Предложены полинуклеотиды, кодирующие антитела к ICOS. Предложены также полинуклеотиды, кодирующие тяжелые цепи или легкие цепи антител. Предложены способы получения и/или очистки антител к ICOS. Предложены способы лечения с использованием антител к ICOS. Такие способы включают, но не ограничиваются способом лечения ракового заболевания. Предложены методы выявления ICOS. Такие методы включают методы идентификации индивида, который может получить пользу от лечения анти-ICOS антителом, контроля лечения индивида анти-ICOS антителом и улучшения терапевтической эффективности анти-ICOS антитела у индивида.

Названия разделов, используемые в настоящем документе, предназначены лишь для организационных целей, и их не следует толковать как ограничение описанного объекта изобретения.

Все упомянутые в данном документе источники, включая патентные заявки, патентные публикации и номера доступа Genbank, полностью включены в настоящий документ путем ссылок, как если бы каждый отдельный источник был специально и по отдельности включен путем ссылки в полном объеме.

Способы и процедуры, описанные или упомянутые в настоящем документе, в целом хорошо известны и обычно применяются специалистами в данной области техники с использованием обычной методики, такой как, например, широкоиспользуемые методики, описанные в

Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M.Ausubel, et al. eds., (2003)); серии METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J.MacPherson, B.D.Hames and G.R.Taylor eds.(1995)), Harlow and Lane, eds.(1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL и ANIMAL CELL CULTURE (R.I.Freshney, ed.(1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J.Gait, ed.,1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E.Cellis, ed.,1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I.Freshney), ed.,1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P.Mather and P.E.Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A.Doyle, J.B.Griffiths, and D.G.Newell, eds.,1993-8) J.Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M.Weir and C.C.Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M.Miller and M.P.Calos, eds.,1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds.,1994); Current Protocols in Immunology (J.E.Coligan et al., eds.,1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A.Janeway and P.Travers, 1997); Antibodies (P.Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D.Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P.Shepherd and C.Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E.Harlow and D.Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M.Zanetti and J.D.Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); and Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T.DeVita et al., eds., J.B.Lippincott Company, 1993)

и их обновленных версиях.

I. Определения.

Если не определено иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим описанием, будут иметь значения, которые обычно понятны средним специалистам в данной области техники. Дополнительно, если по контексту не требуется иное или это не выражается явным образом, термины в единственном числе будут включать множественное число, а термины во множественном числе будут включать единственное число. При любом конфликте в определениях между различными источниками или ссылками, управляющим будет определение, предложенное в данном документе.

Следует понимать, что и варианты реализации изобретения, описанные в данном документе, включают определения "состоящие" и/или "состоящие по существу из". В настоящем документе формы единственного числа включают определяемые объекты во множественном числе, если не указано иное. Применение в данном документе термина "или" не подразумевает ввиду, что альтернативные варианты являются взаимоисключающими.

В данной заявке использование "или" означает "и/или", если явным образом не указано или специалистом в данной области не понимается иное. В контексте множества независимых пунктов формулы изобретения, применение "или" возвращает к рассмотрению более одного предыдущего независимого или зависимого пункта.

Как понятно специалисту в данной области техники, указание "около" при значении или параметре в настоящем документе включает (и описывает) варианты реализации изобретения, направленные на само это значение или параметр. Например, описание, ссылаясь на "около X", включает описание "X".

Термины "молекула нуклеиновой кислоты", "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" могут заменяться взаимозаменяемо и относиться к полимеру нуклеотидов. Такие полимеры нуклеотидов могут содержать природные и/или не встречающиеся в природе нуклеотиды и включают, но не ограничиваются ими, ДНК, РНК и ПНК. "Нуклеотидная последовательность" относится к линейной последовательности нуклеотида, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты или полинуклеотид.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" в данном документе используются взаимозаменяемо и относятся к полимеру из аминокислотных остатков и не ограничены минимальной длиной. Такие полимеры из аминокислотных остатков могут содержать природные или не встречающиеся в природе аминокислотные остатки и включать, но не ограничиваться ими, пептиды, олигопептиды, димеры, тримеры и мультимеры аминокислотных остатков. Данным определением охватываются как полноразмерные белки, так и их фрагменты. Термины также включают модификации полипептида после экспрессии, например, гликозилирование, сиалирование, ацелирование, фосфорилирование и т.п. Кроме того, для целей настоящего описания "полипептид" относится к белку, который включает модификации, такие как делеции, добавления и замены (в целом консервативные по природе), в нативную последовательность, при условии, что белок сохраняет требуемую активность. Эти модификации могут быть преднамеренными, как в случае сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, такими как мутации хозяев, которые продуцируют белки, или ошибки при амплификации ПЦР.

"ICOS" и "костимуляция индуцибельных Т-клеток", как используется в данном документе, относится к любому нативному ICOS, который приводит к экспрессии и процессингу ICOS в клетке. Данный термин включает ICOS любого вида позвоночных, в том числе млекопитающих, например приматов (например, людей и яванских макаков) и грызунов (например, мышей и крыс), если не указано иное. Данный термин также включает варианты ICOS природного происхождения, например сплайс-варианты или аллельные варианты. Аминокислотная последовательность типичного белка-предшественника ICOS человека с сигнальной последовательностью (сигнальная последовательность, аминокислоты 1-20) показана в SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность типичного зрелого ICOS человека показана в SEQ ID NO: 2. Аминокислотная последовательность типичного белка-предшественника ICOS мыши с сигнальной последовательностью (сигнальная последовательность, аминокислоты 1-20) показана в SEQ ID NO: 3. Аминокислотная последовательность типичного зрелого ICOS мыши показана в SEQ ID NO: 4. Аминокислотная последовательность типичного белка-предшественника ICOS крысы с сигнальной последовательностью (сигнальная последовательность, аминокислоты 1-20) показана в SEQ ID NO: 190. Аминокислотная последовательность типичного зрелого ICOS крысы показана в SEQ ID NO: 191. Аминокислотная последовательность типичного белка-предшественника ICOS яванского макака с сигнальной последовательностью (сигнальная последовательность, аминокислоты 1-20) показана в SEQ ID NO: 5. Аминокислотная последовательность типичного зрелого ICOS яванского макака показана в SEQ ID NO: 6.

Термин "специфически связывает" по отношению к антигену или эпитопу представляет собой термин, который хорошо понятен в данной области техники, и способы определения такого специфического связывания также хорошо известны в данной области техники. Говорят, что молекула проявляет "специфическое связывание" или "предпочтительное связывание", если она реагирует или ассоциируется чаще, быстрее, более продолжительно и/или с большей аффинностью с конкретной клеткой или веществом по сравнению со связыванием с альтернативными клетками или веществами. Антитело "специфически связывается" или "предпочтительно связывается" с мишенью, если оно связывается с более высокой аффинностью, авидностью, легче и/или более продолжительно по сравнению со связыванием с другими мише-

ниями. Например, антитело, специфически или предпочтительно связывающееся с эпитопом ICOS, представляет собой антитело, связывающее этот эпитоп с более высокой аффинностью, авидностью, легче и/или более продолжительно по сравнению со связыванием с другими эпитопами ICOS и эпитопами, отличными от ICOS. Из этого определения становится также понятно, например, что антитело (или фрагмент или эпитоп), которое специфически или предпочтительно связывается с первой мишенью, может или не может специфически или предпочтительно связываться со второй мишенью. Как таковое, "специфическое связывание" или "предпочтительное связывание" необязательно требует (хотя оно может и включать в себя) исключительное связывание. В целом, но не обязательно, упоминание связывания означает предпочтительное связывание. "Специфичность" относится к способности связывающего белка к селективному связыванию антигена.

Как используется в данном документе, "практически чистый" относится к веществу, которое является по меньшей мере на 50% чистым (а именно, свободным от загрязняющих веществ), предпочтительнее по меньшей мере на 90% чистым, предпочтительнее по меньшей мере на 95% чистым, еще предпочтительнее по меньшей мере на 98% чистым и предпочтительнее всего по меньшей мере на 99% чистым.

Как используется в данном документе, термин "эпитоп" относится к сайту на молекуле-мишени (например, антигене, таком как белок, нуклеиновая кислота, углевод или липид), с которой связывается антигенсвязывающая молекула (например, антитело, фрагмент антитела или каркасный белок, содержащий связывающие участки антитела). Эпитопы, как правило, содержат химически активные поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты, полипептиды или боковые цепи сахаров, и обладают специфическими характеристиками трехмерной структуры, а также специфическими зарядовыми характеристиками. Эпитопы могут быть образованы как из последовательных, так и/или находящихся рядом непоследовательных остатков (например, аминокислот, нуклеотидов, сахаров, липидного фрагмента) молекулы-мишени. Эпитопы, образованные из последовательных аминокислот (например, аминокислот, нуклеотидов, сахаров, липидного фрагмента) обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной укладкой, обычно могут теряться при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп может включать, но не ограничиваться, по меньшей мере 3, по меньшей мере 5 или 8-10 остатков (например, аминокислот или нуклеотидов). В некоторых примерах эпитоп представляет собой менее 20 остатков (например, аминокислот или нуклеотидов) в длину, менее 15 остатков или менее 12 остатков. Два антитела могут связывать тот же эпитоп в пределах антигена, если они проявляют конкурентное связывание с данным антигеном. В некоторых вариантах реализации изобретения эпитоп можно идентифицировать по определенному минимальному расстоянию с остатком CDR на антигенсвязывающей молекуле. В некоторых вариантах реализации изобретения эпитоп можно идентифицировать по вышеуказанному расстоянию и дополнительно ограничить по остаткам, вовлеченным в связь (например, водородную связь) между остатком антитела и остатком антигена. Эпитоп можно также идентифицировать путем проведения различных сканирований, например, сканирование аланином или аргинином может показать один или более остатков, с которыми может взаимодействовать антигенсвязывающая молекула. Если явно не отмечено иное, набор остатков в виде эпитопа не исключает того, что другие остатки являются частью эпитопа конкретного антитела. Скорее наличие такого набора определяет минимальную серию (или набор типов) эпитопов. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения, набор остатков, идентифицированных как эпитоп, скорее определяет соответствие минимального эпитопа антигену, чем исключительный перечень остатков эпитопа на антигене.

"Нелинейный эпитоп" или "конформационный эпитоп" содержит непоследовательные полипептиды, аминокислоты и/или сахара в пределах антигенного белка, к которому антитело специфично по связыванию эпитопа. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один из остатков будет непоследовательным с другими отмеченными остатками эпитопа; однако один или более остатков также могут быть последовательными с другими остатками.

"Линейный эпитоп" содержит последовательные полипептиды, аминокислоты и/или сахара в пределах антигенного белка, к которому антитело специфично по связыванию эпитопа. В некоторых вариантах реализации изобретения отмечается, что не каждый из остатков в пределах линейного эпитопа требует непосредственной связи (или участия в связи) с антителом. В некоторых вариантах реализации изобретения линейные эпитопы могут получать при иммунизациях пептидом, который эффективно состоит из последовательности линейного эпитопа, или из структурных частей белка, которые относительно изолированы от остатков белка (с которыми может взаимодействовать антитело, по меньшей мере, первоначально), только с такой частью последовательности.

Термин "антитело" в настоящем документе используется в самом широком смысле и охватывает различные структуры антител, включая моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические (такие как Vi-специфические T-клеточные активаторы) и триспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют требуемую антигенсвязывающую активность, но не ограничиваются ими.

Термин антитело включает, но не ограничивается ими, фрагменты, которые способны к связыванию антигена, такие как Fv, одноцепочечный Fv (scFv), Fab, Fab', ди-scFv, sdAb (однодоменное антитело) и

(Fab')₂ (включая химически связываемый F(ab')₂). При расщеплении антител папаином образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых "Fab"-фрагментами, каждый из которых содержит один антигенсвязывающий сайт и остаточный "Fc"-фрагмент, название которого отражает его способность к кристаллизации. Обработка пепсином позволяет получать F(ab')₂-фрагмент, содержащий два антигенсвязывающих сайта и по-прежнему способный к перекрестному связыванию антигена. Термин антитело также включает, но не ограничивается ими, химерные антитела, гуманизированные антитела и антитела различных видов, таких как мышь, человек, яванского макака и т.д. Кроме того, для антительных конструкций, предложенных в данном документе, также подразумеваются варианты, имеющие последовательности, взятые у других организмов. Таким образом, если раскрыта человеческая версия антитела, то специалисту в данной области техники будет понятно как трансформировать последовательность человека в основе антитела в последовательность мыши, крысы, кошки, собаки, лошади и т.д. Фрагменты антител также включают любую ориентацию одноцепочечных scFv, tandemных ди-scFv, диател, tandemных три-sdcFv, минител и т.д. Фрагменты антител также включают нанотела (sdAb, антитело, имеющее один мономерный домен, такой как пара вариабельных доменов тяжелых цепей, без легкой цепи). В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела может относиться к такому из конкретных видов (например, scFv человека или scFv мыши). Это скорее отмечает последовательности по меньшей мере не-CDR участков, а не источник конструкции.

Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции практически однородных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением мутаций природного происхождения, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены против единственного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антиген. Таким образом, образец моноклональных антител может связываться с тем же эпитопом на том же антигене. Модификатор "моноклональное" указывает на то, что антитело получено из практически однородной популяции антител; и его не следует интерпретировать как требование о продукции антитела посредством какого-либо конкретного способа. Например, моноклональные антитела, которые можно получать методом гибридом, впервые описанным Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495, или можно получать методами рекомбинантных ДНК, такими как описано в пат. США № 4816567. Моноклональные антитела также можно выделять из фаговых библиотек, созданных с использованием методик, описанных, например, в McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554.

Термином "CDR" отмечается определяющий комплементарность участок, как определено по меньшей мере одним способом идентификации и признано специалистом в данной области техники. В некоторых вариантах реализации изобретения CDR можно определять в соответствии с любыми схемами нумерации Чотиа, схеме нумерации Кабата, комбинации схемы Кабата и Чотиа, определения AbM, определения контакта и/или комбинаций определений по Кабату, Чотиа, AbM и/или для контакта. Типовые CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) встречаются по аминокислотным остаткам 24-34 L1, 50-56 L2, 89-97 L3, 31-35B H1, 50-65 H2 и 95-102 H3 (Rabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Определение AbM может включать, например, CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) по аминокислотным остаткам 24-34 L1, 50-56 L2, 89-97 L3, H26-H35B H1, 50-58 H2 и 102 H3. Определение контакта может включать, например, CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) по аминокислотным остаткам 30-36 L1, 46-55 L2, 89-96 L3, 30-35 H1, 47-58 H2 и 93-101 H3. Определения по Чотиа может включать, например, CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, и CDR-H3) по аминокислотным остаткам 24-34 L1, 50-56 L2, 89-97 L3, 26-32 ... 34 H1, 52-56 H2 и 95-102 H3. CDR можно также представлять, как показано в любой одной или более сопровождающих фигур. За исключением CDR1 в V_H, CDR обычно содержат аминокислотные остатки, образующие гипервариабельные петли. Различные CDR в пределах антитела могут обозначаться по их соответствующему номеру и типу цепи, включая, без ограничения: а) CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3; б) CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3; в) LCDR-1, LCDR-2, LCDR-3, HCDR-1, HCDR-2 и HCDR-3 или d) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 и HCDR3; и т.д. Термин "CDR", используемый в данном документе, также охватывает HVR или "гипервариабельный участок", включая гипервариабельные петли. Типовые гипервариабельные петли находятся на аминокислотных остатках 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

Термин "вариабельный участок тяжелой цепи", как используется в данном документе, относится к участку, содержащему по меньшей мере три CDR тяжелой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения вариабельный участок тяжелой цепи содержит три CDR и по меньшей мере FR2 и FR3. В некоторых вариантах реализации изобретения вариабельный участок тяжелой цепи содержит по меньшей мере HCDR1 тяжелой цепи, каркасный (FR)₂, HCDR2, FR3 и HCDR3. В некоторых вариантах реализации изобретения вариабельный участок тяжелой цепи также содержит по меньшей мере часть FR1 и/или по

меньшей мере часть FR4.

Термин "константный участок тяжелой цепи", как используется в данном документе, относится к участку, содержащему по меньшей мере три константных домена тяжелой цепи C_{H1} , C_{H2} , и C_{H3} . Конечно, если не отмечено иное, в пределах объема термином "константный участок тяжелой цепи" охвачены не изменяющие функционирование делеции и изменения внутри доменов. Неограничивающие типовые константные участки тяжелой цепи включают γ , δ и α . Неограничивающие типовые константные участки тяжелой цепи также включают ϵ и μ . Каждый тяжелый константный участок соответствует изотипу антитела. Например, антитело, содержащее константный участок γ , представляет собой антитело-IgG, антитело, содержащее константный участок δ , представляет собой антитело-IgD, а антитело, содержащее константный участок α , представляет собой антитело-IgA. Дополнительно антитело, содержащее константный участок μ , представляет собой антитело-IgM, а антитело, содержащее константный участок ϵ , представляет собой антитело-IgE. Определенные изотипы могут дополнительно подразделяться на подклассы. Например, антитела-IgG включают, но не ограничиваются ими, IgG1 (содержащий константный участок γ_1), IgG2 (содержащий константный участок γ_2), IgG3 (содержащий константный участок γ_3) и IgG4 (содержащий константный участок γ_4); антитела-IgA включают, но не ограничиваются ими, IgA1 (содержащий константный участок α_1) и IgA2 (содержащий константный участок α_2); и антитела IgM включают, но не ограничиваются IgM1 и IgM2.

Термин "тяжелая цепь", как используется в данном документе, относится к полипептиду, содержащему, по меньшей мере, переменный участок тяжелой цепи, с лидерной последовательностью или без нее. В некоторых вариантах реализации изобретения тяжелая цепь также содержит по меньшей мере часть константного участка тяжелой цепи. Термин "полноразмерная тяжелая цепь", как используется в данном документе, относится к полипептиду, содержащему, по меньшей мере, переменный участок тяжелой цепи и константный участок тяжелой цепи, с лидерной последовательностью или без нее.

Термин "переменный участок легкой цепи", как используется в данном документе, относится к участку, содержащему по меньшей мере три CDR легкой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения переменный участок легкой цепи содержит три CDR и по меньшей мере FR2 и FR3. В некоторых вариантах реализации изобретения переменный участок легкой цепи содержит по меньшей мере LCDR1 легкой цепи, каркасный (FR)2, LCDR2, FR3 и LCDR3. Например, переменный участок легкой цепи может содержать CDR1 легкой цепи, каркасный (FR)2, CDR2, FR3 и CDR3. В некоторых вариантах реализации изобретения переменный участок легкой цепи также содержит по меньшей мере часть FR1 и/или по меньшей мере часть FR4.

Термин "константный участок легкой цепи", как используется в данном документе, относится к участку, включающему константный домен легкой цепи, C_L . Неограничивающие типовые константные участки легкой цепи включают λ и κ . Конечно, если не отмечено иное, в пределах объема термина "константный участок легкой цепи" охвачены не изменяющие функционирование делеции и изменения внутри доменов.

Термин "легкая цепь", как используется в данном документе, относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере переменный участок легкой цепи, с лидерной последовательностью или без нее. В некоторых вариантах реализации изобретения легкая цепь также содержит по меньшей мере часть константного участка легкой цепи. Термин "полноразмерная легкая цепь", как используется в данном документе, относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере переменный участок легкой цепи и константный участок легкой цепи, с лидерной последовательностью или без нее.

"Акцепторный каркас человека" для целей настоящего изобретения представляет собой каркас, содержащий аминокислотную последовательность каркаса переменного домена легкой цепи (V_L) или каркаса переменного домена тяжелой цепи (V_H), происходящий из каркаса иммуноглобулина человека или консенсусной последовательности каркаса человека, как указано ниже. Акцепторный каркас человека, происходящий из каркаса иммуноглобулина человека или консенсусной последовательности каркаса человека, может содержать совпадающую с ними аминокислотную последовательность или может содержать изменения аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах реализации количество аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее. В некоторых вариантах реализации последовательность акцепторного каркаса человека V_L идентична последовательности каркаса иммуноглобулина человека V_L или консенсусной последовательности каркаса человека.

Термин "аффинность" относится к интенсивности суммарных общих нековалентных взаимодействий между одиночным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнера по связыванию (например, антигена). Аффинность молекулы X для ее партнера Y, в целом, можно представить в виде константы диссоциации (K_D). Аффинность можно измерять при помощи общепринятых в данной области техники методов (таких как, например, ELISA K_D , KinExA, интерферометрия в биослое (BLI) и/или на устройствах поверхностного плазмонного резонанса (таких как устройство BIAcore®), включая те, которые описаны в данном документе).

Термин " K_D ", как используется в данном документе, относится к равновесной константе диссоциа-

ции взаимодействия антитело-антиген.

В некоторых вариантах реализации изобретения K_D , K_d , K_d или значение K_d антитела измеряется путем использования анализов поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора BIACORE®-2000 или BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., г. Пискатауэй, штат Нью-Джерси) при 25°C с чипами CM5 с иммобилизованным антигеном при ~10 единицах ответа (RU). Вкратце, чипы биосенсора с карбоксиметилированным декстраном (CM5, BIACORE, Inc.) активируют N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлоридом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) согласно инструкциям поставщика. До введения антиген разбавляют 10 мМ раствором ацетата натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) и вводят при скорости потока 5 мкл/мин до достижения приблизительно 10 единиц ответа (RU) связанного белка. После введения антигена вводят 1М раствор этаноламина для блокирования непрореагировавших групп. Для измерения кинетики вводят серийные разведения полипептида, например полноразмерного антитела в ФСБ (фосфатно-солевой буфер), содержащего 0,05% TWEEN-20™ в качестве поверхностно-активного вещества (PBST), при 25°C на скорости потока приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) рассчитывают, используя простую взаимно однозначную модель связывания Ленгмюра (программа для обработки данных BIACORE®, версия 3.2) путем одновременной подгонки сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (K_d) рассчитывают как соотношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Если скорость ассоциации согласно вышеописанному анализу поверхностного плазмонного резонанса превышает $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, то ее можно определить с помощью методики гашения флуоресценции, измеряющей увеличение или снижение интенсивности испускания флуоресценции (возбуждение=295 нм; испускание=340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C в 20 нМ растворе антител против антигена в ФСБ, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, с измерением на спектрометре, например на спектрофотометре с устройством остановки потока (Aviv Instruments) или спектрофотометре SLM-AMINCO™ серии 8000 (ThermoSpectronic) с перемешиваемой кюветой.

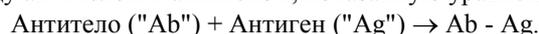
В некоторых вариантах реализации изобретения разница между указанными двумя значениями как функция значения эталонного соединения/соединения сравнения (например, значениями K_d) оказывается практически одинаковой, например менее около 50%, менее около 40%, менее около 30%, менее около 20% и/или менее около 10%.

В некоторых вариантах реализации изобретения разница между указанными двумя значениями (например, значениями K_d) составляет более чем около 10%, более чем около 20%, более чем около 30%, более чем около 40% и/или более чем около 50% в зависимости от значения для эталонного соединения/соединения сравнения.

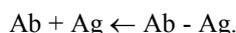
Под "поверхностным плазмонным резонансом" понимается оптический феномен, который позволяет анализировать биоспецифические реакции в реальном времени путем выявления изменений в концентрациях белков в пределах биосенсорной матрицы, например, используя систему BIAcore™ (BIAcore International AB, компания GE Healthcare, г. Уппсала, Швеция и г. Пискатауэй, штат Нью-Джерси, США). Для получения дополнительных описаний см. Jonsson et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26.

"Интерферометрия в биослое" относится к оптической аналитической методике, которая анализирует профиль интерференции света, отраженного от слоя иммобилизованного белка на острие биосенсора и внутреннего эталонного слоя. Изменения в количестве молекул, связанных с острием биосенсора, вызывает сдвиги в профиле интерференции, которые можно измерять в реальном времени. Неограничивающим типовым устройством для интерферометрии в биослое является система ForteBio Octet® RED96 (Pall Corporation). См., например, Abdiche et al., 2008, Anal. Biochem. 377:209-277.

Обозначение " k_{on} ", как используется в данном документе, относится к константе скорости связывания антитела с антигеном. А именно, константы скорости (k_{on} и k_{off}) равновесные константы диссоциации измеряют с использованием IgG (бивалентных) с моновалентным антигеном ICOS. Понятия " K_{on} ", " k_{on} ", "константа скорости ассоциации" или " ka " используют в данном документе взаимозаменяемо. Данное значение показывает скорость связывания связывающего белка с его антигеном-мишенью или скорость образования комплекса между антителом и антигеном, показанную уравнением



Обозначение " k_{off} ", как используется в данном документе, относится к константе скорости диссоциации антитела от комплекса антитело/антиген. Обозначение k_{off} также обозначается как " K_{off} " или "скорость константы диссоциации". Это значение показывает скорость диссоциации антитела от своего антигена-мишени или разделение комплекса Ab-Ag с течением времени на свободное антитело и антиген, как показано уравнением



Термин "биологическая активность" относится к любому из одного или более биологических свойств молекулы (существующей в природе, найденной *in vivo*, или получаемой или добываемой рекомбинантными средствами). Биологические свойства включают, но не ограничиваются ими, связывание рецептора, индуцирование пролиферации клеток, ингибирование роста клеток, индуцирование других цитокинов, включая апоптоз, и ферментативную активность. В некоторых вариантах реализации изобре-

тения биологическая активность белка ICOS включает, например, костимуляцию пролиферации Т-клеток и секретирование цитокинов, ассоциированные с клетками Th1 и Th2; модуляцию Treg-клеток; влияние на дифференцировку Т-клеток, включая модуляцию фактора транскрипции генной экспрессии; индукцию передача сигнала посредством механизмов PI3K и АКТ и опосредование АЗКЦ.

Антитело с "созревшей аффинностью" относится к антителу с одной или более модификациями в одном или более CDR по сравнению с исходным антителом, которое не содержит таких изменений, причем такие изменения приводят к улучшению аффинности антитела к антигену.

"Химерное антитело", как используется в данном документе, относится к антителу, у которого фрагмент тяжелой и/или легкой цепи происходит из конкретного источника или биологического вида, в то время как, по меньшей мере, остальная часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из другого источника или биологического вида. В некоторых вариантах реализации изобретения химерное антитело относится к антителу, содержащему по меньшей мере один переменный участок из первого вида (такого как мышь, крыса, яванский макак и т.д.) и по меньшей мере один константный участок из второго вида (такого как человек, яванский макак и т.д.). В некоторых вариантах реализации изобретения химерное антитело содержит по меньшей мере один переменный участок мыши и по меньшей мере один константный участок человека. В некоторых вариантах реализации изобретения химерное антитело содержит по меньшей мере один переменный участок яванского макака и по меньшей мере один константный участок человека. В некоторых вариантах реализации изобретения все переменные участки химерного антитела происходят из первого вида, а все константные участки химерного антитела - из второго вида. Как отмечено выше, химерная конструкция также может быть функциональным фрагментом.

"Гуманизованное антитело", как используется в данном документе, относится к антителу, в котором по меньшей мере одна аминокислота в каркасном участке нечеловеческого переменного участка была заменена на соответствующую аминокислоту из переменного участка человека. В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизованное антитело содержит по меньшей мере один константный участок или его фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизованное антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как Fab, scFv, (Fab')₂ и т.д. Термин "гуманизованный" также обозначает формы нечеловеческих (например, мышинных) антител, которые являются химерными иммуноглобулинами, цепями иммуноглобулинов или их фрагментами (такими как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), содержащие минимальную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизованные антитела включают иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из определяющего комплементарность участка (CDR) реципиента заменены остатками из CDR отличных от человека видов (донорное антитело), таких как мышь, крыса или кролик, обладающие требуемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях остатки Fv-каркасного участка (FR) иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизованное антитело может содержать остатки, которые отсутствуют как в реципиентном антителе, так и в импортированном CDR или каркасных последовательностях, но они включаются для дополнительного улучшения и оптимизации характеристик антитела. В основном, гуманизованное антитело может содержать практически все из по меньшей мере одного, а чаще двух переменных доменов, в которых все или практически все участки CDR соответствуют таковым в нечеловеческом иммуноглобулине, а все или практически все участки FR соответствуют консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизованное антитело также может содержать по меньшей мере часть константного участка или домена иммуноглобулина (Fc), обычно человеческого иммуноглобулина. Другие формы гуманизованных антител имеют один или более CDR (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2 и/или CDR H3), которые изменены относительно исходного антитела, которые также называются как один или более CDR "происходящие из" одного или более CDR из исходного антитела. Как будет понятно, гуманизованную последовательность можно идентифицировать по ее первичной последовательности и необязательно отмечать способ, которым создано антитело.

"CDR-привитое антитело", как используется в данном документе, относится к гуманизованному антителу, у которого один или более определяющих комплементарность участков (CDR) первого (нечеловеческого) вида, были привиты на каркасные участки (FR) второго вида (человека).

"Антитело человека", как используется в данном документе, охватывает антитела, продуцируемые в организме людей, антитела, продуцируемые у отличных от человека животных, которые содержат ген иммуноглобулина человека, таких как мыши Xenomouse®, и антитела, отобранные с использованием методов *in vitro*, таких как фаговый дисплей (Vaughan et al., 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314; Sheets et al., 1998, Proc.Natl. Acad.Sci. (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581), где репертуар антител основан на последовательности иммуноглобулина человека. Термин "антитело человека" обозначает род последовательностей, которые являются человеческими последовательностями. Таким образом, данный термин не обозначает способ, которым было получено антитело, но род соответствующих последовательностей.

"Функциональный Fc-участок" обладает "эффektorной функцией" нативной последовательности Fc-участка. Типовые "эффektorные функции" включают связывание рецептора Fc; связывание C1q; КЗЦ;

АЗКЦ; фагоцитоз; подавление экспрессии рецепторов на поверхности клетки (например, рецептора В-клеток; BCR) и т.д. Для таких эффекторных функций обычно необходимо объединение Fc-участка со связывающим доменом (например, варибельным доменом антитела); их оценку можно выполнять с использованием различных анализов.

"Нативная последовательность Fc-участка" содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-участка, обнаруженной в природе. Нативная последовательность Fc-участков человека включает нативную последовательность Fc-участка IgG1 человека (аллотипы не-А и А); нативную последовательность Fc-участка IgG2 человека; нативную последовательность Fc-участка IgG3 человека и нативную последовательность Fc-участка IgG4 человека, а также их варианты природного происхождения.

"Вариантный Fc-участок" содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности Fc-участка за счет модификации по меньшей мере одной аминокислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения "вариантный Fc-участок" содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности Fc-участка за счет модификации по меньшей мере одной аминокислоты, при сохранении по меньшей мере одной эффекторной функции нативной последовательности Fc-участка. В некоторых вариантах реализации изобретения вариантный Fc-участок содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с нативной последовательностью Fc-участка или с Fc-участком исходного полипептида, например, содержит от около одной до около десяти аминокислотных замен и предпочтительно от около одной до около пяти аминокислотных замен в нативной последовательности Fc-участка или в Fc-участке исходного полипептида. В некоторых вариантах реализации изобретения вариантный Fc-участок в данном документе будет обладать по меньшей мере около 80% идентичностью последовательностей с нативной последовательностью Fc-участка и/или с Fc-участком исходного полипептида, по меньшей мере около 90% идентичностью последовательностей с ними, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичностью последовательностей с ними.

"Рецептор Fc" или "FcR" описывает рецептор, который связывается с Fc-участком антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc γ R является нативным FcR человека. В некоторых вариантах реализации изобретения FcR представляет собой рецептор, который связывает антитело IgG (γ -рецептор) и включает рецепторы подклассов Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторы Fc γ RII включают Fc γ RIIA ("активирующий рецептор") и Fc γ RIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, которые главным образом отличаются по их цитоплазматическим доменам. Активирующий рецептор Fc γ RIIA содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). Ингибирующий рецептор Fc γ RIIB содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) (см., например, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Обзор FcR представлен, например, в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); and de Haas et al., *J. lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Другие FcR, включают те, которые будут идентифицированы в будущем, и охватываются в данном документе термином "FcR".

Термин "рецептор Fc" или "FcR" также включает неонатальный рецептор, FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)) и регулирование гомеостаза иммуноглобулинов. Методы измерения связывания с FcRn хорошо известны (см., например, Ghetie and Ward., *Immunol. Today* 18 (12): 592-598 (1997); Ghetie et al., *Nature Biotechnology*, 15(7): 637-640 (1997); Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279(8): 6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al.).

"Эффекторные функции" относятся к биологическим видам активности, приписываемым Fc-участку антитела, которые зависят от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ); связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора) и активацию В-клеток.

"Эффекторные клетки человека" представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют один или более FcR и выполняют эффекторные функции. В некоторых вариантах реализации изобретения клетки экспрессируют по меньшей мере Fc γ RIII и выполняют эффекторную(ые) функцию(и) АЗКЦ. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют АЗКЦ, включают мононуклеарные клетки периферийной крови (РВМС), естественные клетки-киллеры (НК), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы. Эффекторные клетки могут быть выделены из нативного источника, например из крови.

"Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или "АЗКЦ" относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig, связанный на Fc-рецепторах (FcR), присутствует на определенных цитотоксических клетках (например, НК-клетках, нейтрофилах и макрофагах), давая возможность этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с несущими антиге-

ны клетками-мишенями и впоследствии уничтожать данные клетки-мишени с помощью цитотоксинов. Первичные клетки для опосредования АЗКЦ, НК-клетки, экспрессируют только Fc γ RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Данные по экспрессии FcR на гемопоэтических клетках собраны в табл. 3 на стр. 464 статьи Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Для оценки АЗКЦ-активности; интересующей молекулы можно выполнять анализ АЗКЦ *in vitro*, такой как описанный в пат. США № 5500362 или 5821337, или пат. США № 6737056 (Presta). Эффекторные клетки, пригодные для такого анализа, включают клетки РВМС и NK-клетки. В альтернативном или дополнительном варианте АЗКЦ-активность интересующей молекулы можно оценивать *in vivo*, например, на животной модели, такой как описано в Clynes et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998). Дополнительные варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями Fc-участка (полипептиды с вариантным Fc-участком) и повышенной или пониженной способностью активностью АЗКЦ, описаны, например, в пат. США № 7923538 и пат. США № 7 994290.

"Комплементзависимая цитотоксичность" или "КЗЦ" относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. Активация классического пути комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), которые связаны с распознаваемым ими антигеном. Для оценки активации комплемента можно выполнять анализ КЗЦ, например, как описано в Gazzano-Santoro et al. *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Описаны варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями Fc-участка (полипептиды с вариантным Fc-участком) и повышенной или пониженной способностью связывания C1q, например, в пат. США № 6194551 B1, пат. США № 7923538, пат. США № 7994290 и WO 1999/51642. См. также, например, Idusogie et al., *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

Вариант полипептида с "измененной" аффинностью связывания FcR или активностью АЗКЦ является таковым, который обладает либо усиленной, либо ослабленной активностью связывания FcR и/или активностью АЗКЦ по сравнению с исходным полипептидом или полипептидом, содержащим нативную последовательность Fc-участка. Вариант полипептида, который "показывает повышенное связывание" с FcR, связывает по меньшей мере один FcR с большей аффинностью, чем исходный полипептид. Вариант полипептида, который "показывает пониженное связывание" с FcR, связывает по меньшей мере один FcR с меньшей аффинностью, чем исходный полипептид. Такие варианты, которые отображают увеличение связывания с FcR могут обладать низким или не обладать существенным связыванием с FcR, например, связывание с FcR на уровне 0-20% по сравнению с нативной последовательностью Fc-участка IgG.

Полипептидный вариант, который "опосредует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) в присутствии эффекторных клеток человека более эффективно", чем исходное антитело, является таким, который в анализе *in vitro* или *in vivo* является более эффективным в опосредовании АЗКЦ, когда количества полипептидного варианта и исходного антитела, используемого в анализе, являются, по существу, одинаковыми. В целом, такие варианты будут идентифицированы с использованием анализа АЗКЦ *in vitro*, как описано в данном документе, но подразумеваются и другие анализы или методы для определения активности АЗКЦ, например, на модели животного и т.п.

Термин "практически сходный" или "практически такой же", как используется в данном документе, обозначает достаточно высокую степень сходства между двумя или более численными значениями, так что специалист в данной области техники может считать различие между двумя или более указанными значениями малым или не имеющим биологической и/или статистической значимости в контексте биологической характеристики, измеренной указанным значением. В некоторых вариантах реализации изобретения два или более практически сходных значений отличаются не более чем приблизительно на любое одно из значений 5, 10, 15, 20, 25 или 50%.

Фраза "существенно отличающийся", как используется в данном документе, обозначает достаточно высокую степень различия между двумя численными значениями, так что специалист в данной области техники может считать различие между двумя указанными значениями, имеющими статистическую значимость, в контексте биологической характеристики, измеренной указанными значениями. В некоторых вариантах реализации изобретения два практически отличающихся численных значения отличаются на более чем приблизительно любое одно из значений 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%.

Фраза "практически уменьшенный", как используется в данном документе, обозначает достаточно высокую степень уменьшения между численным значением и эталонным численным значением, так что специалист в данной области техники может считать различие между двумя значениями, имеющим статистическую значимость, в контексте биологической характеристики, измеренной указанными значениями. В некоторых вариантах реализации изобретения практически сниженные численные значения отличаются на более чем приблизительно любое одно из значений 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с эталонным значением.

Термин "лидерная последовательность" относится к последовательности аминокислотных остатков, расположенных на N-конце полипептида, который способствует секреции полипептида из клетки млекопитающего. Лидерная последовательность может отщепляться при экспорте полипептида из

клетки млекопитающего, образуя зрелый белок. Лидерные последовательности могут быть природными или синтетическими, и они могут быть гетерологичными или гомологичными по отношению к белку, к которому они присоединены.

Полипептид с "нативной последовательностью" представляет собой полипептид, который имеет такую же аминокислотную последовательность, как полипептид природного происхождения. Таким образом, полипептид с нативной последовательностью может иметь аминокислотную последовательность человеческого полипептида природного происхождения из любого млекопитающего. Такой полипептид с нативной последовательностью может быть выделен из природы или может быть получен рекомбинантными или синтетическими способами. Термин полипептид с "нативной последовательностью" конкретно охватывает усеченные или секретируемые формы полипептида природного происхождения (например, последовательность внеклеточного домена), варианты формы природного происхождения (например, формы альтернативного сплайсинга) и аллельные варианты полипептида природного происхождения.

Полипептидный "вариант" означает биологически активный полипептид, имеющий по меньшей мере около 80% идентичности аминокислотной последовательности с нативной последовательностью полипептида после выравнивания последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательности и без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательностей. Такие варианты включают, к примеру, полипептиды, в которых добавлены или удалены в N- или C-конец полипептида один или более аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации изобретения вариант будет иметь по меньшей мере около 80% идентичности аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения вариант будет иметь по меньшей мере около 90% идентичности аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения вариант будет иметь по меньшей мере около 95% идентичности аминокислотной последовательности с нативной последовательностью полипептида.

Как используется в данном документе, "процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" по отношению к пептиду, полипептиду или последовательности антитела определяют как процентное содержание аминокислотных остатков в исследуемой последовательности, идентичных аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и, при необходимости, внедрения гэпов для достижения максимальной процентной идентичности последовательности, без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно достигать различными способами, известными специалисту в данной области техники, например, используя общедоступное компьютерное программное обеспечение, например программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN™ (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определять соответствующие параметры для измерения степени выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Аминокислотная замена может включать, но не ограничивается, замену одной аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой. Типовые замены показаны в табл. 1. В интересующее антитело можно внедрять аминокислотные замены и отбирать продукты посредством скрининга на предмет требуемой активности, например, сохранения/улучшения связывания антигена, снижения иммуногенности или улучшения АЗКЦ или КЗЦ.

Таблица 1

Исходный остаток	Типовые замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин

Аминокислоты можно группировать по общим свойствам боковой цепи:

- (1) гидрофобные: Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотные: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены приводят к замене представителя одного из этих классов на представителя другого класса.

Термин "вектор" для описания полинуклеотида, который может быть сконструирован так, чтобы содержать клонированный полинуклеотид или полинуклеотиды, которые могут быть синтезированы в клетке-хозяине. Вектор может включать один или более из следующих элементов: точку начала репликации, одну или более регуляторных последовательностей (таких как, например, промоторы и/или энхансеры), которые управляют экспрессией интересующего полипептида, и/или один или более селективируемых маркерных генов (таких как, например, гены устойчивости к антибиотикам и гены, которые могут быть задействованы для колориметрического анализа, например β -галактозидаза). Термин "экспрессионный вектор" относится к вектору, применяемому для экспрессии интересующего полипептида в клетке-хозяине.

"Клетка-хозяин" относится к клетке, которая может быть или была реципиентом вектора или выделенного полинуклеотида. Клетки-хозяева могут быть прокариотическими клетками или эукариотическими клетками. Типовые эукариотические клетки включают клетки млекопитающих, такие как клетки животных приматов или не приматов; клетки грибов, таких как дрожжи; клетки растений и клетки насекомых. Неограничивающие типовые клетки млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, клетки NSO, клетки PER.C6® (Stucell) и клетки 293 и CHO и их производные, такие как клетки 293-6E и DG44 соответственно. Клетки-хозяева включают потомство единственной клетки-хозяина, причем указанное потомство необязательно должно быть полностью идентичным (морфологически или на уровне комплементарной геномной ДНК) исходной родительской клетке в силу природной, случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные *in vivo* полинуклеотидом(ами), предложенным(и) в данном документе.

Термин "выделенный", как используется в данном документе, относится к молекуле, которую отделили по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми она обычно находится в природе или синтезируется. Например, полипептид называется "выделенным", когда его отделили по меньшей мере от некоторых компонентов клетки, в которой он получен. Если полипептид секретируется клеткой после экспрессии, то физическое отделение супернатанта, содержащего полипептид из клетки, которая его синтезировала, считается "выделением" полипептида. Аналогичным образом, полинуклеотид называется "выделенным", когда он не является частью большего полинуклеотида (такого как, например, геномная ДНК или митохондриальная ДНК, в случае полинуклеотида ДНК), в котором он обычно находится в

природе, или его отделили по меньшей мере от некоторых компонентов клетки, в которой он синтезирован, например, в случае полинуклеотида РНК. Таким образом, полинуклеотид ДНК, который содержится в векторе внутри клетки-хозяина, может называться "выделенным".

Термин "индивид" или "субъект" применяется взаимозаменяемо в данном документе по отношению к животному; например млекопитающему. В некоторых вариантах реализации изобретения предложены способы лечения животных, включающих, но не ограничивающихся ими, людей, грызунов, обезьян, кошачьих, псовых, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, овечьих, коз, лабораторных животных-млекопитающих, сельскохозяйственных животных млекопитающих, животных-млекопитающих для спортивных соревнований и домашних животных-млекопитающих. В некоторых примерах "индивид" или "субъект" относится к индивиду или субъекту, нуждающемуся в лечении заболевания или нарушения. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект, требующий получения лечения, может быть пациентом, отмечая факт, что субъект был идентифицирован как имеющий нарушение, относящееся к лечению, или подвержен достаточному риску развития нарушения.

"Заболевание" или "нарушение", как используется в данном документе, относится к патологическому состоянию, при котором требуется и/или желательно лечение.

"Рак" и "опухоль", как используется в данном документе, являются взаимозаменяемыми терминами, которые относятся к любому аномальному росту клетки или ткани или пролиферации в организме животного. Как используется в данном документе, термины "рак" и "опухоль" охватывают солидные и гематологические/лимфатические раковые заболевания, а также охватывают злокачественный, предраковый и доброкачественный рост, такой как дисплазия. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные неограничивающие примеры таких видов рака включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, рак гипофиза, рак пищевода, астроцитому, саркому мягких тканей, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак ободочной кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнных желез, рак почки, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, рак головного мозга, рак эндометрия, рак яичка, холангиокарциному, карциному желчного пузыря, рак желудка, меланому и различные типы рака головы и шеи.

Как используется в данном документе, "лечение" представляет собой подход для получения благоприятных или требуемых клинических результатов. "Лечение", как используется в данном документе, охватывает любое введение или применение лекарственного средства для лечения заболевания у млекопитающего, включая человека. Для целей этого описания благоприятные или требуемые клинические результаты включают, но не ограничиваются любым одним или более из облегчения одного или более симптомов, уменьшения степени заболевания, предотвращения или задержки распространения (например, метастазов, например метастазов в легкое или лимфатический узел) заболевания, предотвращения или задержки рецидива заболевания, задержки или замедления прогрессирования заболевания, облегчения течения заболевания, подавления заболевания или прогрессирования заболевания, подавления или замедления заболевания или его прогрессирования, остановки его развития и ремиссии (либо частичной, либо полной). Под "лечением" также понимается снижение патологических последствий пролиферативного заболевания. Способы, предложенные в данном документе, подразумевают любой один или более аспектов лечения. Наряду с вышеизложенным, термин лечение не требует стопроцентное прекращение всех аспектов нарушения.

"Облегчение" означает ослабление или улучшение одного или более симптомов по сравнению с отсутствием введения анти-ICOS антитела. "Облегчение" также включает сокращение или уменьшение длительности проявления симптома.

В контексте ракового заболевания термин "лечение" включает любое или все из ингибирования роста раковых клеток, ингибирования репликации раковых клеток, ослабления общей опухолевой нагрузки и облегчения одного или более симптомов, связанных с данным заболеванием.

Термин "биологический образец" означает количество вещества, взятого из живого существа или бывшего ранее живого существа. Такие субстанции включают, но не ограничиваются ими, кровь (например, цельная кровь), плазму, сыворотку, мочу, амниотическую жидкость, синовиальную жидкость, эндотелиальные клетки, лейкоциты, моноциты, другие клетки, органы, ткани, костный мозг, лимфатические узлы и селезенку.

Образец, у которого имеется "повышенный уровень ICOS" или "ICOS экспрессируется на повышенном уровне", или существует "высокий ICOS", означает, что уровень ICOS такой, что специалист в данной области может заключать, что рак можно лечить с помощью анти-ICOS лекарственного средства, такого как антитело, предложенное в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения "повышенный уровень ICOS" представляет собой такой уровень, при котором 1% клеток внутри образца опухоли проявляет окрашивание по ICOS. В некоторых вариантах реализации изобретения "высокий уровень" по отношению к ICOS представляет собой 1% или более окрашивания, например 1, 5, 10, 20, 30,

40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% клеток внутри образца опухоли проявляют окрашивание. В некоторых вариантах реализации изобретения уровни ICOS можно измерять методом хромогенного ИГХ или иммунофлуоресцентного ИГХ (показатель Aqua).

Для образца, который "экспрессирует ICOS", или обладает "позитивным окрашиванием по ICOS", или является "ICOS-позитивным", понимается, что 1% или более клеток в образце проявляют окрашивание по ICOS. В некоторых вариантах реализации изобретения образец, являющийся ICOS-позитивным, проявляет, по меньшей мере, слабое, умеренное и/или сильное окрашивание клеток (основанное на мембранной экспрессии ICOS). Образец с умеренным или сильным окрашиванием клеток по ICOS также считается имеющим ^{"высоким"} ICOS".

Для образца, у которого имеется "низкий уровень PD-L1", или экспрессируется "PD-L1 на низком уровне", или имеется ^{"низкий"} PD-L1", понимается, что уровень PD-L1 находится ниже порогового уровня экспрессии для ракового заболевания, который является обычным показанием для лечения с помощью PD-1 терапии. В некоторых вариантах реализации изобретения "низкий уровень PD-L1" представляет собой такой, при котором менее 5% клеток в опухоли проявляют окрашивание мембран по PD-L1. В некоторых вариантах реализации изобретения "низкий уровень" по отношению к PD-L1 представляет собой менее 5% окрашивания, например 4, 3, 2, 1 или 0% клеток опухоли проявляют окрашивание. В некоторых вариантах реализации изобретения уровни PD-L1 можно измерять методом хромогенного ИГХ или иммунофлуоресцентного ИГХ (показатель Aqua). Об образце, который не экспрессирует выявляемого PD-L1, также можно сказать, что он "экспрессирует низкий уровень PD-L1". Таким образом, термином "низкий" охватывается невыявляемый PD-L1.

Образец, у которого имеется "повышенный уровень PD-L1", или "PD-L1 экспрессируется на повышенном уровне", или существует ^{"высокий"} PD-L1", означает, что уровень PD-L1 такой, что специалист в данной области может заключать, что рак можно лечить с помощью PD-1 терапии. В некоторых вариантах реализации изобретения "повышенный уровень PD-L1" представляет собой такой, при котором 5% или более клеток в опухоли проявляют окрашивание мембран по PD-L1. В некоторых вариантах реализации изобретения "высокий уровень" по отношению к PD-L1 представляет собой 5% или более окрашивания, например 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% клеток опухоли проявляют окрашивание. В некоторых вариантах реализации изобретения уровни PD-L1 можно измерять методом хромогенного ИГХ или иммунофлуоресцентного ИГХ (показатель Aqua).

Для образца, который "экспрессирует PD-L1", или обладает "позитивным окрашиванием по PD-L1", или является "PD-L1-позитивным", понимается, что 1% или более клеток проявляют окрашивание мембран по PD-L1. В некоторых вариантах реализации изобретения образец, являющийся PD-L1-позитивным, проявляет, по меньшей мере, слабое, умеренное и/или сильное окрашивание клеток (основанное на мембранной экспрессии PD-L1). Образец с умеренным или сильным окрашиванием клеток по PD-L1 также считается имеющим ^{"высокий"} PD-L1".

Для образца, в котором "отсутствует экспрессия PD-L1", или имеется "негативное окрашивание по PD-L1", или является "PD-L1-негативным", понимается, что экспрессия PD-L1 на поверхности клеток образца оказывается невыявляемой методом ИГХ, таким как хромогенный ИГХ или иммунофлуоресцентный ИГХ (показатель Aqua). PD-L1-негативный образец также считается ^{"низким"} PD-L1".

В некоторых вариантах реализации изобретения можно применять любой метод для измерения уровня PD-L1. В некоторых вариантах реализации изобретения он может включать использование ИГХ-исследования PD-L1 22C3 pharmDx (Dako Inc., г. Карпинтерия, штат Калифорния, США), которое является клинически валидированным и утвержденным FDA исследованием для оценки экспрессии PD-L1 при NSCLC. Анализ ИГХ PD-L1 22C3 pharmDx представляет собой качественный иммуногистохимический анализ, использующий моноклональное анти-PD-L1 антитело мыши (клон 22C3), который можно применять при выявлении белка PD-L1 в фиксированных формалином и залитых парафином (FFPE) тканях немелкоклеточного рака легкого (NSCLC). Данный анализ можно выполнять на системе Autostainer Link 48 и визуализировать с использованием системы Envision FLEX. Экспрессию белка PD-L1 количественно определяют с использованием опухолевого пропорционального показателя (TPS), который представляет собой процентное содержание жизнеспособных клеток опухоли, показывающих частичное или полное окрашивание мембран. В некоторых вариантах реализации изобретения образец считается PD-L1-позитивным, если TPS $\geq 50\%$ жизнеспособных клеток опухоли проявляет окрашивание мембран при любой интенсивности. Анализ ИГХ PD-L1 22C3 pharmDx показан как помощь для лечения пациентов с NSCLC с помощью KEYTRUDA® (пембролизумаб). Дополнительные подробности по системе присвоения показателей и ответной реакции на пембролизумаб описаны в статье Garon et al. (N. Engl. J. Med. 2015; 372:2018-28). В некоторых вариантах реализации изобретения образцы пациентов с NSCLC могут считаться позитивными по экспрессии PD-L1, если опухолевый пропорциональный показатель составляет $\geq 50\%$ от жизнеспособных клеток опухоли, проявляющих окрашивание мембраны (частичное или полное) при любой интенсивности (т.е. $\geq 1+$). В некоторых вариантах реализации изобретения это конкретно может относиться к антителу клона 22C3. В некоторых вариантах реализации изобретения, если TPS = от 5 до 50% жизнеспособных клеток опухоли проявляют окрашивание мембран при любой интенсивности,

то образец и/или пациент считается PD-L1-положительным. В некоторых вариантах реализации изобретения, если $TPS \geq 50\%$ жизнеспособных клеток опухоли проявляют окрашивание мембран при любой интенсивности, то образец и/или пациент считается ^{высоким} PD-L1.

Термин "контроль" относится к композиции, о которой известно, что она не содержит анализируемое вещество ("негативный контроль") или содержит анализируемое вещество ("позитивный контроль"). Позитивный контроль может содержать известную концентрацию анализируемого вещества. "Контроль", "позитивный контроль" и "калибровочный стандарт" может применяться в данном документе взаимозаменяемо по отношению к композиции, включающей известную концентрацию анализируемого вещества. "Позитивный контроль" может использоваться для определения рабочих характеристик анализа и является полезным индикатором чистоты реактивов (например, анализируемых веществ).

"Предопределенное граничное значение" и "предопределенный уровень" обычно относится к анализируемому граничному значению, которое используется для оценки результатов диагностической/прогностической/терапевтической эффективности путем сравнения результатов анализа по предопределенному граничному значению/уровню, которое уже было связано или ассоциировано с различными клиническими параметрами (например, тяжестью заболевания, прогрессированием/отсутствием прогрессирования/улучшением и т.д.). Поскольку в настоящем описании могут обеспечиваться типовые предопределенные уровни, хорошо известно, что граничные значения могут изменяться в зависимости от природы иммуноанализа (например, примененных антител и т.п.). Дополнительно специалисту в данной области техники хорошо удается адаптировать описание данного документа для других иммуноанализов для получения специфических для иммуноанализов граничных значений для других иммуноанализов на основе этого описания. В то время как точное значение предопределенного граничного значения/уровня может варьировать между анализами, обычно можно применять корреляции (если существуют), как описано в данном документе.

Термин "ингибирование" или "ингибировать" относится к уменьшению или прекращению любой фенотипической характеристики или уменьшению или прекращению встречаемости, степени или вероятности такой характеристики. Под термином "уменьшать" или "ингибировать" понимается уменьшение, снижение или блокировка активности, функционирования и/или количества по сравнению с эталоном. В некоторых вариантах реализации изобретения "уменьшать" или "ингибировать" означает возможность вызывать общее уменьшение на 20% или более. В некоторых вариантах реализации изобретения "уменьшать" или "ингибировать" означает возможность вызывать общее уменьшение на 50% или более. В некоторых вариантах реализации изобретения "уменьшать" или "ингибировать" означает возможность вызывать общее уменьшение на 75, 85, 90, 95% или более. В некоторых вариантах реализации изобретения количество, отмеченное выше, ингибируется или уменьшается в течение некоторого времени относительно контрольной дозы (такой как плацебо) в течение того же периода времени. Как используется в данном документе, "эталонный образец" относится к любому образцу, стандарту или уровню, который используется для целей сравнения. Эталон можно получать из образца, полученного от здорового и/или не заболевшего субъекта. В некоторых примерах эталон можно получать из образца, полученного от не лечившегося субъекта. В некоторых примерах эталон получают из образца от не заболевшего или не лечившегося субъекта-индивида. В некоторых примерах образец получают от одного или более здоровых индивидов, не являющихся субъектом или пациентом.

Как используется в данном документе, "задержка развития заболевания" означает отсрочку, мешающее влияние, замедление, задержку, стабилизацию, подавление и/или отдаление сроков развития заболевания (такого как рак). Эта задержка может быть различной по времени, в зависимости от истории болезни и/или индивида, подвергаемого лечению. Как очевидно специалисту в данной области техники, достаточная или значительная задержка фактически может охватывать понятие профилактики, при которой у индивида не развивается заболевание. Например, возможна задержка развития поздней стадии рака, например развития метастазов.

"Предотвращение", как используется в данном документе, включает предоставление профилактики применительно к возникновению или повторному проявлению заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого еще не диагностировали данное заболевание. Если только не указано иное, термины "снижать", "ингибировать" или "предотвращать" не отмечают или требуют полного предотвращения на все время.

Как используется в данном документе, "подавлять" функционирование или активность означает снижать функционирование или активность по сравнению в другом случае с аналогичными условиями, за исключением интересующего условия или параметра, или в альтернативном варианте по сравнению с другим условием. Например, антитело, которое подавляет рост опухоли, снижает скорость роста опухоли по сравнению со скоростью роста опухоли в отсутствие антитела.

"Терапевтически эффективное количество" вещества/молекулы, агониста или антагониста может варьировать в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст, пол и масса тела индивида, и способности вещества/молекулы, агониста или антагониста вызывать требуемую реакцию в организме индивида. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором любые токсические или вредные эффекты вещества/молекулы, агониста или антагониста пере-

вешиваются терапевтически полезными эффектами.

Терапевтически эффективное количество может доставляться за одно или более введений. "Терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического и/или профилактического результата.

"Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого профилактического результата. Поскольку профилактическую дозу используют для субъектов, находящихся до заболевания или его на ранней стадии, обычно, но не обязательно, профилактически эффективное количество оказывается меньше терапевтически эффективного количества.

Термин "фармацевтический состав" или "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечить биологическую активность активного(ых) ингредиента(ов), и не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, которому должен вводиться данный состав. Такие составы могут быть стерильными.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксическому твердому, мягкому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу, вспомогательному веществу состава или носителю, принятому в данной области техники, для применения с лекарственным средством, которые вместе составляют "фармацевтический состав" для введения субъекту. Фармацевтически приемлемый носитель обычно является нетоксичным для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и является совместимым с другими ингредиентами состава. Фармацевтически приемлемый носитель является соответствующим для применяемой лекарственной формы.

"Стерильный" состав является аспептическим или, по существу, не содержит живых микроорганизмов и их спор.

"Терапия PD-1" охватывает любую терапию, которая модулирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2. Лекарственные средства PD-1 могут, к примеру, непосредственно взаимодействовать с PD-1 и/или PD-L1. В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственное средство PD-1 включает молекулу, которая непосредственно связывается с PD-1 и/или влияет на его активность. В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственное средство PD-1 включает молекулу, которая непосредственно связывается с PD-L1 и/или влияет на его активность. Таким образом, антитело, которое связывается с PD-1 или PD-L1 и блокирует взаимодействие PD-1 с PD-L1, является лекарственным средством по отношению к PD-1. Когда подразумевается терапия для требуемого подтипа PD-1, то она будет обозначена фразой "специфическая к PD-1" для лекарственного средства, содержащего молекулу, которая непосредственно взаимодействует с PD-1, или "специфическая к PD-L1" для молекулы, которая непосредственно взаимодействует с PD-L1, соответственно. Если только не указано иное, все описание, содержащееся в данном документе касательно терапии PD-1, применяется обычно к терапии PD-1, а также к специфической к PD-1 и/или специфической к PD-L1 терапиям. Неограничивающие типовые лекарственные средства для PD-1 терапии включают ниволумаб (анти-PD-1 антитело; BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538; OPDIVO®; Bristol-Myers Squibb); пидолизумаб (анти-PD-1 антитело, CureTech), пембролизумаб (анти-PD-1 антитело; KEYTRUDA®, MK-3475, ламбролизумаб); дурвалумаб (анти-PD-L1 антитело, MEDI-4736; AstraZeneca/MedImmune); RG-7446; MSB-0010718C; AMP-224; BMS-936559 (анти-PD-L1 антитело; Bristol-Myers Squibb); AMP-514; MDX-1105; ANB-011; анти-LAG-3/PD-1; анти-PD-1 Ab (CoStim); анти-PD-1 Ab (Kadmon Pharm.); анти-PD-1 Ab (Immunovo); анти-TIM-3/PD-1 Ab (AnaptysBio); анти-PD-L1 Ab (CoStim/Novartis); атезолизумаб (анти-PD-L1 антитело, Genentech/Roche); авелумаб (анти-PD-L1 антитело, MSB0010718C, Pfizer); KD-033, антагонист PD-1 (Agenus); STI-A1010; STI-A1110; TSR-042 и другие антитела, направленные против белка программированной гибели-1 (PD-1) или лиганда белка программированной гибели 1 (PD-L1).

Термин "ингибитор IDO" относится к средству, способному к ингибированию активности индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) и, тем самым, сохранению IDO-опосредованной иммуносупрессии. Ингибитор IDO может ингибировать IDO1 и/или IDO2 (INDOL1). Ингибитор IDO может быть обратимым или необратимым ингибитором IDO. "Обратимый ингибитор IDO" представляет собой соединение, которое необратимо ингибирует ферментную активность IDO, либо в каталитическом участке, либо в некаталитическом участке, а "необратимый ингибитор IDO" представляет собой соединение, которое необратимо ингибирует ферментную активность IDO путем образования ковалентной связи с данным ферментом. Неограничивающие типовые ингибиторы IDO включают индоксимод (New Link Genetics), INCB024360 (Incyte Corp), 1-метил-D-триптофан (New Link Genetics) и GDC-0919 (Genentech).

"Терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором" или "терапия CAR-T" относится к лекарственному средству, содержащему генетически модифицированные Т-клетки для экспрессии рецептора, который распознает антиген, экспрессируемый опухолевой клеткой. Антиген может быть антигеном, специфически экспрессируемым опухолью, или антигеном, экспрессируемым как злокачественными клетками, так и здоровыми тканями. В некоторых вариантах реализации изобретения терапия CAR-T представляет собой адоптивную терапию CAR-T, при которой удаляют Т-клетки пациентов и модифици-

руют их для экспрессии химерного антигенного рецептора, а затем возвращают их пациенту. См., например, Dai et al., 2016, *J. Natl. Cancer. Inst.*, 108 (7): djv439, doi:10.1093/jnci/djv439; Gill et al., 2015, *Blood Rev.*, pii:S0268-960X(15)00080-6, doi:10.1016/j.blre.2015.10.003; Gill et al., 2015, *Immunol. Rev.*, 263 (1):68-89. doi:10.1111/imr.12243.

Введение "в комбинации с" одним или более дополнительными лекарственными средствами включает одновременное (параллельное) введение и последовательное введение в любом порядке.

Термин "параллельно" используется в данном документе касательно введения двух или более лекарственных средств, когда по меньшей мере часть введения перекрывается по времени или когда одно лекарственное средство попадает в короткий период времени относительно введения другого лекарственного средства. Например, два или более лекарственных средств вводят с разделением по времени на не более чем около определенного количества минут.

Термин "последовательно" используется в данном документе касательно введения двух или более лекарственных средств, когда введение одного или более средств продолжается после прекращения введения одного или более других средств, или при этом введение одного или более средств начинается перед введением одного или более других средств. Например, введение двух или более лекарственных средств проводят с разделением по времени на не более чем около определенного количества минут.

Как используется в данном документе, термин "совместно с" относится к применению одного способа лечения в дополнение к другому способу лечения. Таким образом, "совместно с" относится к проведению одного способа лечения до, во время или после проведения другого способа лечения у индивида.

Термин "вкладыш в упаковку" используется для инструкций, в обычном порядке вкладываемых в упаковки терапевтических продуктов для продажи, содержащие информацию о показаниях, применении, дозировке, приеме, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предостережениях, касающихся применения таких терапевтических продуктов.

"Изделие" представляет собой любое изделие (например, пакет или контейнер) или набор, содержащий по меньшей мере один реактив, например лекарственное средство для лечения заболевания или нарушения (например, рака), или зонд для специфического обнаружения биомаркера, описанного в данном документе. В некоторых вариантах реализации изделие или набор популяризируют, распространяют или продают в виде блока для осуществления способов, описанных в данном документе.

Термин "метка" и "выявляемая метка" означает фрагмент, присоединенный к антителу или его анализируемому веществу для прохождения выявляемой реакции (например, связывания) между представителями специфически связывающейся пары. Меченый представитель специфически связывающейся пары называется "выявляемой меткой". Таким образом, термин "меченый связывающий белок" относится к белку с меткой, включенной так чтобы обеспечивать идентификацию связывающего белка. В некоторых вариантах реализации изобретения метка представляет собой выявляемый маркер, который может генерировать сигнал, выявляемый путем визуальных или инструментальных средств, например внедрения радиоизотопно-меченой аминокислоты или присоединения к полипептиду фрагментов биотина, которые могут выявляться маркированным авидином (например, стрептавидином, содержащим флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которую можно выявлять оптическими или калориметрическими методами). Примеры меток для полипептидов включают, но не ограничиваются ими, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho или ^{153}Sm); хромогены, флуоресцентные метки (например, ФИТЦ, родамин, люминофоры на основе комплексов лантанидов), ферментные метки (например, пероксидаза хрена, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные маркеры, биотинильные группы; predetermined полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновых молний, участки связывания вторичных антител, металлсвязывающие домены, эпитопные метки) и магнитные средства, такие как хелаты гадолиния. Репрезентативные примеры меток, обычно применяемых для иммуноанализов, включают фрагменты, которые создают свет, например соединения акридина, и фрагменты, которые создают флуоресценцию, например флуоресцеин. В связи с этим, сам по себе фрагмент может не быть выявляемо меченым, но может становиться выявляемым при реакции с еще одним фрагментом.

Термин "конъюгат" относится к антителу, которое химически связано со вторым химическим фрагментом, таким как терапевтическое или цитотоксическое средство. Термин "средство" включает химическое соединение, смесь химических соединений, биологическую макромолекулу или экстракт, полученный из биологических материалов. В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственные или цитотоксические средства включают, но не ограничиваются ими, коклюшный токсин, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи. Применительно к контексту иммуноанализа конъюгат антитела может быть выявляемо меченым антителом, используемым как антитело для выявления.

II. Анти-ICOS антитела.

Предложены новые антитела, направленные против ICOS. Анти-ICOS антитела включают, но не ограничиваются ими, гуманизированные антитела, химерные антитела, антитела мыши, антитела челове-

ка и антитела, содержащие тяжелую цепь и/или легкую цепь CDR, обсуждаемые в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое связывается с ICOS. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено моноклональное антитело, которое связывается с ICOS. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело представляет собой анти-ICOS антитело-агонист. В некоторых вариантах реализации изобретения введение анти-ICOS антител, описанных в данном документе, увеличивает количество Teff-клеток, активирует Teff-клетки, истощает Treg-клетки в организме субъекта и/или увеличивает соотношение Teff-клеток к Treg-клеткам. В некоторых вариантах реализации изобретения Treg-клетки являются CD4+ FoxP3+ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD8+ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD4+ FoxP3- Т-клетками и CD8+ Т-клетками.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело содержит по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или шесть CDR, выбранных из таких: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; (d) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; (e) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; и (f) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело содержит по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или шесть CDR, выбранных из таких: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; (d) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; (e) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; и (f) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело содержит шесть CDR, включающих: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; (d) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65; (e) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; и (f) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело содержит по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или шесть CDR, выбранных из таких: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, 62, 72, 82, 92, 102 и 112; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23, 63, 73, 83, 93, 103 и 113; (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 24, 64, 74, 84, 94, 104 и 114; (d) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 25, 65, 75, 85, 95, 105 и 115; (e) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 26, 66, 76, 86, 96, 106 и 116; и (f) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 27, 67, 77, 87, 97, 107 и 117.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело содержит по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или шесть CDR, выбранных из таких: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32, 162, 172 и 182; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 33, 163, 173 и 183; (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 34, 164, 174 и 184; (d) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 35, 165, 175 и 185; (e) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 36, 166, 176 и 186; и (f) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 37, 167, 177 и 187.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело содержит по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или шесть CDR, выбранных из таких: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 52, 122, 132, 142 и 152; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 53, 123, 133, 143 и 153; (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 54, 124, 134, 144 и 154; (d) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 55, 125, 135, 145 и 155; (e) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 56, 126, 136, 146 и 156; и (f) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 57, 127, 137, 147 и 157.

