

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041306**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.06

(21) Номер заявки
201991854

(22) Дата подачи заявки
2018.04.05

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ICOS И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/483,158; 62/514,151; 62/545,732;
62/581,412**

(32) **2017.04.07; 2017.06.02; 2017.08.15;
2017.11.03**

(33) **US**

(43) **2020.02.25**

(86) **PCT/US2018/026318**

(87) **WO 2018/187613 2018.10.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:
**Энгельхардт Джон Дж., Селби Марк
Дж., Корман Алан Дж., Фейнгерш
Мэри Дайан, Стивенс Бренда Л. (US)**

(74) Представитель:
**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Глухарёва А.О. (RU)**

(56) **DENG ZHONG-BIN ET AL.:** "An agonist human ICOS monoclonal antibody that induces T cell activation and inhibits proliferation of a myeloma cell line", HYBRIDOMA AND HYBRIDOMICS, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 23, no. 3, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 176-182, XP002657735, ISSN: 1536-8599, abstract, page 179, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2

WO-A2-2011041613

WO-A1-2014089113

WO-A2-2012131004

WO-A1-2016120789

WO-A2-2016154177

WO-A1-2017025871

WO-A2-2018029474

FLORENT AMATORE ET AL.: "Inducible Co-Stimulator (ICOS) as a potential therapeutic target for anti-cancer therapy", EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS, vol. 22, no. 4, 3 April 2018 (2018-04-03), pages 343-351, XP055480895, UK, ISSN: 1472-8222, DOI: 10.1080/14728222.2018.1444753, the whole document

(57) Изобретение относится к выделенным моноклональным антителам (например, гуманизированным и человеческим моноклональным антителам), которые связываются с человеческим индуцибельным костимулятором Т-клеток (ICOS) и проявляют терапевтически желательные функциональные свойства, например способность стимулировать активность человеческого ICOS. Также обеспечены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела согласно изобретению, векторы экспрессии, клетки-хозяева и способы экспрессии антител согласно изобретению. Также обеспечены иммуноконъюгаты, биспецифические молекулы и фармацевтические композиции, содержащие антитела согласно изобретению. Антитела согласно изобретению можно применять, например, в качестве агониста для стимулирования или усиления иммунного ответа у субъекта, например антигенспецифических Т-клеточных ответов против опухоли или вирусного антигена. Антитела согласно изобретению можно также применять в комбинации с другими антителами (например, антителами к PD-1, PD-L1 и/или CTLA-4) для лечения, например, рака. Таким образом, антитела можно применять в терапевтических применениях и способах для детекции белка ICOS.

B1**041306****041306
B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к агонистическим антителам против индуцибельного костимулятора Т-клеток (ICOS) и их фармацевтическим композициям, а также способам применения таких антител, например, для лечения рака путем введения анти-ICOS агонистических антител и фармацевтических композиций.

Родственные заявки

В этой заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/483158 (поданной 7 апреля 2017 г.), 62/514151 (поданной 2 июня 2017 г.), 62/545732 (поданной 15 августа 2017 г.) и 62/581412 (поданной 3 ноября 2017 г.). Полное содержание вышеуказанных заявок включено в настоящий документ путем ссылки.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит Список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Упомянутая копия ASCII, созданная 30 марта 2018 г., называется MXI-556PC_SL.txt и имеет размер 321751 байт.

Предпосылки создания изобретения

Существует необходимость противостояния глобальной эпидемии рака. Рак является одной из ведущих причин заболеваний и второй ведущей причиной смерти во всем мире. В 2015 г. на долю рака приходилось 8,8 млн смертей. В глобальном масштабе почти одна из шести смертей связана с раком. Согласно оценкам в Соединенных Штатах в 2018 г. ожидается 1735350 новых диагностированных случаев рака и 609640 смертей, связанных с раком. В 2012 г. было зафиксировано 3,5 млн новых случаев рака и 1,9 млн смертей от рака в Европе. Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения (World Health Organization), сделанным в 2018 г., ожидается, что число новых случаев рака увеличится приблизительно на 70% в течение следующих двух десятилетий.

Традиционные способы лечения рака включают хирургию, лучевую терапию и химиотерапию, среди других способов лечения. В последние годы в качестве нового метода лечения рака появилась иммуноонкология. Иммуноонкология отличается от традиционных методов лечения рака, которые, например, пытались направленно воздействовать на опухоли напрямую или нарушить кровоснабжение опухоли. Вместо этого, иммуноонкология предполагает использование собственного иммунного ответа пациента для лечения рака. Понимание того, как иммунная система воздействует на развитие рака и как ее можно использовать для лечения рака, является сложной, непростой задачей. Например, пациенты могут не отвечать на определенные иммуноонкологические препараты, и некоторые развивают механизмы резистентности, такие как истощение Т-клеток, которое происходит, когда Т-клетка, специфический тип лейкоцитов, больше не функционирует должным образом. (Dempke et al., Eur. J. of Cancer, 74 55-72 (2017))

Важная роль иммунной системы заключается в ее способности проводить различие между нормальными клетками и "чужеродными" клетками. Таким образом, иммунная система может атаковать чужеродные клетки и оставлять только нормальные клетки. Для этого иммунная система использует "контрольные точки", которые представляют собой молекулы на определенных иммунных клетках, которые должны быть активированы или инактивированы для того, чтобы начать иммунный ответ. Опухолевые клетки могут иногда использовать эти контрольные точки для того, чтобы избежать атаки иммунной системы. Некоторые иммуноонкологические лекарственные средства направленно воздействуют на эти контрольные точки, действуя в качестве ингибиторов контрольных точек. Белок программируемой гибели клеток 1 (PD-1) представляет собой ингибитор контрольных точек, который обычно действует в качестве тормоза для предотвращения атаки Т-клетками других клеток в организме. PD-1 осуществляет это, когда он связывается с лигандом программируемой гибели клеток 1 (PD-L1), белком на некоторых нормальных (и раковых) клетках. Когда PD-1 связывается с PD-L1, это взаимодействие говорит о том, что Т-клетка не атакует другие клетки. Некоторые раковые клетки имеют большие количества PD-L1, что помогает им избежать иммунной атаки. Терапевтические агенты, такие как моноклональные антитела, которые нацелены на это взаимодействие PD-1/PD-L1, такие как ниволумаб (Opdivo®), могут блокировать связывание PD-1/PD-L1 для увеличения иммунного ответа организма против опухолевых клеток.

Существует потребность в лекарственных средствах, нацеленных на различные механизмы действия, которые работают отдельно или в комбинации с ингибиторами контрольных точек для безопасного и эффективного лечения рака и других заболеваний или состояний. Активация и функция Т-клеток регулируются врожденной иммунной системой через костимулирующие молекулы в суперсемействе CD28 (например, положительные и отрицательные костимулирующие молекулы, которые стимулируют или ингибируют активацию сигнала Т-клеточного рецептора, соответственно). Молекула индуцибельного костимулятора (ICOS), также известная как CD278, является белком иммунной контрольной точки, который является членом этого суперсемейства CD28. ICOS представляет собой трансмембранный белок типа I с молекулярной массой 55-60 кДа, который экспрессируется на Т-клетках после активации Т-клеток и костимулирует активацию Т-клеток после связывания его лиганда, ICOS-L (B7H2). ICOS экспрессируется CD4+ клетками, CD8+ клетками и регуляторными Т-клетками (Treg). Также было показано, что ICOS играет ключевую роль в функции фолликулярных хелперных Т-клеток (T_{fh}) и гуморальном иммунном ответе.

Величина и качество иммунного ответа Т-клеток частично зависит от сложного баланса между костимулирующими и ингибирующими сигналами, передаваемыми Т-клеткам. Для улучшения показателей ответа пациентов после иммунотерапии и для преодоления резистентности к лекарственным средствам существует потребность в новых иммуноонкологических терапиях.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает выделенные моноклональные антитела (например, гуманизированные и человеческие моноклональные антитела), которые связываются с человеческим ICOS (SEQ ID NO: 1), т.е. анти-huICOS антитела, и проявляют терапевтически желательные функциональные свойства. Антитела согласно изобретению могут быть использованы в качестве агониста для стимуляции или усиления иммунного ответа у субъекта, например, для стимуляции активности человеческого ICOS и/или для обеспечения антигенспецифических Т-клеточных ответов против опухолевого или вирусного антигена. Антитела согласно изобретению могут быть также использованы в комбинации с другими антителами (например, антитела к PD-1, PD-L1 и/или CTLA-4) для лечения различных состояний, например, рака. Соответственно, антитела, описанные в настоящем документе, отдельно или в комбинации с другими агентами, можно применять для лечения различных состояний или заболеваний, включая рак. В других вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, можно применять в способах детекции белка ICOS.

В одном аспекте выделенное антитело представляет собой гуманизированное выделенное антитело (или его антигенсвязывающую часть), которое связывается с человеческим ICOS и блокирует связывание и/или взаимодействие лиганда ICOS (например, ICOS-L человека) с человеческим ICOS, и

(a) индуцирует пролиферацию и выработку интерферона-гамма (IFN- γ) в CD25-CD4+ Т-клетках со значением EC50 примерно 0,01-0,16 нМ в анализе *in vitro* совместной культуры CHO-ОКТ3-CD32А; и/или

(b) индуцирует выработку IFN- γ в CD25-CD4+ Т-клетках со значением EC50 примерно 0,002-0,4 нМ в стафилококковом энтеротоксине В в анализе совместной культуры CD25-CD4+ Т-клеток и В-клеток.

В другом варианте осуществления антитело (или его антигенсвязывающая часть) проявляет один или несколько из следующих отличительных признаков:

(a) связывается с человеческими Т-клетками со значением EC50 примерно 0,7 нМ и Т-клетками яванского макака со значением EC50 примерно 0,3 нМ;

(b) связывается с человеческими активированными CD4+ Т-клетками;

(c) не связывается с человеческим CD28 или человеческим CTLA-4;

(d) активирует по меньшей мере один первичный Т-лимфоцит, такой как CD4+ эффекторную Т-клетку (Teff), фолликулярную Т-хелперную клетку (Tfh) и регуляторную Т-клетку (Treg);

(e) индуцирует фосфорилирование протеинкиназы В (pAkt) в *in vitro* анализе сигнализации первичных Т-клеток со значением EC50 примерно 30 нМ;

(f) индуцирует выработку интерлейкина-10 (IL-10) в ответ на стафилококковый энтеротоксин В в анализе совместной культуры Tfh и наивных В-клеток;

(g) индуцирует большее увеличение пролиферации CD3-стимулированных Teff по сравнению с CD45RA+ Treg и CD45RO+ Treg в анализе *in vitro*;

(h) уменьшает супрессию Teff клетками Treg;

(i) не увеличивает выработку цитокинов в анализе цельной крови при 10 мкг/мл;

(j) увеличивает секрецию по меньшей мере одного из IL-10 и IFN- γ клетками Tfh *in vitro*;

(k) стимулирует ICOS-опосредованную передачу сигнала;

(l) обладает повышенной аффинностью к CD32B и/или CD32A и/или

(m) имеет пониженную аффинность к CD16.

В другом варианте осуществления выделенное антитело представляет собой гуманизированное выделенное антитело (или его антигенсвязывающую часть), которое связывается с человеческим ICOS и блокирует связывание и/или взаимодействие лиганда ICOS (например, ICOS-L человека) с человеческим ICOS, и индуцирует пролиферацию и выработку интерферона-гамма (IFN- γ) в CD25- CD4+ Т-клетках со значением EC50 примерно 0,083 нМ в анализе *in vitro* совместной культуры CHO-ОКТ3-CD32А. В другом варианте осуществления выделенное антитело представляет собой гуманизированное выделенное антитело (или его антигенсвязывающую часть), которое связывается с человеческим ICOS и блокирует связывание и/или взаимодействие лиганда ICOS (например, ICOS-L человека) с человеческим ICOS человека, и индуцирует пролиферацию и выработку интерферона-гамма (IFN- γ) в CD25- CD4+ Т-клетках со значением EC50 примерно 0,01-0,1 нМ в анализе *in vitro* совместной культуры CHO-ОКТ3-CD32А.

В одном аспекте выделенное антитело представляет собой гуманизированное выделенное антитело (или его антигенсвязывающую часть), которое связывается с человеческим ICOS и блокирует связывание и/или взаимодействие лиганда ICOS (например, ICOS-L человека) с человеческим ICOS и индуцирует выработку IFN- γ в CD25- CD4+ Т-клетках со значением EC50 примерно 0,2 нМ в стафилококковом энтеротоксине В в анализе совместной культуры CD25- CD4+ Т-клеток и В-клеток. В другом аспекте выде-

ленное антитело представляет собой гуманизованное выделенное антитело (или его антигенсвязывающую часть), которое связывается с человеческим ICOS и блокирует связывание и/или взаимодействие лиганда ICOS (например, ICOS-L человека) с человеческим ICOS и индуцирует выработку IFN- γ в CD25- CD4+ Т-клетках со значением EC50 примерно 0,01-0,1 нМ в стафилококковом энтеротоксине А в анализе совместной культуры CD25- CD4+ Т-клеток и В-клеток.

В другом варианте осуществления антитело (или его антигенсвязывающая часть) связывается с ICOS человека, яванского макака, мыши и крысы.

В другом аспекте выделенное антитело связывается с молекулой человеческого индуцибельного костимулятора (ICOS) и содержит:

(а) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий области CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий области CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 12, 14 и 15 соответственно;

(b) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий области CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 18, 19 и 20 соответственно, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий области CDR1,

CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 21, 22 и 23 соответственно;

(с) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий области CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 26, 27 и 28 соответственно, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий области CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 29, 30 и 31 соответственно;

(d) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий области CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34, 35 и 36 соответственно, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий области CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37, 38 и 39 соответственно;

(е) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий области CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 42, 43 и 44 соответственно, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий области CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 45, 46 и 47 соответственно;

(f) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий области CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 42, 43 и 44 соответственно, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий области CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 49, 50 и 51 соответственно, или

(g) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий области CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 191, 192 и 193 соответственно, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий области CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 194, 195 и 196 соответственно.

В другом аспекте выделенное антитело связывается с молекулой человеческого индуцибельного костимулятора (ICOS), и вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат:

(а) аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 5 и 6 соответственно;

(b) аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 16 и 176 соответственно;

(с) аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 24 и 25 соответственно;

(d) аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 32 и 33 соответственно;

(е) аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно;

(f) аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 40 и 48 соответственно; или

(g) аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 186 и 189 соответственно.

В другом аспекте выделенное, полноразмерное, гуманизованное моноклональное антитело, которое связывается с молекулой человеческого индуцибельного костимулятора (ICOS), содержит тяжелые цепи, которые содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7, и легкие цепи, которые содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8.

В одном варианте осуществления выделенное антитело конкурирует за связывание с ICOS или связывается с тем же эпитопом, что и антитело, которое блокирует взаимодействие человеческого ICOS с ICOS-L человека. В другом варианте осуществления выделенное антитело специфически связывается с одним или несколькими остатками SIFDPPPFKVTI (SEQ ID NO: 203) человеческого ICOS. В другом варианте осуществления эпитоп ICOS содержит аминокислотные остатки SIFDPPPFKVTI (SEQ ID NO: 203) человеческого ICOS.

В одном варианте осуществления антитела согласно изобретению представляют собой полноразмерные антитела, например изотип IgG1, IgG2, IgG2a или IgG4. В другом варианте осуществления антитела представляют собой связывающие фрагменты, такие как фрагменты Fab, Fab' или (Fab')₂, или одноцепочечные антитела.

В одном аспекте анти-ICOS антитела или их антигенсвязывающие части связываются с Fc-

рецепторами, такими как один или несколько активирующих Fc-гамма-рецепторов (FcγRs). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области по сравнению с последовательностью IgG1 человека (SEQ ID NO: 206), что повышает аффинность антитела к FcγR, например FcγRIIIb, такую как одна или несколько аминокислотных замен в положении, включающем по меньшей мере одно из 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 и/или 332, согласно индексу EU, например, 234D, 234E, 234F, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y и/или 332E. В других вариантах осуществления Fc-область содержит по меньшей мере две замены 235Y-267E, 236D-267E, 239D-268D, 239D-267E, 267E-268D, 267E-268E и/или 267E-328F по сравнению с последовательностью IgG1 человека (SEQ ID NO: 206). В еще одном варианте осуществления аминокислотная замена в Fc-области представляет собой S267E по сравнению с последовательностью IgG1 человека, указанной в SEQ ID NO: 206.

В другом аспекте изобретение обеспечивает иммуноконъюгаты, содержащие антитело согласно изобретению, или его антигенсвязывающую часть, связанное с терапевтическим агентом, например цитотоксическим агентом или радиоактивным изотопом, а также биспецифические молекулы, содержащие антитело согласно изобретению, или его антигенсвязывающую часть, связанное со вторым функциональным фрагментом, обладающим специфичностью связывания, отличающейся от специфичности связывания указанного антитела или его антигенсвязывающей части.

Также обеспечены композиции (например, фармацевтические композиции), содержащие антитело или его антигенсвязывающую часть, или иммуноконъюгат, или биспецифическую молекулу согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В другом аспекте композиция, кроме того, содержит растворимый, нейтрально-активный гликопротеин гиалуронидазу.

Также обеспечены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела (например, кДНК") или их антигенсвязывающие части (например, вариабельные области и/или CDR), согласно изобретению, а также экспрессирующие векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты, и клетки-хозяева, содержащие такие экспрессирующие векторы. Также обеспечены способы получения анти-ICOS антител путем экспрессии антитела в таких клетках-хозяевах и выделения антитела из клетки-хозяина.

В одном аспекте выделенное антитело обладает пониженной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксической (ADCC) активностью по сравнению с контрольным антителом IgG1.

В другом аспекте изобретение обеспечивает способы стимуляции иммунных ответов с использованием анти-ICOS антител или их антигенсвязывающих частей согласно изобретению. В одном варианте осуществления способ включает стимуляцию антигенспецифического T-клеточного ответа путем приведения в контакт T-клеток с антителом или его антигенсвязывающей частью согласно изобретению, таким образом, что стимулируется антигенспецифический T-клеточный ответ. В другом варианте осуществления стимулируется выработка интерлейкина-2 антигенспецифической T-клеткой. В еще одном варианте осуществления субъект имеет опухоль(и) и стимулируется иммунный ответ против опухоли. В другом варианте осуществления субъект имеет вирус и стимулируется иммунный ответ против вируса.

В еще одном аспекте изобретение обеспечивает способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающий введение субъекту антитела согласно изобретению или его антигенсвязывающей части, таким образом, что ингибируется рост опухоли у субъекта. В другом аспекте изобретение обеспечивает способ лечения вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту антитела согласно изобретению или его антигенсвязывающей части, таким образом, что происходит лечение вирусной инфекции у субъекта. Такие способы включают введение антитела или его антигенсвязывающей части, композиции, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата согласно изобретению.

В еще одном аспекте изобретение обеспечивает способ стимуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту антитела согласно изобретению или его антигенсвязывающей части, например, в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом, таким как анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1-антитело и/или анти-CTLA-4 антитело, таким образом, что иммунный ответ стимулируется у субъекта, например, для ингибирования роста опухоли или для стимуляции противовирусного ответа. В одном варианте осуществления дополнительное иммуностимулирующее антитело представляет собой анти-PD-1 антитело. В другом варианте осуществления дополнительный иммуностимулирующий агент представляет собой анти-PD-L1 антитело. В еще одном варианте осуществления дополнительный иммуностимулирующий агент представляет собой анти-CTLA-4 антитело. В еще одном варианте осуществления антитело согласно изобретению или его антигенсвязывающую часть вводят с цитокином (например, IL-2, модифицированным IL-2 и/или IL-21) или костимулирующим антителом (например, анти-CD137 и/или анти-GITR антителом). В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой, например, человеческие, химерные или гуманизированные антитела.

В одном варианте осуществления выделенное антитело вводят с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами субъекту-человеку. В другом варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент.

Также в настоящем документе обеспечены способы лечения рака у субъекта (например, пациента-

человека), включающие введение пациенту анти-ICOS антитела или комбинации анти-ICOS антитела и по меньшей мере одного дополнительного антитела (например, анти-PD-1 антитела, анти-PD-L1 антитела и/или анти-CTLA-4 антитела), при этом анти-ICOS антитело или комбинацию антител вводят в соответствии с конкретным режимом дозирования (т.е., при определенном размере дозы и в соответствии со конкретной схемой дозирования). В одном аспекте способ включает по меньшей мере один цикл введения и для каждого из хотя бы одного цикла по меньшей мере одну дозу антитела вводят в дозе около 375 мг. В другом аспекте антитело вводят в количестве или с частотой, достаточной для достижения и/или поддержания занятости рецепторов, составляющей менее чем около 80%. В другом варианте осуществления способ включает введение с интервалом один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз каждые четыре недели, один раз каждые пять недель, один раз каждые шесть недель, один раз каждые семь недель, один раз каждые восемь недель, один раз каждые девять недель, один раз каждые десять недель, один раз каждые одиннадцать недель или один раз каждые двенадцать недель.

Способы, раскрытые в настоящем документе, включают лечение рака, такого как колоректальный рак (CRC), плоскоклеточная карцинома головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак предстательной железы (PRC), уротелиальная карцинома (UCC), рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки/шейки матки, рак яичника, рак яичка, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак почки, рак желудка, герминогенный рак, рак кости, рак печени, рак щитовидной железы, рак кожи, новообразования центральной нервной системы, лимфома, лейкоз, миелома, саркома или связанный с вирусом рак.

В еще одном варианте осуществления антитела составлены для внутривенного введения. В другом варианте осуществления антитела составлены для подкожного введения. В другом варианте осуществления антитела вводят одновременно (например, в одном составе или одновременно в отдельных составах). Альтернативно, в другом варианте осуществления антитела вводят последовательно (например, в виде отдельных составов).

Эффективность способов лечения, обеспеченных в настоящем документе, может быть оценена с использованием любых подходящих средств. В некоторых вариантах осуществления лечение уменьшает размер опухоли, уменьшает число метастатических поражений со временем, вызывает полный ответ, вызывает частичные результаты и/или приводит к стабильному заболеванию.

В другом аспекте изобретение обеспечивает анти-ICOS антитела или их антигенсвязывающие части и композиции согласно изобретению для применения в вышеупомянутых способах, или для изготовления лекарственного средства для применения в вышеуказанных способах (например, для лечения различных состояний).

Также, обеспечены наборы, которые включают фармацевтическую композицию, содержащую анти-ICOS антитело в терапевтически эффективном количестве, адаптированном для применения в способах, описанных в настоящем документе. В другом варианте осуществления набор включает анти-ICOS антитело и другое антитело (например, анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело и/или анти-CTLA-4 антитело) в терапевтически эффективных количествах, адаптированных для применения в способах, описанных в настоящем документе. Например, набор содержит:

- (a) дозу анти-ICOS антитела;
- (b) дозу анти-PD-1 антитела, анти-PD-L1 антитела и/или анти-CTLA-4 антитела и
- (c) инструкции по применению антител в способе согласно изобретению.

В другом аспекте анти-ICOS антитело обеспечено для введения (или совместного введения с другим антителом, например, анти-PD-1 антителом, анти-PD-L1 антителом и/или анти-CTLA-4 антителом) в соответствии со способами, описанными в настоящем документе.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и примеров, которые не следует рассматривать как ограничивающие. Содержание всех ссылок, записей в GenBank, патентов и опубликованных заявок на патент, цитированных во всей данной заявке, специально включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана последовательность человеческого ICOS (SEQ ID NO: 1). Результаты анализа связывания с эпитопом для ICOS.4 с использованием масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS) показаны путем выделения жирным шрифтом и подчеркивания эпитопа ICOS.4.

На фиг. 2 показана часть последовательности константного домена IgG1f человека (SEQ ID NO: 52, перенумерованной в виде остатков 118-446), которая может быть использована в вариантах Fc-последовательности, раскрытых в настоящем документе. Остатки, выделенные жирным шрифтом, являются иллюстративными остатками, подвергнутыми изменению. Измененная аминокислота выделена жирным шрифтом под конкретным остатком. Замена D270E подчеркнута. С-концевой остаток лизина (K) опущен из последовательности SEQ ID NO: 52, но присутствует в некоторых вариантах осуществления. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие эти варианты осуществления, включают нуклеотиды, кодирующие дополнительный лизин на 3'- конце нуклеиновой кислоты.

На фиг. 3 показано выравнивание последовательностей тяжелой и легкой цепей зародышевой линии человека, используемых для гуманизации родительского хомьячьего антитела (С398.4). VH3-15 выбирали для тяжелой цепи, и VKI O18 выбирали для легкой цепи на основании гомологии каркасных последовательностей. Зародышевую линию человека FW4, JK3 также выбирали для легкой цепи на основании гомологии последовательностей. Зародышевую линию человека FW4, JH4 выбирали для тяжелой цепи на основании сходства последовательностей, и она не содержала остатков, которые могут создавать потенциальный риск подверженности. Звездочки и подчеркивание указывают на аминокислотные остатки, которые различаются между последовательностями зародышевой линии и последовательностью родительского хлячьего антитела (С398.4).

На фиг. 4 показаны последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей анти-ICOS антитела ICOS.33 IgG1f S267E. Области CDR1, 2 и 3 переменных областей тяжелой и легкой цепей выделены жирным шрифтом, подчеркнуты и помечены.

На фиг. 5А и 5В представлены графики, которые показывают выработку интерферона-гамма (IFN- γ) и клеточную пролиферацию, индуцированную ICOS.33 IgG1f S267E, с совместных культурах CD25-CD4+ Т-клеток и клеток CHO-ОКТ3-CD32А.

На фиг. 6 представлен график, который иллюстрирует индукцию IFN- γ анти-ICOS антителами в анализе SEB-стимулированной совместной культуры CD25- CD4+ Т-клеток и В-клеток.

На фиг. 7А и 7В представлены графики, которые показывают индукцию IL-10 и IFN- γ в анализе SEB-стимулированной совместной культуры Tfh и наивных В-клеток. В среднем 4,4-кратная индукция.

На фиг. 8А и 8В представлены графики, которые показывают устранение супрессии Teff путем ко-стимуляции Treg с анти-ICOS антителом.

На фиг. 9А и 9В представлены графики, которые сравнивают способность ICOS.33 IgG1f S267E и ICOS.33 IgG1 индуцировать ADCC с использованием клеток от двух разных доноров (Доноры 9 и 12).

На фиг. 10 представлен график результатов анализа ELISA, сравнивающий способность ICOS.33 IgG1f S267E и ICOS.33 IgG1 связываться с компонентом C1q человеческого комплемента.

На фиг. 11А-С представлены графики, которые показывают противоопухолевую активность Fc-вариантов ICOS, антител ICOS IgG1 SE ("ICOS hg1 SE") и ICOS IgG1 ("ICOS hg1") и изотипического контрольного антитела IgG1 ("hIgG1") в модели опухоли MC38.

На фиг. 12А-Е представлены графики, которые показывают кривые роста опухолей по лечебным группам. Мышей подвергали лечению изотипическим контролем mG1, ICOS.1 mg1 D265A, ICOS.4 mg1, ICOS.4 hg1 или ICOS.4 mg2a на дни 7, 10 и 14 после имплантации клеток Sa1N.

На фиг. 13А и 13В представлены графики, которые иллюстрируют кривые среднего и медианного роста опухолей по лечебным группам. Мышей подвергали лечению изотипическим контролем mG1, ICOS.1 mg1 D265A, ICOS.4 mg1, ICOS.4 hg1 или ICOS.4 mg2a на дни 7, 10 и 14 после имплантации клеток Sa1N.

На фиг. 14А-Д представлены графики, на которых показано процентное содержание Foxp3+ Treg-клеток, CD4+ Teff-клеток и CD8+ Т-клеток в опухолях на День 15. Мышей подвергали лечению изотипическим контролем mG1, ICOS.1 mg1 D265A, ICOS.4 mg1, ICOS.4 hg1 или ICOS.4 на дни 7, 10 и 14 после имплантации клеток Sa1N.

На фиг. 15А-Ж представлены графики, которые показывают кривые роста опухолей для отдельных мышей по лечебным группам: изотипический контроль mIgG1, анти-PD-1 антитело mIgG1 D265A ("PD-1") и/или анти-ICOS.4 антитело mIgG1 ("ICOS.4mg1").

На фиг. 16А и 16В представлены графики, которые показывают кривые среднего и медианного роста опухолей по лечебным группам: изотипический контроль mIgG1, анти-PD-1 антитело mg1 и/или анти-ICOS.4 антитело mIgG1 ("ICOS.4 mg1").

На фиг. 17А-Д представлены графики, которые показывают среднее процентное содержание (SEM) Foxp3+, CD8+, Ki-67 и Granzyme B в опухолях. Мышей подвергали лечению изотипическим контролем mIgG1, анти-PD-1 антителом mg1 и/или анти-ICOS.4 антителом mIgG1 ("ICOS.4 mg1").

На фиг. 18А-И представлены графики, которые показывают кривые роста опухолей для отдельных мышей по лечебным группам: изотипический контроль mIgG1, анти-PD-1 антитело mIgG1 D265A ("PD-1") и/или анти-ICOS.4 антитело mIgG1 ("ICOS").

На фиг. 19А и 19В представлены графики, которые показывают кривые среднего и медианного роста опухолей по лечебным группам: изотипический контроль mIgG1, анти-PD-1 антитело mIgG1 D265A ("PD-1") и/или анти-ICOS.4 антитело mIgG1 ("ICOS").

На фиг. 20А-Д представлены графики, которые показывают процентное содержание Foxp3+ Treg-клеток, CD4+ Teff-клеток и CD8+ Т-клеток в опухолях. Мышей подвергали лечению изотипическим контролем mIgG1, анти-PD-1 антителом mIgG1 D265A ("PD-1") и/или анти-ICOS.4 антителом mIgG1 ("ICOS").

На фиг. 21А-С представлены графики, которые показывают среднее процентное содержание Ki-67 в опухолях. Мышей подвергали лечению изотипическим контролем mIgG1, анти-PD-1 антителом mIgG1 D265A ("PD-1") и/или анти-ICOS.4 антителом mIgG1 ("ICOS").

На фиг. 22A-D представлены графики, которые показывают экспрессию ICOS-L на В-клетках в селезенке и PBMC. Мышей подвергали лечению изотипическим контролем mIgG1, анти-PD-1 антителом mIgG1 D265A ("PD-1") и/или анти-ICOS.4 антителом mIgG1 ("ICOS").

На фиг. 23A-F представлены графики, которые показывают кривые роста опухолей для отдельных мышей по лечебным группам: изотипический контроль mIgG1, анти-CTLA-4 антитело mIgG2b ("CTLA-4 mg2b"), анти-ICOS.4 антитело mIgG1 ("ICOS.4 mg1") и/или анти-ICOS.4 антитело mIgG2a ("ICOS.4 mg2a").

На фиг. 24A и 24B представлены графики, которые показывают кривые среднего и медианного роста опухолей по лечебным группам: изотипический контроль mIgG1, анти-CTLA-4 антитело mIgG2b ("CTLA-4 mg2b"), анти-ICOS.4 антитело mIgG1 ("ICOS.4 mg1") и/или анти-ICOS.4 антитело mIgG2a ("ICOS.4 mg2a").

На фиг. 25A и 25B представлены графики, которые показывают связывание ICOS.33 IgG1f S267E с Т-клетками человека, яванского макака, крысы и мыши, как измерено с использованием FACS.

На фиг. 26A и 26B представлены графики, которые показывают, что антитело ICOS.33 IgG1f обладает более высокой avidностью связывания с CD4+ Т-клетками, как рассчитано по значениям EC50, по сравнению с двумя конкурирующими анти-ICOS антителами.

На фиг. 27 представлена схема, иллюстрирующая клиническое испытание с эскалацией дозы с использованием анти-ICOS антитела в комбинации с анти-PD-1 антителом и/или анти-CTLA-4 антителом.

На фиг. 28 представлен график, показывающий эффекты увеличения доз анти-ICOS антитела, ICOS.33 IgG1f S267E, в комбинации с анти-PD1 антителом и эффект на ингибирование роста опухоли в мышинной модели.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает выделенные антитела, такие как моноклональные антитела, например, гуманизированные или человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с человеческим ICOS ("huICOS") и обладает агонистической активностью для стимуляции иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, содержат конкретные структурные особенности, такие как CDR-области, содержащие конкретные аминокислотные последовательности. В других вариантах осуществления антитела конкурируют за связывание с человеческим белком ICOS или связываются с тем же эпитопом, что и антитела согласно настоящему изобретению.