В некоторых вариантах реализации анти-ICOS антитело содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь, содержащую переменный участок тяжелой цепи и по меньшей мере часть константного участка тяжелой цепи, и по меньшей мере одну легкую цепь, содержащую переменный участок легкой цепи и по меньшей мере часть константного участка

одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL CDR, выбранные из таких: (d) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165; (e) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166; и (f) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 167.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело содержит (I) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности CDR VH, выбранные из таких: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 172; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 173; и (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 174; и (II) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL CDR, выбранные из таких: (d) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 175; (e) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 176; и (f) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 177.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело содержит (I) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности CDR V_H, выбранные из таких: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 182; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183; и (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 184; и (II) домен V_L, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности CDR V_L, выбранные из таких: (d) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 185; (e) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186; и (f) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 187.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело содержит последовательность варибельного домена тяжелой цепи (VH), обладающую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность VH, обладающая по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции по сравнению с эталонной последовательностью, однако анти-ICOS антитело, содержащее указанную последовательность, сохраняет способность связываться с ICOS. В некоторых вариантах реализации изобретения были заменены, вставлены и/или удалены всего от 1 до 10 аминокислот из SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180. В некоторых вариантах реализации замены, вставки или делеции присутствуют на участках, расположенных вне CDR (т.е. в FR). Необязательно анти-ICOS антитело содержит последовательность VH в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180, включая пост-трансляционные модификации указанной последовательности.

В некоторых вариантах реализации изобретения VH содержит: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах реализации изобретения VH содержит: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах реализации изобретения VH содержит: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах реализации изобретения VH содержит: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; и (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах реализации изобретения VH содержит: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53; и (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах реализации изобретения VH содержит: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

В некоторых вариантах реализации изобретения VH содержит: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73; и (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах реализации изобретения VH содержит: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83; и (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.

В некоторых вариантах реализации изобретения VH содержит: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность

ность SEQ ID NO: 76; и (c) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах реализации изобретения VL содержит: (a) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; (b) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86; и (c) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах реализации изобретения VL содержит: (a) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; (b) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; и (c) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97.

В некоторых вариантах реализации изобретения VL содержит: (a) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105; (b) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; и (c) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107.

В некоторых вариантах реализации изобретения VL содержит: (a) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115; (b) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116; и (c) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117.

В некоторых вариантах реализации изобретения VL содержит: (a) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125; (b) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126; и (c) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127.

В некоторых вариантах реализации изобретения VL содержит: (a) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135; (b) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136; и (c) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137.

В некоторых вариантах реализации изобретения VL содержит: (a) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145; (b) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146; и (c) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147.

В некоторых вариантах реализации изобретения VL содержит: (a) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155; (b) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156; и (c) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157.

В некоторых вариантах реализации изобретения VL содержит: (a) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165; (b) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166; и (c) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 167.

В некоторых вариантах реализации изобретения VL содержит: (a) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 175; (b) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 176; и (c) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 177.

В некоторых вариантах реализации изобретения VL содержит: (a) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 185; (b) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186; и (c) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 187.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи (V_H), обладающую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180, и переменного домена легкой цепи (V_L), обладающую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 или 181. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность V_H , обладающая по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, или 99% идентичностью, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, и последовательность V_L , обладающая по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью, содержит замены (например, консервативные замены), инсерции или делеции относительно эталонной последовательности, но анти-ICOS антитело, содержащее указанную последовательность, сохраняет способность связываться с ICOS. В некоторых вариантах реализации изобретения были заменены, вставлены и/или удалены всего от 1 до 10 аминокислот из SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180. В некоторых вариантах реализации изобретения были заменены, вставлены и/или удалены всего от 1 до 10 аминокислот из SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 или 181. В некоторых вариантах реализации замены, вставки или делеции присутствуют на участках, расположенных вне CDR (т.е. в FR). Необязательно анти-ICOS антитело содержит последовательность V_H в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180, и последовательность V_L SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 или 181, включая посттрансляционные модификации одной или обеих последовательностей.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело содержит (I) домен V_H , содержащий: (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 13; и (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и (II) домен V_L , содержащий: (d) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; (e) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; и (f) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 17.

тельностью. В одном варианте реализации изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте реализации изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 71 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте реализации изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 81 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте реализации изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 90 и SEQ ID NO: 91 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте реализации изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 101 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте реализации изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 110 и SEQ ID NO: 111 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте реализации изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 121 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте реализации изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 130 и SEQ ID NO: 131 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте реализации изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 141 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте реализации изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 150 и SEQ ID NO: 151 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте реализации изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 160 и SEQ ID NO: 161 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте реализации изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 170 и SEQ ID NO: 171 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте реализации изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 180 и SEQ ID NO: 181 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложены антитела, которые конкурируют за связывание с ICOS с анти-ICOS антителами, предложенными в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела конкурируют за связывание с ICOS с анти-ICOS антителами, предложенными в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения для идентификации моноклональных антител, которые конкурируют за связывание с ICOS с анти-ICOS антителами, описанными в данном документе (такими как 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 или 35A9S89), можно применять конкурентные анализы. Для определения того, связываются ли два антитела с одним и тем же эпитопом путем распознавания идентичных или пространственно перекрывающихся эпитопов, или того что одно антитело конкурентно ингибирует связывание другого антитела с антигеном, можно использовать конкурентные анализы. В некоторых вариантах реализации изобретения такое конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом, который связывается антителом, описанным в данном документе. Типовые конкурентные анализы включают, но не ограничиваются, обычными анализами, такими как предложенные в Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Подробные примеры методы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," в *Methods in Molecular Biology* vol.66 (Humana Press, Totowa, N.J.). В некоторых вариантах реализации изобретения указывается, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если каждое из них блокирует связывание другого на 50% или больше. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, которое конкурирует с анти-ICOS антителом, описанным в данном документе, представляет собой химерное, гуманизованное или человеческое антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено антитело, которое конкурирует с химерным, гуманизованным или человеческим анти-ICOS антителом, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложены антитела, которые связываются с любым одним или более из указанных эпитопов, что и антитела, предложенные в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения предложены антитела, которые связывают и перекрывают эпитоп, с которым связываются данные антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено антитело, которое конкурирует по меньшей мере с одним из антител, предложенных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено антитело, которое конкурирует по меньшей мере с двумя из антител, предложенных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено антитело, которое конкурирует по меньшей мере с тремя из антител, предложенных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело связывается с перекрывающимся эпитопом, как антитело, описанное в примерах данного документа. В некото-

рых вариантах реализации изобретения конкурирующим антителом связывается и/или блокируется целый эпитоп. В некоторых вариантах реализации изобретения конкурирующим антителом связывается и/или блокируется часть эпитопа. В некоторых вариантах реализации изобретения паратоп конкурирующего антитела связывается по меньшей мере с частью эпитопа антитела, предложенного в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения паратоп конкурирующего антитела связывает мишень, а отличающаяся область структуры конкурирующего антитела блокирует по меньшей мере часть эпитопа антитела, предложенного в данном документе.

Типовые химерные антитела.

В некоторых вариантах реализации антитело, предложенное в данном документе, представляет собой химерное антитело. Некоторые химерные антитела описаны, например, в патенте США № 4816567 и Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). В одном примере химерное антитело содержит вариабельный участок нечеловеческого происхождения (например, вариабельный участок, происходящий от антитела мыши, крысы, хомяка, кролика или примата, не являющегося человеком, например обезьяны) и константный участок человека. В дополнительном примере химерное антитело представляет собой антитело с "переклоченным классом", в котором изменен класс или подкласс по сравнению с исходным антителом. Термин "химерные антитела" включают антигенсвязывающие фрагменты таких антител.

Неограничивающие типовые химерные антитела включают химерные антитела, содержащие вариабельные участки тяжелой и/или легкой цепи антитела, выбранного из 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 или 35A9S89. Дополнительные неограничивающие типовые химерные антитела включают химерные антитела, содержащие CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и/или CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела, выбранного из 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 или 35A9S89. Еще дополнительные неограничивающие типовые химерные антитела включают химерные антитела, содержащие CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и/или CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела, выбранного из 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 или 35A9S89. В некоторых вариантах реализации изобретения химерное анти-ICOS антитело содержит вариабельные участки, описанные выше, и связывается с ICOS. В некоторых вариантах реализации изобретения химерное анти-ICOS антитело содержит вариабельные участки, описанные выше, связывается с ICOS и увеличивает количество Teff-клеток, и/или активирует Teff-клетки, и/или уменьшает количество Treg-клеток, и/или увеличивает соотношение Teff-клеток к Treg-клеткам. В некоторых вариантах реализации изобретения Treg-клетки являются CD4+ FoxP3+ T-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD4+ FoxP3- T-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD8+ T-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD4+ FoxP3- T-клетками и CD8+ T-клетками.

В некоторых вариантах реализации изобретения химерное анти-ICOS антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность вариабельного участка, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180, причем данное антитело связывает ICOS. В некоторых вариантах реализации изобретения химерное анти-ICOS антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность вариабельного участка, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 или 181, причем данное антитело связывает ICOS. В некоторых вариантах реализации изобретения химерное анти-ICOS антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность вариабельного участка, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 и 180; и легкую цепь, содержащую последовательность вариабельного участка, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 и 181; причем данное антитело связывает ICOS.

Типовые химерные анти-ICOS антитела также включают химерные антитела, которые конкурируют за связывание с ICOS с антителом или его фрагментом, описанными в данном документе. Таким обра-

зом, в некоторых вариантах реализации изобретения предложено химерное анти-ICOS антитело, которое конкурирует за связывание с ICOS с антителом, выбранным из 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 и 35A9S89 или его фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения данное антитело конкурирует за связывание с ICOS и увеличивает количество Teff-клеток, и/или активирует Teff-клетки, и/или уменьшает количество Treg-клеток, и/или увеличивает соотношение Teff-клеток к Treg-клеткам. В некоторых вариантах реализации изобретения Treg-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD8⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁻ Т-клетками и CD8⁺ Т-клетками.

В некоторых вариантах реализации изобретения химерное антитело, описанное в данном документе, содержит один или более константных участков человека. В некоторых вариантах реализации изобретения константный участок тяжелой цепи представляет собой изотип, выбранный из IgA, IgG и IgD. В некоторых вариантах реализации изобретения константный участок легкой цепи представляет собой изотип, выбранный из κ и λ. В некоторых вариантах реализации изобретения химерное антитело, описанное в данном документе, содержит константный участок IgG человека. В некоторых вариантах реализации изобретения химерное антитело, описанное в данном документе, содержит константный участок тяжелой цепи IgG4 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения химерное антитело, описанное в данном документе, содержит константный участок IgG4 человека и легкую цепь к человеку.

Как отмечено выше, то, будет востребована эффекторная функция или нет, может зависеть от конкретного способа обработки, предполагаемого для антитела. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения, когда требуется эффекторная функция, выбирают химерное анти-ICOS антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи IgG1 человека или константный участок тяжелой цепи IgG3 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, когда не требуется эффекторная функция, выбирают химерное анти-ICOS антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи IgG4 или IgG2 человека.

Типовые гуманизированные антитела.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложены гуманизированные антитела, которые связывают ICOS. Гуманизированные антитела применяются в качестве терапевтических молекул, поскольку гуманизированные антитела снижают или исключают иммунный ответ человека по сравнению с антителами нечеловеческого происхождения, которые могут приводить к иммунному ответу к лекарственным средствам на основе антител (таким как ответ организма человека против антител мыши (КАМА)) и снижать эффективность данного терапевтического средства.

В некоторых вариантах реализации химерное антитело представляет собой гуманизированное антитело. Как правило, антитело нечеловеческого происхождения гуманизируют с целью снижения иммуногенности для человека, сохраняя при этом специфичность и аффинность исходного антитела нечеловеческого происхождения. Обычно гуманизированное антитело содержит один или более переменных доменов, в которых CDR (или их части) происходят от антитела нечеловеческого происхождения, а FR (или их части) происходят от последовательностей антитела человека. Необязательно гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константного участка антитела человека. В некоторых вариантах реализации изобретения некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками антитела нечеловеческого происхождения (например, антитела, из которого получены остатки CDR), например, с целью восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Гуманизированные антитела и способы их получения рассмотрены, например, в Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633 и дополнительно описаны, например, в Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-329; Queen et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033; патенты США №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri et al. (2005) *Methods* 36:25-34; Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498 (описание "изменения поверхности"); Dall'Acqua et al., (2005) *Methods* 36:43-60 (описание "перетасовки FR"); и Osbourn et al. (2005) *Methods* 36:61-68 и Klimka et al. (2000) *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (описание подхода "направленного отбора" к перетасовке FR).

Человеческие каркасные участки, которые могут быть использованы для гуманизации, включают, но не ограничиваются ими, каркасные участки, отобранные с использованием способа "максимального соответствия" (см., например, Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2296); каркасные участки, происходящие от консенсусной последовательности антител человека конкретной подгруппы переменных участков легкой или тяжелой цепи (см., например, Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; и Presta et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623); зрелые (содержащие соматические мутации) каркасные участки человека или эмбриональные каркасные участки человека (см., например, Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633); и каркасные участки, полученные при скрининге библиотек FR (см., например, Vasa et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 и Rosok et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618).

Неограничивающие типовые гуманизированные антитела включают 37A10S713, 37A10S714,

37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 и 35A9S89, описанные в данном документе.

Неограничивающие типовые гуманизированные антитела также включают антитела, содержащие переменный участок тяжелой цепи антитела, выбранного из 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 и 35A9S89, и/или переменный участок легкой цепи антитела, выбранного из 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 и 35A9S89. Неограничивающие типовые гуманизированные антитела включают антитела, содержащие переменный участок тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 и 180, и/или переменный участок легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 и 181. Типовые гуманизированные антитела также включают, но не ограничиваются ими, гуманизированные антитела, содержащие CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и/или CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела, выбранного из 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 и 35A9S89. В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизированное анти-ICOS антитело содержит CDR, описанные выше, и связывается с ICOS. В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизированное анти-ICOS антитело содержит CDR, описанные выше, связывается с ICOS и увеличивает количество Тeff-клеток, и/или активирует Тeff-клетки, и/или уменьшает количество Тreg-клеток, и/или увеличивает соотношение Тeff-клеток к Тreg-клеткам. В некоторых вариантах реализации изобретения Тreg-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Тeff-клетки являются CD8⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Тeff-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁻ Т-клетками и CD8⁺ Т-клетками.

В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизированное анти-ICOS антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и/или CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела, выбранного из 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 и 35A9S89.

В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизированное анти-ICOS антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность переменного участка, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 и 180, и причем данное антитело связывает ICOS. В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизированное анти-ICOS антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность переменного участка, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 и 181, причем данное антитело связывает ICOS. В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизированное анти-ICOS антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность переменного участка, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 и 180; и легкую цепь, содержащую последовательность переменного участка, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 и 181; причем данное антитело связывает ICOS.

В некоторых вариантах реализации изобретения сохраняется любая одна или более из последовательностей CDR, предложенных в данном документе, при этом остается участок тяжелой, легкой или тяжелой и легкой цепей (который представляет собой, FR1, FR2, FR3 и FR4), имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 и 181.

В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизированное анти-ICOS антитело содержит по меньшей мере один из CDR, обсуждаемых в данном документе. Иначе говоря, в некоторых вариантах реализации изобретения гуманизированное анти-ICOS антитело содержит по меньшей мере один CDR, выбранный из CDR1 тяжелой цепи, обсуждаемого в данном документе, CDR2 тяжелой цепи, обсуждаемого в данном документе, CDR3 тяжелой цепи, обсуждаемого в данном документе, CDR1 легкой цепи, обсуждаемого в данном документе, CDR3 легкой цепи, обсуждаемого в данном документе, и CDR3, об-

суждаемого в данном документе. Дополнительно в некоторых вариантах реализации изобретения, гуманизированное анти-ICOS антитело содержит по меньшей мере один мутировавший CDR на основе CDR, обсуждаемого в данном документе, причем мутировавший CDR содержит 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены относительно CDR, обсуждаемого в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более из аминокислотных замен являются консервативными аминокислотными заменами. Специалист в данной области техники может выбирать одну или более подходящих консервативных аминокислотных замен для конкретной последовательности CDR, причем предположительно подходящие консервативные аминокислотные замены значительно не изменяют свойства связывания антитела, содержащего мутировавший CDR.

Типовые гуманизированные анти-ICOS антитела также включают антитела, которые конкурируют за связывание с ICOS с антителом или его фрагментом, описанными в данном документе. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения предложено гуманизированное анти-ICOS антитело, которое конкурирует за связывание с ICOS с антителом или его фрагментом, выбранным из 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 и 35A9S89 или его фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено гуманизированное анти-ICOS антитело, которое конкурирует за связывание с ICOS с антителом или его фрагментом, выбранным из 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 и 35A9S89, и увеличивает количество Teff-клеток, и/или активирует Teff-клетки, и/или уменьшает количество Treg-клеток, и/или увеличивает соотношение Teff-клеток к Treg-клеткам. В некоторых вариантах реализации изобретения Treg-клетки являются CD4+ FoxP3+ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD8+ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD4+ FoxP3- Т-клетками и CD8+ Т-клетками.

В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизированное анти-ICOS антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 188, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189.

Типовые антитела человека.

В некоторых вариантах реализации анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, представляет собой антитело человека. Антитела человека можно получать, используя различные методики, известные в данной области техники.

Человеческие антитела описаны в общих чертах в публикации van Dijk and van de Winkel, (2001) *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-374 и Lonberg, (2008) *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459. В некоторых вариантах реализации антитело человека не является антителом природного происхождения. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело человека представляет собой моноклональное антитело; таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения каждое из антител человека в наборе может связываться с таким же эпитопом на антигене.

Антитела человека можно получать путем введения иммуногена трансгенному животному, модифицированному с целью продукции интактных антител человека или интактных антител с переменными участками человека в ответ на антигенную стимуляцию. Такие животные, как правило, содержат все или часть локусов иммуноглобулинов человека, замещающих эндогенные локусы иммуноглобулинов или локализованных вне хромосом, или случайным образом интегрированных в хромосомы животного. Обычно у таких трансгенных мышей инактивированы эндогенные локусы иммуноглобулинов. Обзор способов получения человеческих антител с использованием трансгенных животных см. в Lonberg, (2005) *Nat. Biotech.* 23: 1117-1125. См. также, например, патенты США №№ 6075181 и 6150584, описывающие технологию XENOMOUSE™; патент США № 5770429, описывающий технологию HUMAB®; патент США № 7041870, описывающий технологию K-M MOUSE® и публикацию заявки на патент США № US 2007/0061900, описывающую технологию VELOCIMOUSE®). Переменные участки человека из интактных антител, генерируемых такими животными, можно дополнительно модифицировать, например, путем объединения с другим константным участком человека.

Антитела человека также можно получать с помощью способов на основе гибридом. Описаны линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для продукции моноклональных антител человека. (см., например, Kozbor (1984) *J. Immunol.*, 133:3001; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); и Boerner et al. (1991) *J. Immunol.*, 147:86). Человеческие антитела, полученные посредством технологии на основе В-клеточной гибридомы человека, также описаны в Li et al. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562. Дополнительные способы включают, например, способы, описанные в патенте США № 7189826 (в котором описана продукция моноклональных IgM-антител человека гибридными линиями клеток) и в работе Ni, (2006) *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (в которой описаны полностью человеческие гибридомы). Технология на основе гибридом человека (технология триом) также описана в статьях Vollmers and Brandlein, (2005) *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) и Vollmers and Brandlein, (2005) *Methods*

and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-191.

Антитела человека также можно получать путем выделения Fv-клона последовательностей варибельного домена, выбранных из библиотек фагового дисплея человеческого происхождения. Такие последовательности варибельного домена затем можно объединять с требуемым константным доменом человека. Методики отбора антител человека из библиотек антител описаны ниже.

Антитело можно выделять путем скрининга комбинаторных библиотек на предмет антител с требуемой активностью или активностями. Например, в данной области техники известны различные способы получения библиотек фагового дисплея и скрининг таких библиотек на предмет антител, обладающих требуемыми характеристиками связывания. Такие методы рассмотрены, например, в публикации Hoogenboom et al., в *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) и дополнительно описаны, например, в McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554; Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Marks et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; Marks and Bradbury, в *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310; Lee et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093; Fellouse, (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472; и Lee et al. (2004) *J. Immunol. Methods* 284 (1-2): 119-132 и публикации согласно РСТ WO 99/10494.

В некоторых способах на основе фагового дисплея репертуары генов V_H и V_L по отдельности клонируют посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) и случайным образом рекомбинируют в фаговых библиотеках, которые затем можно подвергать скринингу на наличие антигенсвязывающего фага, как описано в Winter et al. (1994) *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455. Фаг обычно отображает фрагменты антитела в виде одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv) или Fab-фрагментов. Библиотеки из иммунизированных источников позволяют получать антитела с высокой аффинностью к иммуногену без необходимости конструирования гибридом. В альтернативном варианте можно клонировать наивный репертуар (например, человека) для получения единого источника антител к широкому спектру чужеродных антигенов и аутоантигенов без иммунизации, как описано в работе Griffiths et al., (1993) *EMBO J.* 12:725-734. Наконец, наивные библиотеки можно также получать путем синтеза, клонируя сегменты V-генов стволовых клеток, не подвергавшиеся реаранжировке, и используя ПЦР-праймеры, содержащие случайную последовательность для кодирования гиперварибельных участков CDR3 и осуществления реаранжировки *in vitro*, как описано в работе Hoogenboom and Winter (1992), *J. Mol. Biol.*, 227:381-388. Патентные публикации, в которых описаны фаговые библиотеки антител человека, включают, например, патент США № 5750373 и публикации патентов США №№ 20050079574, 20050119455, 20050266000, 20070117126, 20070160598, 20070237764, 20070292936 и 20090002360.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело человека связывается с полипептидом, имеющим последовательность SEQ ID NO: 1 или 2. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело человека связывается с ICOS и увеличивает количество Teff-клеток, и/или активирует Teff-клетки, и/или уменьшает количество Treg-клеток, и/или увеличивает соотношение Teff-клеток к Treg-клеткам. В некоторых вариантах реализации изобретения Treg-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁺ T-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD8⁺ T-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁻ T-клетками и CD8⁺ T-клетками.

Типовые анти-ICOS антитела человека также включают антитела, которые конкурируют за связывание с ICOS с антителом человека или его фрагментом, описанными в данном документе. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения предложено анти-ICOS антитело человека, которое конкурирует за связывание с ICOS с антителом или его фрагментом, выбранным из 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 и 35A9S89, или его фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено анти-ICOS антитело человека, которое конкурирует за связывание с ICOS с антителом или его фрагментом, выбранным из 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 и 35A9S89, и увеличивает количество Teff-клеток, и/или активирует Teff-клетки, и/или уменьшает количество Treg-клеток, и/или увеличивает соотношение Teff-клеток к Treg-клеткам. В некоторых вариантах реализации изобретения Treg-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁺ T-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD8⁺ T-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁻ T-клетками и CD8⁺ T-клетками.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложено химерное анти-ICOS антитело человека, причем данное антитело содержит варибельный участок из антитела человека, который связывает ICOS и константный участок из другого антитела человека. В некоторых вариантах реализации изобретения предложено химерное анти-ICOS антитело человека, причем данное антитело содержит CDR из антитела человека, который связывает ICOS и каркасный участок из другого антитела человека. В некоторых вариантах реализации антитело не является человеческим антителом природного происхождения.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело человека содержит один или

более константных участков человека. В некоторых вариантах реализации изобретения константный участок тяжелой цепи представляет собой изотип, выбранный из IgA, IgG и IgD. В некоторых вариантах реализации изобретения константный участок легкой цепи представляет собой изотип, выбранный из κ и λ . В некоторых вариантах реализации изобретения антитело человека, описанное в данном документе, содержит константный участок IgG человека. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело человека, описанное в данном документе, содержит константный участок тяжелой цепи IgG4 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело человека, описанное в данном документе, содержит константный участок IgG4 человека и легкую цепь κ человека.

В некоторых вариантах реализации изобретения, когда требуется эффекторная функция, выбирают анти-ICOS антитело человека, содержащее константный участок тяжелой цепи IgG1 человека или константный участок тяжелой цепи IgG3 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, когда не требуется эффекторная функция, выбирают анти-ICOS антитело человека, содержащее константный участок тяжелой цепи IgG4 или IgG2 человека.

Как отмечено в данном документе, термин "антитело человека" скорее указывает на род возможных последовательностей для конструкции антитела, чем на источник происхождения антитела.

Типовые константные участки антител.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит один или более константных участков человека. В некоторых вариантах реализации изобретения константный участок тяжелой цепи представляет собой изотип, выбранный из IgA, IgG и IgD. В некоторых вариантах реализации изобретения константный участок легкой цепи представляет собой изотип, выбранный из κ и λ . В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит константный участок IgG человека. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит константный участок тяжелой цепи IgG4 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит константный участок IgG4 человека и легкую цепь κ человека.

Во всем настоящем описании и формуле изобретения, если только конкретнее не указано иное или известно специалисту в данной области техники, нумерация остатков тяжелой цепи иммуноглобулинов выполняется согласно индексу EU, как указано в статье Rabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), явным образом включенной в данный документ путем ссылки. "Индекс EU по Кабату" относится к нумерации остатков человеческого EU IgG1-антитела.

Как отмечено выше, то, будет востребована эффекторная функция или нет, может зависеть от конкретного способа обработки, предполагаемого для антитела. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения, когда требуется эффекторная функция, выбирают анти-ICOS антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи IgG1 человека или константный участок тяжелой цепи IgG3 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, когда не требуется эффекторная функция, выбирают анти-ICOS антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи IgG4 или IgG2 человека.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело содержит вариантный Fc-участок, имеющий по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с Fc-участком IgG дикого типа или антитела дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения вариантный Fc-участок имеет две или более аминокислотных замен в Fc-участке антитела дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения вариантный Fc-участок имеет три или более аминокислотных замен в Fc-участке антитела дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения вариантный Fc-участок имеет по меньшей мере одну, две или три или более аминокислотных замен Fc-участка, описанного в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения вариантный Fc-участок в данном документе будет обладать по меньшей мере около 80% гомологией с нативной последовательностью Fc-участка и/или с Fc-участка исходного полипептида. В некоторых вариантах реализации изобретения вариантный Fc-участок в данном документе будет обладать по меньшей мере около 90% гомологией с нативной последовательностью Fc-участка и/или с Fc-участка исходного полипептида. В некоторых вариантах реализации изобретения вариантный Fc-участок в данном документе будет обладать по меньшей мере около 95% гомологией с нативной последовательностью Fc-участка и/или с Fc-участка исходного полипептида.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, предложенное в данном документе, модифицируют с целью увеличения или уменьшения степени гликозилирования антитела. Добавление или делецию сайтов гликозилирования в антителе можно легко осуществлять путем модификации аминокислотной последовательности, приводящей к созданию или удалению одного или более сайтов гликозилирования.

Если антитело содержит Fc-участок, то можно модифицировать углевод, присоединенный к нему. Нативные антитела, продуцируемые клетками млекопитающих, обычно содержат разветвленный двуантенарный олигосахарид, обычно присоединенный с помощью N-связи к Asn297 в CH2-домене Fc-участка. См., например, Wright et al., *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Указанный олигосахарид может содержать различные углеводы, например маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую ки-

слоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в "стебле" двухантенарной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах реализации изобретения можно выполнять модификации олигосахарида в антители с целью создания вариантов антител с определенными улучшенными свойствами.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложены варианты антител, содержащие углеводную структуру без фукозы, присоединенной (прямо или опосредованно) к Fc-участку. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1 до 80%, от 1 до 65%, от 5 до 65% или от 20 до 40%. Количество фукозы определяют путем расчета среднего количества фукозы в углеводной цепи при Asn297 по отношению к сумме всех углеводных структур, присоединенных к Asn 297 (например, сложных гибридных структур с высоким содержанием маннозы), измеренного с помощью ВП-МАЛДИ масс-спектрометрии, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному приблизительно в положении 297 в Fc-участке (EU-нумерация остатков Fc-участка); однако Asn297 также может располагаться на расстоянии около ± 3 аминокислоты выше или ниже положения 297, а именно между положениями 294 и 300 из-за незначительной изменчивости последовательности антител. Такие варианты фукозилирования могут обладать улучшенной АЗКЦ-функцией. См., например, публикации патентов CHIA US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, связанных с "дефукозилированными" или "фукозодефицитными" вариантами антител включают US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/01098 65; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki et al., J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87:614 (2004). Примеры клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают клетки Lec13 CHO, дефектные по фукозилированию белков (Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); заявка на патент США № US 2003/0157108 A1, Presta, L.; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., особенно в примере 11) и нокаутированные клеточные линии, такие как нокаутированные клетки CHO по гену α -1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, (см., например, Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87:614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); и WO 2003/085107).

Дополнительно предложены варианты антител с олигосахаридами, разделенными пополам, например, в которых двухантенарный олигосахарид, присоединенный к Fc-участку антитела, разделен пополам GlcNAc. Такие варианты антител могут характеризоваться сниженным фукозилированием и/или улучшенной АЗКЦ-функцией. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); патент США № 6602684 (Umana et al.); и US 2005/0123546 (Umana et al.). Предложены также варианты антител по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенному к Fc-участку. Такие варианты антител могут обладать улучшенной КЗЦ-функцией. Такие варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.) и WO 1999/22764 (Raju, S.).

Предложены также варианты антител с аминоконцевыми лидерными удлинениями. Например, на аминоконце любой одной или более тяжелой или легкой цепей антитела присутствует один или более аминокислотных остатков аминоконцевой лидерной последовательности. Типовое аминоконцевое лидерное удлинение содержит или состоит из трех аминокислотных остатков, VHS, присутствующих на одной или более легких цепей антитела.

Можно анализировать связывание *in vivo* или период полувыведения из сыворотки полипептидов с высокой аффинностью связывания с человеческим FcRn, например, на трансгенных мышцах, в организме людей или на приматах, не являющихся человеком, которым вводят полипептиды, содержащие вариантный Fc-участок. См. также, например, Petkova et al., International Immunology 18 (12):1759-1769 (2006).

В некоторых вариантах реализации изобретения вариант антитела опосредует АЗКЦ в присутствии эффекторных клеток человека более эффективно, чем исходное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения вариант антитела практически является более эффективным в опосредовании АЗКЦ *in vitro*, когда количества варианта полипептида и исходного антитела, используемого в анализе, являются, по существу, одинаковыми. В некоторых вариантах реализации изобретения вариант антитела практически является более эффективным в опосредовании АЗКЦ *in vivo*, когда количества варианта полипептида и исходного антитела, используемого в анализе, являются, по существу, одинаковыми. В целом, такие варианты будут идентифицированы с использованием анализа АЗКЦ *in vitro*, как описано в данном документе, но подразумеваются и другие анализы или методы для определения активности АЗКЦ, например, на модели животного и т.п.

Типовые конъюгаты антител.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело конъюгировано с другой молекулой. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительная молекула может быть выявляемым маркером, таким как метка. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительная молекула может быть терапевтической молекулой, такой как цитотоксическое средство. В некоторых вариантах реализации изобретения метка и/или цитотоксическое средство может быть конъюгировано с

антителом. Как используется в данном документе, метка представляет собой фрагмент, который облегчает обнаружение антитела и/или облегчает обнаружение молекулы, с которой данное антитело связывается. Неограничивающие типовые метки включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы, флуоресцентные группы, ферментные группы, хемилюминесцентные группы, биотин, эпитопные маркеры, металлосвязывающие маркеры и т.п. Специалист в данной области техники может выбирать подходящую метку в соответствии с конкретным применением.

Как используется в данном документе, цитотоксическое средство представляет собой фрагмент, который снижает пролиферативную способность одной или более клеток. Клетка обладает пониженной пролиферативной способностью, когда она становится менее способной к пролиферации, например, из-за того, что клетка претерпевает апоптоз или погибает иным образом, у клетки нарушается прохождение по клеточному циклу и/или нарушается деление, клетка дифференцируется и т.п. Неограничивающие типовые цитотоксические средства включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы, токсины и химиотерапевтические средства. Специалист в данной области техники может выбирать подходящее цитотоксическое средство в соответствии с предполагаемым применением. В некоторых вариантах реализации изобретения цитотоксическое средство представляет собой по меньшей мере одно средство из анти-метаболита, алкилирующего средства, антибиотика, фактора роста, цитокина, антиангиогенного средства, антимитотического средства, антрациклина, токсина или апоптического средства.