Кроме того, в настоящем документе обеспечены способы получения таких антител, иммуноконъюгатов и биспецифических молекул, содержащих такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, и фармацевтические композиции, составленные таким образом, что они содержат антитела или фрагменты антител. Также в настоящем документе обеспечены способы применения антител, либо отдельно, либо в комбинации с другими агентами, например, другими иммуностимулирующими агентами (например, антителами) для усиления иммунного ответа, например, для лечения рака и/или инфекций. Таким образом, анти-huICOS антитела, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения различных состояний, включая, например, ингибирование роста опухоли.

Определения

Для более легкого понимания настоящего описания сначала приводятся определения некоторых терминов. Дополнительные определения приводятся в подробном описании. Представленные в настоящем документе заголовки не являются ограничениями различных аспектов изобретения, которое может быть понято при обращении к описанию в целом. В соответствии с этим термины, определенные непосредственно ниже, более подробно определены путем ссылки на описание изобретения во всей своей полноте.

Как используется в настоящем документе, ICOS относится к белку, "индуцибельному костимулятору Т-клеток", который у людей кодируется геном ICOS. Также ICOS известен как "индуцибельный костимулятор", "индуцируемая активацией иммуномодулирующая лимфоцитарная молекула", AILIM, CVID1 и CD278. Человеческий ICOS, кроме того, описан в GENE ID NO: 29851 и базе данных MIM (Mendelian Inheritance in Man): 604558. Последовательность человеческого ICOS (NP_036224.1), включая сигнальную последовательность из 20 аминокислот, представлена в виде SEQ ID NO: 1 и показана на фиг. 1.

Ниже представлены аминокислотные последовательности двух изоформ человеческого ICOS.

Изоформа 1 (Q9Y6W8)

MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ
FKMQLLKGGQ ILCDLTKTKG SGNVSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD
HSHANYYFCN LSIFDPPPFK VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF
VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY MFMRAVN TAK KSRSLTDVTL (SEQ ID
NO: 1)

Изоформа 2 (Q9Y6W8-2)

MKSGLWYFFLFLCLRIKVLTEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLLK
 GGQILCDLTKTKGSGNVTYSIKSLKFCQSLSNNSVSFFLYNLDSHANYFYFCNLSIFDP
 PPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVCILGCILICWLTKKM (SEQ ID
 NO: 205)

Сигнальная последовательность изоформ 1 и 2 соответствует аминокислотам 1-20 (подчеркнуто выше). Таким образом, зрелые изоформы 1 и 2 состоят из аминокислот 21-199 SEQ ID NO: 1 и аминокислот 21-158 SEQ ID NO: 205.

ICOS взаимодействует с лигандом ICOS (ICOS-L), который также известен как ICOSL, ICOS-LG, LICOS, B7H2, B7-H2, B7RP1, B7RP-1, CD275 и GL50. Человеческий ICOS-L, кроме того, описан в GENE ID NO: 23308 и MIM: 605717. Последовательность человеческого ICOS-L (NP_001269979.1), включая сигнальную последовательность из 18 аминокислот, представлена в SEQ ID NO: 2. Таким образом, зрелая форма ICOS-L состоит из аминокислот 19-302 SEQ ID NO: 2.

Термины "антитело" или "иммуноглобулин", которые используются взаимозаменяемо в настоящем документе, относятся к белку, содержащему по меньшей мере две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариательной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как V_H) и константной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как CH). В некоторых антителах, например, встречающихся в природе антителах IgG, константная область тяжелой цепи состоит из шарнира и трех доменов, CH1, CH2 и CH3. В некоторых антителах, например, встречающихся в природе антителах IgG, каждая легкая цепь состоит из вариательной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (сокращенно обозначенного в настоящем документе как CL). Области V_H и V_L могут дополнительно подразделяться на области гиперварибельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающимися более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L область состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариательные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. В тяжелой цепи может присутствовать или отсутствовать С-концевой лизин. Если не указано иное, аминокислоты в вариательных областях пронумерованы с использованием системы нумерации Kabat и аминокислоты в константных областях пронумерованы с использованием системы EU. Иммуноглобулин может быть любого известного изоформа, включая IgA, секреторный IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Изотип IgG разделяется на подклассы у некоторых видов: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей, и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. В некоторых вариантах осуществления анти-ICOS антитела, описанные в настоящем документе, относятся к подтипу IgG1. Иммуноглобулины, например, IgG1, существуют в нескольких аллотипах, которые отличаются друг от друга не более чем несколькими аминокислотами. В качестве примера "антитело" включает как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе антитела; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие и нечеловеческие антитела и полностью синтетические антитела.

Как используется в настоящем документе, "антитело IgG" имеет структуру природного антитела IgG, то есть оно имеет такое же количество тяжелых и легких цепей и дисульфидных связей как и встречающееся в природе антитело IgG того же подкласса. Например, анти-ICOS антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 состоит из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), при этом две тяжелые цепи и легкие цепи связаны одинаковым числом и расположением дисульфидных мостиков, которые встречаются в природных антителах IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 соответственно (если антитело не было подвергнуто мутации для модификации дисульфидных связей).

"Антиген" представляет собой молекулу или вещество, которое запускает иммунный ответ и с которым связывается антитело. Антитела обычно связываются специфически с их распознанным антигеном с высокой аффинностью, отражаемой константой диссоциации (K_D), равной 10^{-7} - 10^{-11} М или менее. Любое значение K_D более чем около 10^{-6} М, как правило, обозначает неспецифическое связывание. Как используется в настоящем документе, антитело, которое "специфически связывается" с антигеном, относится к антителу, которое связывается с антигеном, а в некоторых случаях по существу идентичными антигенами, с высокой аффинностью, то есть имеет K_D 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 5×10^{-9} М или менее, или от 10^{-8} М до 10^{-10} М или менее, но не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами. Антиген является "по существу идентичным" заданному антигену, если он обладает высокой степенью идентичности последовательности с заданным антигеном, например, если он проявляет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с последовательностью заданного антигена. В качестве примера, антитело, которое специфически связывается с ICOS человека, в некоторых вариантах осуществления также перекрестно реагирует с антигенами ICOS от некоторых видов приматов отличных от

человека (например, макак-крабоедов), но не реагирует перекрестно с ICOS от других видов или с антигеном, отличным от ICOS.

Как используется в настоящем документе, термин "антигенсвязывающая часть" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела относится к одному или нескольким частям антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, человеческим ICOS). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами или частями полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охваченные термином "антигенсвязывающая часть" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела, например, анти-ICOS антитела, описанного в настоящем документе, включают:

(1) Fab-фрагмент (фрагмент, образующийся в результате расщепления папаином) или аналогичный моновалентный фрагмент, состоящий из V_L , V_H , LC и CH1 доменов;

(2) F(ab')₂-фрагмент (фрагмент, образующийся в результате расщепления пепсином) или аналогичный бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области;

(3) Fd-фрагмент, состоящий из V_H и CH1 доменов;

(4) Fv-фрагмент, состоящий из V_L и V_H доменов одного плеча антитела;

(5) фрагмент однодоменного антитела (dAb) (Ward et al., (1989) Nature 341:544-46), который состоит из V_H домена;

(6) выделенную область, определяющую комплементарность (CDR); и

(7) комбинацию из двух или более выделенных CDR, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, они могут быть соединены, используя рекомбинатные способы, с помощью синтетического линкера, что позволяет их получить в виде одной белковой цепи, в которой V_L и V_H области спариваются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Предполагается, что такие одноцепочечные антитела также охвачены термином "антигенсвязывающая часть" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела. Эти фрагменты антител получают с использованием традиционных методик, известных специалистам в данной области, и фрагменты подвергают скринингу в отношении применимости таким же способом, что и интактные антитела. Антигенсвязывающие части могут быть получены методами с использованием рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

Термин "акцепторная человеческая каркасная область" относится к каркасной области, содержащей аминокислотную последовательность каркасной области переменного домена легкой цепи (V_L) или каркасной области переменного домена тяжелой цепи (V_H), происходящей от каркасной области человеческого иммуноглобулина или от человеческой консенсусной каркасной области. Акцепторная человеческая каркасная область, "происходящая от" каркасной области человеческого иммуноглобулина или человеческой консенсусной каркасной области, может иметь такую же аминокислотную последовательность, что и каркасная область человеческого природного иммуноглобулина или человеческая консенсусная каркасная область, либо она может иметь изменения аминокислотных последовательностей по сравнению с каркасной областью природного человеческого иммуноглобулина дикого типа или человеческой консенсусной каркасной областью. В некоторых вариантах осуществления количество изменений аминокислот замен составляет 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2, или 1. В некоторых вариантах осуществления акцепторная каркасная область V_L человека идентична по последовательности каркасной области V_L иммуноглобулина человека или консенсусной последовательности каркасной области человека.

"Шарнир", "шарнирный домен" или "шарнирная область", или "шарнирная область антитела" относится к домену константной области тяжелой цепи, который соединяет домен CH1 с доменом CH2 и содержит верхнюю, среднюю и нижнюю части. (Roux et al. (1998) J. Immunol. 161:4083). В зависимости от своей аминокислотной последовательности шарнир обеспечивает различные уровни гибкости между антигенсвязывающим доменом и эффекторной областью антитела, а также обеспечивает сайты для образования межмолекулярных дисульфидных связей между двумя константными областями тяжелой цепи. Как используется в настоящем документе, шарнир начинается в E216 и заканчивается в G237 для всех изоформ IgG (по нумерации EU). Id. Последовательности шарниров IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 дикого типа приведены в табл. 1.

Таблица 1. Последовательности шарнирной области

Тип Ig	С-концевой C _H 1*	Верхний шарнир	Средний шарнир	Нижний шарнир
IgG1	VDKRV (SEQ ID NO:66)	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:67)	CPPCP (SEQ ID NO:68)	APELLGG (SEQ ID NO:69)
IgG2	VDKTV (SEQ ID NO:70)	ERK	CCVECPPCP (SEQ ID NO:71)	APPVAG (SEQ ID NO:72)
IgG3 (17-15-15)	VDKRV (SEQ ID NO:66)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:73)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP); (SEQ ID NO:74)	APELLGG (SEQ ID NO:69)
IgG3 (17-15-15)	VDKRV (SEQ ID NO:66)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:73)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP); (SEQ ID NO:75)	APELLGG (SEQ ID NO:69)
IgG3 (17-15)	VDKRV (SEQ ID NO:66)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:73)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP); (SEQ ID NO:76)	APELLGG (SEQ ID NO:69)
IgG3 (15-15-15)	VDKRV (SEQ ID NO:66)	EPKS (SEQ ID NO:77)	CDTPPCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP); (SEQ ID NO:78)	APELLGG (SEQ ID NO:69)
IgG3 (15)	VDKRV (SEQ ID NO:66)	EPKS (SEQ ID NO:77)	CDTPPCPRCP (SEQ ID NO:79)	APELLGG (SEQ ID NO:69)
IgG4	VDKRV (SEQ ID NO:66)	ESKYGPP (SEQ ID NO:80)	CPSCP (SEQ ID NO:81)	APEFLGG (SEQ ID NO:82)

*С-концевые аминокислотные последовательности доменов СН1.

Термин "шарнир" включает шарниры дикого типа (такие как представленные в табл. 1), а также их варианты (например, шарниры, не встречающиеся в природе, или модифицированные шарниры). Например, термин "шарнир IgG2" включает шарнир IgG2 дикого типа, как показано в табл. 1, и варианты, имеющие 1 или более мутаций (например, замен, делеций и/или добавлений), например, 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 и/или не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию. Иллюстративные варианты шарнира IgG2 включают шарниры IgG2, в которых 1, 2, 3 или все 4 цистеина (C219, C220, C226 и C229) заменены на другую аминокислоту, например, серин. В определенных вариантах осуществления шарнирная область IgG2 содержит замену C219S. В некоторых вариантах осуществления шарнир содержит последовательности по меньшей мере двух изотипов. Например, шарнир может содержать верхний, средний или нижний шарнир одного изотипа, а остальную часть шарнира одного или нескольких других изотипов. Например, шарнир может представлять собой шарнир IgG2/IgG1 и может содержать, например, верхний и средний шарниры IgG2 и нижний шарнир IgG1. Шарнир может обладать эффекторной функцией или может быть лишен эффекторной функции. Например, нижний шарнир IgG1 дикого типа обеспечивает эффекторную функцию. Термин "СН1 домен" относится к константной области тяжелой цепи, связывающей переменный домен с шарниром в константном домене тяжелой цепи. Как используется в настоящем документе, СН1 домен начинается в A118 и заканчивается в V215. Термин "СН2 домен" относится к константной области тяжелой цепи, связывающей шарнир с СН3 доменом в константном домене тяжелой цепи. Как используется в настоящем документе, домен СН2 начинается в P238 и заканчивается в K340. Термин "СН3 домен" относится к константной области тяжелой цепи, которая является С-концевой относительно СН2 домена в константном домене тяжелой цепи. Как используется в настоящем документе, СН3 домен начинается в G341 и заканчивается в K447.

"Биспецифическое" или "бифункциональное антитело" представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две различные специфичности связывания, например, две отличающиеся пары тяжелых/легких цепей, что приводит к образованию двух сайтов связывания антигена со специфичностью в отношении различных антигенов. Биспецифические антитела могут быть получены с помощью ряда способов, в том числе слияния гибридом или связывания Fab'-фрагментов. См., например, Song-sivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

Как используется в настоящем документе, термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела в популяции являются по существу схожими и связываются с тем же эпитопом(ами) (например, антитела проявляют одну специфичность связывания и аффинность), за исключением возможных вариантов, которые могут возникать во время получения моноклонального антитела, при этом такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. Термин "моноклональное" указывает на характер антитела как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и не требует получения антитела каким-либо конкретным способом. Термин "человеческое моноклональное антитело" относится к антителу из популяции по существу гомогенных антител, которое проявляет одну специфичность связывания и которое имеет переменные и необязательные константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. В одном варианте осуществления человеческие моноклональные антитела получены способом на основе гибридом. Используя способ на основе гибридом, трансгенное животное, не являющееся человеком, например, трансгенную мышь, подвергают воздейст-

вию антигена, и лейкоцит, известный как В-клетка, продуцирует антитела, которые связываются с антигеном, который собирают у трансгенного животного, не являющегося человеком. Выделенные В-клетки сливают с иммортализованной клеткой с получением гибридной клеточной линии, называемой гибридомой. В одном варианте осуществления гибридома имеет геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитый с иммортализованной клеткой.

Антигенсвязывающие фрагменты (включая scFv) таких иммуноглобулинов также охвачены термином "моноклональное антитело", используемым в настоящем документе. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, направленными против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от обычных (поликлональных) препаратов антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных эпитопов на антигене, каждое моноклональное антитело направлено против одного эпитопа. Моноклональные антитела могут быть получены с использованием любой известной в данной области методики, а также методик, описанных в настоящем документе, таких как, например, метод на основе гибридом, трансгенное животное, методы рекомбинантной ДНК (см. например, патент США 4816567), или с использованием фаговых библиотек антител по методике, описанной, например, в патенте США 7388088 и публикации PCT WO 00/31246). Моноклональные антитела включают химерные антитела, человеческие антитела и гуманизированные антитела, и могут быть природными или получены рекомбинантными методами.

Как используется в настоящем документе, термин "рекомбинантное человеческое антитело" включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как (1) антитела, выделенные у животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным в отношении генов человеческих иммуноглобулинов или гибридомы, полученной из данного животного, (2) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (3) антитела, выделенные из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител, и (4) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими средствами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные области, которые используют специфические последовательности иммуноглобулинов зародышевой линии человека, кодируемые генами зародышевой линии, но включают последующие перегруппировки и мутации, которые возникают, например, во время созревания антитела. Как известно в данной области (см. например, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9): 1117-1125), переменная область содержит антигенсвязывающий домен, кодируемый различными генами, которые перегруппировываются с образованием антитела, специфического для чужеродного антигена. В дополнение к перегруппировке, переменная область может быть дополнительно модифицирована путем многократных изменений одной аминокислоты (именуемых соматической мутацией или гипермутацией), чтобы увеличить аффинность антитела к чужеродному антигену. Константная область будет меняться при дальнейшем ответе на антиген (т.е. происходить переключение изотипа). Таким образом, перегруппированные и соматически мутированные молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи иммуноглобулина в ответ на антиген, могут быть не идентичны оригинальным последовательностям зародышевой линии, но вместо этого, будут по существу идентичными или аналогичными (например, будут иметь по меньшей мере 80% идентичности).

Как используется в настоящем документе, термин "человеческое антитело" относится к антителу, имеющему переменные области, в которых как каркасные участки, так и CDR-области получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также происходит из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела против huICOS, описанные в настоящем документе, могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или путем соматической мутации *in vivo*). Однако, термин "человеческое антитело" не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека. В настоящем описании термины "человеческие" антитела и "полностью человеческие" антитела используются взаимозаменяемо.

"Гуманизированное" антитело относится к антителу, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты за пределами доменов CDR антитела, не являющегося человеческим, заменены соответствующими аминокислотами, происходящими из человеческих антител. В одном варианте осуществления гуманизированной формы антитела некоторые, большинство или все аминокислоты за пределами доменов CDR заменены аминокислотами из человеческих антител, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в пределах одной или нескольких областей CDR остаются неизменными. Небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот являются допустимыми при условии, что они не нарушают способность антитела к связыванию с конкретным антигеном. "Гуманизированное" антитело сохраняет антигенную специфичность, подобную таковой исходного антитела.

"Химерное антитело" относится к антителу, в котором переменные области получены из одних

видов, а константные области получены из других видов, такому как антитело, в котором переменные области получены из мышинного антитела, а константные области получены из человеческого антитела. "Гибридное" антитело относится к антителу, имеющему тяжелые и легкие цепи различного типа, например, мышиную или хомьячую (родительскую) тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь, или наоборот. Химерные или гибридные антитела могут быть сконструированы, например, методами генной инженерии, из сегментов генов иммуноглобулинов, принадлежащих разным видам.

Как используется в настоящем документе, "изотип" относится к классу антитела (например, антитела IgG (включая антитела IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgM, IgA (включая IgA1 и IgA2), IgD и IgE), который кодируется генами константной области тяжелой цепи антитела.

"Аллотип" относится к встречающимся в природе вариантам в пределах группы определенных изо-типов. (См., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1).

Фразы "антитело, узнающее антиген" и "антитело, специфическое в отношении антигена" используются в настоящем документе взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфически связывается с антигеном".

Как используется в настоящем документе, "выделенное антитело" относится к антителу, которое по существу не содержит других белков и клеточных материалов. Как используется в настоящем документе, "эффекторная функция" относится к взаимодействию Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом, или к биохимическому явлению, которое является результатом такого взаимодействия. Иллюстративные "эффекторные функции" включают в себя связывание с C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), связывание с Fc-рецептором, Fcγ-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), и понижающая регуляция рецептора клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора; BCR). Такие эффекторные функции обычно требуют объединения Fc-области со связывающим доменом (например, переменным доменом антитела).

"Fc-рецептор" или "FcR" представляет собой рецептор, который связывается с Fc-областью иммуноглобулина. FcR, которые связываются с антителом IgG, содержат рецепторы семейства FcγR, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы данных рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих (FcγRI, FcγRIII и FcγRIV у мышей; FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIA у человека) и одного ингибирующего (FcγRIIb или, что эквивалентно, FcγRIIB) рецептора. Различные иллюстративные свойства человеческих FcγR приведены в табл. 2. Большинство врожденных типов эффекторных клеток совместно экспрессируют один или несколько активирующих FcγR и ингибирующий FcγRIIb, тогда как природные клетки-киллеры (NK) селективно экспрессируют один активирующий Fc-рецептор (FcγRIII у мышей и FcγRIIA у людей), но не экспрессируют ингибирующий FcγRIIb у мышей и людей. Человеческий IgG1 связывается с большинством Fc-рецепторов человека и считается эквивалентным мышинному IgG2a в отношении типов активирующих Fc-рецепторов, с которыми он связывается. Таблица 2. Типичные свойства человеческих FcγR

Fcγ	Аллельные варианты	Аффинность в отношении человеческого IgG	Предпочтение изо-типа	Клеточное распределение
FcγRI	Не описаны	Высокая (K _D ~ 10 нМ)	IgG1=3>4>>2	Моноциты, макрофаги, активированные нейтрофилы, дендритные клетки
FcγRIIA	H131	Низкая-средняя	IgG1>3>2>4	Нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эозинофилы, дендритные клетки, тромбоциты
	R131	Низкая	IgG1>3>4>2	
FcγRIIA	V158	Средняя	IgG1=3>>4>2	NK-клетки, моноциты, макрофаги, тучные клетки, эозинофилы, дендритные клетки
	F158	Низкая	IgG1=3>>4>2	
FcγRIIb	I232	Низкая	IgG1=3=4>2	B-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки
	T232	Низкая	IgG1=3=4>2	

Как используется в настоящем документе, "Fc-область" (фрагмент, способный к кристаллизации) или "Fc-домен" или "Fc" относится к C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая связывание с Fc-рецепторами, расположенными на различных клетках иммунной системы (например, эффекторных клетках), или с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, Fc-область содержит константную область антитела, за исключением первого домена константной области иммуноглобулина (например, CH1 или CL). В изо-типах антител IgG, IgA и IgD Fc-область содержит константные домены CH2 и CH3 в каждой из двух тяжелых цепей антитела; Fc-области в IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (CH-домены 2-4) в каждой полипептидной цепи. В случае IgG, Fc-область содержит иммуноглобулиновые домены Cγ2 и Cγ3, и шарнир между Cγ1 и Cγ2. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут отличаться, определено, что Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно продолжается от аминокислотного остатка в положении C226 или P230 (или аминокислоты меж-

ду этими двумя аминокислотами) до карбоксиконца тяжелой цепи, где нумерация соответствует индексу EU, как в Kabat. (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Домен C_m Fc-области IgG человека простирается от приблизительно аминокислоты 231 до приблизительно аминокислоты 340, в то время как домен C_{H3} расположен на C-концевой стороне домена C_{H2} в Fc-области, т.е., он продолжается от приблизительно аминокислоты 341 до приблизительно аминокислоты 447 в IgG (включая C-концевой лизин). Как используется в настоящем документе, Fc-область может представлять собой нативную последовательность Fc, включая любой аллотипический вариант или вариант Fc (например, не встречающуюся в природе Fc). Fc может также относиться к данной области в отдельности или в контексте полипептида Fc-содержащего белка, такого как "связывающий белок, содержащий Fc-область", также называемый "Fc-слитым белком" (например, антитело или иммуноадгезин).

"Fc-область" (фрагмент, способный к кристаллизации) или "Fc-домен" или "Fc" относится к C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая связывание с Fc-рецепторами, расположенными на различных клетках иммунной системы (например, эффекторных клетках) или с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, Fc-область содержит константную область антитела, за исключением первого домена константной области иммуноглобулина (например, C_{H1} или CL). В изоформах антител IgG, IgA и IgD Fc-область содержит два идентичных белковых фрагмента, полученных из второго (C_{H2}) и третьего (C_{H3}) константных доменов двух тяжелых цепей антитела. В случае изоформ антител IgM и IgE Fc-области содержат три константных домена тяжелой цепи (C_H-домены 2-4) в каждой полипептидной цепи. В случае IgG, Fc-область содержит домены иммуноглобулина C_{H2} и C_{H3} и шарнир между доменами C_{H1} и C_{H2}. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут отличаться, в настоящем документе определено, что Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно продолжается от аминокислотного остатка в положении D221 для IgG1, V222 для IgG2, L221 для IgG3 и P224 для IgG4 до карбоксиконца тяжелой цепи, где нумерация соответствует индексу EU, как в Kabat (Kabat, et al., 1991). Домен C_{H2} Fc-области человеческого IgG простирается от аминокислоты 237 до аминокислоты 340, и домен C_{H3} расположен на C-концевой стороне домена C_{H2} в области Fc, т.е., он продолжается от аминокислоты 341 до аминокислоты 447 или 446 (если C-концевой остаток лизина отсутствует), или 445 (если отсутствуют C-концевые остатки глицина и лизина) в IgG. Как используется в настоящем документе, Fc-область может представлять собой нативную последовательность Fc, включая любой аллотипический вариант, или вариант Fc (например, не встречающуюся в природе Fc). Fc также может относиться к данной области в отдельности или в контексте полипептида Fc-содержащего белка, такого как "связывающий белок, содержащий Fc-область", также называемый "Fc-слитый белок" (например, антитело или иммуноадгезин).

"Нативная последовательность Fc-области" или "нативная последовательность Fc" содержит аминокислотную последовательность, которая является идентичной аминокислотной последовательности Fc-области, встречающейся в природе. Нативные последовательности Fc-области человека включают нативную последовательность Fc-области человеческого IgG1 (например, SEQ ID NO: 206); нативную последовательность Fc-области человеческого IgG2; нативную последовательность Fc-области человеческого IgG3; и нативную последовательность Fc-области человеческого IgG4, а также их природные варианты. Fc с нативными последовательностями включают различные аллотипы Fc-областей. (См., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1).

Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к сайту на антигене (например, huICOS), с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы могут быть образованы последовательно расположенными аминокислотами (обычно линейный эпитоп) или не расположенными последовательно аминокислотами, находящимися рядом благодаря укладке белка в третичную структуру (обычно конформационный эпитоп). Эпитопы, образованные из последовательно расположенных аминокислот, как правило, но не всегда, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные при укладке белка в третичную структуру, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 аминокислоты в уникальной пространственной конформации.

Термин "картирование эпитопов" относится к процессу идентификации молекулярных детерминант на антигене, участвующих в распознавании антитело-антиген. Способы определения того, какие эпитопы связываются данным антителом, хорошо известны в данной области и включают, например, иммунолоттинг и анализы иммунопреципитации, где перекрывающиеся или смежные пептиды (например, из ICOS) испытывают на реактивность с данным антителом (например, антителом к ICOS); рентгеноструктурную кристаллографию; мутационный анализ антигена, двумерный ядерный магнитный резонанс; дрожжевой дисплей; и масс-спектрометрию водородно-дейтериевого обмена (FIDX-MS) (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Термин "связывается с одним и тем же эпитопом", со ссылкой на два или более антител, означает, что антитела связываются с одним и тем же сегментом аминокислотных остатков, как определено дан-

ным способом. Методики для определения того, связываются ли антитела с "одним и тем же эпитопом на ICOS" с антителами, описанными в настоящем документе, включают, например, способы картирования эпитопов, такие как рентгеновские анализы кристаллов комплексов антиген:антитело, что обеспечивает атомное разрешение эпитопа, и FIDX-MS. Другие способы контролируют связывание антитела с фрагментами антигена (например, протеолитическими фрагментами) или мутированными вариациями антигена, где потеря связывания за счет модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто считается признаком эпитопного компонента, например, аланин-сканирующий мутагенез (Cunningham & Wells (1985) *Science* 244:1081) или дрожжевой дисплей мутантных вариантов последовательности-мишени (см. Пример 16). Кроме того, также могут быть использованы вычислительные комбинаторные способы для картирования эпитопов. Данные способы основаны на способности представляющего интерес антитела к выделению по средству отдельных коротких пептидов из комбинаторных пептидных библиотек фагового дисплея. Антитела, имеющие такие же V_H и V_L , или те же самые последовательности CDR1, 2 и 3, как ожидается, связываются с одним и тем же эпитопом.

Антитела, которые "конкурируют с другим антителом за связывание с мишенью", относятся к антителам, которые ингибируют (частично или полностью) связывание другого антитела с мишенью. Конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мишенью, т.е. может ли и в какой степени может одно антитело ингибировать связывание другого антитела с мишенью, может быть определено с использованием известных экспериментов по конкурентному связыванию, например, анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) BIACORE®. В некоторых вариантах осуществления антитело конкурирует с другим антителом и ингибирует связывание другого антитела с мишенью по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Уровень ингибирования или конкуренции может быть различным в зависимости от того, какое антитело является "блокирующим антителом" (т.е. антитело, которое при объединении с антигеном блокирует другую иммунологическую реакцию с антигеном). Анализы конкурентного связывания можно проводить, как описано, например, в Ed Harlow and David Lane, *Cold Spring Harb. Protoc.* 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277 или в Chapter 11 of "Using Antibodies" by Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Конкурирующие антитела связываются с одним и тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или смежными эпитопами (например, о чем свидетельствует стерическое затруднение). Два антитела "перекрестно конкурируют", если антитела блокируют друг друга в обоих направлениях по меньшей мере на 50%, т.е., независимо от того, контактирует ли одно или другое антитело первым с антигеном в конкурентном эксперименте.

Анализы конкурентного связывания для определения, конкурируют ли или перекрестно конкурируют два антитела за связывание, включают конкуренцию за связывание с Т-клетками, экспрессирующими ICOS, например, с помощью проточной цитометрии. Другие способы включают: поверхностный плазмонный резонанс (SPR) (например, BIACORE®), твердофазный прямой или непрямой радиоиммунный анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); твердофазный EIA с прямой меченной биотин-авидин (см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); твердофазный анализ прямого мечения, твердофазный сэндвич-анализ прямого мечения (см. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазный RIA прямого мечения с использованием метки I-125 (см. Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); твердофазный EIA с прямым мечением биотин-авидин (Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990)); и RIA с прямым мечением (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)).

Как используется в настоящем документе, термины "специфическое связывание", "селективное связывание", "селективно связывается" и "специфически связывается" относятся к связыванию антитела с эпитопом на предварительно заданном антигене. Как правило, антитело: (1) связывается с равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно менее чем 10^{-7} М, например, приблизительно менее чем 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М, или даже ниже при определении с помощью, например, технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе для измерения поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® 2000 с использованием предварительно заданного антигена, например, рекомбинантного человеческого ICOS в качестве аналита и антитела в качестве лиганда, или анализа Скэтчарда связывания антитела с антигенположительными клетками, и (2) связывается с предварительно заданным антигеном с аффинностью, которая превышает по меньшей мере в два раза его аффинность в отношении связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеин), отличающимся от предварительно заданного антигена или близкородственного антигена. Соответственно, антитело, которое "специфически связывается с ICOS человека", относится к антителу, которое связывается с растворимым или связанным с клетками человеческим ICOS с K_D , равной 10^{-7} М или менее, например, приблизительно менее 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М, или даже более низкой. Антитело, которое "перекрестно реагирует с ICOS яванского макака", относится к антителу, которое связывается с ICOS яванского макака с K_D , равной 10^{-7} М или менее, например, приблизительно менее 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже более низкой.

Термин " k_{assoc} " или " k_a ", как используется в настоящем документе, относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, в то время как термин " k_{diss} " или " k_d ", как

используется в настоящем документе, относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин " K_D ", как используется в настоящем документе, относится к равновесной константе диссоциации, которую получают из соотношения k_d и k_a (т.е. k_d/k_a) и выражают в виде молярной концентрации (М). Значения K_D для антител могут быть определены с использованием способов, хорошо известных в данной области. Доступные способы для определения K_D антитела включают анализ биослойной интерферометрии (BLI), например, с использованием устройства ForteBio Octet RED, поверхностный плазмонный резонанс, предпочтительно с использованием биосенсорной системы, такой как система на основе способа поверхностного плазмонного резонанса BIACORE®, или проточная цитометрия и анализ Скэтчарда.

Термин "EC50" в контексте анализа *in vitro* или *in vivo* с использованием антитела или его антиген-связывающего фрагмента относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которая индуцирует ответ, составляющий 50% от максимального ответа, т.е. находится посередине между максимальной ответной реакцией и базовой линией.

Термин "связывается с иммобилизованным ICOS" относится к способности антитела, описанного в настоящем документе, связываться с ICOS, например, экспрессированным на поверхности клетки или прикрепленным к твердой подложке.

Термин "перекрестно реагирует", как используется в настоящем документе, относится к способности антитела, описанного в настоящем документе, связываться с ICOS из других видов. Например, антитело, описанное в настоящем документе, которое связывается с человеческим ICOS, может также связывать ICOS из другого вида (например, ICOS яванского макака). Как используется в настоящем документе, перекрестная реактивность может быть измерена путем определения специфической реактивности с очищенным антигеном в анализах связывания (например, SPR, ELISA) или связывания, или иным образом функционального взаимодействия с клетками, физиологически экспрессирующими ICOS. Способы определения перекрестной реактивности включают стандартные анализы связывания, как описано в настоящем документе, например, при помощи SPR-анализа с использованием прибора BIACORE® 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Sweden) или способами проточной цитометрии.

Термин "рецепторная занятость" или "занятость рецептора", как используется в настоящем документе, относится к количеству агонистического антитела (например, анти-ICOS антител, описанных в настоящем документе), которое связано с иммуностимулирующим рецептором (например, человеческим ICOS). "% рецепторной занятости" или "% занятости рецептора" может быть рассчитан по следующей формуле: $([\Delta\text{MFI Тестируемый}] / [\Delta\text{MFI Общий}]) \times 100$. ΔMFI (изменение в единицах средней флуоресценции) рассчитывают путем вычитания MFI фонового окрашивания изотипическим контрольным антителом из MFI от связанного агонистического антитела. Общий уровень рецептора определяют путем добавления насыщающего количества агонистического антитела для определения максимальной экспрессии и, следовательно, MFI конкретного иммуностимулирующего рецептора. Альтернативным способом для расчета общей экспрессии рецептора является использование антитела против того же иммуностимулирующего рецептора, который не конкурирует с агонистическим антителом, для которого рассчитывается занятость рецептора.