В некоторых вариантах реализации изобретения метка и/или цитотоксическое средство конъюгировано с антителом с использованием химических методов *in vitro*. Неограничивающие типовые химические методы конъюгации известны в данной области техники и включают услуги, методы и/или реактивы, коммерчески доступные, например, в компании Thermo Scientific Life Science Research Products (бывшая Pierce; г. Рокфорд, штат Иллинойс), Prozyme (г. Хейворд, штат Калифорния), SACRI Antibody Services (г. Калгари, Канада), AbD Serotec (г. Роли, штат Северная Каролина) и т.д. В некоторых вариантах реализации изобретения, когда метка и/или цитотоксическое средство представляет собой полипептид, то данная метка и/или цитотоксическое средство может экспрессироваться из того же экспрессионного вектора по меньшей мере с одной цепью антитела для продуцирования полипептида, содержащего метку и/или цитотоксическое средство, слитое с цепью антитела. Специалист в данной области техники может выбирать подходящий способ конъюгирования метки и/или цитотоксического средства с антителом в соответствии с предполагаемым применением.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгация может быть ковалентной. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгация может быть нековалентной. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгация может происходить посредством специфического взаимодействия связывания, например, посредством связывания вторичного антитела.

Типовые лидерные последовательности.

Для того чтобы некоторые секретлируемые белки экспрессировались и секретировались в больших количествах, может требоваться лидерная последовательность из гетерологичного белка. В некоторых вариантах реализации изобретения может быть целесообразным применение гетерологичных лидерных последовательностей, в которых результирующий зрелый полипептид может оставаться неизменным, так как лидерная последовательность удаляется в ЭР по время процесса секреции. Добавление гетерологичной лидерной последовательности может быть полезным для экспрессии и секретирования некоторых белков.

Последовательности определенных типовых лидерных последовательностей описаны, например, в доступной в сети базе данных лидерных последовательностей, поддерживаемой отделом биохимии Национального университета Сингапура. См. Choo et al., BMC Bioinformatics, 6:249 (2005) и публикацию согласно РСТ № WO 2006/081430.

IV. Экспрессия и продукция антител.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие анти-ICOS антитела.

В данном документе предложены молекулы нуклеиновых кислот, содержащие полинуклеотиды, которые кодируют одну или более цепей анти-ICOS антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, который кодирует тяжелую цепь или легкую цепь анти-ICOS антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит как полинуклеотид, который кодирует тяжелую цепь, так и полинуклеотид, который кодирует легкую цепь, анти-ICOS антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения первая молекула нуклеиновой кислоты содержит первый полинуклеотид, который кодирует тяжелую цепь, а вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит второй полинуклеотид, который кодирует легкую цепь.

В некоторых вариантах реализации изобретения тяжелая цепь и легкая цепь экспрессируются на одной молекуле нуклеиновой кислоты или на двух отдельных молекулах нуклеиновой кислоты, как два отдельных полипептида. В некоторых вариантах реализации изобретения, в которых антитело представляет собой scFv, единственный полинуклеотид кодирует единственный полипептид, содержащий и тяжелую цепь, и легкую цепь, соединенные вместе.

В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или легкую цепь анти-ICOS антитела, содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует по

меньшей мере один из CDR, предложенных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или легкую цепь анти-ICOS антитела, содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует по меньшей мере 3 из CDR, предложенных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или легкую цепь анти-ICOS антитела, содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует по меньшей мере 6 из CDR, предложенных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или легкую цепь анти-ICOS антитела, содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует лидерную последовательность, которая после трансляции расположена на N-конце тяжелой цепи или легкой цепи. Как обсуждается выше, лидерная последовательность может быть нативной лидерной последовательностью тяжелой или легкой цепи, или может быть другой гетерологичной лидерной последовательностью.

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота представляет собой такую, которая кодирует любую из аминокислотных последовательностей антител в таблице последовательностей данного документа. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота представляет собой такую, которая является по меньшей мере на 80% идентичной нуклеиновой кислоте, кодирующей любую из аминокислотных последовательностей антител в таблице последовательностей данного документа, например идентичной по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота представляет собой такую, которая гибридизируется с любой одной или более из последовательностей нуклеиновых кислот, предложенных в данном документе. В некоторых из вариантов реализации изобретения гибридизация проходит в умеренных условиях. В некоторых вариантах реализации изобретения гибридизация проходит в очень жестких условиях, таких как по меньшей мере приблизительно 6X SSC и 1% SDS при 65°C, с первой промывкой в течении 10 мин при около 42°C с приблизительно 20% (об./об.) формамида в 0,1X SSC и с последующей промывкой 0,2X SSC и 0,1% SDS при 65°C.

Молекулы нуклеиновых кислот можно конструировать с использованием методик рекомбинантных ДНК, традиционных в данной области техники. В некоторых вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты представляет собой экспрессионный вектор, который является подходящим для экспрессии в выбранной клетке-хозяине.

Векторы.

Предложены векторы, содержащие полинуклеотиды, которые кодируют тяжелые цепи анти-ICOS и/или легкие цепи анти-ICOS. Предложены также векторы, содержащие полинуклеотиды, которые кодируют тяжелые цепи анти-ICOS и/или легкие цепи анти-ICOS. Такие векторы включают, но не ограничиваются ими, ДНК-вектор, фаговый вектор, вирусный вектор, ретровирусный вектор и т.д. В некоторых вариантах реализации изобретения вектор содержит первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь, и вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь. В некоторых вариантах реализации изобретения тяжелая цепь и легкая цепь экспрессируются на векторе как два отдельных полипептида. В некоторых вариантах реализации изобретения тяжелая цепь и легкая цепь экспрессируются как часть одного полипептида, такого как, например, в случае антитела scFv.

В некоторых вариантах реализации изобретения первый вектор содержит первый полинуклеотид, который кодирует тяжелую цепь, а второй вектор содержит второй полинуклеотид, который кодирует легкую цепь. В некоторых вариантах реализации изобретения первый вектор и второй вектор трансфицируют в клетки-хозяева в одинаковых количествах (таких как одинаковые мольные количества или одинаковые массовые количества). В некоторых вариантах реализации изобретения в клетки-хозяева трансфицируют мольное или массовое соотношение первого вектора и второго вектора между 5:1 и 1:5. В некоторых вариантах реализации изобретения используют массовое соотношение между 1:1 и 1:5 для вектора, кодирующего тяжелую цепь, и вектора, кодирующего легкую цепь. В некоторых вариантах реализации изобретения используют массовое соотношение 1:2 для вектора, кодирующего тяжелую цепь, и вектора, кодирующего легкую цепь.

В некоторых вариантах реализации изобретения выбирают вектор, который оптимизирован для экспрессии полипептидов в клетках CHO, или происходящих от CHO клетках, или в клетках NSO. Такие типовые векторы описаны, например, в Running Deer et al., *Biotechnol. Prog.* 20:880-889 (2004).

Клетки-хозяева.

В некоторых вариантах реализации изобретения тяжелые цепи анти-ICOS антитела и/или легкие цепи анти-ICOS антитела могут экспрессироваться в прокариотических клетках, таких как бактериальные клетки; или в эукариотических клетках, таких как клетки грибов (такие как дрожжи), клетки растений, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Такая экспрессия может выполняться, например, в соответствии с процедурами, известными в данной области техники. Типовые эукариотические клетки, которые можно использовать для экспрессии полипептидов включают, но не ограничиваются ими, клетки COS, включая клетки COS 7; клетки 293, включая клетки 293-6E; клетки CHO, включая CHO-S, DG44. Клетки Lec13 CHO и клетки FUT8 CHO; клетки PER.C6® (Stucell) и клетки NSO. В некоторых вариантах реализации изобретения тяжелые цепи анти-ICOS антитела и/или легкие цепи анти-ICOS антитела

могут экспрессироваться в дрожжах. См., например, публикацию США № US 2006/0270045 A1. В некоторых вариантах реализации изобретения конкретная эукариотическая клетка-хозяин выбирается на основе ее способности выполнять требуемые посттрансляционные модификации в отношении тяжелых цепей анти-ICOS антитела и/или легких цепей анти-ICOS антитела. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения клетки CHO продуцируют полипептиды, которые имеют более высокий уровень сиапирования, чем такой же полипептид, полученный в клетках 293.

Введение одной или более нуклеиновых кислот в требуемую хозяйскую клетку может выполняться любым способом, включая, но не ограничиваясь, трансфекцией с помощью фосфата кальция, опосредованной ДЭАЭ-декстраном трансфекцией, опосредованной катионными липидами трансфекцией, электропорацией, трансдукцией, инфекцией и т.п.

Неограничивающие типовые способы описаны, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Нуклеиновые кислоты могут быть транзientно или стабильно трансфицированы в требуемые клетки-хозяева в соответствии с любым подходящим способом.

Также предложены клетки-хозяева, содержащие любой из полинуклеотидов или векторов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая анти-ICOS антитело. Для целей выделения генов, кодирующих данное антитело, полипептид или интересующий белок, можно использовать любые клетки-хозяева, способные сверхэкспрессировать гетерологичные ДНК. Неограничивающие примеры клеток-хозяев млекопитающих включают, но не ограничиваются клетками COS, HeLa и CHO. См. также публикацию согласно РСТ № WO 87/04462. Подходящие клетки-хозяева, не относящиеся к млекопитающим, включают прокариоты (такие как *E. coli* или *V. subtilis*) и дрожжи (такие как *S. cerevisiae*, *S. pombe* или *K. lactis*).

Очистка антител.

Анти-ICOS антитела можно очищать любым подходящим методом. Такие методы включают, но не ограничиваются ими, применение аффинных матриц или хроматографии гидрофобных взаимодействий. Подходящие аффинные лиганды включают ROR1 ECD и лиганды, которые связывают константные участки антител. Например, для связывания константного участка и очистки анти-ICOS антитела можно применять аффинную колонку с белком А, белком G, белком А/G или антителом. Хроматография гидрофобных взаимодействий, например бутильная или фенильная колонка, также может подходить для очистки некоторых полипептидов, таких как антитела. Ионообменная хроматография (например анионообменная хроматография и/или катионообменная хроматография) также может подходить для очистки некоторых полипептидов, таких как антитела. Хроматография смешанного режима (например обращенно-фазная/анионообменная, обращенно-фазная/катионообменная, гидрофобных взаимодействий/анионообменная, гидрофобных взаимодействий/катионообменная и т.д.) также может подходить для очистки некоторых полипептидов, таких как антитела. В данной области техники известно много методов очистки полипептидов.

Бесклеточная продукция антител.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело продуцируют в бесклеточной системе.

Неограничивающие типовые бесклеточные системы описаны, например, в Sitaraman et al., *Methods Mol. Biol.* 498:229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22:538-45 (2004); Endo et al., *Biotechnol. Adv.* 21:695-713 (2003).

Композиции.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложены антитела, полученные описанными выше способами. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело получают в клетке-хозяине. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело получают в бесклеточной системе. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело является очищенным. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, получаемое в клетке-хозяине или бесклеточной системе, является химерным антителом. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, получаемое в клетке-хозяине или бесклеточной системе, является гуманизированным антителом. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, получаемое в клетке-хозяине или бесклеточной системе, является антителом человека. В некоторых вариантах реализации изобретения предложена культуральная среда клеток, содержащая анти-ICOS антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения предложена культуральная жидкость клеток-хозяев, содержащая анти-ICOS антитело.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложены композиции, содержащие антитела, полученные описанными выше способами. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит антитело, полученное в клетке-хозяине. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит антитело, полученное в бесклеточной системе. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит очищенное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит химерное антитело, полученное в клетке-хозяине или бесклеточной системе. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит гуманизированное антитело, полученное в клетке-хозяине или бесклеточной системе. В некоторых вариантах реализации изобретения

композиция содержит антитело человека, полученное в клетке-хозяине или бесклеточной системе.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложена композиция, содержащая анти-ICOS антитело в концентрации более чем около любого из значений 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225 или 250 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит химерное антитело, полученное в клетке-хозяине или бесклеточной системе. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит гуманизированное антитело, полученное в клетке-хозяине или бесклеточной системе. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит антитело человека, полученное в клетке-хозяине или бесклеточной системе.

V. Терапевтические композиции и способы.

Способы лечения заболеваний с использованием анти-ICOS антител.

Для применения в способах лечения людей и животных предложены антитела и композиции, содержащие антитела. Предложены также способы лечения заболевания, включающие введение анти-ICOS антител. Неограничивающие типовые заболевания, которые могут излечиваться с помощью анти-ICOS антител, включают, но не ограничиваются раковым заболеванием.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложен способ лечения опухоли, в котором клетки внутри образца опухоли экспрессируют ICOS. В некоторых таких вариантах реализации изобретения опухоль может считаться ICOS-позитивной или экспрессировать ICOS. Экспрессию ICOS можно определять методом ИГХ, например, как обсуждается в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения считается, что опухоль экспрессирует ICOS, когда образец из опухоли показывает 1+ , 2+ или 3+ окрашивание по ICOS методом ИГХ. В некоторых вариантах реализации изобретения образец из опухоли показывает 2+ или 3+ окрашивание по ICOS методом ИГХ. В некоторых вариантах реализации изобретения образец опухоли, полученный от субъекта, анализируют на экспрессию ICOS и субъект отбирают для лечения с помощью антител, описанных в данном документе, если образец опухоли показывает экспрессию ICOS. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект отбирают, если образец опухоли показывает повышенную экспрессию ICOS.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект отбирают для лечения с помощью анти-ICOS антитела, предложенного в данном документе, если опухоль субъекта представляет собой PD-L1^{низкий}. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект отбирают для лечения с помощью анти-ICOS антитела, предложенного в данном документе, если опухоль субъекта представляет собой ICOS^{высокий}/PD-L1^{низкий}. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект отбирают для лечения с помощью анти-ICOS антитела, предложенного в данном документе, если опухоль субъекта представляет собой ICOS^{высокий}/PD-L1^{высокий}.

Анти-ICOS антитело можно вводить субъектам по мере необходимости. Определение частоты введения может выполняться специалистами в данной области, такими как лечащий врач, на основе соотношений относительно подлежащего лечению патологического состояния, возраста подлежащего лечению субъекта, тяжести подлежащего лечению патологического состояния, общего состояния здоровья подлежащего лечению субъекта и т.п. В некоторых вариантах реализации изобретения субъекту вводится эффективная доза анти-ICOS антитела один или более раз. В некоторых вариантах реализации изобретения субъекту вводится эффективная доза анти-ICOS антитела раз в месяц, менее раза в месяц, так как, например, каждые два месяца или каждые три месяца. В некоторых вариантах реализации изобретения эффективная доза анти-ICOS антитела вводится менее раза в месяц, так как, например, раз каждые три недели, раз каждые две недели или раз в неделю. В некоторых вариантах реализации изобретения субъекту вводится эффективная доза анти-ICOS антитела по меньшей мере один раз. В некоторых вариантах реализации изобретения эффективную дозу анти-ICOS антитела можно вводить множество раз, включая периоды по меньшей мере одного месяца, по меньшей мере шести месяцев или по меньшей мере один год.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции вводят в количестве, эффективном для лечения (включая профилактику) ракового заболевания.

Терапевтически эффективное количество, как правило, зависит от массы подлежащего лечению субъекта, его или ее физического состояния или состояния здоровья, запущенности подлежащего лечению патологического состояния или возраста подлежащего лечению субъекта. В общем, анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 10 мкг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 50 мкг/кг массы тела до около 5 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 100 мкг/кг массы тела до около 10 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 100 мкг/кг массы тела до около 20 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 0,5 мг/кг массы тела до около 20 мг/кг массы тела на дозу.

Фармацевтические композиции вводят в количестве, эффективном для увеличения количества Teff-клеток; активации Teff-клеток; истощения Treg-клеток и/или увеличения соотношения Teff-клеток к

Трег-клеткам. В некоторых вариантах реализации изобретения Трег-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD8⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения Teff-клетки являются CD4⁺ FoxP3⁻ Т-клетками и CD8⁺ Т-клетками.

В некоторых вариантах реализации изобретения лечение с помощью анти-ICOS антитела приводит к такому показателю фармакодинамики, как повышение регуляции лиганда ICOS (ICOSL). В некоторых вариантах реализации изобретения наблюдается повышение регуляции ICOSL на поверхности В-клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения наблюдается повышение регуляции ICOSL на поверхности гранулоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения наблюдается повышение регуляции ICOSL на поверхности нейтрофилов. Повышение регуляции ICOSL можно наблюдать на клетках в опухоли; на клетках в селезенке; на клетках в периферической крови. Повышение регуляции ICOSL на поверхности клеток можно наблюдать, например, методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах реализации изобретения растворимый ICOSL увеличивается в сыворотке после лечения с помощью анти-ICOS антитела. Растворимый ICOSL также можно обнаруживать способами, включающими, но не ограничивающимися ELISA, MSD и масс-спектрометрией. В некоторых вариантах реализации изобретения захват мишени ICOS, при измерении по доступности свободного рецептора, анти-ICOS антителами также можно использовать как показатель фармакодинамики. В некоторых таких вариантах реализации изобретения при лечении анти-ICOS антителом можно количественно определять рецепторы ICOS на поверхности Т-лимфоцитов, которые свободны для связывания дополнительных антител. Уменьшение наблюдаемых доступных рецепторов может служить индикатором, что анти-ICOS антитела связываются со своей молекулой-мишенью.

Терапевтически эффективное количество, как правило, зависит от массы подлежащего лечению субъекта, его или ее физического состояния или состояния здоровья, запущенности подлежащего лечению патологического состояния или возраста подлежащего лечению субъекта. В общем, анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 10 мкг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 50 мкг/кг массы тела до около 5 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 100 мкг/кг массы тела до около 10 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 100 мкг/кг массы тела до около 20 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 0,5 мг/кг массы тела до около 20 мг/кг массы тела на дозу.

Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложены композиции, содержащие анти-ICOS антитела в лекарственных формах с широким диапазоном фармацевтически приемлемых носителей (см., например, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippincott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)). Доступны различные фармацевтически приемлемые носители, которые включают носители, адъюванты и разбавители. Более того, доступны также различные фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как регулирующие pH и буферизирующие средства, регулирующие тоничность средства, стабилизаторы, увлажняющие средства и т.п. Неограничивающие типовые носители включают солевой раствор, забуференный солевой раствор, декстрозу, воду, глицерин, этанол и их комбинации.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая анти-ICOS антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит химерное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит гуманизованное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит антитело, полученное в клетке-хозяине или бесклеточной системе. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции вводят в количестве, эффективном для лечения (включая профилактику) ракового заболевания.

Терапевтически эффективное количество, как правило, зависит от массы подлежащего лечению субъекта, его или ее физического состояния или состояния здоровья, запущенности подлежащего лечению патологического состояния или возраста подлежащего лечению субъекта. В общем, анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 0,05 мг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 10 мкг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 50 мкг/кг массы тела до около 5 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобре-

тения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 100 мкг/кг массы тела до около 10 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 100 мкг/кг массы тела до около 20 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 0,5 до около 20 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 0,5 до около 10 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 0,05 до около 20 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 0,05 до около 10 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить в количестве в диапазоне от около 5 мг/кг массы тела или менее, например менее чем 4, менее чем 3, менее чем 2 или менее чем около 1 мг/кг антитела.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела могут присутствовать в количестве в диапазоне от около 50 мкг/кг массы тела до около 5 мг/кг массы тела на дозу. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения доза для лица массой 20 кг может находиться в диапазоне от около 1 до около 100 мг. В некоторых вариантах реализации изобретения доза может находиться в диапазоне от 2 до 200 мг анти-ICOS антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения доза может находиться в диапазоне от 10 до 400 мг анти-ICOS антитела.

Пути введения.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитела можно вводить *in vivo* различными путями, включающими, но не ограничиваемыми ими, внутривенный, внутриаартериальный, парентеральный, внутриопухолевый, внутриперитонеальный или подкожный. Соответствующая лекарственная форма и путь введения может выбираться в соответствии с предполагаемым применением.

Комбинированная терапия.

Анти-ICOS антитела можно вводить самостоятельно или с другими способами лечения. Их можно вводить перед, практически одновременно с и/или после других способов лечения, например хирургической, химиотерапии, радиационной терапии или введения биологического препарата, такого как другое терапевтическое антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело вводят в сочетании с другим противораковым средством.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело назначается одновременно со вторым лекарственным средством. Например, два или более лекарственных средств вводят с разделением по времени не более чем около 60 мин, например не более чем около любого разделения из 30, 15, 10, 5 или 1 мин. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело назначается последовательно со вторым лекарственным средством. Например, введение двух или более лекарственных средств проводят с разделением по времени не более чем около 15 мин, например около любого разделения из 20, 30, 40, 50 или 60 мин, 1 дня, 2 дней, 3 дней, 1 недели, 2 недель или 1 месяца, или дольше.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело вводят со вторым терапевтическим способом лечения. Таким образом, введение антитела, предложенного в данном документе, может происходить в комбинации с другой системой лечения.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят с PD-1 терапией. Типовые лекарственные средства для PD-1 терапии включают, но не ограничиваются ими, ниволумаб (OPDIVO®, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538); пидолизумаб, ламбролизумаб/пембролизумаб (KEYTRUDA, MK-3475); дурвалумаб (анти-PD-L1 антитело, MEDI-4736; AstraZeneca/MedImmune); RG-7446; авелумаб (анти-PD-L1 антитело; MSB-0010718C; Pfizer); AMP-224; BMS-936559 (анти-PD-L1 антитело); AMP-514; MDX-1105; ANB-011; анти-LAG-3/PD-1; анти-PD-1 антитело (CoStim); анти-PD-1 антитело (Kadmon Pharm.); анти-PD-1 антитело (Immunovo); анти-TIM-3/PD-1 антитело (AnaptysBio); анти-PD-L1 антитело (CoStim/Novartis); RG7446/MPDL3280A (анти-PD-L1 антитело, Genentech/Roche); KD-033, антагонист PD-1 (Agenus); STI-A1010; STI-A1110; TSR-042 и другие антитела, которые направлены против белка-1 программируемой гибели (PD-1) или лиганда 1 белка программируемой гибели 1 (PD-L1).

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект отбирают для лечения с помощью анти-ICOS антитела, предложенного в данном документе, и PD-1 терапии, если опухоль субъекта экспрессирует PD-L1. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект отбирают для лечения с помощью анти-ICOS антитела, предложенного в данном документе, и PD-1 терапии, если опухоль субъекта определяется как имеющая PD-L1 ^{высокий}. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект отбирают для лечения с помощью анти-ICOS антитела, предложенного в данном документе, и PD-1 терапии, если опухоль субъекта экспрессирует ICOS и PD-L1. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект отбирают для лечения с помощью анти-ICOS антитела, предложенного в данном документе, и PD-1 терапии, если опухоль субъекта определяется как имеющая ICOS ^{высокий}/PD-L1 ^{высокий}. Можно проводить определение уровня PD-L1 и/или ICOS, например, с использованием ИГХ. В некоторых вариантах реализации изобретения считается, что опухоль пациента экспрессирует PD-L1, когда 1% или более, или 5% или более опухолевых клеток в образце показывают окрашивание мембраны по PD-L1 методом ИГХ. В

некоторых вариантах реализации изобретения более чем 50% опухолевых клеток в образце показывают окрашивание мембраны по PD-L1 методом ИГХ. В некоторых таких вариантах реализации изобретения опухоль субъекта считается имеющей PD-L1 ^{высокий}. В некоторых вариантах реализации изобретения считается, что опухоль пациента экспрессирует ICOS, когда 1% или более клеток в образце показывают окрашивание по ICOS методом ИГХ. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект сначала лечат с помощью PD-1 терапии, а позже лечат с помощью анти-ICOS антитела, предложенного в данном документе, с продолжением PD-1 терапии или без ее продолжения. Таким образом, предложенные в данном документе способы включают лечение субъекта с помощью анти-ICOS антитела, причем субъекта ранее лечили с помощью PD-1 терапии.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят с анти-OX40 антителом-агонистом (таким как Medi6469, MedImmune; MOXR0916/RG7888, Roche). В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят с анти-CTLA4 антителом (таким как ипилидумаб, YERVOY®, BMS).

В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительное лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое средство. Типовые химиотерапевтические средства, которые можно комбинировать с анти-ICOS антителами, предложенными в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, капецтабин, циклофосфамид, дакарбазин, темозоломид, циклофосфамид, доцетаксел, доксорубин, даунорубин, цисплатин, карбоплатин, эпирубин, эрибулин, 5-ФУ, гемцитабин, иринотекан, иксабепилон, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел, наб-паклитаксел, ABRAXANE® (связанный с белком паклитаксел), пеметрексед, винорелбин и винкристин. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят по меньшей мере с одним ингибитором киназ. Неограничивающие типовые ингибиторы киназ включают эрлотиниб, афатиниб, gefитиниб, кризотиниб, дабрафениб, траметиниб, вемурафениб и кобиметаниб.

В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительное лекарственное средство представляет собой ингибитор IDO. Неограничивающие типовые ингибиторы IDO описаны, например, в US 2016/0060237 и US 2015/0352206. Неограничивающие типовые ингибиторы IDO включают индоксимод (New Link Genetics), INCB024360 (Incyte Corp), 1-метил-D-триптофан (New Link Genetics) и GDC-0919 (Genentech).

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят в комбинации с иммуномодулирующим лекарственным средством (IMiD). Неограничивающие типовые IMiD включают талидомид, леналидомид и помалидомид.

В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительное лекарственное средство представляет собой противораковую вакцину. Противораковые вакцины исследовали в качестве потенциального подхода для переноса антигенов и активации дендритных клеток. В частности, продемонстрировано доказательство, что вакцинация в комбинации с иммунологическими контрольными точками или агонистами для костимулирующих механизмов преодолевает устойчивость и создает увеличенный противоопухолевый ответ. Испытали ряд противораковых вакцин, которые применяют различные подходы для улучшения иммунного ответа против опухоли (см., например, Emens L.A., Expert Opin Emerg Drugs 13(2):295-308 (2008)). Были разработаны подходы для усиления ответа В-клеток, Т-клеток или специализированных антигенпрезентирующих клеток против опухолей. Типовые типы противораковых вакцин включают, но не ограничиваются ими, вакцины на основе пептидов, которые используют нацеливание на разные опухолевые антигены, которые могут доставляться как пептиды/белки или как генетически сконструированные ДНК-векторы, вирусы, бактерии или т.п.; и подходы клеточной биологии, например, для разработки противораковых вакцин против менее четко определенных мишеней, включая, но ограничиваясь ими, вакцинами, разработанными на основе полученных из организма пациента дендритных клеток, аутологичных опухолевых клеток или лизатов опухолевых клеток, аллогенных опухолевых клеток и т.п.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, может применяться в комбинации с противораковой вакциной. Типовые противораковые вакцины включают, но не ограничиваются ими, вакцины на основе дендритных клеток, онколитические вирусы, вакцины на основе опухолевых клеток и т.п. В некоторых вариантах реализации изобретения такие вакцины увеличивают противоопухолевый ответ. Примеры противораковых вакцин, которые можно использовать в комбинации с анти-ICOS антителами, предложенными в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, вакцину MAGE3 (например, против меланомы и рака мочевого пузыря), вакцину MUC1 (например против рака молочной железы), EGFRv3 (такую как Rindopepimut, например, против рака головного мозга, включая многоформную глиобластому) или ALVAC-CEA (например, против CEA+ раковых заболеваний).

Неограничивающие типовые противораковые вакцины также включают Sipuleucel-T, которая получена из аутологичных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), включающих антигенпрезентирующие клетки (см., например, Kantoff PW et al., N. Engl. J. Med. 363:411-22 (2010)). При получении Sipuleucel-T активируют PBMC пациента ex vivo с помощью PA2024, рекомбинантный белок сли-

яния простатической кислой фосфатазы (простатический антиген) и гранулоцитарно-макрофагально колониестимулирующего фактора (активатора иммунных клеток). Другой подход к вероятной противораковой вакцине заключается в создании иммунного ответа против специфических полипептидов, мутировавших в опухолевой ткани, такой как меланома (см., например, Carreno B.M. et al., Science 348:6236 (2015)). Такие мутировавшие пептиды могут в некоторых вариантах реализации изобретения называться неоантигенами. В качестве неограничивающего примера применения неоантигенов в противоопухолевых вакцинах, у отдельных пациентов с раковым заболеванием, таким как меланома, идентифицируют неоантигены в опухоли, которые, как предполагается, связываются с белком главного комплекса гистосовместимости HLA-A*02:01. Дендритные клетки из организма пациента созревают *ex vivo*, затем инкубируют с неоантигенами. Активированные дендритные клетки затем переносят, вводят в организм пациента. В некоторых вариантах реализации изобретения после введения противораковой вакцины выявляется устойчивый Т-клеточный иммунитет против данного неоантигена.

В некоторых таких вариантах реализации изобретения противораковую вакцину разрабатывают с использованием неоантигена. В некоторых вариантах реализации изобретения противораковая вакцина представляет собой ДНК-вакцину. В некоторых вариантах реализации изобретения противораковая вакцина представляет собой сконструированный вирус, содержащий раковый антиген, такой как PROST-VAC (рилимоген галвацирепвек/рилимоген глафоливек). В некоторых вариантах реализации изобретения противораковая вакцина содержит сконструированные опухолевые клетки, такие как GVAX, которые представляют собой вакцину на основе опухолевых клеток, трансфицированных геном гранулоцитарно-макрофагально колониестимулирующего фактора (GM-CSF) (см., например, Nemunaitis, 2005, Expert Rev Vaccines, 4:259-74).

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, описанное в данном документе, вводят перед, одновременно и/или после противораковой вакцины. В некоторых вариантах реализации изобретения противораковую вакцину, разработанную с использованием неоантигенов, применяют в комбинации с анти-ICOS антителами, описанными в данном документе. В некоторых таких вариантах реализации изобретения данную комбинацию используют для лечения ракового заболевания с высокой мутационной нагрузкой, такого как меланома, рак легкого, мочевого пузыря или колоректальный рак.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-ICOS антитело, предложенное в данном документе, вводят в комбинации с Т-клеточной терапией с химерным антигенным рецептором (терапия CAR-T).

Диагностические применения.

В данном документе предложены способы применения анти-ICOS антител, полипептидов и полинуклеотидов для выявления, диагностики и мониторинга заболевания, нарушения или патологического состояния, связанного с экспрессией эпитопа анти-ICOS антитела (либо увеличенной, либо уменьшенной относительно нормального образца, и/или недопустимой экспрессией, такой как наличие экспрессии в ткани(ях) и/или клетке(ах), у которых в норме отсутствует экспрессия данного эпитопа). Предложенные в данном документе способы предназначены для определения того, будет ли пациент отвечать на терапию анти-ICOS антителами.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает выявление с использованием анти-ICOS антител наличия в организме пациента клеток, которые экспрессируют ICOS. В некоторых вариантах реализации изобретения способ выявления включает приведение в контакт образца с антителом, полипептидом или полинуклеотидом и определение отличия уровня связывания от такого уровня эталонного образца или образца сравнения (такого как контроль). В некоторых вариантах реализации изобретения способ можно применять для определения того, являются ли антитела или полипептиды, описанные в данном документе, подходящим лечением для субъекта.

В некоторых вариантах реализации изобретения клетки или лизат клеток/тканей приводят в контакт с анти-ICOS антителом и определяют связывание антитела и клетки. Если исследуемые клетки показывают активность связывания по сравнению с эталонной клеткой такого же типа ткани, то это может указывать на то, что субъект может получать пользу от лечения с помощью анти-ICOS антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения исследуемые клетки происходят из тканей человека.

Можно применять различные способы, известные в данной области техники, для выявления специфического связывания антитело-антиген. Типовые иммуноанализы, которые можно проводить, включают иммуноанализ с поляризацией флуоресценции (FPIA), флуоресцентный иммуноанализ (FIA), ферментный иммуноанализ (EIA), нефелометрический иммуноанализ ингибирования (NIA), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммунологический анализ (RIA). Индикаторный фрагмент, или маркерную группу, можно присоединять к исследуемым антителам и отбирать так, чтобы соответствовать требованиям различных применений способа, которые часто обусловлены доступностью аналитического оборудования и совместимых иммуноаналитических процедур. Подходящие метки включают, без ограничения, радионуклиды (например ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H или ^{32}P), ферменты (например, щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена, люцифераза или β -галактозидаза), флуоресцентные фрагменты или белки (например, флуоресцеин, родамин, фикоэритрин GFP или BFP) или люминесцентные фрагменты (на-

пример, наночастицы Qdot™, поставляемые Quantum Dot Corporation, г. Пало-Альто, штат Калифорния). Общие методики, используемые для выполнения различных иммуноанализов, отмеченных выше, известны средним специалистам в данной области техники.

Для целей диагностики полипептид, включающий антитела, может быть маркирован выявляемым фрагментом, включающим, но ограничивающимся радиоизотопами, флуоресцентными метками и различными фермент-субстратными метками, известными в данной области техники. Методы конъюгирования меток с антителом известны в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации изобретения нет необходимости, чтобы анти-ICOS антитела были маркированы, и их присутствие можно выявлять с использованием второго меченого антитела, которое связывается с первым анти-ICOS антителом.

В некоторых вариантах реализации изобретения можно применять анти-ICOS антитело в любом известном аналитическом методе, таком как конкурентные анализы связывания, прямые и непрямые сэндвич-анализы и анализы иммунопреципитации. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Анти-ICOS антитела и полипептиды можно также применять для диагностических анализов *in vivo*, таких как визуализация *in vivo*. В целом, антитело или полипептид меченный радионуклидом (таким как ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹⁴C, ¹³¹I, ¹²⁵I, ³H или любая другая радионуклидная метка, включая отмеченные в данном документе) является таким, что интересующие клетки или ткани можно локализовать с использованием иммуносцинтиграфии.

Данное антитело также можно применять как реактив для окрашивания в патологическом исследовании с использованием методик, хорошо известных в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации изобретения первое антитело используют для диагностики, а второе антитело используют в качестве терапевтического средства. В некоторых вариантах реализации изобретения первое и второе антитела различаются. В некоторых вариантах реализации изобретения первое антитело представляет собой антитело нечеловеческого происхождения, тогда как терапевтическое средство представляет собой антитело человека. В некоторых вариантах реализации изобретения первое и второе антитела могут оба связываться с антигеном одновременно, путем связывания с отдельными эпитопами.

Наборы/изделия.

В данном документе также предложены наборы, лекарственные препараты, композиции и стандартные лекарственные формы для применения в любом из способов, описанных в данном документе.

Наборы могут включать один или более контейнеров, включающих анти-ICOS антитело (или стандартные лекарственные формы и/или изделия). В некоторых вариантах реализации изобретения предложена стандартная лекарственная форма, содержащая предварительно определенное количество композиции, содержащей анти-ICOS антитело, с одним или более дополнительных средств или без них. В некоторых вариантах реализации изобретения такая стандартная лекарственная форма поставляется в предварительно наполненном шприце для инъекции однократного применения. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция, содержащаяся в стандартной лекарственной форме, может содержать солевой раствор, сахарозу или т.п.; буферный раствор, такой как фосфатный или подобный; и/или быть приготовленным в пределах стабильного и эффективного диапазона pH. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция может быть представлена в виде лиофилизированного порошка, который можно растворять при добавлении соответствующей жидкости, например стерильной воды. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит одно или более полинуклеотидных веществ, которые ингибируют агрегацию белков, включая, но не ограничиваясь, сахарозу и аргинин. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит гепарин и/или протеогликан.

В некоторых вариантах реализации изобретения количество анти-ICOS антитела, применяемого в лекарственной форме, может составлять любое количество, предложенное в данном документе, для различных описанных способов и/или композиций.

В некоторых вариантах реализации изобретения наборы дополнительно содержат инструкции по применению для лечения ракового заболевания в соответствии с любым из способов, описанных в данном документе. Набор может дополнительно содержать описание выбора подходящего индивида для лечения. Инструкции, поставляемые в наборах, как правило, представляют собой письменные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковке (например, бумажном листе, включенным в набор), но машиночитаемые инструкции (например, инструкции, записанные на магнитном или оптическом накопительном диске) также являются приемлемыми. В некоторых вариантах реализации набор дополнительно содержит другое терапевтическое средство.

Наборы находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, но не ограничивается ими, флаконы, бутылки, сосуды, гибкую упаковку (например, герметические майларовые или пластиковые пакеты) и т.п. Наборы необязательно могут обеспечиваться дополнительными компонентами, такими как буферные растворы, и интерпретирующую информацию. Таким образом, в настоящей заявке также предложены изделия, которые включают флаконы (такие как герметично закрытые флаконы), бутылки, сосуды, гибкую упаковку и т.п.

Примеры

Примеры, обсуждаемые ниже, предназначены только для иллюстрирования данного изобретения и не должны считаться как ограничивающие изобретение каким-либо способом. Примеры не предназначены для представления того, что описанные ниже эксперименты являются всеми или единственными выполняемыми экспериментами. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении использованных числовых значений (например, количеств, температуры и т.п.), но должны учитываться некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части являются частями по массе, молекулярная масса представляет собой средневзвешенную молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1. Биоинформационный анализ экспрессии мРНК ICOS в опухолях человека.

Использовали данные секвенирования РНК, собранные как часть TCGA, экспрессию ICOS в ~7500 опухолях сравнивали по 24 различным показателям. Обнаружены высокие уровни мРНК ICOS в субпопуляциях плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC). См. фиг. 1А.

Исследовали связь между инфильтрацией Т-клеток и уровнями экспрессии ICOS. Экспрессия набора из 12 генов хемокинов была связана с высокими уровнями инфильтрации Т-клеток и образованием структур, подобных лимфоузлам (Messina et al., 2012, Sci Reports. 2:765-771). Для каждого образца рассчитывали показатель сигнатуры хемокинов на основе средней экспрессии этих 12 генов хемокинов. Этот показатель сигнатуры рассчитывали для всех образцов плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC). Уровни сигнатуры хемокинов или маркера Трег-клеток (FoxP3) коррелировали с уровнями ICOS в опухолях HNSCC. См. фиг. 2. Существовала сильная корреляция между сигнатурой хемокинов и уровнями ICOS ($R=0,83$; корреляция Спирмана) или ICOS и FoxP3, маркера Трег-клеток ($R=0,88$; корреляция Спирмана). Эти данные демонстрируют, что экспрессия ICOS тесно связана с инфильтрацией Т-клеток и Трег-клеток. Сходные данные наблюдали в случае заболеваний NSCLC и TNBC.

В опухолях HNSCC экспрессии ICOS в значительной степени коррелировала ($R=0,93$ и $0,78$ соответственно) с уровнями экспрессии других молекул контрольных точек, такими как CTLA-4 и PD-1. См. фиг. 3. Корреляция ICOS с PD-L1 была слабой ($R=0,62$). Сходные данные наблюдали в случае других показаний, таких как NSCLC. Эти данные дают возможность предположить, что ICOS может экспрессироваться на одних и тех же Т-клетках, которые экспрессируют другие молекулы контрольных точек, таких как CTLA-4 и PD-1. Более слабая корреляция с PD-L1 и ICOS предполагает, что может существовать субпопуляция пациентов с высоким уровнем ICOS, которая может иметь низкий или негативный показатель по PD-L1. Эти данные подтверждают, что ICOS является единственным фактором у PD-L1 негативных пациентов, и также определяют комбинированную стратегию с использованием видов терапии с анти-PD-1 или анти-CTLA-4 средствами.

Пример 2. Анализ ИГХ опухолей человека.

Уровни экспрессии белка ICOS определяли с использованием иммуногистохимического (ИГХ) анализа. Этот анализ с использованием анти-ICOS моноклонального антитела кролика (SP98, Spring Biosciences, г. Плезантон, штат Калифорния) валидировали на аналитическую специфичность, аналитическую прецизионность (межлабораторные, внутрिलाбораторные анализы и воспроизводимость от серии к серии) и чувствительность. Валидационные исследования выполняли с использованием срезов, фиксированных формалином и залитых парафином (FFPE) тканей и контрольных линий клеток (СНО, сконструированные для экспрессии ICOS человека (положительный контроль) или контрольная линия клеток СНО с вектором, неэкспрессирующим ICOS (отрицательный контроль)). Анализ выполняли на платформе для автоматического окрашивания Leica-Bond Rx, выявляли ICOS в положительном контроле клеток СНО и в субпопуляциях Т-клеток в нормальных миндалинах человека.

Срезы оценивал квалифицированный патоморфолог с использованием следующих критериев для хромогенного окрашивания:

Частота встречаемости ICOS-позитивных клеток	Показатель
< 1% клеток ICOS-позитивные	0
> 1%, но < 5% клеток ICOS-позитивные	1+
> 5%, но < 15% клеток ICOS-позитивные	2+
> 15% клеток ICOS-позитивные	3+

Микромассивы тканей из 11 различных типов опухолей окрашивали и классифицировали с использованием этой системы определения показателей. См. фиг. 1В. Данные ИГХ подтвердили данные на основе мРНК о том, что HNSCC, NSCLC и TNBC содержали больший процент инфильтрации иммунных клеток с высоким уровнем ICOS+ (т.е. 3+). См. фиг. 1В. В дополнение к этому данные опухоли, субпопуляции клеток пациентов из меланомы, колоректальный рак и аденокарцинома желудочно-кишечного тракта имели умеренные уровни инфильтрации ICOS-позитивных клеток. См. фиг. 1В.

Для оценки преобладания и природы Т-Т-клеток, которые экспрессируют ICOS, разрабатывали мультитеплексный иммунофлуоресцентный анализ ИГХ для обнаружения ICOS, FOXP3 и CD8. Использо-

вали маркер ДНК (DAPI) для учета общего количества ядер в срезах опухолей человека.

Экспрессию ICOS определяли с использованием иммуногистохимического анализа с клоном моноклонального антитела кролика, которое распознает ICOS человека (Spring Biosciences Inc. г. Плезантон, штат Калифорния). Специфичность и чувствительность анализа ИГХ для ICOS подтвердили, используя клетки миндалин человека и линии клеток, конститутивно сверхэкспрессирующие ICOS. Интенсивность окрашивания оценивал обученный квалифицированный патоморфолог с использованием следующих критериев. Все типы позитивного окрашивания оценивали на основе экспрессии на мембраны у по меньшей мере двух-третей клеток.

Репрезентативное изображение схемы оценивания показано на фиг. 4. Оценивание выполняли на основе следующих критериев для иммунофлуоресценции:

0 (негативное) = нет или менее 0,1% клеток имеют окрашивание мембраны,

1+ (умеренное) = позитивны от 0,1 до 5% клеток,

2+ (среднее) = позитивны от 5 до 10% клеток,

3+ (сильное) = позитивны от >10 до 50% клеток.

Преобладание экспрессии ICOS в различных субпопуляциях NSCLC или соседних нормальных образцах легкого обобщено в табл. 2. У больных раком пациентов не наблюдали сильной экспрессии ICOS в соседней нормальной ткани легкого. Во всех основных подтипах рака легкого наблюдали сильную экспрессию ICOS. Около 29-31% из наиболее часто встречающихся подтипов NSCLC (аденокарцинома или плоскоклеточная карцинома) имело сильное окрашивание ICOS.

Таблица 2

Распределение окрашивания ICOS в различных субпопуляциях образцов NSCLC на основе патоморфологического оценивания

Подтип опухоли	N	Сильное (3+)	Умеренное (2+)	Слабое (1+)	Негативное (0)
SCLC	2	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)
Плоскоклеточная	49	14 (29%)	14 (29%)	17 (35%)	4 (8%)
Аденокарцинома	16	5 (31%)	2 (13%)	8 (50%)	1 (6%)
Аденосквамозная	9	3 (11%)	2 (11%)	3 (11%)	1 (67%)
Бронхоальвеолярная карцинома	9	2 (22%)	2 (22%)	5 (56%)	0 (0%)
Недифференцированная	5	1 (20%)	0 (0%)	3 (60%)	1 (20%)
Нормальная ткань	3		1 (33%)	2 (67%)	0 (0%)

Применяли также автоматизированную методологию для измерения ICOS-позитивных клеток, используя программное обеспечение для анализа изображений (Strataquest из Tissuegnostics Inc., г. Тарзана, штат Калифорния). Плотность ICOS-позитивных клеток в фиксированной области опухолевой ткани устанавливали путем определения количества ICOS-позитивных клеток на живом участке опухолевой ткани человека, как определено окрашиванием участка по DAPI. Плотность клеток ICOS определяли из отобранного набора из приблизительно 500 отдельных пациентов по 4 основным типам [NSCLC (N=100); HNSCC (N=102); рак молочной железы, все основные подтипы (N=94); трижды негативный подтип рака молочной железы, TNBC (N=95); рак яичника (N=94)]. Обобщающие результаты анализа показаны на фиг. 5. В соответствии с анализом на мРНК ICOS опухоли HNSCC и NSCLC имели значительно более высокую плотность ICOS-позитивных опухолей по сравнению с раком яичника или молочной железы. Хотя экспрессия ICOS при раке молочной железы является низкой, наблюдали высокие уровни экспрессии ICOS в подтипе TNBC, который составляли около 10% случаев рака молочной железы. См. фиг. 5. Этот подтип TNBC рака молочной железы является наиболее агрессивным подтипом с ограниченными возможностями лечения и наибольшей неудовлетворенной потребностью в медицинском лечении.

Вариабельность среди пациентов в экспрессии ICOS в двух различных когортах с типами опухолей с высокой экспрессией ICOS (NSCLC) показана на фиг. 6A и 6B. Диапазон плотности клеток ICOS наблюдали у NSCLC из 98 образцов рака легкого (фиг. 6A), доступных у коммерческого поставщика. Сходное разнообразие наблюдали при экспрессии ICOS с использованием независимой клинической когорты (фиг. 6B) с NSCLC (N=204).

Анализировали и количественно определяли ICOS, FoxP3 (маркер Treg-клеток) и CD8 из образцов опухолей человека, описанных выше, с помощью мультиплексного ИГХ использованием программного обеспечения для анализа изображений (Strataquest из Tissuegnostics Inc., г. Тарзана, штат Калифорния).

Репрезентативное изображение множественного окрашивания ICOS этих маркеров T-клеток показано на фиг. 7А. ICOS-позитивные клетки, которые являются также ГОХР3-позитивными, называют ICOS CD4 Treg-клетками. ICOS-позитивные и CD8-позитивные клетки называют ICOS CD8-клетками. ICOS-позитивные, но негативные по CD8 и FoxP3, называют ICOS+ CD4 Teff-клетками. Плотность различных субпопуляций ICOS-позитивных T-клеток количественно определяли с использованием программного обеспечения для анализа изображений, как описано ниже. В образцах легкого (N=100) и TNBC (n=95) существовало высокое количество как CD4-эффекторов, так и CD4 Treg-клеток, которые были ICOS-позитивными (фиг. 7В). В противоположность этому наблюдали немного ICOS-позитивных клеток при раке яичника (n=94). Опухоли HNSCC (N=102) имели большую популяцию ICOS-позитивных CD4 Treg-клеток. В них наблюдали лишь очень небольшую популяцию ICOS-позитивных CD8 T-клеток во всех исследованных типах опухолей. Эти данные позволяют предположить, что ICOS предпочтительно экспрессировался в компартменте CD4 по сравнению с CD8 T-клетками, и что среди показаний наблюдалась вариация по относительным пропорциям Treg по сравнению с Teff.

Для того чтобы понять, связана ли экспрессия ICOS непосредственно со статусом PD-L1, оценивали корреляцию между уровнями PD-L1 и экспрессией ICOS. Данные анализов с помощью средств биоинформатики позволили предположить, что экспрессия PD-L1 и уровни ICOS слабо коррелировали (R=0,62). Уровни PD-L1, ICOS и PD-1 оценивали мультиплексным анализом ИГХ. Показано репрезентативное изображение данных мультиплексного анализа ИГХ из опухоли легкого с высоким и низким уровнем PD-L1. См. фиг. 8. Оценивали PD-L1 и ICOS в 154 подтипах аденокарциномы опухолей NSCLC. Опухоли подразделяли на опухоли с высоким или низким уровнем PD-L1 на основе 5% клеток, которые были позитивными по PD-L1. Результаты указали, что PD-L1 позитивные опухоли имели более высокую плотность экспрессии ICOS.

Пример 3. Анализ проточной цитометрии.

Для подтверждения данных экспрессии ICOS, полученных методом ИНС, и для сравнения относительных значений интенсивности ICOS, экспрессированного в различных популяциях T-клеток, экспрессию ICOS в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах оценивали с использованием многоцветной проточной цитометрии. Анализировали образцы, полученные от четырех пациентов с HNSCC, трех пациентов с раком легкого и четырех пациентов с раком яичника. В соответствии с данными анализа ИГХ экспрессию ICOS преимущественно наблюдали на CD4 T-клетках. См. фиг. 9 (HNSCC). Частота встречаемости ICOS-позитивных клеток в популяции CD8 оказывается очень низкой в большинстве из этих опухолей. Авторы также наблюдали, что большинство CD4-эффекторных клеток совместно экспрессируют ICOS и PD-1. Эти данные подтверждают необходимость разработки терапевтического средства в отношении ICOS для клинического применения самостоятельно или в комбинации с анти-PD-1 видами терапии. Измерение экспрессии ICOS в различных популяциях T-клеток обеспечивалось средней интенсивностью флуоресценции (MFI) окрашивания ICOS. Значение MFI ICOS-позитивных клеток среди Treg-клеток было в 2-3 раза выше, чем для CD4-эффекторов. См. фиг. 9С. Следует отметить, что существуют небольшие популяции CD4-эффекторов, которые имеют высокое значение MFI ICOS. Подтверждение разницы плотностей рецептора ICOS в Teff по сравнению с Treg согласуется с данными из текущих анализов АЗКЦ для оценки различной чувствительности Teff и Treg к истощению, может подтверждать разработку антитела-агониста с активным Fc, которое потенциально позволяет истощать Treg-клетки.

Исследования трансляции показывают высокие уровни инфильтрации опухоли ICOS позитивными T-клетками в субпопуляции опухолей человека (таких как HNSCC, NSCLC и т.д.). Экспрессия ICOS коррелирует с экспрессией других регуляторов ключевых точек, таких как CTLA-4 и PD-1. Анализ субпопуляций T-клеток показал, что экспрессия ICOS преимущественно ограничена компартментом CD4 T-клеток. ICOS экспрессируется и в FoxP3-позитивных Treg-клетках, а также в CD4 Teff-клетках. Исследования показывают соответствие с литературными данными, в том что уровень экспрессии ICOS является выше в Treg-клетках по сравнению с CD4 Teff-клетками.

Пример 4. Получение антител.

Реактивы.

Белки ICOS, репрезентирующие организм человека, виды мышей, крыс и яванских макаков, получали в виде гомодимерных Fc-слияний (скелет IgG1), и в качестве антигенов для гуманизации белков грызунов использовали ICOS-hFc человека и мыши. ICOS-hFc человека включал аминокислоты ICOS человека от 1 до 141 (от 21 до 141 в зрелой конструкции); ICOS-hFc мыши включал аминокислоты ICOS мыши от 1 до 142 (от 21 до 142 в зрелой конструкции).

Получали ICOS-Fc как в виде бивалентных, так и моновалентных гибридных молекул с Fc для оценки avidного и моновалентного связывания антител с ICOS соответственно.

Для целей скрининга получали стабильные линии клеток CHO, сверхэкспрессирующие полноразмерный ICOS человека или мыши (ICOS+ CHO клетки или "клетки CHO-ICOS") в виде конструкций, кодирующих полноразмерный ICOS яванского макака или крысы для обеспечения скрининга после тран-

зидентной трансфекции.

Компания антител грызунов.

Работу с компаниями антител грызунов выполняли в Precision Antibody. Мышей (10), крыс (6), сирийских хомяков (6) и армянских хомяков (6) иммунизировали с помощью hICOS-hFc или mICOS-hFc. Получали гибридомы и проводили отбор супернатантов методом ELISA на связывание с hICOS и mICOS, а также проводили множественный скрининг методом FACS на связывание с клетками CHO-hICOS и CHO-mICOS. Гибридомы дополнительно оценивали на способность блокировать связывание ICOSL с клетками CHO-ICOS. Клоны, которые оценивали как позитивные на связывание с ICOS мыши и человека, отбирали для очистки белка. Очищенные антитела впоследствии повторно отбирали в анализах на связывание и блокирование, и антитела, получившие позитивную оценку, проходили оценку *in vitro*, как отмечено ниже. Все антитела, отобранные для дальнейшего исследования в подходе с иммунизацией, происходили от слитых белков армянского хомяка.

Определение биохимических характеристик антител.

Измерения аффинности проводили с использованием технологии интерферометрии в биослоях (BLI) (ForteBio Octet® RED96). Значения моновалентной аффинности получали с вариантами IgG антител с моновалентными, гетеродимерными формами рецептора ICOS. Значения авидной аффинности получали с использованием полноразмерных IgG по сравнению с гомодимерными формами рецептора ICOS. Мономерные и бивалентные аффинности hICOS выбранных антител хомяка показаны в табл. 3.

Таблица 3

Аффинность антител хомяка

mAb	Аффинность мономерного hICOS			Аффинность бивалентного hICOS		
	K_D	K_{ac} (1/Мс)	$K_{дис}$ (1/с)	K_D (М)	K_{ac} (1/Мс)	$K_{дис}$ (1/с)
7F12	1.32E-08	1.33E+05	1.75E-03	3.42E-11	6.74E+05	2.30E-05
35A9	2.45E-09	1.78E+05	4.38E-04	<1.0E-12	6.25E+05	<1.0E-07
36E10	1.59E-09	1.43E+05	2.28E-04	<1.0E-12	6.26E+05	<1.0E-07
37A10	3.18E-09	1.51E+05	4.79E-04	3.42E-11	6.74E+05	2.30E-05
16G10	4.37E-09	1.63E+05	7.12E-04	<1.0E-12	1.01E+06	<1.0E-07

Определяли также аффинность связывания антител для ICOS яванского макака, мыши и крысы и выявили антитела, связывающие все виды со сравнимой аффинностью. Измерения перекрестной реактивности проводили с использованием технологии BLI с наборами антител, которые подвергали отбору на связывание со слитыми белками ICOS-Fc человека, мыши и яванского макака (гомодимерная бивалентная форма). В табл. 4 показаны репрезентативные данные по связыванию для нескольких антител хомяка с ICOS человека и яванского макака.

Значения аффинности бивалентного связывания нескольких антител хомьяка с ICOS-Fc человека и яванского макака

лиганд/mAb	hICOS-Fc			супоICOS-Fc		
	K_D (M)	K_{ac} (1/Mc)	$K_{дис}$ (1/c)	K_D (M)	K_{ac} (1/Mc)	$K_{дис}$ (1/c)
hICOSL-mG2a	3.62E-10	9.41E+05	3.41E-04			
7F12	3.42E-11	6.74E+05	2.30E-05	<1.0E-12	5.85E+05	<1.0E-07
35A9	<1.0E-12	1.01E+06	<1.0E-07	<1.0E-12	7.40E+05	<1.0E-07
36E10	<1.0E-12	6.17E+05	<1.0E-07	<1.0E-12	6.97E+05	<1.0E-07
37A10	<1.0E-12	6.25E+05	<1.0E-07	<1.0E-12	7.12E+05	<1.0E-07
16G10	<1.0E-12	6.26E+05	<1.0E-07	<1.0E-12	6.47E+05	<1.0E-07

Для оценки специфичности связывания методом проточной цитометрии отдельно анализировали клетки CHO ICOS+ человека и клетки CHO ICOS мыши. В качестве контроля для отбора пан-реактивных антител также проверяли окрашивание клеток CHO без экспрессии рецептора ICOS. Все выбранные антитела связывали клетки CHO ICOS+ человека, но не с клетками CHO без экспрессии ICOS.

Для дополнительной оценки специфичности анти-ICOS антител их подвергали скринингу на связывание с дополнительными представителями семейства белков CD28 (CD28, BTLA, PD-1 и CTLA-4). Для отобранных антител не наблюдали перекрестной реактивности в отношении CD28, BTLA, PD-1 или CTLA4 человека или мыши. А именно оценивали связывание со слитыми белками Fc (с CD38, BTLA, PD-1 и CTLA-4) в виде димерных форм и не наблюдали связывания. Для поднабора представителей семейства CD38 белок мыши или человека сверхэкспрессировался на поверхности клеток HEK293 и CHO K1. Не наблюдали связывания антитела выше фонового уровня относительно нетрансдуцированных исходных клеток.

Обнаружили также, что антитела не связываются ни с находящимися в избытке белками сыворотки, ни с фибробластами или эритроцитами.

Сортировку эпитопов проводили с использованием BLI. Проводили сортировку антител также по отношению к слитому белку ICOSL-Fc (гомодимерная бивалентная форма). Обнаружили, что все отобранные антитела находятся в одном и том же эпитопном бине и все они блокировали связывание ICOS с лигандом ICOS.

Гуманизация.

Отобранные антитела гуманизировали выполнением исследований гомологии между вариabельными каркасными участками антител человека и хомьяка. Предложен набор первичных разработок для анализа и затем получали антитела для сравнения с антителом дикого типа (хомьяка или химерной формы). Сразу после получения гуманизированных наборов характеризовали лидерные последовательности и упорядочивали их на основе аффинности и активности *in vitro*. Выполняли дополнительные разработки по гуманизации для снижения неустойчивости последовательностей и иммуногенных сайтов с низкими показателями, возникающие в результате незначительных вариаций последовательностей.

Считается, что неустойчивость последовательностей включает наличие свободных цистеинов и потенциальных сайтов для химической дегградации (дезаминирование аспарагина, изомеризация аспартата, метионин/триптофан и неферментативное гликирование лизина).

Измеряли аффинность гуманизированного антитела, имеющего вариabельные участки 37A10S713 для мономерных форм ICOS человека, яванского макака и крысы технологией интерферометрии в биослое (BLI) (ForteBio Octet® RED96) и значения K_D показаны в табл. 5. Оказалось, что значения K_D были сравнимы среди видов, поскольку они находились в от 2- до 5-кратных пределах. Функциональность связывания подтвердили оценкой активности индукции пролиферации первичных CD4+ T-клеток, выделенных из каждого вида.

Аффинность моновалентного связывания 37A10S713 с ICOS человека, яванского макака и крысы

	Человека	Яванского макака	Крысы
Аффинность связывания (K _D нМ) ^А	1,50±0,39	0,66±0,16	7,20±2,55
Активность в пролиферации первичных CD4+ Т-клеток (EC50 нМ) ^В	4,27-49,75	8,25-13,14	10,7-30,0

^А значения аффинности показаны в виде среднего ± SEM из 6 экспериментов;^В показан диапазон для 4 доноров.

Пример 5. Определение функциональных характеристик анти-ICOS антител *in vitro*.

Для оценки активности анти-ICOS mAb использовали ряд анализов *in vitro*, основной целью которых был отбор антител с агонистическими/костимулирующими свойствами. Поскольку клеточная система (первичные клетки по сравнению с трансфицированной линией клеток) и способ презентации антител (растворимые по сравнению со связанными с планшетом или перекрестно-связанные) может влиять на агонистическую активность, то использовали ряд различных форматов анализов. В дополнение к этому также использовали анализ для обнаружения нежелательной сверхагонистической активности (см. Suntharalingam et al., 2006, N. Eng. J. Med., 355:1018-28).

Проводили анализы, разработанные для поиска агонистической/костимулирующей активности анти-ICOS mAb, на типах клеток, отмеченных ниже, с первым сигналом для Т-клеток (сигнал 1), при условии использования любых субоптимальных концентраций анти-CD3 или PMA, или в анализе с PBMC со стимуляцией с помощью суперантигена (SEB).

1. Анализ с первичными CD4+ Т-клетками человека

а) форма антитела, связанного с планшетом/перекрестно-связанного с костимуляцией анти-CD3;

б) форма растворимого антитела с костимуляцией PMA.

2. Анализ с Jurkat (линия репортерных клеток с трансфицированными конструкциями ICOS человека или мыши)

а) форма связанного с планшетом/перекрестно-связанного антитела либо с анти-CD3, либо с PMA;

б) форма растворимого антитела с костимуляцией PMA.

3. Анализ с PBMC человека

а) форма растворимого антитела с суперантигеном (SEB).

Наборы анти-ICOS mAb хомяка подвергали отбору в вышеперечисленных анализах для идентификации антител с агонистическими свойствами. Пример агонистической активности при отборе анти-ICOS антител хомяка наблюдали в анализе с использованием первичных CD4+ Т-клеток человека, костимулированных субоптимальной концентрацией анти-CD3 с добавлением связанного с планшетом анти-ICOS антителом, показан на фиг. 10А. В этом анализе CD4+ Т-клетки человека, выделенные из PBMC, активировали субоптимальной концентрацией связанным с планшетом анти-CD3 в присутствии связанных с планшетом анти-ICOS антител хомяка (7F12, 37A10 и 16G10) при четырех концентрациях (мкг/мл). В качестве позитивных контролей использовали связанное с планшетом hICOSL и растворимое анти-CD28 в присутствии анти-CD3. На графике отмечен % деленых клеток. Множество анти-ICOS антител в этом анализе проявляют активность. На фиг. 10В показаны результаты анализа с использованием растворимого антитела и костимуляции с субоптимальным PMA. Из PBMC отрицательным отбором и маркированием CFSE выделяли CD4+ Т-клетки. Клетки активировали в 96-луночных планшетах субоптимальной концентрацией одного PMA (0,25 нг/мл) или в присутствии различных вариантов Fc (хомяка, mG1, mG2a, mG1Agly или hG1) анти-ICOS антитела 37A10 при указанных концентрациях (мкг/мл). В качестве контроля использовали растворимое анти-CD28 антитело. На сутки 3 анализировали пролиферацию методом проточной цитометрии. Варианты IgG1 мыши и IgG1-agly мыши показали в данном анализе активность вместе с исходным полным антителом хомяка. Как минимум антитело 37A10 показало агонистическую активность как в растворимой форме, так и связанной с планшетом форме. См. фиг. 10А и 10В.

На фиг. 10С показана агонистическая активность результирующего 37A10S713 антитела с IgG1 человека в анализе с первичными CD4+ Т-клетками человека. Выделяли CD4+ Т-клетки из PBMC, взятых у 4 здоровых доноров, метили их красителем CFSE и затем инкубировали в планшетах, покрытых субоптимальной концентрацией анти-CD3, и с различными концентрациями либо 37A10S713-hIgG1, либо отрицательным контролем антитела-IgG1 человека (против респираторно-синцициального вируса (RSV)). После 3 суток определяли процент деленых клеток с использованием проточной цитометрии. Исследовали значения EC₅₀ в диапазоне от 4,27-49,75 нМ для 4 доноров. Значения пролиферации отмечены на графике в виде процента деленых клеток (измерено разведением CFSE с использованием про-

точной цитометрии) и означают средние значения двух анализов. На фиг. 10С показаны данные репрезентативного донора.

Другой пример анализа, в котором антитела хомяка демонстрируют агонистическую активность, представляет репортерный анализ с Jurkat. Репортерный анализ с Jurkat разработали в компании авторов изобретения путем трансдуцирования химерной конструкции экспрессии hICOS-hCD38 в линию репортерных клеток Jurkat NFkB. Репортерные клетки Jurkat-hICOS-hCD38 активировали в течение 5 ч с помощью РМА и растворимого анти-ICOS антитела 37A10 хомяка с различными Fc-концами при 11 концентрациях (мкг/мл). В качестве контролей использовали растворимые анти-CD28 и hICOSL-Fc. На графике отмечен % GFP+ клеток. Репрезентативные данные, полученные репортерным анализом с Jurkat с использованием анти-ICOS антител хомяка, показаны на фиг. 11. На фиг. 11А показаны результаты для различных вариантов Fc анти-ICOS антитела 37A10 (hG1, mG1, mG2a, mG1Agly) в указанных концентрациях (мкг/мл). Все варианты Fc анти-ICOS антитела, включая вариант mG1-agly (т.е. с минимальной эффекторной функцией Fc) показывают активность в данном анализе. На фиг. 11В показаны результаты для гуманизированных антител 37A10S713, 37A10S715, 37A10S716 и 37A10S718 в указанных концентрациях (мкг/мл). Все четыре исследованных гуманизированных антитела показали агонистическую активность в данном анализе.

Другой формат анализа, показывающий агонистическую активность, представляет собой анализ с РВМС с использованием продукции цитокинов с помощью суперантигенного энтеротоксина В стафилококка (SEB) (например, IFN γ) в качестве показателя. Данному анализу обычно свойственно небольшое окно 1,5-3-кратного изменения на высвобождение цитокинов. В соответствии с опубликованными данными для анти-PD-1, индукция цитокинов с помощью анти-ICOS антител составляет ~2-кратное увеличение, но оно воспроизводимо в данном анализе среди множества доноров. См., например, Kogman et al., 2014, *Cancer Res.*, 2:846-856. Данные репрезентативного анализа показаны на фиг. 12. Замороженные РВМС, полученные от здоровых доноров, стимулировали с помощью SEB и растворимого анти-ICOS антитела 37A10 (с mG1, mG1-agly или hG1-Fc) в указанных концентрациях (мкг/мл) в течение 3 суток. Собирали супернатанты и измеряли уровни IFN γ в анализе цитокина с гранулами с использованием проточной цитометрии. В качестве контролей использовали анти-CD28 антитело и изотип IgG1 мыши. IFN γ индуцировался клетками РВМС после стимуляции SEB в присутствии растворимых анти-ICOS антител. В данном формате анализа вариант mG1-agly 37A10 показал пониженную активность.

Для скрининга любых потенциальных суперагонистов применяли анализ, в котором первичные CD4+ Т-клетки человека инкубировали с растворимыми или связанными с планшетом анти-ICOS антителами в отсутствие сигнала 1, с использованием в качестве положительного контроля известного анти-CD28 антитела-суперагониста. CD4 Т-клетки человека, активированные в отсутствие анти-CD3, могли пролиферировать только когда их обрабатывали анти-CD28 антителом-суперагонистом (клон CD28.2/5D10) в растворимой форме, но не когда их обрабатывали ICOSL-Fc или анти-ICOS антителом 37A10 (антитело хомяка и варианты hG1-Fc), или анти-CD28 (CD28.2) антителом-несуперагонистом. Ни одно из исследованных анти-ICOS mAb не проявило суперагонистическую активность в этом анализе. Репрезентативные данные представлены на фиг. 13.

Хорошо установлено, что ICOS может сигнализировать посредством механизма передачи сигнала АКТ (обзор в Simpson et al., 2010, *Curr. Opin. Immunol.*, 22:326-332). Способность анти-ICOS антитела индуцировать передачу сигнала посредством АКТ оценивали, как дополнительные способы для демонстрации агонистической активности антитела.