Как используется в настоящем документе, термин "природный" относится к веществу, присутствующему в природе, которое не было специально модифицировано человеком. Например, полипептид или полинуклеотидная последовательность, присутствующий в организме (включая вирусы), который может быть выделен из природного источника, и который не был намеренно модифицирован человеком в лаборатории, является природным.

Термин "полипептид" относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно связанных аминокислотных остатка, без верхнего предела по длине цепи. Один или более аминокислотных остатков в белке может содержать модификацию, такую как, но без ограничения, гликозилирование, фосфорилирование или дисульфидная связь. "Белок" может содержать один или более полипептидов.

Термин "молекула нуклеиновой кислоты", используемый в настоящем документе, предназначен для включения молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной и может представлять собой кДНК.

Термин "кДНК" относится к неприродной молекуле нуклеиновой кислоты, которая была создана или получена из мРНК, т.е. некодирующие области были удалены.

Термин "мРНК" или "матричная РНК" представляет собой интермедиат нуклеиновой кислоты, который определяет аминокислотную последовательность полипептида во время трансляции.

Как используется в настоящем документе, термин "консервативные модификации последовательности" относится к модификациям аминокислот, которые значительным образом не влияют или не меняют связывающих характеристик антитела, которое содержит такую аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации могут быть введены в антитело в соответствии с настоящим изобретением стандартными способами, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез и опосредованный полимеразно-цепной реакцией (PCR) мутагенез. Консервативные аминокислотные замены являются та-

кими, при которых аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков со сходными боковыми цепями. Данные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков в CDR участках антитела в соответствии с изобретением могут быть замещены другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей, и измененное антитело анализируется на сохраненную функцию (т.е., функции, описанные в настоящем документе выше) при использовании функциональных анализов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления заранее рассчитанный остаток аминокислоты, не относящейся к числу незаменимых аминокислот, в анти-ICOS антителах замещен другим аминокислотным остатком из семейства с таким же типом боковой цепи. Способы идентификации нуклеотидных и аминокислотных консервативных замен, которые не исключают связывания антигена, хорошо известны в данной области (см., например, Brummell et al., *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10): 879-884 (1999); and Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

В отношении нуклеиновых кислот, термин "существенная гомология" указывает на то, что при оптимальном выравнивании и сравнении с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями две нуклеиновые кислоты или их назначенные последовательности идентичны по меньшей мере приблизительно в 80% нуклеотидов, по меньшей мере от около 90 до 95% или по меньшей мере от около 98 до 99,5% нуклеотидов. В качестве альтернативы, существенная гомология существует, когда сегменты гибридизуются в условиях селективной гибридизации с комплементом нуклеотидной цепи.

В отношении полипептидов, термин "существенная гомология" указывает на то, что два полипептида или их назначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении идентичны с соответствующими аминокислотными вставками или делециями по меньшей мере приблизительно в 80% аминокислот, по меньшей мере от около 90 до 95% или по меньшей мере от около 98 до 99,5% аминокислот.

Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных положений, общих для последовательностей, когда последовательности оптимально выровнены (т.е. % гомологии = число идентичных положений/общее число положений×100), причем оптимальное выравнивание определяется с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть осуществлено с использованием математического алгоритма, как описано ниже.

Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен, например, с использованием программы GAP в пакете программного обеспечения GCG, с использованием матрицы *nwsgapdna.cmp* и веса гэпа (*gap weight*) 40, 50, 60, 70 или 80, и веса длины (*length weight*) 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями также может быть определен с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), который был включен в программу ALIGN (версию 2.0), используя таблицу веса остатков (*weight residue*) PAM120, штраф за длину гэпа (*gap length penalty*), равный 12, и штраф за открывание гэпа (*gap penalty*), равный 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в пакете программ GCG, использующую либо матрицу Blossum 62, либо матрицу PAM250, и вес гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и вес длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Последовательности нуклеиновых кислот и белка, описанные в настоящем документе, могут быть дополнительно использованы в качестве "последовательности запроса" для выполнения поиска в публичных базах данных, например, чтобы определить родственные последовательности. Такие поиски могут быть выполнены с помощью программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) из Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Поиск нуклеотидов BLAST может быть осуществлен с помощью программы NBLAST, счет = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе. Поиски белков BLAST могут быть осуществлены с помощью программы XBLAST, счет = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам, описанным в настоящей заявке. Для получения имеющих гэпы выравниваний в сравнительных целях можно использовать Gapped BLAST, как описано у Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. При применении программ BLAST и Gapped BLAST могут быть использованы параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). (См., например, National Center for Biotechnology Information

(NCBI), на веб-сайте <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, например, в клетке-хозяине, в клеточном лизате или в частично очищенном или по существу чистом виде. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "оказывается по существу чистой", будучи очищенной от других клеточных компонентов или других примесей, например, других клеточных нуклеиновых кислот (например, других частей хромосомы) или белков, стандартными способами, включая щелочную/SDS обработку, разделение в CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие способы, хорошо известные в данной области техники. (См., F. Ausubel, et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)).

Термин "вектор", как используется в настоящем документе, предназначен для обозначения: молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой "плазмиду", в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие сайт инициации репликации бактериального происхождения, и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и таким образом реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы упоминаются в настоящем документе как "рекомбинантные экспрессирующие векторы" (или просто "экспрессирующие векторы"). Экспрессирующие векторы, используемые в способах рекомбинантных ДНК, включают плазмиды. Как используется в настоящем описании, термины "плазида" и "вектор" могут быть использованы взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Тем не менее, также включены и другие формы экспрессирующих векторов, такие как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Термин "клетка-хозяин" или термин "рекомбинантная клетка-хозяин", которые используются взаимозаменяемо, относится к клетке, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая не присутствует естественным образом в клетке, и может представлять собой клетку, в которую был введен рекомбинантный экспрессирующий вектор. Следует понимать, что такие термины относятся не только к конкретной рассматриваемой клетке, но к потомству такой клетки. Поскольку некоторые модификации могут происходить в последующих поколениях вследствие мутации или воздействия окружающей среды, такое потомство, на самом деле, может не быть идентичным родительской клетке, но по-прежнему включено в объем термина "клетка-хозяин", как использовано в настоящем документе.

"Иммунный ответ" относится к биологическому ответу в организме против чужеродных агентов, например, антигенов, которые защищают организм от этих агентов и вызываемых ими заболеваний. Иммунный ответ опосредован действием клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцит, В-лимфоцит, клетка естественного киллера (NK), макрофаг, эозинофил, тучная клетка, дендритная клетка или нейтрофил) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из данных клеток или печенью (включая антитела, цитокины и комплемент), что приводит к селективному нацеливанию, связыванию с, повреждению или разрушению и/или выведению из организма патогенных микроорганизмов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других аномальных клеток, или, в случаях аутоиммунных заболеваний или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей, включая, например, человеческие клетки или ткани. Иммунный ответ включает, например, активацию или ингибирование Т-клеток, например, эффекторной Т-клетки или клетки Th, такой как CD4+ или CD8+ Т-клетки, или ингибирование или истощение клетки Treg. Клетка "Т-эффектор" ("Teff") относится к Т-клеткам (например, CD4+ и CD8+ Т-клеткам) с цитолитическими активностями. Т-хелперные (Th) клетки секретируют цитокины и активируют и направляют другие иммунные клетки, но не включают регуляторные Т-клетки (Treg-клетки). Т-регуляторные ("Treg") клетки являются субпопуляцией Т-клеток, которые модулируют иммунную систему, сохраняют толерантность к аутоантигенам и предотвращают аутоиммунное заболевание. В-клетки памяти представляют собой подтип В-клеток, которые образуются в зародышевых центрах после первичной инфекции и являются важными для генерирования ускоренного и более устойчивого опосредованного антителом иммунного ответа в случае повторной инфекции (также известного как вторичный иммунный ответ). NK-клетки представляют собой тип цитотоксических лимфоцитов, критических для врожденной иммунной системы. Роль NK-клеток аналогична роли цитотоксических Т-клеток в адаптивном иммунном ответе позвоночных. NK-клетки обеспечивают быстрые ответы на инфицированные вирусом клетки и отвечают на образование опухоли.

Как используется в настоящем документе, термин "опосредованный Т-клетками ответ" относится к ответу, опосредованному Т-клетками, например, эффекторными Т-клетками (например, CD8+ клетками) и хелперными Т-клетками (например, CD4+-клетками). Опосредованные Т-клетками ответы включают, например, Т-клеточную цитотоксичность и пролиферацию.

Как используется в настоящем документе, термин "ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL)"

относится к иммунному ответу, индуцированному цитотоксическими Т-клетками. CTL-реакции опосредованы, например, CD8+ Т-клетками.

"Иммуномодулятор" или "иммунорегулятор" относится к агенту, например, компоненту сигнального пути, который может быть вовлечен в модулирование, регулирование или модифицирование иммунного ответа. "Модулирование", "регулирование" или "модифицирование" иммунного ответа относится к любому изменению в клетке иммунной системы или в активности такой клетки (например, эффекторной Т-клетки). Такая модуляция включает стимуляцию или подавление иммунной системы, которая может проявляться увеличением или уменьшением числа различных типов клеток, увеличением или уменьшением активности данных клеток и/или какими-либо другими изменениями, которые могут произойти в пределах иммунной системы. Оба ингибирующие и стимулирующие иммуномодуляторы были идентифицированы, некоторые из которых, возможно, имеют повышенную функцию в микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятор расположен на поверхности Т-клеток. "Иммуномодулирующая мишень" или "иммунорегуляторная мишень" представляет собой иммуномодулятор, который предназначен для связывания, и активность которого изменяется в результате связывания вещества, агента, фрагмента, соединения или молекулы. Иммуномодулирующие мишени включают, например, рецепторы на поверхности клетки ("иммуномодулирующие рецепторы") и лиганды рецептора (иммуномодулирующие лиганды").

Термин "иммунотерапия" относится к лечению субъекта, страдающего или подверженного риску возникновения заболевания или страдающего рецидивом заболевания, способом, включающим индуцирование, усиление подавления или иным образом модифицирование иммунного ответа.

"Иммуностимулирующая терапия" или "иммуностимуляторная терапия", относится к терапии, которая приводит к увеличению (индукции или усилению) иммунного ответа у субъекта, например, при лечении рака.

"Потенцирование эндогенного иммунного ответа" означает увеличение эффективности или потенции существующего иммунного ответа у субъекта. Такое повышение эффективности и потенции может быть достигнуто, например, путем преодоления механизмов, которые подавляют эндогенный иммунный ответ хозяина, или стимулируя механизмы, которые усиливают эндогенный иммунный ответ хозяина.

Как используется в настоящем документе, термин "связанный" относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь может быть также генетической (то есть, рекомбинантно слиты). Такие связи могут быть достигнуты с использованием широкого спектра известных в данной области способов, таких как химическая конъюгация и получение рекомбинантного белка.

Как используется в настоящем документе, термин "введение" относится к физическому введению композиции, содержащей терапевтический агент, например, анти-ICOS антитело, субъекту, с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. "Введение" включает, например, введение пациенту-человеку другим, таким как, например, один или несколько медицинских работников, и самостоятельное введение пациентом-человеком. Различные способы введения для антител, описанных в настоящем документе, включают внутривенный, внутривенный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемая в настоящем документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, например, путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, интралезиональную, внутрикапсульную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию, а также *in vivo* электропорацию. Альтернативно, антитело, описанное в настоящем документе, можно вводить через непарентеральный путь, например топикальный, эпидермальный или через слизистую оболочку пути введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или топикально. Введение также может осуществляться, например, один раз, несколько раз и/или в течение одного или более длительных периодов времени.

Как используется в настоящем документе, "вспомогательное" или "комбинированное" введение (совместное введение) включает одновременное введение соединений в одной или разных лекарственных формах, или раздельное введение соединений (например, последовательное введение). Таким образом, первое антитело, например, анти-ICOS антитело, и второе, третье или более антител можно вводить одновременно в виде единой композиции. Альтернативно, первое и второе (или более) антитело можно составить для раздельного введения и вводить одновременно или последовательно. "Комбинированная" терапия, как используется в настоящем документе, означает введение двух или более терапевтических агентов скоординированным образом и включает, но без ограничения, одновременное дозирование. В частности, комбинированная терапия охватывает как совместное введение (например, введение совместного препарата или одновременное введение отдельных терапевтических композиций) и серийное или последовательное введение, при условии, что введение одного терапевтического агента осуществляется таким же способом, как и введение другого терапевтического агента. Например, один терапевтический

агент можно вводить только после введения другого терапевтического агента и позволяют ему действовать в течение предписанного периода времени. (См., например, Kohrt et al. (2011) Blood 117:2423).

Например, анти-ICOS антитело можно вводить первым, с последующим (например, непосредственно после введения) введением второго антитела, или наоборот. В одном варианте осуществления анти-ICOS антитело вводят до введения второго антитела. В другом варианте осуществления анти-ICOS антитело вводят, например, примерно через 30 минут после второго антитела. Такое одновременное или последовательное введение предпочтительно приводит к тому, что оба антитела одновременно присутствуют у получаемых лечение пациентов.

Используемые в настоящем документе термины "ингибирует" или "блокирует" используются взаимозаменяемо и охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование по меньшей мере приблизительно на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100%, как определено, например, с помощью способов, описанных в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин "рак" относится к обширной группе заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемый рост или деление клеток может привести к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые внедряются в прилегающие ткани и могут метастазировать в удаленные части организма через лимфатическую систему или кровотоки.

Используемые в настоящем документе термины "лечить", "проводить лечение" и "лечение" относятся к любому типу вмешательства или процесса, выполняемого на субъекте, или введению активного агента субъекту с целью реверсирования, облегчения, смягчения, ингибирования или замедления, или предотвращения прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимических показателей, связанных с заболеванием. В противоположность этому, "профилактика" или "предупреждение" относится к введению субъекту, который не имеет заболевания, для предупреждения возникновения заболевания. "Лечить", "проводить лечение" и "лечение" не охватывает профилактику или предупреждение.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения желаемого эффекта. "Терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная дозировка" лекарственного средства или терапевтического агента представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при отдельном применении или в комбинации с другим терапевтическим агентом способствует регрессии заболевания, что подтверждается уменьшением тяжести симптомов заболевания, увеличением частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания, или предотвращением нарушения или инвалидности вследствие поражения заболеванием. "Профилактически эффективное количество" или "профилактически эффективная дозировка" лекарственного средства представляет собой количество лекарственного средства, которое при отдельном введении или в комбинации с другим терапевтическим агентом субъекту, имеющему риск развития заболевания или риск рецидива заболевания, предотвращает развитие или рецидив заболевания. Способность терапевтического агента способствовать регрессии заболевания или профилактического агента предупреждать развитие или рецидив заболевания может быть оценена с использованием ряда способов, известных практикующему специалисту в данной области, например, у субъектов-людей во время клинических испытаний, на модельных животных системах прогнозирования эффективности у людей или по оценке активности агента в *in vitro* анализах.

Введение эффективных количеств взятого в отдельности анти-ICOS антитела или анти-ICOS антитела в комбинации с анти-PD-1 антителом, в комбинации с анти-PD-L1 антителом или в комбинации с анти-CTLA-4 антителом, в соответствии с любым из способов, представленных в настоящем документе, может обеспечить по меньшей мере один терапевтический эффект, включая, например, уменьшение роста или размера опухоли, уменьшение числа метастатических поражений, появляющихся со временем, полную ремиссию, частичную ремиссию или стабильное заболевание. Например, способы лечения обеспечивают более высокий процент пациентов с улучшением клинических показателей (clinical benefit rate) ($CBR = \text{полная ремиссия (CR)} + \text{частичная ремиссия (PR)} + \text{стабильное течение болезни (SD)} \geq 6 \text{ месяцев}$) по сравнению с таковым, который был достигнут без введения анти-ICOS антитела, или по сравнению с таковым, который был достигнут при введении любого из комбинированных антител, например, повышение процента пациентов с улучшением клинических показателей составляет около 20, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80% или более.

В качестве примера противораковый агент представляет собой лекарственное средство, которое замедляет прогрессирование рака или способствует регрессии рака у субъекта. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессии рака до точки ликвидации рака. "Способствует регрессии рака" означает, что введение эффективного количества лекарственного средства, взятого в отдельности или в комбинации с противоопухолевым агентом, приводит к уменьшению роста или размера опухоли, некрозу опухоли, уменьшению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, увеличению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания, предотвращению нарушения или инвалидности вследствие поражения заболеванием или иному ослаблению симптомов заболевания у пациента. "Фармакологическая эффективность"

(Pharmacological effectiveness)", "эффективность (effectiveness)" (препарата в условиях, приближенных к реальным) или "эффективность (efficacy)" (препарата в "идеальных" условиях) относится к способности лекарственного средства способствовать регрессии рака у пациента. "Физиологическая безопасность" относится к приемлемо низкому уровню токсичности или других нежелательных физиологических явлений на клеточном уровне, на уровне органа и/или организма (нежелательные явления) в результате введения лекарственного средства.

В качестве примера, для лечения опухолей терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства ингибирует рост клеток опухоли по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80% по сравнению с субъектами, не получавшими лечение, или по меньшей мере на около 90%. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства полностью ингибирует рост клеток или рост опухоли, т.е. ингибирует рост клеток или рост опухоли на 100%. Способность соединения, включая антитело, ингибировать рост опухоли можно оценить с использованием анализов, описанных в настоящем документе. Альтернативно, это свойство композиции может быть оценено путем изучения способности соединения ингибировать рост клеток; такое ингибирование может быть измерено *in vitro* с помощью анализов, известных специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления ингибирование роста опухоли может не происходить немедленно после лечения, а может возникать только через некоторый период времени или после повторного введения. В других вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, регрессия опухоли наблюдается и продолжается в течение по меньшей мере около 20 дней, по меньшей мере около 30 дней, по меньшей мере около 40 дней, по меньшей мере около 50 дней или по меньшей мере около 60 дней, или дольше.

Используемые в настоящем документе термины "фиксированная доза", "постоянная доза" и "постоянная-фиксированная доза" используются взаимозаменяемо и относятся к дозе, которую вводят пациенту независимо от веса или площади поверхности тела пациента. Таким образом, фиксированная или постоянная доза не представлена в виде дозы в мг/кг, а скорее в виде абсолютного количества терапевтического агента.

Используемый в настоящем документе термин "основанная на массе" доза или дозирование означает, что доза, вводимая пациенту, рассчитана на основании веса пациента. Например, когда для пациента весом 60 кг требуется 3 мг/кг анти-ICOS антитела, можно рассчитать и применять для введения соответствующее количество анти-ICOS антитела (т.е. 180 мг).

Термин "пациент" включает человека и других субъектов-млекопитающих, которые получают терапевтическое или профилактическое лечение.

Термин "субъект" относится к любому человеку или животному, отличному от человека. Например, способы и композиции, раскрытые в настоящем документе, можно применять для лечения субъекта, имеющего рак. Животное, отличное от человека, включает всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, включая отличных от человека приматов, овец, собак, коров, кур, земноводных, пресмыкающихся и др. В одном варианте осуществления субъектом является субъект-человек.

Используемый в настоящем документе термин "а" или "an" перед объектом относится к одному или нескольким таким объектам, если не указано иное; например, под "нуклеотидной последовательностью" подразумевается одна или несколько нуклеотидных последовательностей. Фактически, термины "а" или "an", "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо.

Как используется в настоящем документе, "и/или" следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин "и/или", используемый в выражении, таком как "А и/или В", включает "А и В", "А или В", только "А" и только "В". Аналогичным образом, термин "и/или", используемый в выражении, таком как "А, В и/или С", охватывает каждый из следующего: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; и А и В; В и С; только А; только В; и только С.

Следует понимать, что во всех случаях, если аспекты описаны в настоящем документе с помощью языка "содержащие", также обеспечены иные аналогичные аспекты, описанные в терминах "состоящие из" и/или "состоящие по существу из".

Единицы измерения, префиксы и символы обозначены в форме, принятой в Международной системе единиц (Système International de Unites, SI). Числовые диапазоны включают в себя числа, определяющие этот диапазон. Если не указано иное, нуклеотидные последовательности записаны слева направо в направлении от 5' к 3'. Аминокислотные последовательности записаны слева направо в направлении от аминоконца к карбоксиконцу.

Используемый в настоящем документе термин "примерно" означает приблизительно, порядка, ориентировочно или около. Когда термин "примерно" используется в сочетании с численным диапазоном, он модифицирует этот диапазон путем расширения его границ выше и ниже указанных численных значений. Как правило, термин "примерно" может изменять численное значение выше и ниже указанного значения с колебанием, например, 10%, вверх или вниз (выше или ниже).

Заголовки, представленные в настоящем документе, не являются ограничениями различных аспектов изобретения, которые могут существовать, исходя из описания в целом. Таким образом, термины, определенные непосредственно ниже, более подробно определены, исходя из описания в целом. Различные аспекты, описанные в настоящем документе, описаны более подробно в следующих подразделах.

I. Анти-ICOS антитела

Настоящее изобретение в некоторых вариантах осуществления раскрывает антитела, такие как полностью человеческие антитела, с желаемыми функциями или свойствами. В настоящем документе описаны агонистические антитела против человеческого ICOS (анти-huICOS), обладающие желаемыми свойствами для применения в качестве терапевтических агентов при лечении заболеваний, таких как рак. Данные свойства включают одно или более из способности связываться с человеческим ICOS с высокой аффинностью, приемлемо низкой иммуногенности у субъектов-людей, способности связываться преимущественно с Fc γ RIIb (специфическим типом Fc-рецептора IgG) и отсутствия нежелательных особенностей в последовательности, которые могли бы снизить химическую стабильность антитела. Антитела согласно изобретению являются также полезными, например, для диагностики рака и других нарушений, связанных с экспрессией и/или активностью ICOS.

Анти-ICOS антитела, раскрытые в настоящем документе в виде аминокислотной последовательности, связываются со специфическими эпитопами на человеческом ICOS, как описано в примерах.

Анти-huICOS антитела, обладающие конкретными функциональными свойствами

Антитела согласно изобретению характеризуются конкретными функциональными особенностями или свойствами. Например, антитела специфически связываются с человеческим ICOS с высокой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления антитела специфически связываются с сайтом на ICOS, с которым связывается ICOS-L. Связывание с человеческим ICOS может быть оценено с использованием одной или нескольких методик, хорошо известных в данной области. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело может быть подвергнуто тестированию с помощью анализа методом проточной цитометрии, в котором антитело взаимодействует с клеточной линией, экспрессирующей человеческий ICOS, например, клетками CHO, трансфицированными для экспрессии человеческого ICOS на своей клеточной поверхности. Дополнительно или альтернативно, связывание антитела, включая кинетику связывания (например, значение K_D) может быть протестировано в анализах связывания ViaSage. Еще другие подходящие анализы связывания включают анализы ELISA с использованием, например, рекомбинантного человеческого белка ICOS.

В одном варианте осуществления антитело согласно изобретению или его антигенсвязывающая часть связывается с белком ICOS со значением K_D , равным 5×10^{-8} М или менее, связывается с белком ICOS со значением K_D , равным 2×10^{-8} М или менее, связывается с белком ICOS со значением K_D , равным 5×10^{-9} М или менее, связывается с белком ICOS со значением K_D , равным 4×10^{-9} М или менее, связывается с белком ICOS со значением K_D , равным 3×10^{-9} М или менее, связывается с белком ICOS со значением K_D , равным 2×10^{-9} М или менее, связывается с белком ICOS со значением K_D , равным 1×10^{-9} М или менее, связывается с белком ICOS со значением K_D , равным 5×10^{-10} М или менее, или связывается с белком ICOS со значением K_D , равным 1×10^{-10} М или менее.

В другом варианте осуществления антитело связывается с одним или несколькими остатками SIFDPPPFKVTI (SEQ ID NO: 203) человеческого ICOS. В другом варианте осуществления антитело связывается с эпитопом, который содержит аминокислотные остатки SIFDPPPFKVTI (SEQ ID NO: 203) человеческого ICOS. В другом варианте осуществления антигенсвязывающая часть антитела связывается с эпитопом, который содержит аминокислотные остатки SIFDPPPFKVTI (SEQ ID NO: 203) человеческого ICOS.

В другом варианте осуществления антитело связывается с человеческим ICOS человека и стимулирует иммунный ответ, например, антигенспецифический Т-клеточный ответ. Способность антитела стимулировать иммунный ответ может быть протестирована путем измерения роста опухоли, например, в *in vivo* модели опухолевого трансплантата (см., например, примеры 6, 7, 8 и 9).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с человеческим ICOS и проявляет по меньшей мере одно из следующих свойств:

- связывание с одним или несколькими остатками в пределах SIFDPPPFKVTI (SEQ ID NO: 203) человеческого ICOS;
- связывание с тем же эпитопом на человеческом ICOS, что и антитело ICOS.33, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 или 2644;
- конкурирование за связывание с человеческим ICOS с антителом ICOS.33, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 или 2644;
- уменьшение ADCC активности по сравнению с контрольным антителом IgG1;
- увеличение специфичности связывания с рецептором Fc γ RIIb;
- блокирующее связывание лиганда ICOS (ICOS-L) с человеческим ICOS;
- блокирование взаимодействия человеческого ICOS с ICOS-L человека;
- связывание с ICOS человека, яванского макака, мыши и крысы;

- (i) связывание с активированными Т-клетками человека и яванского макака;
- (j) связывается с человеческими Т-клетками со значением EC50, равным приблизительно 0,7 нМ и Т-клетками яванского макака со значением EC50, равным приблизительно 0,3 нМ;
- (k) отсутствие связывания с человеческим CD28 или человеческим CTLA-4;
- (l) активация по меньшей мере одного первичного Т-лимфоцита, такого как CD4 + Teff-клетка, Tfh-клетка и Treg-клетка;
- (m) индуцирует пролиферацию и выработку интерферона-гамма (IFN- γ) в CD25- CD4+ Т-клетках со значением EC50, равным приблизительно 0,01-0,16 нМ в *in vitro* анализе совместной культуры CHO-ОКТ3-CD32A;
- (n) индукция протеинкиназы В (pAkt) в *in vitro* анализе сигнализации первичных Т-клеток со значением EC50 приблизительно 30 нМ;
- (o) индуцирует выработку IFN- γ в CD25- CD4+ Т-клетках со значением EC50 приблизительно 0,002-0,4 нМ в стафилококковом энтеротоксине В в анализе совместной культуры CD25- CD4+ Т-клеток и В-клеток;
- (p) индукция выработки интерлейкина-10 (IL-10) в ответ на стафилококковый энтеротоксин В в анализе совместной культуры Tfh-клеток и наивных В-клеток;
- (q) индукция большего увеличения пролиферации CD3-стимулированных Teff-клеток по сравнению с CD45RA+ Treg-клетками и CD45RO+ Treg-клетками в анализе *in vitro*;
- (r) увеличение пролиферации Teff-клеток по сравнению с CD45RA+ Treg-клетками (например, когда увеличение пролиферации является более значительным в CD45RA+ Treg-клетках по сравнению с CD45RO+ Treg-клетками);
- (s) уменьшение супрессии Teff Treg-клетками;
- (t) при этом около 10 мкг/мл антитела не увеличивает выработку цитокинов в клеточном анализе цельной крови;
- (u) увеличение секреции по меньшей мере одного из IL-10 и IFN- γ Tfh-клетками *in vitro*; и/или
- (v) стимуляция ICOS-опосредованной сигнализации.

В другом варианте осуществления выделенное антитело представляет собой гуманизированное выделенное антитело (или его антигенсвязывающую часть), которое связывается с человеческим ICOS и блокирует связывание и/или взаимодействие лиганда ICOS (например, ICOS-L человека) с человеческим ICOS, и индуцирует пролиферацию и выработку интерферона-гамма (IFN- γ) в CD25- CD4+ Т-клетках со значением EC50 около 0,083 нМ в анализе *in vitro* совместной культуры CHO-ОКТ3-CD32A. В другом варианте осуществления выделенное антитело представляет собой гуманизированное выделенное антитело (или его антигенсвязывающую часть), которое связывается с человеческим ICOS и блокирует связывание и/или взаимодействие лиганда ICOS (например, ICOS-L человека) с человеческим ICOS и индуцирует пролиферацию и выработку интерферона-гамма (IFN- γ) в CD25- CD4+ Т-клетках со значением EC50 около 0,01-0,1 нМ в анализе *in vitro* совместной культуры CHO-ОКТ3-CD32A.

В одном аспекте выделенное антитело представляет собой гуманизированное выделенное антитело (или его антигенсвязывающую часть), которое связывается с человеческим ICOS и блокирует связывание и/или взаимодействие лиганда ICOS (например, ICOS-L человека) с человеческим ICOS и индуцирует выработку IFN- γ в CD25- CD4+ Т-клетках со значением EC50 около 0,2 нМ в стафилококковом энтеротоксине В в анализе совместной культуры CD25- CD4+ Т-клеток и В-клеток. В другом аспекте выделенное антитело представляет собой гуманизированное выделенное антитело (или его антигенсвязывающую часть), которое связывается с человеческим ICOS и блокирует связывание и/или взаимодействие лиганда ICOS (например, ICOS-L человека) с человеческим ICOS и индуцирует выработку IFN- γ в CD25- CD4+ Т-клетках со значением EC50 около 0,01-0,1 нМ в стафилококковом энтеротоксине В в анализе совместной культуры CD25- CD4+ Т-клеток и В-клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитела согласно изобретению включают гуманизированные и полностью человеческие моноклональные антитела. В других вариантах осуществления антитела представляют собой, например, химерные моноклональные антитела.

Моноклональные антитела ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644

В некоторых вариантах осуществления антитела согласно изобретению представляют собой гуманизированные и человеческие моноклональные антитела ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644, которые выделяют и структурно характеризуют, как описано в следующих примерах. Аминокислотные последовательности V_H ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644, и аминокислотные последовательности V_L ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644 приведены в табл. 35.

С учетом того, что каждое из этих антител может связываться с человеческим ICOS, последовательности V_H и V_L могут быть смешаны и подобраны в пары "mixed and matched", чтобы создать другие анти-huICOS связывающие молекулы согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления, когда цепи V_H и V_L смешаны и подобраны в пары, последовательность V_H из конкретной пары V_H/V_L заменяется схожей по структуре последовательностью V_H. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления последовательность V_L в конкретной паре V_H/V_L заменяется схожей по структуре последователь-

ностью V_L.

Соответственно, в одном аспекте данное раскрытие обеспечивает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее:

(a) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, 16, 24, 32, 40 или 186; и

(b) варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6, 17, 25, 33, 41, 48 или 189;

при этом антитело специфически связывается с человеческим ICOS. В некоторых вариантах осуществления комбинации варибельных областей тяжелой и легкой цепей включают:

(a) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

(b) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17;

(c) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;

(d) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;

(e) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41;

(f) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; или

(g) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189.

В другом аспекте данное раскрытие обеспечивает антитела, которые содержат CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644 или их комбинации. Аминокислотные последовательности CDR1 V_H антител ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644 показаны в SEQ ID NO: 9,

18, 26, 34, 42 и 191, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR2 V_H антител ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644 показаны в SEQ ID NO: 10,

19, 27, 35, 43 и 192, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR3 V_H антител ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644 показаны в SEQ ID NO: 11,

20, 28, 36, 44 и 193, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1 V_L антител ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644 показаны в SEQ ID NO: 12,

21, 29, 37, 49 и 194, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR2 V_L антител ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644 показаны в SEQ ID NO: 14,

22, 30, 38, 50 и 195, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR3 V_L антител ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644 показаны в SEQ ID NO: 15,

23, 31, 39, 51 и 196, соответственно. Области CDR выделены с применением системы Kabat (Kabat et al., 1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

С учетом того, что каждое из этих антител может связываться с человеческим ICOS, и что антигенсвязывающая специфичность обеспечивается в основном областями CDR1, CDR2 и CDR3, последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_L могут быть смешаны и подобраны в пары "mixed and matched", (т.е. CDR из разных антител могут быть смешаны и подобраны в пары, хотя каждое антитело должно содержать CDR1, CDR2 и CDR3 V_H, и CDR1, CDR2 и CDR3 V_L) для создания других анти-huICOS связывающих молекул согласно изобретению. Связывание с ICOS таких "mixed and matched" антител может быть протестировано с использованием анализов связывания, описанных в настоящем документе, в том числе в примерах (например, анализы ELISA, Biacore®). В некоторых вариантах осуществления, когда последовательности CDR V_H смешаны и подобраны в пары, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности V_H заменяется схожей по структуре последовательностью(ями) CDR. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления, когда последовательности CDR V_L смешаны и подобраны в пары, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности V_L предпочтительно заменяется схожей по структуре последовательностью(ями) CDR. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что новые последовательности V_H и V_L могут быть созданы путем замещения одной или нескольких последовательностей

областей CDR V_H и/или V_L схожими по структуре последовательностями из последовательностей CDR, раскрытых в настоящем документе для моноклональных антител ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644.