CD4 Т-клетки, выделенные из РВМС человека, стимулировали в течение 24 ч с помощью анти-CD3/анти-CD28, а затем оставляли без стимуляции в течение 24 ч в культуральной среде. Затем клетки инкубировали с анти-ICOS 37A10-mG2a, hICOSL-mG2a Fc или ФСБ в течение 2, 5, 15 или 30 мин с перекрестно-связанным антимышиным антителом-IgG или без него. После инкубации клетки фиксировали, увеличивали их проницаемость и затем окрашивали с помощью анти-фосфо-АКТ антитела. Анализировали процент рАКТ-позитивных клеток методом проточной цитометрии.

Как показано на фиг. 14А-В, рАКТ индуцировался на CD4 Т-клетках после обработки 37A10-mG2a со сходной кинетикой по сравнению с обработкой hICOSL-mG2a. Индукция передачи сигнала рАКТ наблюдали только в присутствии вторичного перекрестно-связывающего средства.

Пример 6. Определение функциональных свойств анти-ICOS антител *In vivo*.

Антитела, выбранные в описанных выше анализах скрининга, оценивали *in vivo* с использованием сингенных опухолевых моделей.

Модель фибросаркомы Sa1N (Ostrand-Rosenberg, 2001, *Curr. Protoc. Immunol.*, Chapter 20) можно использовать для оценки анти-ICOS антител *in vivo*. Определение иммунного профиля мышинной модели Sa1/N показало, что она сильно инфильтрована CD4 Т-клетками и что CD4 Т-клетки экспрессируют высокие уровни ICOS. Этот иммунный профиль является сходным с иммунными профилями образцов NSCLC пациентов, в которых наблюдали высокие уровни инфильтрации CD4 с экспрессией ICOS, главным образом ограниченной компартментом CD4.

Вторая модель, использованная для оценки эффективности анти-ICOS антител, представляет собой модель карциномы СТ26 толстой кишки (Wang et al., 1995, *J. Immunol.*, 9:468 5-4692). Определение им-

мунного профиля мышинной модели СТ26 показало высокие уровни инфильтрации CD8. В этой модели наблюдали экспрессию ICOS в субпопуляции CD8 Т-клеток. Небольшая пропорция образцов NSCLC человека сходным образом показывает экспрессию ICOS в CD8 Т-клетках.

Формы антител для оценки *in vivo*.

IgG1 человека (hIgG1) может параллельно связывать множество рецепторов Fc, включая сильное связывание с активирующими рецепторами Fc, которые способны к перекрестному связыванию рецепторов и опосредованию АЗКЦ и КЗЦ. Обеспечивая способность связывать активирующие рецепторы Fc, hIgG1 обычно способен истощать клетки, которые экспрессируют высокий уровень мишени. Наиболее близкий мышинный эквивалент для hIgG1 является мышинным IgG2a (mIgG2a). Таким образом, в качестве примера в экспериментах *in vivo* для оценки антитела-агониста к ICOS с истощающей способностью могут использовать mIgG2a для имитации свойств hIgG1.

В терапевтических случаях, когда не требуется истощение, можно использовать IgG4 человека (hIgG4), хотя hIgG4 способен к некоторому уровню истощения. В общих чертах, хотя и не точно, по активности он согласуется с IgG1 мыши (mIgG1), который практически исключительно связывает ингибирующие рецепторы FcγRII и, таким образом, способен перекрестно связываться, но не конкретно конкурировать при истощении.

Относительно анти-ICOS антител, антитела хомяка первоначально оценивали *in vivo*, как полные Ab хомяка. Ab хомяка содержат IgG1 хомяка, который обладает свойствами связывания FcR, сходными с mIgG1. Интересующие антитела хомяка клонировали в виде химер с мышинными Fc-участками, либо в виде mIgG2a, либо mIgG1.

Модель фибросаркомы Sa1N.

Для скрининга эффективности потенциальных анти-ICOS антител в качестве первичной модели *in vivo* использовали модель фибросаркомы Sa1N. Таким образом, антитела, выбранные в описанных выше анализах скрининга, оценивали в модели Sa1N. В начальных исследованиях несколько антител хомяка (клоны 7F12, 36E10, 37A10, 16G10 и 35A9) продемонстрировали устойчивую противоопухолевую активность, при введении в качестве единственных средств в дозе 8 мг/кг в модели Sa1N. См. фиг. 15. Клетки фибросаркомы Sa1N (1×10^6) инъецировали п. К. в правый бок наивных мышей A/J (возраст 6-8 недель, самки). Когда объемы опухоли достигли 50-100 мм³ на 7 сутки, мышей рандомизировали. Мыши получали дозу анти-ICOS хомяка (7F12, 36E10, 37A10, 16G10 и 35A9) или изотипного антитела-IgG хомяка в. Б. на сутки 7, 10, 14 и 17. Проводили мониторинг роста опухолей два раза в неделю. N=10.

Потенциально полезное свойство противоракового иммунотерапевтического препарата является способность создавать постоянный и длительный иммунный ответ против опухоли. Определяли способность мыши, которую ранее лечили анти-ICOS антителом, впоследствии отторгнуть опухоль. Мышей лечили антителом в дозе 8 мг/кг на сутки 7, 10, 14 и 17. Впоследствии мышам без опухолей затем повторно имплантировали опухоль на сутки 60. Все мыши, предварительно пролеченные анти-ICOS антителом 7F12 (n=7), отторгали вновь имплантированную опухоль, в отличие от наивных мышей (n=10), у всех, из которых выростали опухоли. См. фиг. 16.

Антитела хомяка клонировали в виде химерных антител с Fc-участками мыши (mG1 или mG2a) для возможности оценивания влияния эффекторной функции Fc в активность *in vivo*. Мыши получали всего 4 дозы дважды в неделю по 4 мг/кг антитела, начиная с суток 11. Анти-CTLA-4 антитело было включено в качестве положительного контроля. Начальный эксперимент по скринингу выполняли в дозе 4 мг/кг и эффективность наблюдали и для формы mG1, и для формы mG2a. Репрезентативные данные для одного из антител хомяка, 37A10, показаны на фиг. 17.

Сингенная опухолевая модель СТ26 толстой кишки.

Сингенная опухолевая модель СТ26 толстой кишки использовалась как для оценки активности единственного средства, а также в качестве комбинированной терапии с анти-PD-1 антителом.

В модели СТ26 несколько анти-ICOS антител хомяка (например, 7F12, 35A9, 36E10, 37A10) проявляли активность как единственное средство. См. фиг. 18. Модель СТ26 также использовали для оценки потенциальной комбинированной активности с анти-PD-1. Когда анти-ICOS антитела комбинировали с анти-PD-1 антителом, была отмечена усиленная противоопухолевая активность. Мышей, которые несли опухоли СТ26, лечили дважды в неделю (по 4 дозы начиная с суток 3), с анти-ICOS антителом (8 мг/кг) самостоятельно или в комбинации с анти-PD-1 антителом (8 мг/кг). Следует отметить, что комбинация анти-PD-1 с анти-ICOS антителом 37A10 приводит к 9/10 мышам без опухолей. См. фиг. 18.

Пример 7. Избирательное истощение Treg влияет на эффективность анти-ICOS антител.

Выполняли исследования *ex vivo* для определения характеристик статуса инфильтратов иммунных клеток после введения доз анти-ICOS антител. Исследования в модели Sa1N показали уменьшение популяции Treg после обработки с помощью 7F12. Мыши получали две дозы анти-ICOS хомяка 7F12, 7F12-mG1 или 7F12-mG2a в количестве 8 мг/кг на сутки 7 и 10. На сутки 12 собирали и анализировали опухоли и селезенки. Отмечено значительное уменьшение Tregs, но не Teff-клеток, но незначительное влияние на популяции Т-клеток в лимфоидных органах, таких как селезенка или лимфоузлы. См. фиг. 19.

Сходные результаты также наблюдали с другими анти-ICOS антителами, такими как 37A10. См.

фиг. 20. Мыши получали две дозы анти-ICOS антител в количестве 8 мг/кг на сутки 7 и 10. На сутки 12 собирали и анализировали опухоли. Сходное уменьшение популяции Treg также наблюдали в модели CT26, после введения доз анти-ICOS антитела.

Собранные вместе, данные исследований TIL (инфильтрирующие опухоли лимфоциты) подтверждают гипотезу, что Treg-клетки избирательно истощаются анти-ICOS антителами, описанными в данном документе, без соответствующего истощения популяций Teff-клеток и исключительно в опухолях, но не других органах или на периферии.

Для формальной демонстрации влияния иммунной системы на эффективность анти-ICOS антитела, выполняли эксперименты по истощению клеток в контексте опухолевой модели Sa1N. Конкретно, у мышей истощали CD8 T-клетки, CD4 T-клетки или комбинация CD4+ CD8 T-клеток. На сутки 6 и 13 после имплантации опухолей мышей лечили с помощью анти-CD8, анти-CD4, анти-CD4+ анти-CD8 или контрольного антитела-Ig (n=10 на группу). Анти-ICOS антитело 7F12 вводили в дозе 8 мг/кг антитела на сутки 7, 10, 14 и 17. Проводили мониторинг роста опухоли два раза в неделю.

Наблюдали заметное уменьшение противоопухолевой эффективности 7F12, когда мыши были истощены по CD4, CD8 или CD4+CD8 T-клеткам. См. фиг. 21.

Пример 8. Избирательное уменьшение Treg гуманизированным анти-ICOS антителом.

PBMC человека инкубировали при 37°C с 100 нг/мл рекомбинантного IL-2 человека в течение 48 ч во влажном инкубаторе с 5% CO₂. Через 48 ч добавляли антитело 37A10S713 в указанных концентрациях. Антитело готовили в виде 10-кратных серийных разведений в культуральной среде, содержащей IL-2. Смеси антител/клеток оставляли дополнительно инкубироваться 72 ч. После инкубации клетки окрашивали на CD3, CD4, CD8, CD25 и FoxP3 согласно стандартных методик и анализировали методом проточной цитометрии. Выполняли количественное определение клеток Treg (CD4+ CD25+ FoxP3+) и Teff (CD4+ CD25- FoxP3-) для каждой концентрации и обработки. Данные для каждой концентрации нормализовали по процентному содержанию каждой субпопуляции в леченной трастузумабом группе.

Результаты данного эксперимента показаны на фиг. 22A. Антитело 37A10S713 вызывало дозозависимое уменьшение Treg-клеток. Как показано на фиг. 22B, Teff- и Treg-клетки экспрессировали сходные уровни ICOS после пяти дней лечения IL-2.

Пример 9. Повторное имплантирование опухоли после лечения анти-ICOS антителом.

Самкам мышей A/J возрастом от шести до восьми недель подкожно в правый бок инокулировали 1×10^6 клеток Sa1/N cells в 100 мкл ФСБ, используя шприцы для введения туберкулина с иглами 27-го калибра. Рост опухолей отслеживали на сутки 7, животных перераспределяли в новые клетки после нормализации среднего объема опухолей в пределах 100-150 мм³ для каждой группы лечения. В каждую группу лечения включали десять мышей. Животных лечили антителами посредством внутрибрюшинной инъекции 0,25 мг/кг анти-ICOS антитела (37A10S713 VH и VL (SEQ ID NO: 60 и 61) с мышинным IgG2a) или изотипным контролем. Дозирование выполняли на сутки 7 для однократной дозы или на сутки 7 и 14 для 2 доз. Рост опухоли и массы тела животных отслеживали два раза в неделю. Мышей умерщвляли, когда объем опухоли достигал ~2000 мм³, или если имели место признаки клинического тяжелого недомогания, такого как сильное изъязвление, в соответствии с протоколом IACUC.

На фиг. 23, левое изображение, показывает объем опухоли у мышей, которым вводили однократную дозу анти-ICOS антитела (n=10) или две дозы анти-ICOS антитела (n=10).

Выполняли эксперимент с повторным имплантированием опухоли для оценки продолжительности ответа. Для 7 мышей с имплантированными ранее клетками Sa1/N, у которых были удалены опухоли с помощью однократной дозы или двух доз из 0,25 мг/кг антитела 37A10S713-mIgG2a, повторно имплантировали в противоположный бок клетки Sa1/N через 10 недель после начальной имплантации опухоли. В качестве контроля наивным мышам также имплантировали клетки Sa1/N (N=10). Животные оценивали на рост опухоли на основе двухнедельного периода.

Как показано на фиг. 23, правое изображение, ни у одной из мышей, у которых ранее были удалены опухоли с помощью лечения анти-ICOS антителом, не был отмечен рост опухоли в эксперименте с повторным имплантированием.

Пример 10. Экспрессия лиганда ICOS (ICOS) у мышей и яванских макак, несущих опухоли Sa1/N, вводили анти-ICOS антитело.

Самкам мышей возрастом восемь недель A/J инокулировали опухолевые клетки Sa1/N на нулевые сутки. На сутки 7, когда опухоли достигали ~100 мм³, мышам вводили однократную в. Б. дозу из 5 или 100 мкг антитела 37A10 либо с мышинным IgG1 или IgG2a, либо изотипное контрольное антитело. Мышам вводили последующую дозу из антитела на сутки 10 и собирали ткани (кровь, селезенку и опухоль) на сутки 12. После обработки тканей клетки инкубировали с 5% Fc-блокирующим раствором (5% растворенная нормальная сыворотка крысы, мыши и человека, 5% фетальная сыворотка теленка, 0,1 мг/мл Fc-блокирующим Ab 2.4G2, 0,01% азидом натрия) в течение 15 мин на льду в проточном окрашивающем буферном растворе (FSB:5% FBS, 0,01% азид натрия в 1xФСБ). После Fc-блокирующего раствора клетки окрашивали смесью для внеклеточного окрашивания (анти-CD45-BV510, анти-CD19-BV605, анти-ICOSL-PE, краситель с возможностью фиксации жизнеспособности eFluor 780) в FSB в течение 1 ч на

льду. Клетки промывали дважды с помощью FSB. Клетки фиксировали с помощью раствора для фиксации/пермебилизации в течение 30 мин на льду. Клетки промывали дважды с помощью 1× буферного раствора для пермебилизации, затем окрашивали смесью для внутриклеточного окрашивания (анти-CD3-BUV496, в буферном растворе для пермебилизации в течение 1 ч на льду. Клетки промывали дважды буферным раствором для пермебилизации, затем ресуспендировали в растворе FSB с 1,5% PFA. Клетки анализировали на приборе BD Fortessa, а данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo.

Образцы анализировали на проточном цитометре BD Fortessa. Для анализа экспрессии ICOSL анализировали окрашивание ICOSL на жизнеспособных CD45+ CD3- CD19+ В-клетках. Получали средние интенсивности флуоресценции (MFI) ICOSL.

Антитело 37A10S713 с IgG1 человека вводили посредством 1-часовой внутривенной инфузии трем яванским макакам на группу дозы (0,5 мг/кг, 5 мг/кг, 75 мг/кг и только носитель). Отбирали кровь перед введением первой дозы (сутки 1), через 48 ч после первой дозы (сутки 3), через 7 суток после первой дозы (перед второй дозой; сутки 8) и через 48 ч после второй дозы (сутки 10). Образцы по 95 мл цельной крови сначала блокировали по Fc с помощью 5 мкл красителя Human TruStain в течение 15 мин на льду. После блокирования Fc добавляли 100 мкл смеси антител, содержащей анти-CD3 FITC, анти-CD20 PE, анти-CD14 PE/Cy7, краситель для определения жизнеспособности e780 и cytoICOS-Fc DyLight 650. Кровь и смесь антител инкубировали на льду в течение 60 мин. После инкубации образцы центрифугировали при 500×g в течение 5 мин. Супернатанты декантировали и образцы ресуспендировали в 200 мкл окрашивающего буферного раствора для FACS. Этапы окрашивания повторяли три раза с последним ресуспендированием в 200 мкл буферного раствора для окрашивания+0,1% параформальдегида.

Образцы анализировали на проточном цитометре BD Fortessa. Для анализа экспрессии ICOSL анализировали окрашивание ICOSL меченым DyLight 650 белком cytoICOS-Fc на жизнеспособных CD3-CD20+ В-клетках. Значения MFI ICOSL нормализовали на носителе для каждого момента времени.

Результаты этих экспериментов показаны на фиг. 24А и 24В. Наблюдали дозозависимое увеличение экспрессии ICOS-L для обработок всеми антителами и дозами и во всех тканях относительно мышей, пролеченных изотипным контролем. См. фиг. 24А. Сходным образом, наблюдали дозозависимое увеличение экспрессии ICOS-L во всех моментах времени групп дозирования 0,5 и 5 мг/кг у яванских макаков относительно носителя и образцов предварительного исследования. См. фиг. 24В. Введение ICOSL также наблюдали в группе 75 мг/кг, но наблюдавшаяся экспрессия может быть недостаточно презентированной из-за потенциального влияния лекарственного средства, поскольку анти-ICOS антитело способно связывать реактив для окрашивания (cytoICOS-Fc).

Захват мишени ICOS также можно оценивать по измерению анализом доступности рецепторов, например, следующим образом. Наивным мышам в. Б. инъектировали либо изотипный контрольный mIgG2a в дозе 2,5 мг/кг, либо 37A10S713 с мышинным IgG2a в дозе 2,5 мг/кг. В различные моменты времени после инъекции собирали кровь в покрытые ЭДТК микропробирки посредством подчелюстного отбора.

Цельную кровь блокировали по Fc с использованием мышинового красителя TruStain (BioLegend) в течение 5 мин на льду. После инкубации добавляли 100 мкл 2× концентрированную смесь антител для внеклеточного окрашивания для каждого образца в течение 30 мин при 4°C. Центрифугировали образцы, фиксировали и увеличивали их проницаемость в буферном растворе для Foxp3 (eBioSciences) в течение 30 мин при 4°C. Затем центрифугировали образцы и ресуспендировали их в растворе антитела для внутриклеточного окрашивания в течение 30 мин при 4°C. Центрифугировали образцы и ресуспендировали их в 0,1% PFA. Анализировали образцы на приборе BD LSR II Fortessa. Идентифицировали Treg как живые CD45+ CD3+ CD4+ Foxp3+. Идентифицировали Teff-клетки как живые CD45+ CD3+ CD4+ Foxp3-. Идентифицировали CD8+ клетки как живые CD45+ CD3+ CD8+. В качестве реактива для окрашивания ICOS использовали флуоресцентно меченные 37A10S713-mG2a (конъюгированы с DyLight 650). Доступность рецептора для каждого момента времени определяли с использованием следующей формулы:

$$\% \text{ доступности рецептора в момент времени } t = \left(\frac{\text{MFI } 37A10S713 - \text{mG2aDy650 в момент } t - \text{MFI изотипн. Dy650 в момент } t}{\text{MFI } 37A10S713 - \text{mG2aDy650 предв. исслед.} - \text{MFI изотипн. Dy650 предв. исслед.}} \right) \times 100.$$

Результаты показывают, что после введения анти-ICOS антител уровни свободного рецептора не выявляются, давая основание предположить, что антитела насыщают все доступные целевые молекулы ICOS.

Пример 11. Индукция хемокинов Th-1 и цитокинов после лечения анти-ICOS антителом.

Свежие опухоли легкого пациентов получали в течение 24 ч после хирургической операции. Из опухоли вручную удаляли мягкую ткань и оставшуюся солидную опухоль погружали в 4% низкоплавкий агар в контейнере для литья и позволяли затвердеть на льду. Погруженную в гель опухоль разрезали вибратором (Leica) (скорость: 2, частота: 9) для получения срезов толщиной 300 мкм. Если опухоль была слишком мягкой и ее было невозможно разрезать вибратором, то ткань вручную разрезали лезвием.

Срезы помещали в межлуночный фильтр на 40 мкм (Millipore) (~1 срез/лунку) и модуль переносили

на лунки 6-луночного планшета, которые содержали 1,5 мл среды для гистокультуры (заполненные RPMI 1640/AIM-V). Затем в среду соответствующей лунки добавляли соответствующее средство для обработки. Обработки включали 10 мкг/мл анти-hlgG1 (Lake Pharma, серия № 3086-849598) в качестве изотипного контроля, 10 мкг/мл антитела 37A10S713 с IgG человека (SEQ ID NO: 188 и 189) или 10 мкг/мл анти-PD-1 (IgG4) антитела. Параллельные планшеты готовили в различные моменты времени в диапазоне 6-72 ч. Планшеты помещали в инкубатор при 37°C, 5% CO₂.

В требуемые моменты времени срезы опухоли собирали и погружали в RNALater (Ambion). Экстрагировали РНК с использованием мининабора RNeasy (Qiagen, № по кат. 74106) в соответствии с инструкциями производителя. После экстракции РНК использовали 1 мкг РНК для обратной транскрипции, используя набор для синтеза кДНК Bio-Rad iScript (№ по кат. 170-8891). Продукт ОТ разбавляли 1 к 7 и для каждой кПЦР реакции использовали 3 мкл раствора. Проводили кПЦР путем использования мастермикса для генной экспрессии TaqMan из Thermo Fisher Scientific (№ по кат. 4369016), применяя систему реального времени Bio-Rad. Проведенные анализы TaqMan перечислены в табл. 6.

Значения экспрессии нормализовали к CD45, с рассчитанным кратным изменением

$$fold\ change = \frac{1/2^{(exp.target\ Ct - exp.CD45\ Ct)}}{1/2^{(iso.target\ Ct - iso.CD45\ Ct)}}$$

Таблица 6

Анализы TaqMan хемокинов и цитокинов

Мишень	Идентификатор анализа	Источник
CD8B	Hs00174762_m1	ThermoFisher Scientific
CSF2	Hs00929873_m1	ThermoFisher Scientific
PRF1	Hs00169473_m1	ThermoFisher Scientific
GZMA	Hs00989184_m1	ThermoFisher Scientific
GZMB	Hs00188051_m1	ThermoFisher Scientific
IL2	Hs00174114_m1	ThermoFisher Scientific
CXCL9	Hs00171065_m1	ThermoFisher Scientific
CXCL10	Hs01124251_g1	ThermoFisher Scientific
CXCL11	Hs04187682_g1	ThermoFisher Scientific
FOXP3	Hs01085834_m1	ThermoFisher Scientific
CTLA4	Hs00175480_m1	ThermoFisher Scientific
CD45	Hs04189704_m1	ThermoFisher Scientific
CXCL13	Hs00757930_m1	ThermoFisher Scientific

Результаты данного эксперимента показаны на фиг. 25. В момент времени 6 ч инкубирования с образцом опухоли легкого 1, анти-ICOS антитело приводило к увеличению экспрессии GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 и CXCL13. Анти-PD-1 антитело также увеличивало экспрессию GZMa, GZMb, CSF2, CXCL9 и CXCL10, хотя и в меньшей степени, и показывало сходное увеличение CXCL11. Для образца опухоли легкого 2 в момент времени 24 ч обработка анти-ICOS антитела показала устойчивое увеличение CXCL11 и несколько продлившееся повышение IL2, CXCL9 и L10. Анти-PD-1 антитело показало лишь слабое повышение CXCL11 в момент 24 ч.

Пример 12. Индукция лиганда NKp46 на Treg-клетках после обработки анти-ICOS антителом.

Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли у здоровых доноров (Research Blood Components) используя центрифугирование на фиколе (GE Life Sciences), замораживали в BamBanker (Wako-Chem) и хранили до использования при -150°C. PBMC инкубировали с растворимым анти-ICOS антителом и помещали на планшет, покрытый античеловеческим CD3 (покрытие 1 мкг/мл, Biolegend, OKT3) при 37°C в среде RPMI (Gibco) с добавкой 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma-Aldrich) и 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco). В анализе исследовали три антитела: сильное антитело-агонист 37A10S713, слабое антитело-агонист и слабое антитело-антагонист. Через четверо суток PBMC осторожно отделяли от планшетов и промывали раствором DPBS (Gibco), содержащим 1% фетальной бычьей сыворотки, 0,05% азида натрия (Ricc) и 2 мМ ЭДТК (Ambion). Затем клетки блокировали с помощью красителя Human TruStain FcX (Biolegend). Для выявления лиганда NKp46 клетки инкубировали с 2 мкг/мл NKp46-hlgG1 Fc (R&D Systems, 1850-NK). NKp46-hlgG1 Fc, связанный с клетками, выявляли с использованием конъюгированного с PE античеловеческого IgG (Biolegend, поликлональный). Клетки снова блокировали красителем Human TruStain FcX, а затем окрашивали с помощью античеловеческого

CD56 (Biolegend, Brilliant Violet 711, HCD56), античеловеческого CD16 (Biolegend, Brilliant Violet 785, 3G8), античеловеческого CD4 (Biolegend, Brilliant Violet 510, OKT4), античеловеческого CD8 (BD Biosciences, BUV395, RPA-T8), античеловеческого CD25 (Biolegend, Brilliant Violet 605, BC96) и фиксирующей жизнеспособность красителя (eBioscience, eFluor 780). После окрашивания клетки фиксировали и повышали проницаемость с помощью набора буферных растворов для окрашивания Foxp3/фактора транскрипции (eBioscience). После повышения проницаемости клетки окрашивали внутриклеточно с помощью античеловеческого CD3 (BD Biosciences, PE-CF594, UCHL1) и античеловеческого Foxp3 (eBioscience, APC, PCN101). Затем клетки фиксировали в параформальдегиде (Alfa Aesar). Данные получали на приборе BD LSRII Fortessa и анализировали на программном обеспечении FlowJo v10.1.

Результаты данного эксперимента показаны на фиг. 26 и 27. Обработка анти-ICOS антителом-агонистом 37A10S713 приводила к сильной индукции лиганда NKp46 на Treg-клетках из трех различных доноров. См. фиг. 26A-F (на фиг. 26A-B показаны данные от донора 1, на фиг. 26C-D показаны данные от донора 2, а на фиг. 26E-F показаны данные от донора 3). Индукция лиганда NKp46 на Teff-клетках была не такой сильной, как на Treg-клетках. См. фиг. 26A-F. В дополнение к этому обработка анти-ICOS антителом-агонистом 37A10S713 приводила к потере CD16 (сбрасывание CD16) на NK-клетках, что предполагает активацию NK-клеток. См. фиг. 27.

Без приверженности к какой-либо конкретной теории авторами постулируется, что анти-ICOS антитело-агонист 37A10S713 существенно увеличивает уровни лиганда NKp46 на Treg-клетках, а также активирует NK-клетки, приводя к избирательному истощению Treg.

Данное описание изобретения может быть воплощено в других конкретных формах без отхода от его сущности или существенных характеристик. Поэтому приведенные выше варианты реализации изобретения должны во всех аспектах считаться скорее иллюстративными, чем ограничивающими данное описание. Объем данного описания, таким образом, обозначен прилагаемой формулой изобретения, а не приведенным выше описанием, и все изменения, подпадающие под смысл и диапазон эквивалентности прилагаемой формулы изобретения, должны быть включены в ее объем.

Таблица последовательностей

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	Предшественник ICOS человека (с сигнальной последовательностью); UniProtKB/Swiss-Prot: Q9Y6W8.1; 07-JAN-2015	MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLLKGQ ILCDLTKTKG SGNVTSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD HSHANYFCN LSIFDPPPFK VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY MFMRAVNTAK KSRLTDVTL
2	Зрелый ICOS человека (без сигнальной последовательности)	EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLLKGQ ILCDLTKTKG SGNVTSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD HSHANYFCN LSIFDPPPFK VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY MFMRAVNTAK KSRLTDVTL
3	Предшественник ICOS мыши (с сигнальной последовательностью); UniProtKB/Swiss-Prot: Q9WVS0.2; 07-JAN-2015	MKPYFCRVFV FCFILRLLTG EINGSADHRM FSFHNGGVQI SCKYPETVQQ LKMRFRERE VLCELTKTKG SGNVTSIKNP MLCLYHLSNN SVSFFLNNPD SSQGSYYFCS LSIFDPPPFQ ERNLSGGYLH IYESQLCCQL KLWLPVGGAA FVVVLLFGCI LIIWFSKKKY GSSVHDPNSE YMFMAAVNTN KKSRLAGVTS
4	Зрелый ICOS мыши (без сигнальной последовательности)	EINGSADHRM FSFHNGGVQI SCKYPETVQQ LKMRFRERE VLCELTKTKG SGNVTSIKNP MLCLYHLSNN SVSFFLNNPD SSQGSYYFCS LSIFDPPPFQ ERNLSGGYLH IYESQLCCQL KLWLPVGGAA FVVVLLFGCI LIIWFSKKKY GSSVHDPNSE YMFMAAVNTN KKSRLAGVTS
5	Предшественник ICOS яванского макака (с сигнальной последовательностью)	MKSGLWYFFL FCLHMKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLLKGQ ILCDLTKTKG SGNKVSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD RSHANYFCN LSIFDPPPFK VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCATF VVVCIFGCIL ICWLTKKKYS STVHDPNGEY MFMRAVNTAK KSRLTGTFP
6	ICOS яванского макака (без сигнальной последовательности)	EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLLKGQ ILCDLTKTKG SGNKVSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD RSHANYFCN LSIFDPPPFK VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCATF VVVCIFGCIL ICWLTKKKYS STVHDPNGEY MFMRAVNTAK KSRLTGTFP
10	Вариабельный участок тяжелой цепи 7F12	E V Q L V E S G G G L V K P G G S L T L S C A A S G F T F S D Y W M D W V R Q G P G K G L E W V G N I D E D G S T T Y Y A P F V K G R F T I S R D N A K K T L Y L Q M N S V K S E D T A T Y Y C T R W G R Y A F D S W G Q G T L V T V S S
11	Вариабельный участок легкой цепи 7F12	D I V M T Q S P S S L A V S P G D K V T I N C K S S Q S L L S G N Y N Y L A W Y Q Q K T G Q A P K L L I F Y A S T R H T G V P D R F M G S G S G T D F S L T I N S F Q T E D L G D Y Y C Q H H Y S T P P T F G P G T K L E I K
12	7F12 VH CDR1	G F T F S D Y W M D
13	7F12 VH CDR2	N I D E D G S T T Y Y A P F V K G
14	7F12 VH CDR3	W G R Y A F D S
15	7F12 VL CDR1	K S S Q S L L S G N Y N Y L A
16	7F12 VL CDR2	Y A S T R H T
17	7F12 VL CDR3	Q H H Y S T P P T
20	Вариабельный участок тяжелой цепи 37A10	E V Q L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S D Y W M D W V R Q A P G K G L E W V G N I D E D G S I T E Y S P F V K G R F T I S R D N V K N T L Y L Q M N S V K S E D T A T Y Y C T R W G R F G F D S W G Q G T L V T V S S
21	Вариабельный участок легкой цепи 37A10	D I V M T Q S P S S L A V S A G D R V T I N C K S S Q S L L S G S F N Y L T W Y Q Q K T G Q A P K L L I F Y A S T R H T G V P D R F M G S

		G S G T D F T L T I N S F Q T E D L G D Y Y C H H H Y N A P P T F G P G T K L E L R
22	37A10 VH CDR1	G F T F S D Y W M D
23	37A10 VH CDR2	N I D E D G S I T E Y S P F V K G
24	37A10 VH CDR3	W G R F G F D S
25	37A10 VL CDR1	K S S Q S L L S G S F N Y L T
26	37A10 VL CDR2	Y A S T R H T
27	37A10 VL CDR3	H H H Y N A P P T
30	Вариабельный участок тяжелой цепи 35A9	E V Q L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S D Y W M D W V R Q A P G K G L E W V G N I D E D G S I A E Y S P F V K G R F T I S R D N V K N T L Y L Q M N S V K S E D T A T Y Y C S R W G R F A F D S W G Q G T L V T V S S
31	Вариабельный участок легкой цепи 35A9	D I V M T Q S P S S L A V S A G D R V T I N C K S S Q S L L S G S F N Y L T W Y Q Q K T G Q A P K L L I F Y A S T R H T G V P D R F M G S G S G T D F T L T I N S F Q T E D L G D Y Y C H H H Y N A P P T F G P G T K L E L R
32	35A9 VH CDR1	G F T F S D Y W M D
33	35A9 VH CDR2	N I D E D G S I A E Y S P F V K G
34	35A9 VH CDR3	W G R F A F D S
35	35A9 VL CDR1	K S S Q S L L S G S F N Y L T
36	35A9 VL CDR2	Y A S T R H T
37	35A9 VL CDR3	H H H Y N A P P T
40	Вариабельный участок тяжелой цепи 36E10	E V Q L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S D Y W M D W V R Q A P G K G L E W V G N I D E D G S I T E Y S P F V K G R F T I S R D N V K N I L Y L Q M N S V K S E D T A T Y Y C T R W G R F A F D S W G Q G T L V T V S S
41	Вариабельный участок легкой цепи 36E10	D I V M T Q S P S S L A V S P G D R V T I N C K S S Q S L L S G S F H Y L T W Y Q Q K T G Q A P K L L I F Y A S T R H T G V P D R F M G S G S G T D F T L T I N S F Q T E D L G D Y Y C H H H Y N A P P T F G P G T K L E L R
42	36E10 VHCDR1	G F T F S D Y W M D
43	36E10 VHCDR2	N I D E D G S I T E Y S P F V K G
44	36E10 VHCDR3	W G R F A F D S
45	36E10 VLCDR1	K S S Q S L L S G S F H Y L T
46	36E10 VLCDR2	Y A S T R H T
47	36E10 VLCDR3	H H H Y N A P P T
50	Вариабельный участок тяжелой цепи 16G10	E V Q L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S D Y W M D W V R Q A P G K G L E W V G N I D H D G N I I N F A P S V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S V K S E D T A T Y Y C A R W G H Y A F D S W G Q G T L V T V S S
		D I V M T Q S P S S L A V S A G D K V T I N C