Соответственно в другом аспекте данное раскрытие обеспечивает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9, 18, 26, 34, 42 или 191;

(b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10, 19, 27, 35, 43 или 192;

(c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, 20, 28, 36, 44 или 193;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12, 21, 29, 37, 49 или 194;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14, 22, 30, 38, 50 или 195; и

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15, 23, 31, 39, 51 или 196;

при этом антитело специфически связывается с человеческим ICOS. В одном варианте осуществления антитело содержит:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9;

(b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 10;

(c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 11;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 12;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 14; и

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15.

В другом варианте осуществления антитело содержит:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18;

(b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19;

(c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 22; и

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 23.

В другом варианте осуществления антитело содержит:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 26;

(b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27;

(c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 28;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 29;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 30; и

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 31.

В другом варианте осуществления антитело содержит:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 34;

(b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 35;

(c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 36;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38; и

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39.

В другом варианте осуществления антитело содержит:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 42;

(b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 43;

(c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 44;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 49;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 50; и

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 51.

В другом варианте осуществления антитело содержит:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 191;

(b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 192;

(c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 193;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 194;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 195; и

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 196.

Хорошо известно в уровне техники, что домен CDR3 независимо от домена(ов) CDR1 и/или CDR2, взятый в отдельности, может определять специфичность связывания антитела в отношении распознано-

го антигена, и что может быть предсказуемым образом генерировано множество антител, обладающих такой же специфичностью связывания на основе общей последовательности CDR3 (См., например, Klimka et al., British J. of Cancer 83(2):252-260 (2000)). Соответственно, настоящее раскрытие обеспечивает моноклональные антитела, содержащие один или несколько доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи антитела, происходящего от человека или животного, отличного от человека, при этом моноклональное антитело способно специфически связываться с человеческим ICOS. В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает моноклональные антитела, содержащие один или несколько доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи нечеловеческого антитела, такого как антитело мыши или крысы, при этом моноклональное антитело способно специфически связываться с человеческим ICOS. В некоторых вариантах осуществления такие антитела согласно изобретению, содержащие один или несколько доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи нечеловеческого антитела, (a) способны конкурировать за связывание с соответствующим исходным нечеловеческим антителом; (b) сохраняют функциональные характеристики соответствующего исходного нечеловеческого антитела; (c) связываются с тем же эпитопом, что и соответствующее исходное нечеловеческое антитело; и/или (d) обладают аффинностью связывания, аналогичную таковой соответствующего исходного нечеловеческого антитела.

В других аспектах настоящее раскрытие обеспечивает моноклональные антитела, содержащие один или несколько доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи человеческого антитела, такого как, например, человеческое антитело, полученное от животного, отличного от человека, при этом человеческое антитело способно специфически связываться с человеческим ICOS. В других аспектах настоящее раскрытие обеспечивает моноклональные антитела, содержащие один или несколько доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи первого человеческого антитела, такого как, например, человеческое антитело, полученное от животного, отличного от человека, при этом первое человеческое антитело способно специфически связываться с человеческим ICOS и при этом домен CDR3 из первого человеческого антитела заменяет домен CDR3 в человеческом антителе, лишенном специфичности связывания в отношении ICOS, с образованием второго человеческого антитела, способного специфически связываться с человеческим ICOS. В некоторых вариантах осуществления такие изобретательские антитела, содержащие один или более доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи первого человеческого антитела, (a) способны конкурировать за связывание с соответствующим исходным нечеловеческим антителом; (b) сохраняют функциональные характеристики соответствующего исходного нечеловеческого антитела; (c) связываются с тем же эпитопом, что и соответствующее исходное нечеловеческое антитело; и/или (d) имеют аффинность связывания, аналогичную таковой соответствующего исходного нечеловеческого антитела.

Настоящее изобретение обеспечивает также анти-huICOS антитела, содержащие новые последовательности варибельного домена, раскрытые в настоящем документе, и константные домены с модифицированными Fc-областями, имеющими повышенную аффинность к Fc γ RIIb по сравнению с их аффинностью к другим Fc-рецепторам. В некоторых вариантах осуществления такие агонистические анти-huICOS антитела с повышенной Fc γ RIIb-специфичностью проявляют превосходную эффективность (efficacy) в лечении рака. В других вариантах осуществления такие агонистические анти-huICOS антитела с повышенной Fc γ RIIb-специфичностью проявляют превосходную эффективность (efficacy) в лечении различных нарушений, например, рака. Без намерения ограничиваться механистической теорией, такие Fc γ RIIb-специфические агонистические анти-ICOS моноклональные антитела могут проявлять повышенные адьювантные эффекты путем увеличения созревания дендритной клетки, таким образом, стимулируя размножение и активацию цитотоксических CD8⁺ Т-клеток, что приводит к усиленному противоопухолевому ответу. Без намерения ограничиваться какой-либо теорией, FcR-опосредованное усиление сигнала агонистических антител против ICOS, обусловленное повышенной кластеризацией рецептора или "перекрестным связыванием" в соответствии с настоящим изобретением может являться основным фактором, влияющим на терапевтическую эффективность. Перекрестное связывание агонистических антител против ICOS путем связывания FcR Fc-частью антитела может повысить интенсивность сигнала и тем самым усилить активацию клеток.

Относительная аффинность связывания антител для активирующих (A) против ингибирующих (I) Fc-рецепторов может быть выражена в виде отношения "A/I" и, как правило, зависит от структуры Fc-области антитела IgG. См. WO 2012/087928. Антитела, обладающие повышенной специфичностью в отношении связывания с ингибирующим рецептором Fc γ RIIb, имеют более низкие значения отношения A/I. В некоторых вариантах осуществления агонистические анти-huICOS антитела, описанные в настоящем документе, имеют отношения A/I менее чем 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,3, 0,1, 0,05, 0,03 или 0,01.

Примеры константных доменов человеческого IgG1, содержащих мутации для повышения специфичности Fc γ RIIb, описаны в настоящем документе, а также представлены в перечне последовательностей. Варианты последовательностей определены со ссылкой на последовательность константной области человеческого IgG1f, представленную в SEQ ID NO: 52 и показанную на фиг. 2. Номенклатура, касающаяся положений (нумерации) мутаций в Fc-области соответствует индексу EU, как в Kabat et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., что облегчает сравнение последовательностей Fc в эквивалентных положениях в

антителах с различной длиной переменных доменов. См. также Edelman et al. (1969) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 63:78; WO 2012/130831 (с использованием той же системы нумерации). В табл. 3 представлены сводные данные по вариантам последовательностей Fc, из которых специалист в данной области сможет легко распознавать соответствующие положения в последовательностях антител, раскрытых в настоящем документе. Варианты SE и SELF описаны у Chu et al. (2008) Mol. Immunol. 45:3926. Варианты P238D, V4, V7, V8, V9, V11 и V12 описаны в работе Mimoto et al. (2013) Protein Engineering Design & Selection 26:589 (например, в табл. 1 в этом документе).

Таблица 3. Варианты последовательностей Fc

Обозначение	SEQ ID:	Варианты последовательностей								
IgG1f	52									
SE	53				S267E					
SELF	54				S267E			L328F		
P238D	55			P238D						
V4	56			P238D			P271G			
V4 - D270E	57			P238D			P271G			D270E
V7	58	E233D		P238D			P271G		A330R	
V8	59		G237D	P238D		H268D	P271G			
V9	60		G237D	P238D			P271G		A330R	
V9 - D270E	61		G237D	P238D			P271G		A330R	D270E
V11	62		G237D	P238D		H268D	P271G		A330R	
V12	63	E233D	G237D	P238D		H268D	P271G		A330R	

Дополнительные варианты последовательностей Fc с увеличенной аффинностью к Fc γ RIIIb раскрыты у Yu et al. (2013) J. Am. Chem. Soc. 135:9723 (и WO 2014/184545), включая V262E и V264E, например, для использования в комбинации с S267E и L328F

Антитела с консервативными модификациями

В некоторых вариантах осуществления антитело согласно изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, при этом одна или несколько из этих последовательностей CDR содержат указанные аминокислотные последовательности на основе антител, описанных в настоящем документе (например, ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644), или их консервативные модификации, и при этом антитела сохраняют требуемые функциональные свойства анти-huICOS антител согласно изобретению. В данной области специалисту понятно, что могут быть сделаны определенные консервативные модификации последовательностей, которые не нарушают связывание антигена. (См., например, Brummell et al. (1993) Biochem 32:1180-8). Таким образом, данное раскрытие обеспечивает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где:

(а) переменная область тяжелой цепи, содержащая последовательность CDR3, содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 11, 20, 28, 36, 44 или 193, или их консервативных модификаций;

(б) переменная область легкой цепи, содержащая последовательность CDR3, содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 15, 23, 31, 39, 51 или 196, или их консервативных модификаций; и

(с) антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связывается с человеческим ICOS.

Дополнительно или альтернативно, антитело может обладать одним или несколькими функциональными свойствами, описанными в настоящем документе, такими как высокоаффинное связывание с человеческим ICOS и/или способность стимулировать антигенспецифические ответы Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи, содержащая последовательность CDR2, содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 10, 19, 27, 35, 43 или 192, или их консервативных модификаций; и переменная область легкой цепи, содержащая последовательность CDR2, содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 14, 22, 30, 38, 50 или 195, или их консервативных модификаций. В другом варианте осуществления переменная область тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, содержащую последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 9, 18, 26, 34, 42 или 191, или их консервативных модификаций; и переменная область легкой цепи, содержащая последовательность CDR1, содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 12, 21, 29, 37, 49 или 194, или их консервативных модификаций.

В различных вариантах осуществления антитело может представлять собой, например, человеческие антитела, гуманизированные антитела или химерные антитела.

Антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и анти-huICOS антитела

В другом варианте осуществления данное раскрытие обеспечивает антитела, которые связываются с тем же эпитопом на человеческом ICOS, что и любое из анти-huICOS моноклональных антител согласно изобретению (т.е., антител, которые обладают способностью перекрестно конкурировать за связывание с человеческим ICOS с любым из моноклональных антител согласно изобретению). В некоторых вариантах осуществления в качестве эталонного антитела для исследований перекрестного конкурентного связывания используют моноклональные антитела ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644.

Такие перекрестно конкурирующие антитела могут быть идентифицированы на основании их способности перекрестно конкурировать с ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и/или 2644 в стандартных анализах связывания с человеческим ICOS. Например, можно использовать стандартные методы анализа ELISA, в которых рекомбинантный человеческий белок ICOS иммобилизуют на планшете, одно из антител метят флуоресцентной меткой и оценивают способность немеченых антител конкурировать за связывание с меченым антителом. Дополнительно или альтернативно, для оценки способности антител перекрестно конкурировать можно использовать анализ Biacore. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание, например, ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и/или 2644 с человеческим ICOS показывает, что тестируемое антитело может конкурировать с ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и/или 2644 за связывание с человеческим ICOS и, следовательно, связывается с тем же эпитопом на человеческом ICOS, что и ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и/или 2644. В одном варианте осуществления антитело, которое связывается с тем же эпитопом на человеческом ICOS, что и ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и/или 2644, является гуманизированным или человеческим моноклональным антителом.

Как обсуждается далее в примере 16, связывание ICOS.33 IgG1f S267E, 3E8 и 9D5 с человеческим ICOS картировано в остатках 112-123 ICOS (SEQ ID NO: 1) или аминокислотной последовательности SIFDPPPFKVTЛ (SEQ ID NO: 203). Соответственно в одном варианте осуществления изобретение обеспечивает анти-huICOS антитело, которое связывается с одним или несколькими остатками SIFDPPPFKVTЛ (SEQ ID NO: 203) человеческого ICOS, например, как определено с помощью HDX-MS. В другом варианте осуществления анти-huICOS антитело связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки SIFDPPPFKVTЛ (SEQ ID NO: 203) человеческого ICOS.

Такие гуманизированные или человеческие моноклональные антитела могут быть получены и выделены, как описано в настоящем документе. Например, анти-huICOS антитела, которые связываются с теми же или сходными эпитопами с антителами, раскрытыми в настоящем документе, могут быть получены с использованием протоколов иммунизации, например, описанных в настоящем документе. Полученные антитела могут быть подвергнуты скринингу на высокоаффинное связывание с человеческим ICOS. Затем отобранные антитела могут быть изучены, например, в анализе дрожжевого дисплея, в котором варианты последовательности huICOS представлены на поверхности дрожжевых клеток, или с помощью экспериментов по водородно-дейтериевому обмену для точного определения эпитопа, связанного антителом.

Определения эпитопов могут быть сделаны любым способом, известным в данной области. В некоторых вариантах осуществления анти-huICOS антитела считаются связывающимися с тем же эпитопом, что и описанное в настоящем документе анти-huICOS mAb, если они контактируют с одним или несколькими одинаковыми остатками в пределах по меньшей мере одной области huICOS; если они контактируют с большинством остатков в пределах по меньшей мере одной области huICOS; если они контактируют с большинством остатков в пределах каждой области huICOS; если они контактируют с большинством остатков по всей длине huICOS; если они контактируют во всех из одних и тех же различных областей человеческого ICOS; если они контактируют со всеми остатками в какой-либо одной области на человеческом ICOS; или если они контактируют со всеми одними и теми же остатками во всех из одних и тех же областей. Эпитопные "области" представляют собой кластеры остатков вдоль, но не обязательно непосредственно рядом в пределах первичной последовательности.

Способы определения антител, которые связываются с "тем же эпитопом на huICOS", что и описанные в настоящем документе антитела, включают рентгеновский анализ кристаллов комплексов антиген:антитело, который обеспечивает атомное разрешение эпитопа. Другие способы контролируют связывание антитела с фрагментами антигена или мутированными вариантами антигена, где потеря связывания в связи с модификацией аминокислот в последовательности антигена считается указанием на компонент эпитопа. Способы также могут основываться на способности представляющего интерес антитела к аффинному выделению специфических коротких пептидов (как в нативной трехмерной форме, так и в денатурированной форме) из комбинаторных пептидных библиотек в формате фагового дисплея или в результате расщепления протеазой белка-мишени. Затем пептиды рассматриваются как лидирующие для определения эпитопа, соответствующего антителу, используемому для скрининга библиотеки пептидов. Для картирования эпитопов также были разработаны вычислительные алгоритмы, которые, как было показано, отображают конформационные прерывистые эпитопы.

Эпитоп или область, содержащая эпитоп, могут быть также идентифицированы путем скрининга на связывание с сериями перекрывающихся пептидов, охватывающих ICOS. Альтернативно, можно использовать способ по Jespers et al. (1994) *Biotechnology* 12:899 в качестве руководства для выбора антител, имеющих один и тот же эпитоп и, следовательно, свойства, аналогичные со свойствами анти-ICOS антител, описанных в настоящем документе. При проведении способа фагового дисплея сначала тяжелая цепь анти-ICOS антитела образует пару с репертуаром (например, человеческих) легких цепей для выбора ICOS-связывающего антитела, а затем новая легкая цепь образует пару с репертуаром (например, человеческих) тяжелых цепей для выбора (например, человеческого) ICOS-связывающего антитела, имеющего тот же эпитоп или эпитопную область, что и анти-huICOS антитело, описанное в настоящем до-

кументе. Альтернативно, варианты антитела, описанные в настоящем документе, могут быть получены путем мутагенеза последовательностей кДНК, кодирующих тяжелую и легкую цепи антитела.

Также, может быть использован аланин-сканирующий мутагенез, описанный Cunningham & Wells (1989) *Science* 244: 1081, или какая-либо другая форма точечного мутагенеза аминокислотных остатков в ICOS (например, способ дрожжевого дисплея, представленный в примере 16) для определения функционального эпитопа для анти-ICOS антитела.