	легкой цепи 16G10	K S S Q S L L S S G Y N Y L I W Y Q Q K T G Q A P K L L I F Y A S T R H T G V P D R F I G S G S G T D F T L T I T S F Q T E D L G D Y Y C Q H H Y S S P P T F G P G T K L E I K
52	16G10 VH CDR1	G F T F S D Y W M D
53	16G10 VH CDR2	N I D H D G N I N F A P S V K G
54	16G10 VH CDR3	W G H Y A F D S
55	16G10 VLCDR1	K S S Q S L L S S G Y N Y L I
56	16G10 VLCDR2	Y A S T R H T
57	16G10 VLCDR3	Q H H Y S S P P T
60	Вариабельный участок тяжелой цепи 37A10S713	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYWMDWVRQA PGKGLVWVSN IDEDEGSITEY SPFVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCTRWG RFGFDSWGQG TLTVVSS
61	Вариабельный участок легкой цепи 37A10S713	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SGSFNYLTWY QQKPGQPPKL LIFYASTRHT GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHHYNAPP TFGPGTKVDI K
62	37A10S713 VHCDR1	GFTFSDYWMD
63	37A10S713 VH CDR2	NIDEDGSITEYSPFVKG
64	37A10S713 VH CDR3	WGRFGFDS
65	37A10S713 VL CDR1	KSSQSLLSGSFNYLT
66	37A10S713 VL CDR2	YASTRHT
67	37A10S713 VL CDR3	HHHYNAPPT
70	Вариабельный участок тяжелой цепи 37A10S714	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYWMDWVRQA PGKGLVWVSN IDEDEGSITEY SPFVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCTRWG RFGFDSWGQG TLTVVSS
71	Вариабельный участок легкой цепи 37A10S714	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SGSFNYLTWY QQKPGQPPKL LIFYASTRET GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHHYNAPP TFGPGTKVDI K
72	37A10S714 VHCDR1	GFTFSDYWMD
73	37A10S714 VH CDR2	NIDEDGSITEYSPFVKG
74	37A10S714 VH CDR3	WGRFGFDS
75	37A10S714 VL CDR1	KSSQSLLSGSFNYLT
76	37A10S714 VL CDR2	YASTRET
77	37A10S714 VL CDR3	HHHYNAPPT
80	Вариабельный участок тяжелой цепи 37A10S715	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYWMDWVRQA PGKGLVWVSN IDEDEGSITEY SPFVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCTRWG RFGFDSWGQG TLTVVSS
81	Вариабельный участок легкой цепи 37A10S715	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SGSFNYLTWY QQKPGQPPKL LIFYASTRQT GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHHYNAPP TFGPGTKVDI K
82	37A10S715 VHCDR1	GFTFSDYWMD
83	37A10S715 VHCDR2	NIDEDGSITEYSPFVKG
84	37A10S715 VHCDR3	WGRFGFDS
85	37A10S715 VLCDR1	KSSQSLLSGSFNYLT
86	37A10S715 VLCDR2	YASTRQT
87	37A10S715 VLCDR3	HHHYNAPPT
90	Вариабельный участок тяжелой цепи 37A10S716	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYWMDWVRQA PGKGLVWVSN IDESGSITEY SPFVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCTRWG RFGFDSWGQG TLTVVSS
91	Вариабельный участок легкой цепи 37A10S716	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SGSFNYLTWY QQKPGQPPKL LIFYASTRHT GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHHYNAPP TFGPGTKVDI K
92	37A10S716 VHCDR1	GFTFSDYWMD
93	37A10S716 VHCDR2	NIDESGSITEYSPFVKG
94	37A10S716 VHCDR3	WGRFGFDS
95	37A10S716 VLCDR1	KSSQSLLSGSFNYLT
96	37A10S716 VLCDR2	YASTRHT
97	37A10S716 VLCDR3	HHHYNAPPT
100	Вариабельный участок тяжелой цепи	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYWMDWVRQA PGKGLVWVSN IDESGSITEY SPFVKGRFTI SRDNAKNTLY

	37A10S717	LQMNSLRAED TAVYYCTRWG RFGFDSWGQG TLVTVSS
101	Вариабельный участок легкой цепи 37A10S717	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SGSFNLYTWY QQKPGQPPKL LIFYASTRET GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHHYNAPP TFGPGTKVDI K
102	37A10S717 VHCDR1	GFTFSDYWMD
103	37A10S717 VHCDR2	NIDESGSITEYSFFVKG
104	37A10S717 VHCDR3	WGRFGFDS
105	37A10S717 VLCDR1	KSSQSLLSGSFNYLT
106	37A10S717 VLCDR2	YASTRET
107	37A10S717 VLCDR3	HHHYNAPPT
110	Вариабельный участок тяжелой цепи 37A10S718	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYWMDWVRQA PGKGLVWVSN IDESGSITEY SPFVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCTRWG RFGFDSWGQG TLVTVSS
111	Вариабельный участок легкой цепи 37A10S718	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SGSFNLYTWY QQKPGQPPKL LIFYASTRQT GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHHYNAPP TFGPGTKVDI K
112	37A10S718 VHCDR1	GFTFSDYWMD
113	37A10S718 VHCDR2	NIDESGSITEYSFFVKG
114	37A10S718 VHCDR3	WGRFGFDS
115	37A10S718 VLCDR1	KSSQSLLSGSFNYLT
116	37A10S718 VLCDR2	YASTRQT
117	37A10S718 VLCDR3	HHHYNAPPT
120	Вариабельный участок тяжелой цепи 16G10S71	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYWMDWVRQA PGKGLVWVSN IDHDGNIINF APSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARWG HYAFDSWGQG TLVTVSS
121	Вариабельный участок легкой цепи 16G10S71	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGYNYLIWY QQKPGQPPKL LIFYASTRHT GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHYYSSPP TFGPGTKVDI K
122	16G10S71 VH CDR1	GFTFSDYWMD
123	16G10S71 VH CDR2	NIDHDGNIINFAPSVKG
124	16G10S71 VH CDR3	WGHYAFDS
125	16G10S71 VLCDR1	KSSQSLLSSGYNYLI
126	16G10S71 VLCDR2	YASTRHT
127	16G10S71 VLCDR3	QHYYSSPPT
130	Вариабельный участок тяжелой цепи 16G10S72	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYWMDWVRQA PGKGLVWVSN IDHDGNIINF APSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARWG HYAFDSWGQG TLVTVSS
131	Вариабельный участок легкой цепи 16G10S72	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGYNYLIWY QQKPGQPPKL LIFYASTRET GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHYYSSPP TFGPGTKVDI K
132	16G10S72 VH CDR1	GFTFSDYWMD
133	16G10S72 VH CDR2	NIDHDGNIINFAPSVKG
134	16G10S72 VH CDR3	WGHYAFDS
135	16G10S72 VLCDR1	KSSQSLLSSGYNYLI
136	16G10S72 VLCDR2	YASTRET
137	16G10S72 VLCDR3	QHYYSSPPT
140	Вариабельный участок тяжелой цепи 16G10S73	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYWMDWVRQA PGKGLVWVSN IDHDGNIINF APSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARWG HYAFDSWGQG TLVTVSS
141	Вариабельный участок легкой цепи 16G10S73	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGYNYLIWY QQKPGQPPKL LIFYASTRQT GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHYYSSPP TFGPGTKVDI K
142	16G10S73 VH CDR1	GFTFSDYWMD
143	16G10S73 VH CDR2	NIDHDGNIINFAPSVKG
144	16G10S73 VH CDR3	WGHYAFDS
145	16G10S73 VLCDR1	KSSQSLLSSGYNYLI
146	16G10S73 VLCDR2	YASTRQT
147	16G10S73 VLCDR3	QHYYSSPPT
150	Вариабельный участок тяжелой цепи 16G10S83	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYWMDWVRQA PGKGLEWVSN IDHDGNIINF APSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNsvRAED TAVYYCARWG HYAFDSWGQG TLVTVSS
151	Вариабельный участок	DIVMTQSPDS LAVSAGERVT INCKSSQSLL SSGYNYLIWY

	легкой цепи 16G10S83	QQKPGQPPKL LIFYASTRQT GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHYYSSPP TFGQGTKLEI K
152	16G10S83 VH CDR1	GFTFSDYWMD
153	16G10S83 VH CDR2	NIDHDGNIINEAFSVKG
154	16G10S83 VH CDR3	WGHYAFDS
155	16G10S83 VLCDR1	KSSQSLLSGGYNYLI
156	16G10S83 VLCDR2	YASTRQT
157	16G10S83 VLCDR3	QHYYSSPPT
160	Вариабельный участок тяжелой цепи 35A9S79	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYWMDWVRQA PGKGLVWVSN IDEGGSIAEY SPFVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG RFAFDSWGQG TLVTVSS
161	Вариабельный участок легкой цепи 35A9S79	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SGSFNLYLTWY QQKPGQPPKL LIFYASTRQT GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHHYNAPP TFGPGTKVDI K
162	35A9S79 VH CDR1	GFTFSDYWMD
163	35A9S79 VH CDR2	NIDEDGSIAEYSPFVKG
164	35A9S79 VH CDR3	WGRFAFDS
165	35A9S79 VL CDR1	KSSQSLLSGTFNYLT
166	35A9S79 VL CDR2	YASTRQT
167	35A9S79 VL CDR3	HHHYNAPPT
170	Вариабельный участок тяжелой цепи 35A9S710	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYWMDWVRQA PGKGLVWVSN IDEGGSIAEY SPFVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG RFAFDSWGQG TLVTVSS
171	Вариабельный участок легкой цепи 35A9S710	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SGSFNLYLTWY QQKPGQPPKL LIFYASTRHT GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHHYNAPP TFGPGTKVDI K
172	35A9S710 VH CDR1	GFTFSDYWMD
173	35A9S710 VH CDR2	NIDEDGSIAEYSPFVKG
174	35A9S710 VH CDR3	WGRFAFDS
175	35A9S710 VL CDR1	KSSQSLLSGTFNYLT
176	35A9S710 VL CDR2	YASTRHT
177	35A9S710 VL CDR3	HHHYNAPPT
180	Вариабельный участок тяжелой цепи 35A9S89	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYWMDWVRQA PGKGLEWVSN IDEGGSIAEY SPFVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG RFAFDSWGQG TLVTVSS
181	Вариабельный участок легкой цепи 35A9S89	DIVMTQSPDS LAVSAGERVT INCKSSQSLL SGSFNLYLTWY QQKPGQPPKL LIFYASTRQT GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHHYNAPP TFGQGTKLEI K
182	35A9S89 VH CDR1	GFTFSDYWMD
183	35A9S89 VH CDR2	NIDEDGSIAEYSPFVKG
184	35A9S89 VH CDR3	WGRFAFDS
185	35A9S89 VL CDR1	KSSQSLLSGTFNYLT
186	35A9S89 VL CDR2	YASTRQT
187	35A9S89 VL CDR3	HHHYNAPPT
188	Тяжелая цепь человеческого IgG1 37A10S713	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYWMDWVRQA PGKGLVWVSN IDEGGSITEY SPFVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCTRWG RFGFDSWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKHTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVWDVSHED PEVKFNWYVD CVEVHNAKTK PREEQYNSTY RWSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTIKAK GQPREPQVYV LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK
189	Легкая цепь к человеческого 37A10S713	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SGSFNLYLTWY QQKPGQPPKL LIFYASTRHT GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHHYNAPP TFGPGTKVDI KRTVAAPSVE IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYLSL STLTLTKADY EKHKVIACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
190	Предшественник ICOS крысы (с сигнальной последовательностью); UniProt Q9R1T7	MKPYFSCVFE FCFLIKLLTG ELNDLANHRM FSHDGGVQI SCNYPETVQQ LKMQLFKDRE VLCDLTKTKG SGNTVSIKNP MSCPYQLSNN SVSFFLDNAD SSQGSYFLCS LSIFDPPPPFQ EKNLSGGYLL IYESQLCCQL KLWLPVGCAG FVAALLFGCI FIVVFAKKKY RSSVHDPNSE YMFMAAVNTN KKSRLAGMTS
191	Зрелый ICOS крысы (без сигнальной последовательности)	ELNDLANHRM FSHDGGVQI SCNYPETVQQ LKMQLFKDRE VLCDLTKTKG SGNTVSIKNP MSCPYQLSNN SVSFFLDNAD SSQGSYFLCS LSIFDPPPPFQ EKNLSGGYLL IYESQLCCQL KLWLPVGCAG FVAALLFGCI FIVVFAKKKY RSSVHDPNSE YMFMAAVNTN KKSRLAGMTS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, связывающееся с ICOS, где антитело

i) содержит (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; (b) HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 или 93; (c) HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; (d) LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65; (e) LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, 76 или 86; и (f) LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67; или

ii) содержит (a) HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72; (b)

лотную последовательность SEQ ID NO: 111.

4. Антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.

5. Антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что антитело представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело.

6. Антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из фрагмента Fab, Fab', Fv, scFv или (Fab')₂.

7. Антитело по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что антитело представляет собой полноразмерное антитело.

8. Антитело по п.7, отличающееся тем, что тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 188, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189.

9. Антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что введение данного антитела млекопитающему приводит к (а) увеличению Т-эффекторных (Teff) клеток в организме млекопитающего, и/или (б) активации Т-эффекторных (Teff) клеток в организме млекопитающего и/или уменьшению Т-регуляторных (Treg) клеток в организме млекопитающего, где Teff-клетки являются необязательно CD4⁺ FoxP3⁻ Т-клетками, или CD4⁺ FoxP3⁻ Т-клетками и CD8⁺ Т-клетками, или CD8⁺ Т-клетками; и где Treg-клетки являются необязательно CD4⁺ FoxP3⁺ Т-клетками.

10. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп.1-9.

11. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.10.

12. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.11.

13. Способ получения анти-ICOS антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по п.12 в условиях, подходящих для экспрессии данного антитела, включающий выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.

14. Применение антитела по любому из пп.1-9 для лечения ракового заболевания у млекопитающего.

15. Применение по п.14, отличающееся тем, что раковое заболевание выбирают из меланомы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), почечноклеточной карциномы (RCC), рака желудка, рака мочевого пузыря, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Ходжкина, рака яичника, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC).

16. Применение антитела по любому из пп.1-9 по меньшей мере с одним дополнительным лекарственным средством для лечения ракового заболевания у млекопитающего.

17. Применение по п.16, где раковое заболевание выбирают из меланомы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), почечноклеточной карциномы (RCC), рака желудка, рака мочевого пузыря, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Ходжкина, рака яичника, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC).

18. Применение по п.16 или 17, где дополнительное лекарственное средство выбирают из анти-PD-1 антитела, анти-PD-L1 антитела или противораковой вакцины.

19. Применение по п.18, где противораковую вакцину выбирают из ДНК-вакцины, сконструированной противовирусной вакцины, сконструированной вакцины против опухолевых клеток и противораковой вакцины, разработанной с использованием неоантигенов.

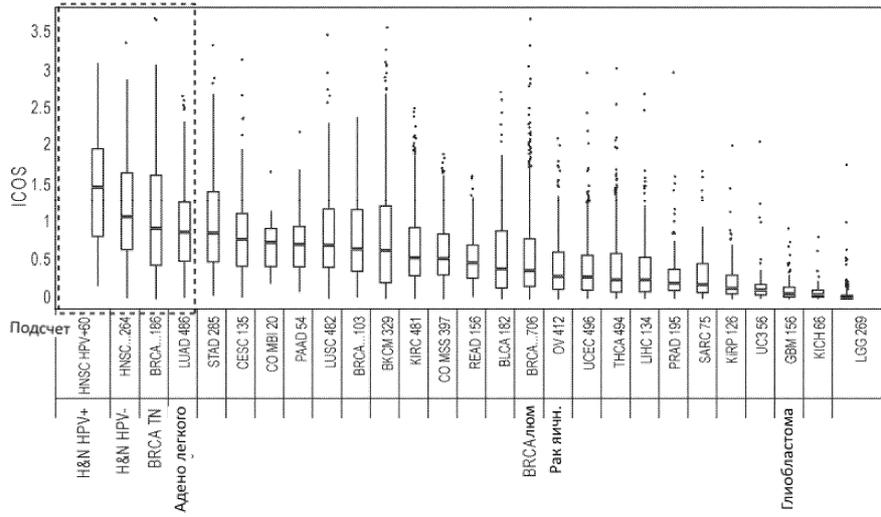
20. Применение по любому из пп.14-19, отличающееся тем, что млекопитающее является человеком.

21. Применение по любому из пп.14-20, отличающееся тем, что образец раковой опухоли определен как экспрессирующий ICOS.

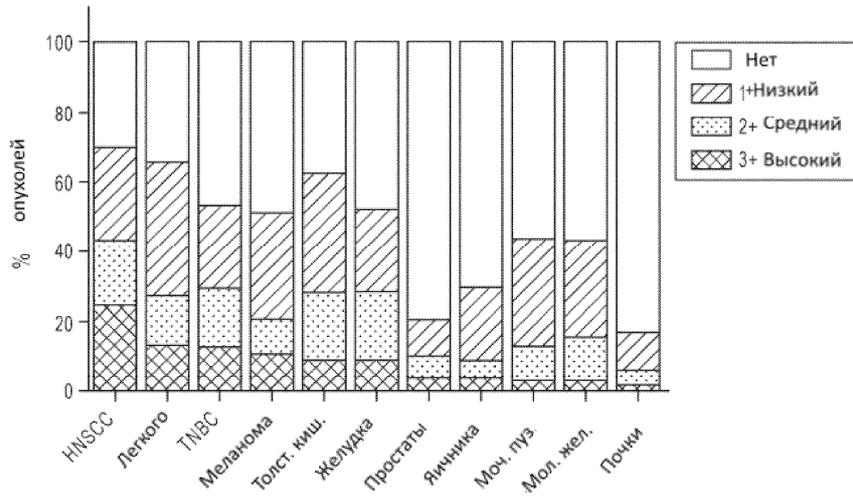
22. Применение по п.21, где образец показывает окрашивание по ICOS 1+, 2+ или 3+, определенное методом иммуногистохимии (ИГХ).

23. Применение по любому из пп.14-22, отличающееся тем, что образец определен как имеющий низкий уровень PD-L1, или как негативный по PD-L1, или как имеющий повышенный уровень PD-L1.

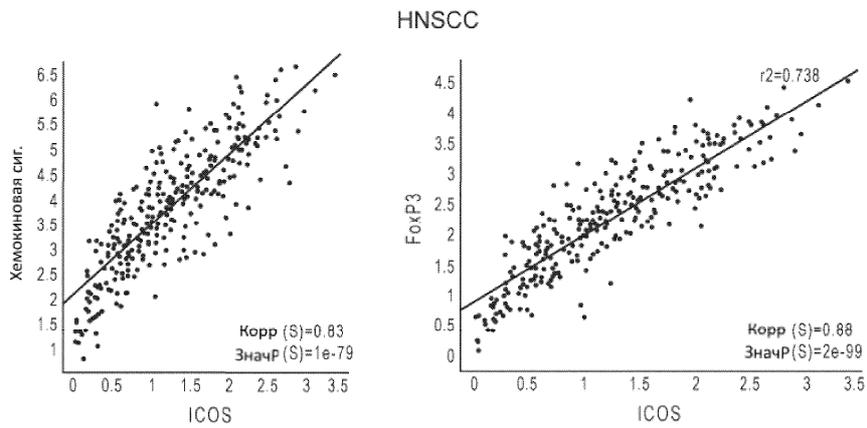
24. Применение по п.23, где уровни PD-L1 определяют с использованием ИГХ.



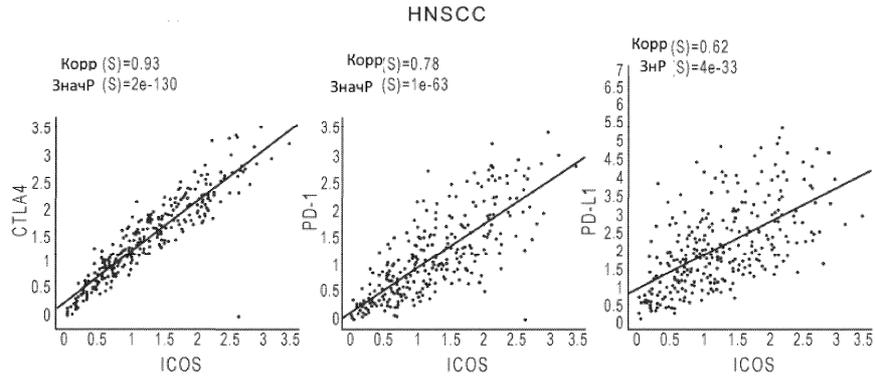
Фиг. 1А



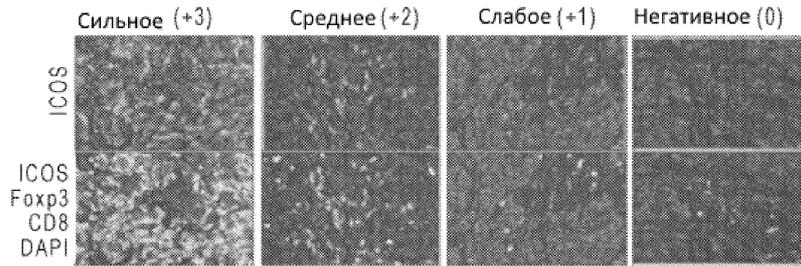
Фиг. 1В



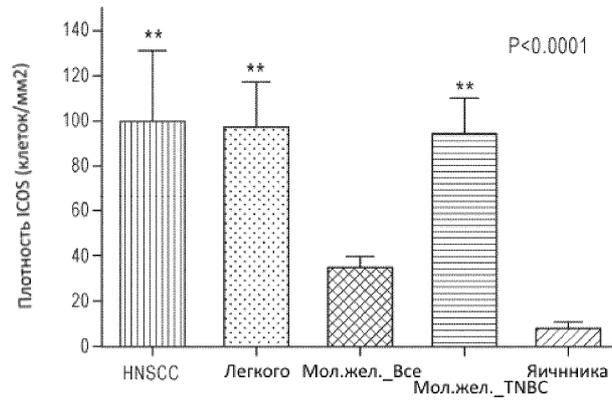
Фиг. 2



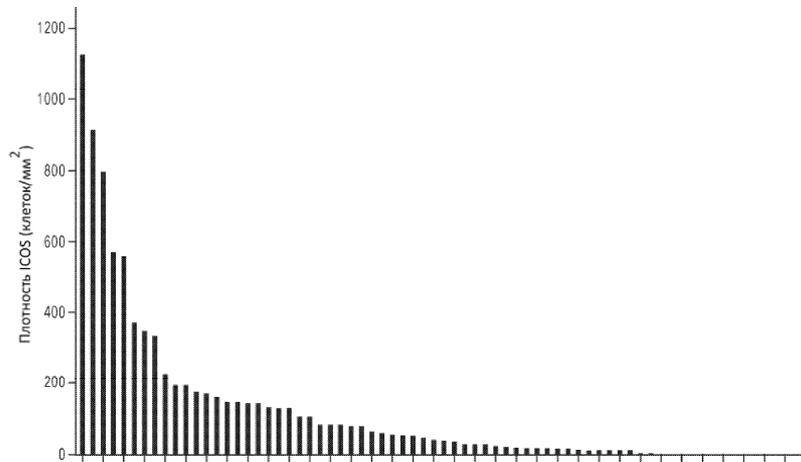
Фиг. 3



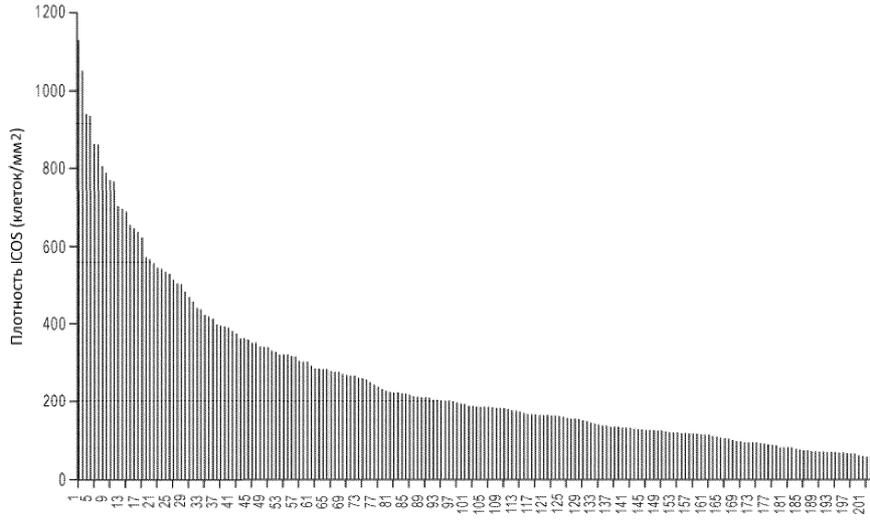
Фиг. 4



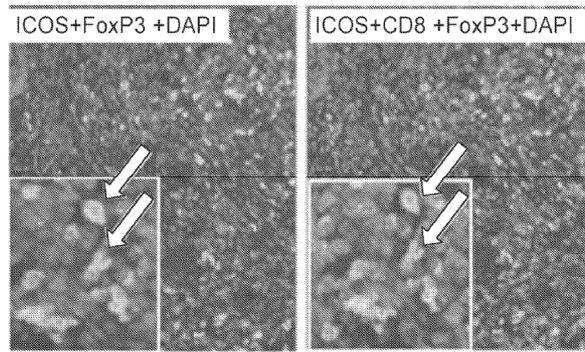
Фиг. 5



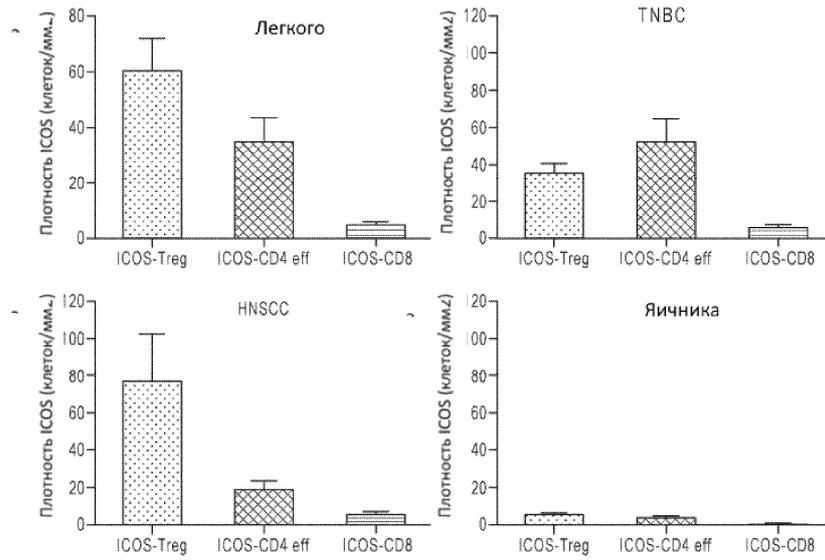
Фиг. 6А



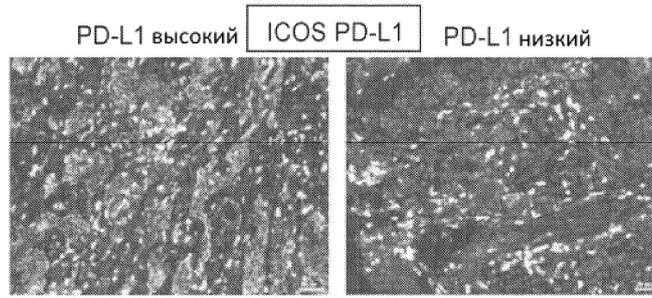
Фиг. 6В



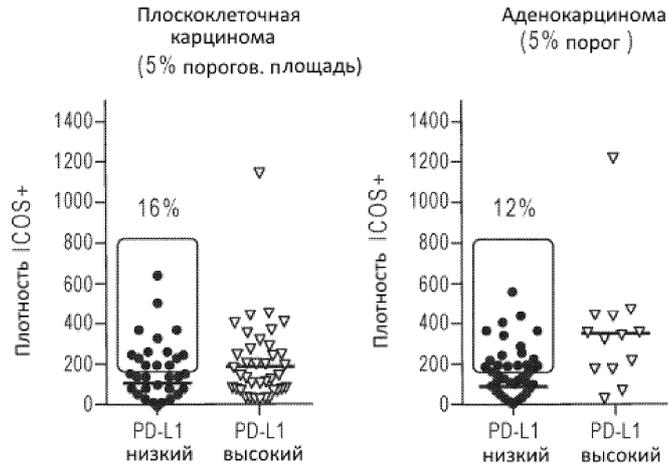
Фиг. 7А



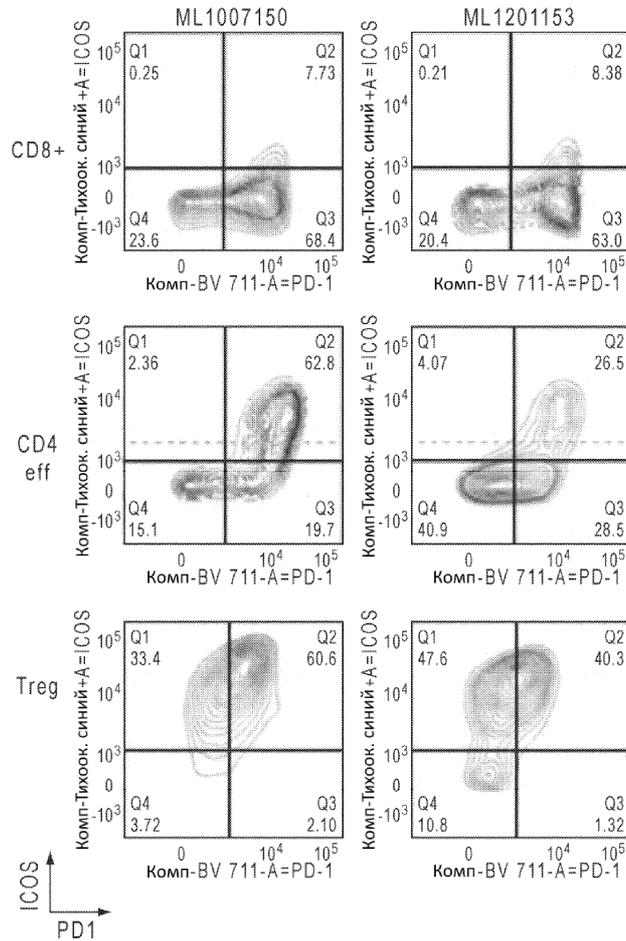
Фиг. 7В

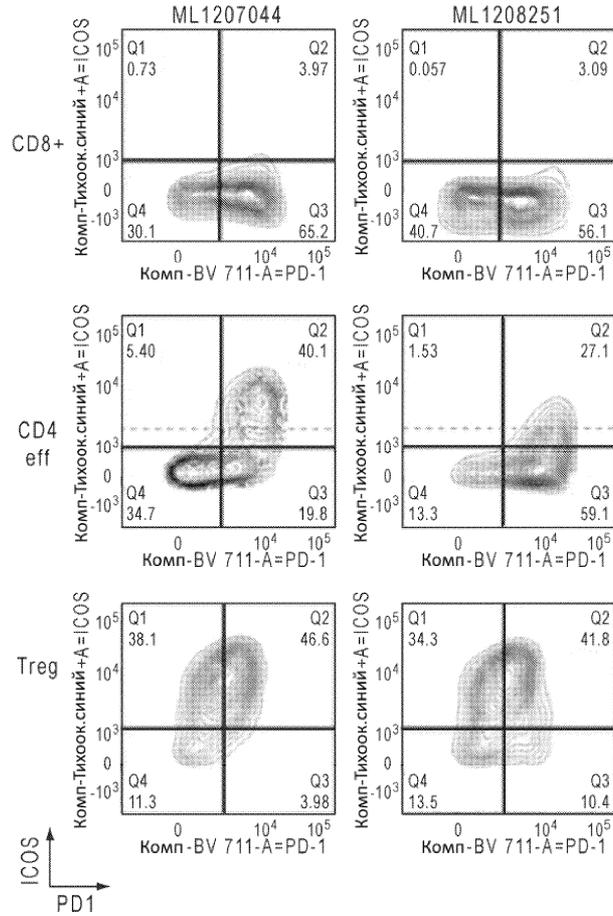


Фиг. 8А

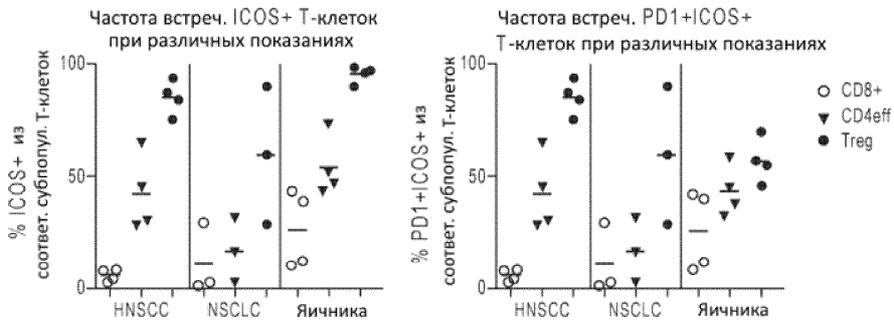


Фиг. 8В

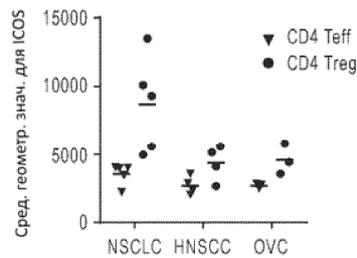




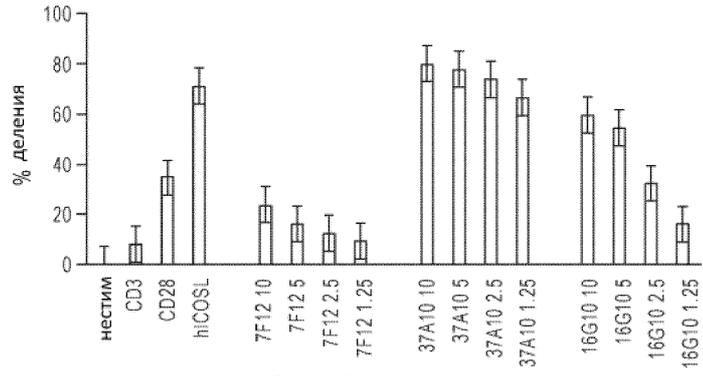
Фиг. 9А



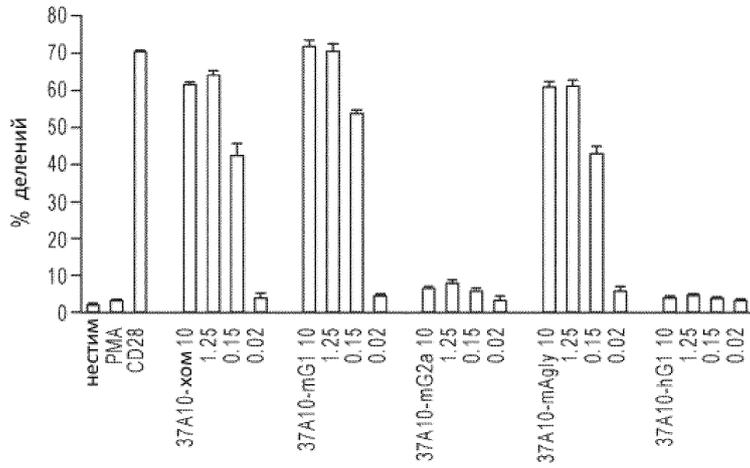
Фиг. 9В



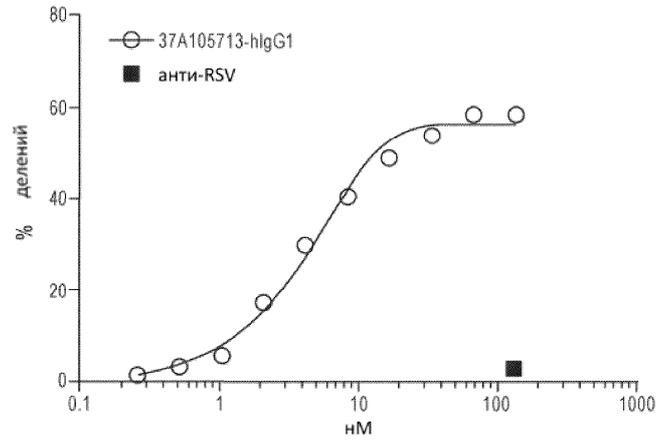
Фиг. 9С



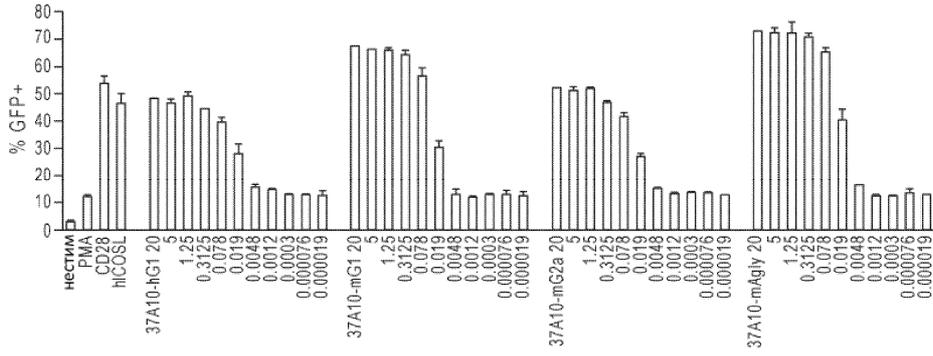
Фиг. 10А



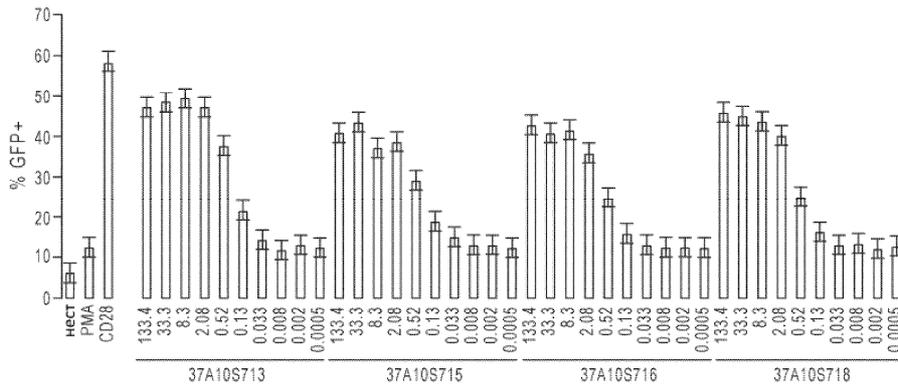
Фиг. 10В



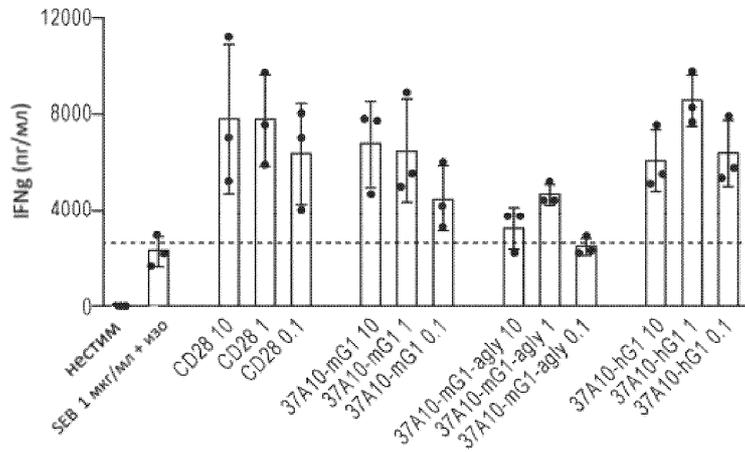
Фиг. 10С



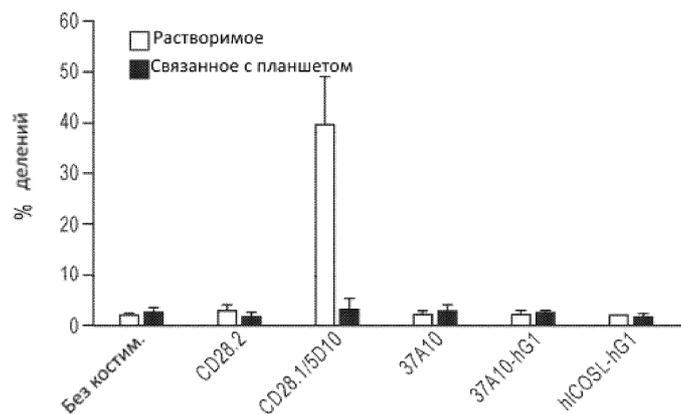
Фиг. 11А



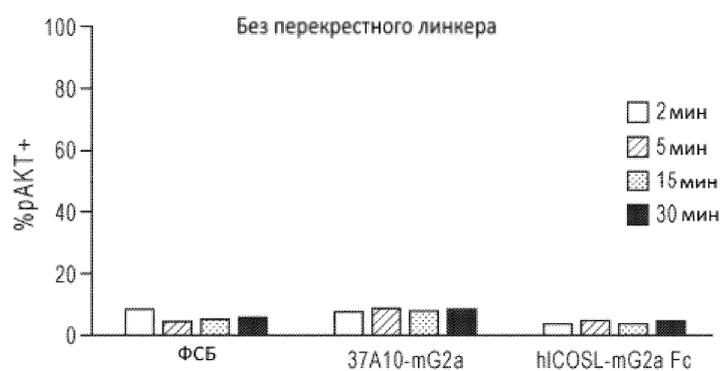
Фиг. 11В



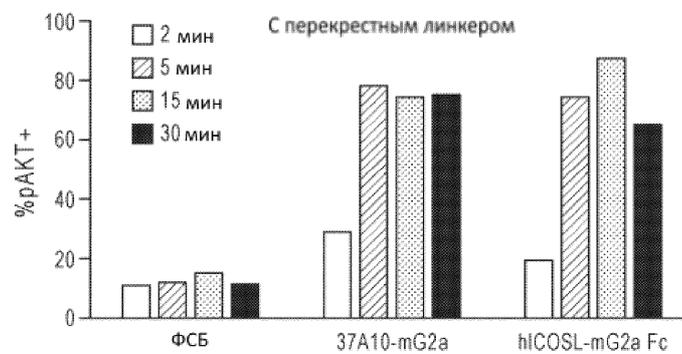
Фиг. 12



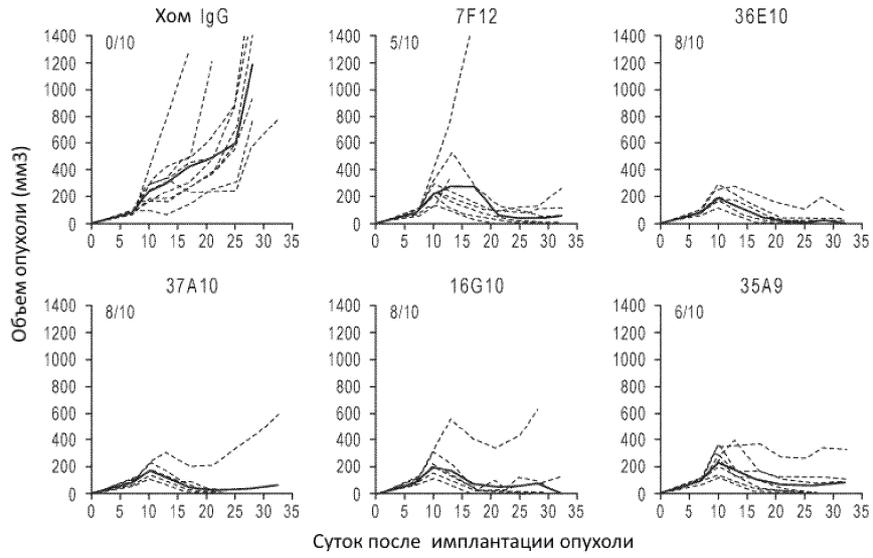
Фиг. 13



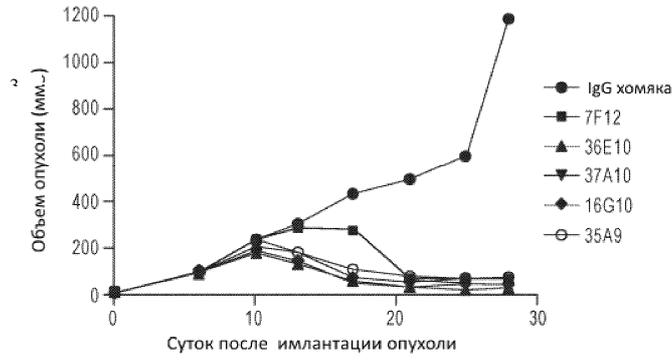
Фиг. 14А



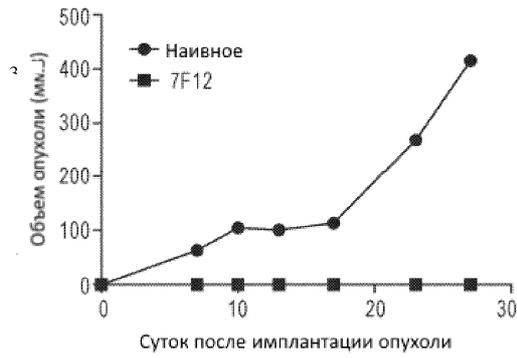
Фиг. 14В



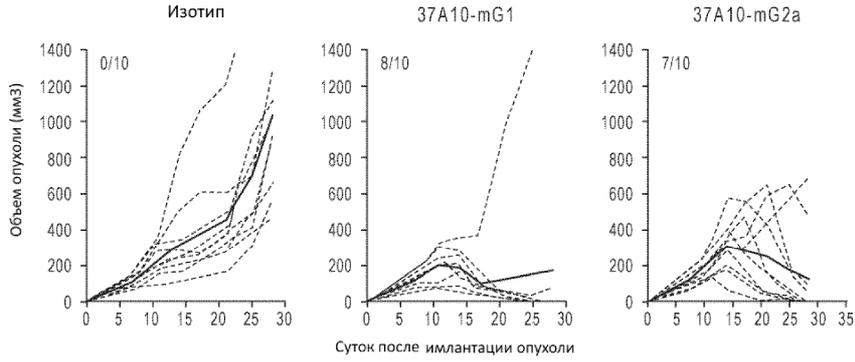
Фиг. 15А



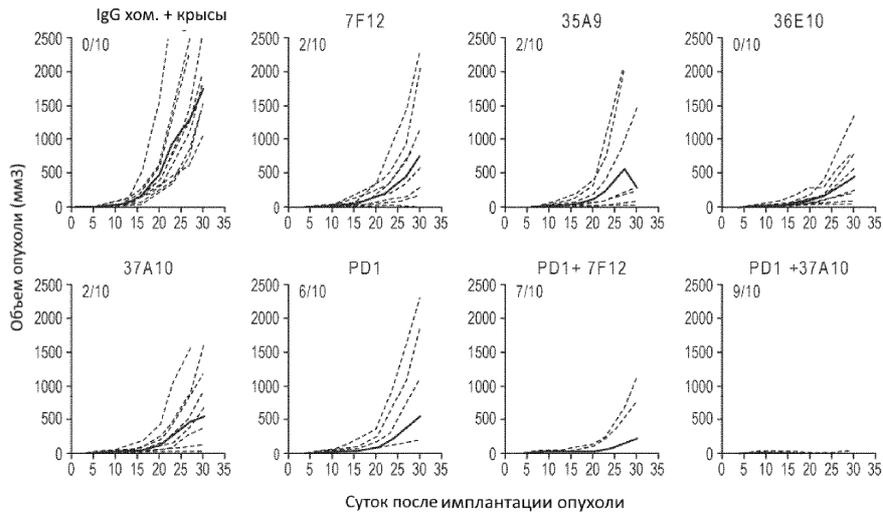
Фиг. 15В



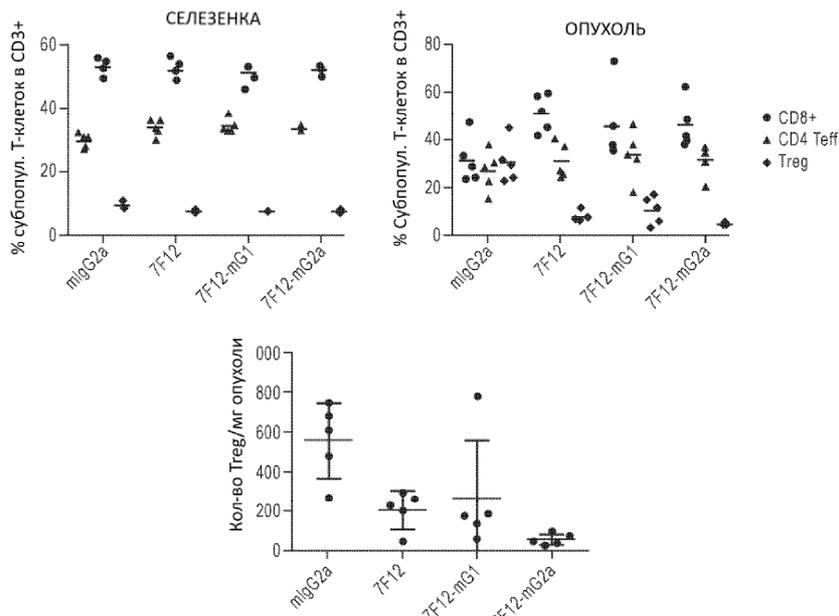
Фиг. 16



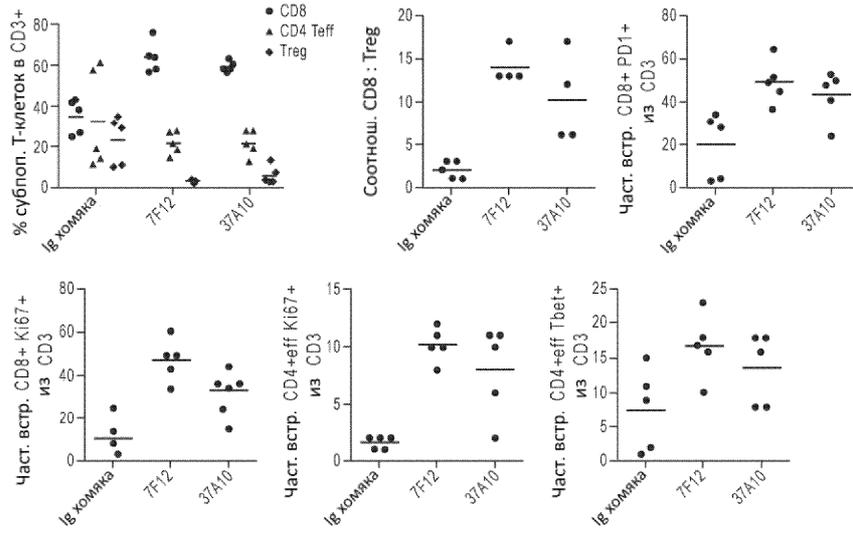
Фиг. 17



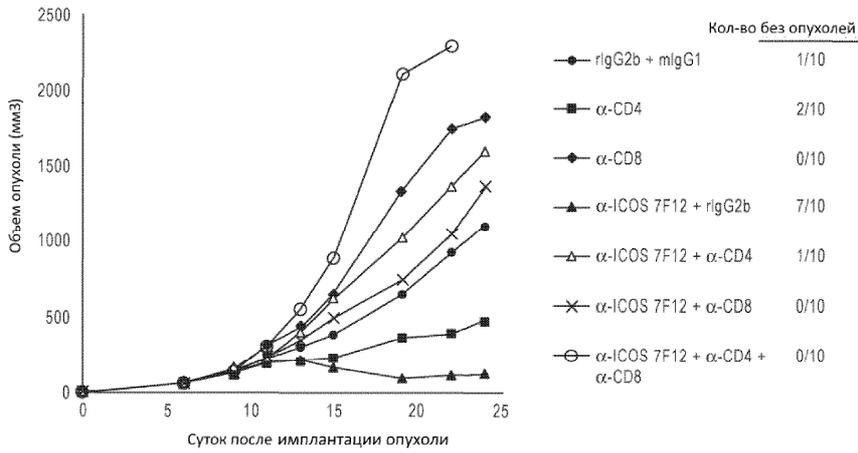
Фиг. 18



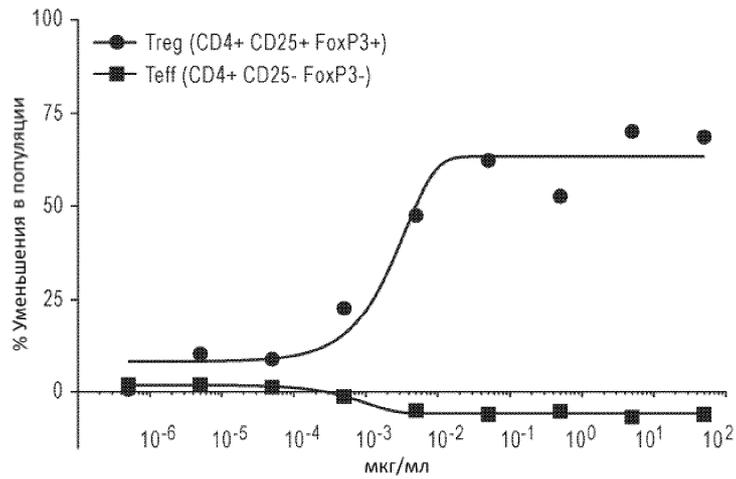
Фиг. 19



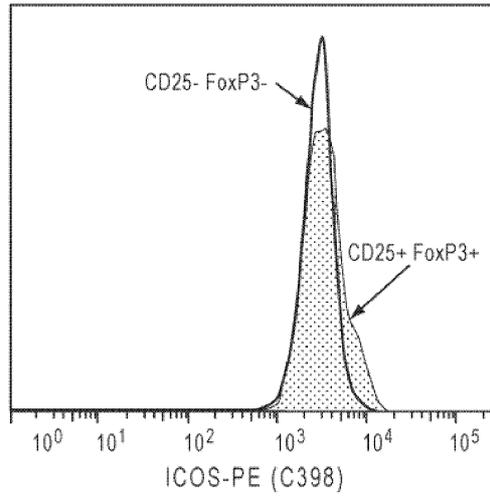
Фиг. 20



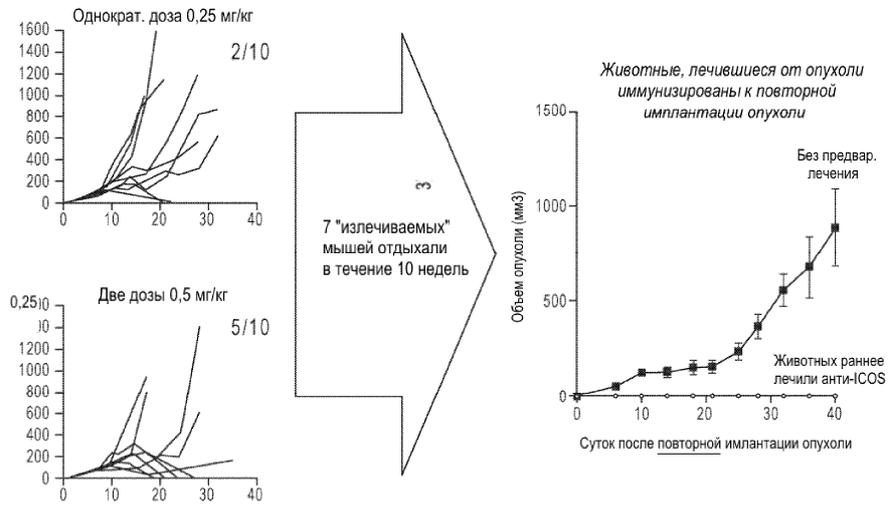
Фиг. 21



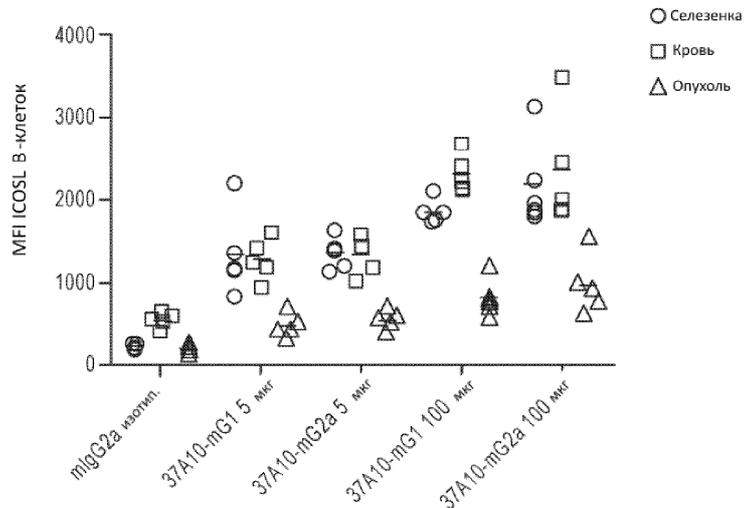
Фиг. 22А



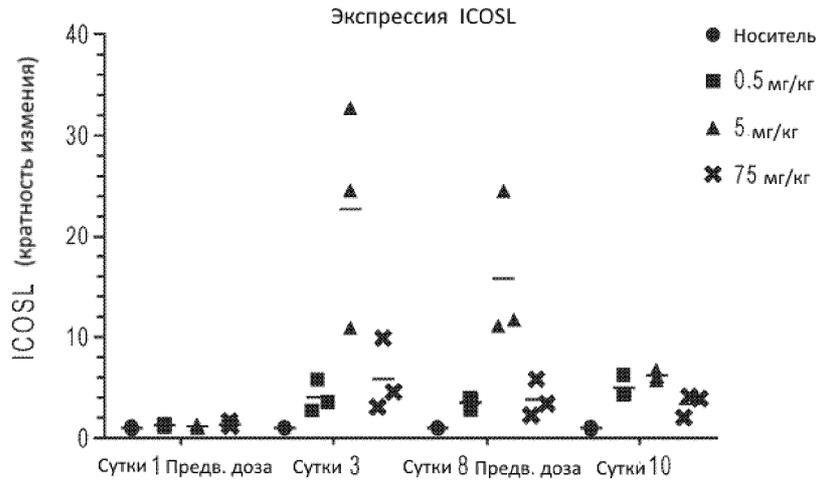
Фиг. 22В



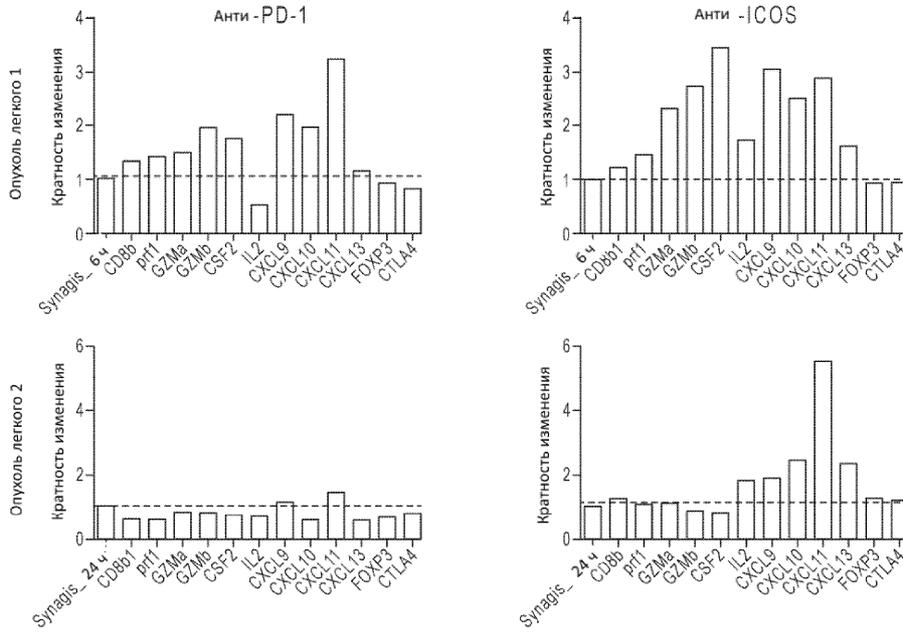
Фиг. 23



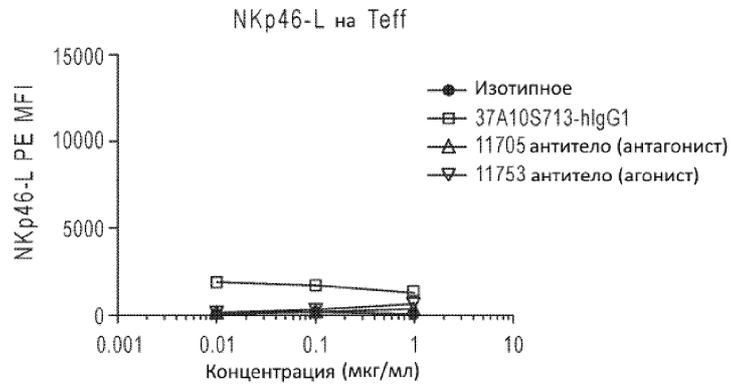
Фиг. 24А



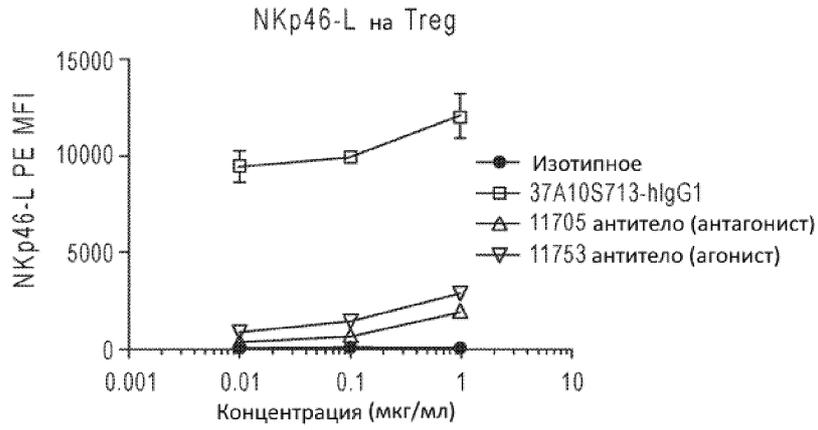
Фиг. 24В



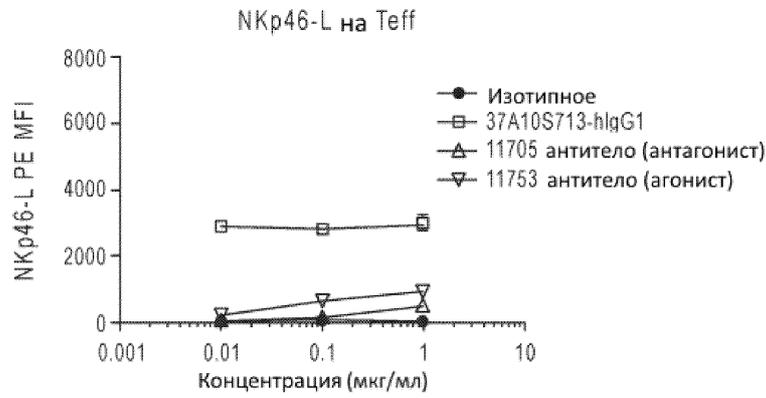
Фиг. 25



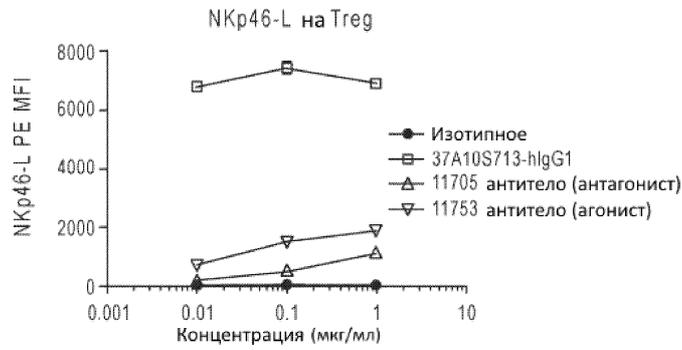
Фиг. 26А



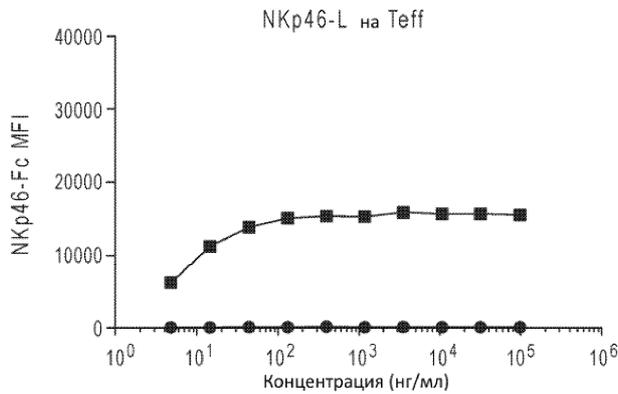
Фиг. 26B



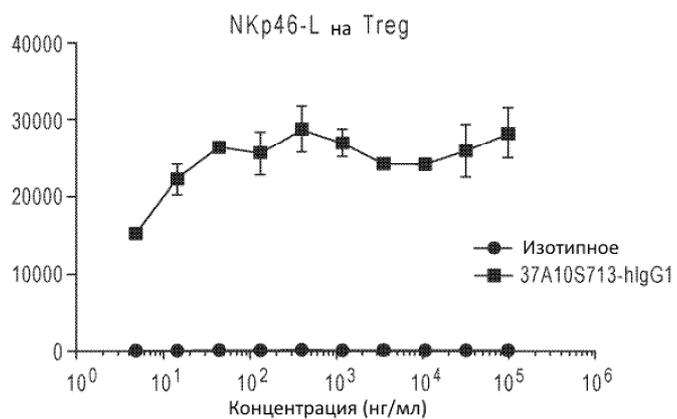
Фиг. 26C



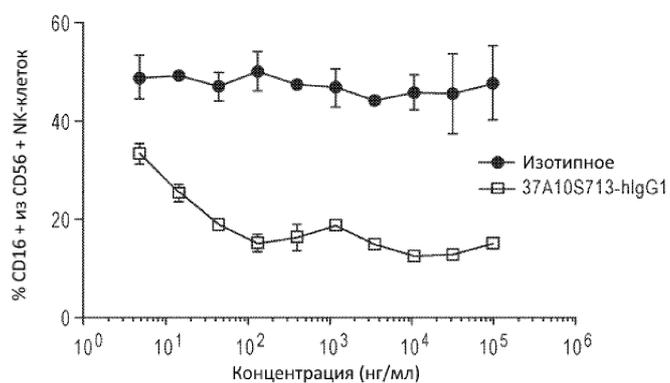
Фиг. 26D



Фиг. 26E



Фиг. 26F



Фиг. 27