Эпитоп или эпитопная область ("эпитопная область" представляет собой область, содержащую эпитоп или перекрытие с эпитопом), связываемый специфическим антителом, также может быть определен путем оценки связывания антитела с пептидами, содержащими фрагменты ICOS. Серии перекрывающихся пептидов, охватывающих последовательность ICOS (например, человеческого ICOS), могут быть синтезированы и подвергнуты скринингу на связывание, например, в прямом ELISA, конкурентном ELISA (где пептид оценивают по его способности предотвращать связывание антитела с ICOS, связанным с поверхностью лунки планшета для микротитрования) или на чипе. Такие способы скрининга пептидов могут быть не способны обнаруживать некоторые прерывистые функциональные эпитопы, т.е. функциональные эпитопы, которые вовлекают аминокислотные остатки, которые не располагаются последовательно вдоль первичной последовательности полипептидной цепи ICOS.

Эпитоп может быть также идентифицирован с помощью основанного на масс-спектрометрии футпринтинга белков, например, масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS) и быстром фотохимическом окислении белков (FPOP). HDX-MS можно проводить, например, как дополнительно описано в работе Wei et al. (2014) *Drug Discovery Today* 19:95, способы из которой специально включены в настоящий документ посредством ссылки. FPOP можно проводить, как описано, например, в работе Hambley & Gross (2005) *J. American Soc. Mass Spectrometry* 16:2057, способы из которой специально включены в настоящий документ посредством ссылки.

Эпитоп, связываемый анти-ICOS антителами, может быть также определен с помощью структурных способов, таких как определение кристаллической структуры при помощи рентгеновского излучения (например, WO 2005/044853), молекулярное моделирование и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), включая определение посредством ЯМР скорости обмена H-D лабильных амидных атомов водорода в ICOS, когда они свободны и связаны в комплексе с представляющим интерес антителом (Zinn-Justin et al. (1992) *Biochemistry* 31:11335; Zinn-Justin et al. (1993) *Biochemistry* 32:6884).

Если не указано иное, и со ссылкой на формулу изобретения, эпитоп, связанный антителом, представляет собой эпитоп, определенный с помощью способов HDX-MS. Анти-huICOS антитела, полученные из хомячьих антител В настоящем документе описаны примеры химерных и гуманизированных антител, которые содержат CDR и/или переменные области тяжелых и/или легких цепей антител, которые были получены из хомячьих последовательностей. Химерные или гуманизированные антитела, описанные в настоящем документе, могут быть получены на основе последовательности моноклонального антитела, например, мыши или хомяка, полученного различными способами, известными в данной области. ДНК, кодирующая тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов, может быть получена из представляющей интерес гибридомы и сконструирована стандартными способами молекулярной биологии таким образом, чтобы содержать последовательности человеческого иммуноглобулина. Например, для создания химерного антитела переменные области, например, мышинового или хомячьего антитела, могут быть связаны с человеческими константными областями с использованием способов, известных в данной области (см. например, патент США 4816567, выданный Cabilly et al.). Для создания гуманизированного антитела области CDR могут быть встроены в человеческую каркасную область с использованием способов, известных в данной области (см. например, патент США 5225539, выданный Winter, и патенты США 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные Queen Et al.).

Анти-ICOS антитела, которые связываются с высокой аффинностью

В некоторых вариантах осуществления анти-huICOS антитела согласно настоящему изобретению связываются с huICOS с высокой аффинностью, подобно анти-huICOS антителам, раскрытым в настоящем документе, делая их эффективными терапевтическими агентами. В различных вариантах осуществления анти-huICOS антитела согласно настоящему изобретению связываются с huICOS с K_D менее чем 10, 5, 2, 1 нМ, 300 или 100 пМ. В других вариантах осуществления анти-huICOS антитела согласно настоящему изобретению связываются с huICOS с K_D в диапазоне от 2 нМ до 100 пМ. Стандартные анализы для оценки связывающей способности антител в отношении huICOS включают ELISA, RIA, Вестерн-блотты, интерферометрию биослоев (BLI) и анализы BIACORE® SPR (см. пример 10).

Варианты последовательностей анти-ICOS антител

Варианты последовательностей анти-ICOS антител, раскрытые в настоящем документе, сохраняют желательные функциональные свойства, раскрытые в настоящем документе. Области CDR описаны с использованием системы Kabat (Kabat, et al., 1991). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение, кроме того, обеспечивает человеческие или гуманизированные анти-huICOS антитела, содержащие последовательности CDR, которые являются по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90 или 95%, 96, 97, 98 или 99% идентичными последовательностям CDR антител, описанных в настоящем документе. Настоящее изобретение также обеспечивает анти-huICOS антитела, содержащие последовательности

вариабельных доменов тяжелых и/или легких цепей, которые являются по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, или на 99% идентичными последовательностям вариабельных доменов тяжелых и/или легких цепей антител, раскрытых в настоящем документе, а также анти-huICOS антител, содержащих полноразмерные последовательности тяжелых и/или легких цепей, которые являются по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными последовательностям тяжелых и/или легких цепей антител, раскрытых в настоящем документе.

II. Сконструированные и модифицированные антитела

Области V_H и V_L

Также обеспечены сконструированные и модифицированные антитела, которые могут быть получены с использованием антитела, имеющего одну или несколько последовательностей V_H и/или V_L , раскрытых в настоящем документе, в качестве исходного материала для конструирования модифицированного антитела, которое может иметь измененные свойства от исходного антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, конструировали путем модификации одного или нескольких остатков в одной или обеих вариабельных областях (т.е., V_H и/или V_L), например, в одной или нескольких областях CDR и/или в одной или нескольких каркасных областях. Дополнительно или альтернативно, антитело, описанное в настоящем документе, сконструировано путем модификации остатков в константной области(ях), например, для изменения эффекторной функции(й) антитела.

В одном варианте осуществления конструирование вариабельной области включает прививку CDR. Такая прививка, в частности, используется для гуманизации нечеловеческих анти-ICOS антител, например, анти-huICOS антител, которые конкурируют за связывание с анти-huICOS антителами, раскрытыми в настоящем документе, и/или связываются с тем же эпитопом, что и выбранные анти-huICOS антитела, раскрытые в настоящем документе. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно через аминокислотные остатки, которые расположены в CDR тяжелой и легкой цепей. CDR являются гипервариабельными в последовательности и/или образуют структурно определенные петли ("гипервариабельные петли"). Экспрессирующие векторы могут быть сконструированы таким образом, что они включают последовательности CDR из специфического эталонного (также называемого "родительским") антитела, привитого на каркасные последовательности из другого антитела (см., например, Riechmann L. et al. (1998) *Nature* 332:323-327; Jones P. et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Queen C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; патент США 5225539, выданный Winter, и патенты США 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные Queen et al.). В некоторых случаях полученное в результате рекомбинантное антитело обладает свойствами, которые являются сходными с родительским антителом. Затем сконструированное антитело может быть дополнительно модифицировано для наделения свойствами, отличными от родительского антитела. В других случаях прививка родительских последовательностей CDR на каркасную область аннулирует некоторые характеристики родительского антитела таким образом, что рекомбинантное антитело больше не обладает этими характеристиками. Одной иллюстративной характеристикой является аффинность связывания в отношении антигена. В таких случаях может быть предпочтительной дополнительная модификация сконструированного антитела для восстановления желаемых характеристик родительского антитела.

Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных ссылочных материалов, которые включают последовательности генов антител зародышевой линии. Например, ДНК-последовательности зародышевой линии для генов вариабельной области тяжелой и легкой цепей человека можно найти в базе данных последовательностей зародышевой линии человека "VBase", а также в Kabat E. A., et al., 1991; Tomlinson I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; и Cox J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage," *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; содержание каждого из этих материалов специально включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления каркасные последовательности для использования в антителах, описанных в настоящем документе, представляют собой такие последовательности, которые являются структурно сходными с каркасными последовательностями, используемыми антителами, описанными в настоящем документе. Последовательности CDR1, 2 и 3 V_H и последовательности CDR1, 2 и 3 V_L могут быть привиты на каркасные области, которые имеют последовательность, идентичную последовательности, обнаруженной в гене иммуноглобулина зародышевой линии, из которого получена каркасная последовательность, или последовательности CDR могут быть привиты на каркасные области, которые содержат до 20 аминокислотных замен, включая консервативные аминокислотные замены, по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было обнаружено, что в некоторых случаях предпочтительно осуществлять мутации остатков в каркасных областях для сохранения или усиления способности антитела к связыванию с антигеном (см., например, патенты США 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные to Queen et al.).

Сконструированные антитела, описанные в настоящем документе, включают антитела, в которых модификации были произведены в каркасных остатках в V_H и/или V_L , например, для улучшения свойств антитела, таких как уменьшение иммуногенности антитела. Например, одним из подходов является "об-

ратное мутирование" одного или нескольких каркасных остатков в соответствующую последовательность зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое было подвергнуто соматической мутации, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой получено данное антитело. Такие остатки могут быть идентифицированы путем сравнения каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевой линии, из которой получено данное антитело. Для возврата последовательностей каркасной области в их конфигурацию в зародышевой линии, соматические мутации могут быть "обратно мутированы" в последовательность зародышевой линии с помощью, например, сайт-направленного мутагенеза или PCR-опосредованного мутагенеза. Такие антитела, подвергнутые "обратной мутации", также включены в данное раскрытие.

Другой тип модификации каркаса включает мутацию одного или нескольких остатков в каркасной области или даже в одной или нескольких областях CDR для удаления эпитопов Т-клеток, чтобы тем самым уменьшить потенциальную иммуногенность антитела. Такой подход называют также "деиммунизацией", и он описан более подробно в публикации патента США № 20030153043 by Carr et al.

Другим типом модификации варибельной области является мутирование аминокислотных остатков в областях CDR для улучшения одного или нескольких связывающих свойств (например, аффинности) представляющего интерес антитела. Сайт-направленный мутагенез или PCR-опосредованный мутагенез может быть выполнен, чтобы ввести мутацию(и) и воздействовать на связывание антитела или другое представляющее интерес функциональное свойство. Предпочтительно вводят консервативные модификации. Мутации могут представлять собой аминокислотные добавления, делеции или замены. В некоторых вариантах осуществления изменяют не более чем один, два, три, четыре или пять остатков в области CDR.

Остатки метионина в CDR антител могут быть окислены, что приводит к потенциальной химической деградации и последующему снижению активности антитела. Соответственно, в настоящем документе также обеспечены анти-ICOS антитела, которые имеют один или несколько остатков метионина в CDR тяжелой и/или легкой цепи, замененные аминокислотными остатками, которые не подвергаются окислительному разложению. Подобным образом, сайты деамидирования могут быть удалены из анти-ICOS антител, в частности, в CDR. В настоящем документе также обеспечены антитела, в которых сайты потенциального гликозилирования в антигенсвязывающем домене удалены, чтобы предотвратить гликозилирование, которое может препятствовать связыванию антигена. См., например, патент США 5714350.

Маскировка антитела

В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, модифицируют для ограничения их связывания с конкретными клетками и/или тканью. В одном варианте осуществления такие антитела содержат "маску" из блокирующего пептида, которая специфически связывается с антигенсвязывающей поверхностью антитела и препятствует связыванию с антигеном. В некоторых вариантах осуществления маска связана с каждым из связывающих плечей антитела с помощью расщепляемого протеазой линкера. См., например, патент США 8518404, выданный CytoMx. Антитела с расщепляемыми протеазой линкерами могут быть использованы для лечения видов рака, при которых уровни протеазы значительно увеличиваются в микроокружении опухоли по сравнению с неопухолевыми тканями. Селективное расщепление расщепляемого линкера в микроокружении опухоли обеспечивает диссоциацию маскирующего/блокирующего пептида, что позволяет антигену избирательно связываться в опухоли, а не в периферических тканях, в которых связывание антигена может вызвать нежелательные побочные эффекты.

В другом варианте осуществления разработано двухвалентное связывающее соединение ("маскирующий лиганд"), содержащее два антигенсвязывающих домена, которое связывается как с антигенсвязывающими поверхностями (двухвалентного) антитела, так и препятствует связыванию антигена. В одном варианте осуществления маски двух связывающих доменов связаны друг с другом (но не с антителом) при помощи расщепляемого линкера, например, расщепляемого пептидазой. (См., например, WO 2010/077643, Tegerpharm Corp.). Маскирующие лиганды могут содержать или происходить от антигена, с которым предназначено связывание антитела, или могут быть образованы независимо (например, антиидиотипические связывающие фрагменты). Такие маскирующие лиганды можно применять для лечения видов рака, при которых уровни протеазы значительно увеличиваются в микроокружении опухоли по сравнению с неопухолевыми тканями. Селективное расщепление расщепляемого линкера в микроокружении опухоли позволяет диссоциировать двум связывающим доменам друг от друга, уменьшая avidность антигенсвязывающих поверхностей антитела. Результирующая диссоциация маскирующего лиганда от антитела позволяет избирательно связывать антиген в опухоли, а не в периферических тканях, в которых связывание антигена может вызвать нежелательные побочные эффекты.

Fc и модифицированные области Fc

В одном варианте осуществления антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать Fc-области, выбранные на основе биологических активностей антитела. Salfeld (2007) Nat. Biotechnol. 25:1369. Человеческие иммуноглобулины IgG, например, могут быть разделены на четыре подклассы: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Каждый из этих подклассов содержит Fc-область, имеющую уникальный профиль для связывания с одним или несколькими Fcγ-рецепторами (активирующими рецепторами FcγRI

(CD64), FcγRIIA, FcγRIIC (CD32a,c); FcγRIIA и FcγRIIB (CD16a,b) и ингибирующим рецептором FcγRIIB (CD32b)), и с первым компонентом комплемента (C1q). Человеческие IgG1 и IgG3 связываются со всеми Fcγ-рецепторами; IgG2 связывается с FcγRIIA_{H131} и с более низкой аффинностью с FcγRIIA_{R131} FcγRIIA_{V158}; IgG4 связывается с FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC и FcγRIIA_{V158}; и ингибирующий рецептор FcγRIIB имеет более низкую аффинность к IgG1, IgG2 и IgG3, чем все другие Fcγ-рецепторы. (Bmhns et al. (2009) Blood 113:3716). Исследования показали, что FcγRI не связывается с IgG2, и FcγRIIB не связывается с IgG2 или IgG4. Id. В целом, в отношении активности ADCC, человеческие IgG1 ≥ IgG3 >> IgG4 ≥ IgG2. В некоторых вариантах осуществления скорее константный домен IgG1, а не IgG2 или IgG4, может быть выбран, например, для применения в терапевтической композиции, так как желательна активность ADCC. В других вариантах осуществления IgG3 может быть выбран, так как желательна активация FcγRIIA-экспрессирующих NK-клеток, моноцитов или макрофагов. В других вариантах осуществления выбран IgG4, так как антитело используют для десенсибилизации пациентов с аллергией. IgG4 также может быть выбран, если желательно, чтобы у антитела отсутствовали все эффекторные функции.

Вариабельные области анти-huICOS антитела, описанные в настоящем документе, могут быть связаны (например, ковалентно связаны или слиты) с Fc, например, Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, который может быть любого аллотипа или изоаллотипа, например, для IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); для IgG2: G2m, G2m23(n); for IgG3: G3m, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m11(b0), G3m5(b1), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t), G3m6(c3), G3m24(c5), G3m26(u), G3m27(v). (См., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1). На выбор аллотипа могут влиять опасения в отношении потенциальной иммуногенности, например, с целью сведения к минимуму образования антител против лекарственного средства.

В некоторых вариантах осуществления анти-ICOS антитела согласно настоящему изобретению имеют Fc-область, которая связывается или обладает повышенным связыванием с FcγRIIb, что обеспечивает повышенный агонизм. См., например, WO 2012/087928; Li & Ravetch (2011) Science 333:1030; Wilson et al. (2011) Cancer Cell 19:101; White et al. (2011) J. Immunol. 187:1754. В некоторых вариантах осуществления вариабельные области, описанные в настоящем документе, могут быть связаны с вариантами Fc, которые повышают аффинность в отношении ингибирующего рецептора FcγRIIb, например, для увеличения апоптоз-индуцирующей или адьювантной активности. Li & Ravetch (2012) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 109:10966; публикация патентной заявки 2014/0010812. Такие варианты обеспечивают антитело иммуномодулирующими активностями, связанными с FcγRIIb+ клетками, включая, например, В-клетки и моноциты. В одном варианте осуществления варианты Fc обеспечивают селективно увеличенную аффинность в отношении FcγRIIb по сравнению с одним или несколькими активными рецепторами. Такие варианты могут также демонстрировать увеличенное FcR-опосредованное перекрестное связывание, что приводит к увеличению терапевтической эффективности. Модификации для изменения связывания с FcγRIIb включают одну или несколько модификаций, например, в положениях 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 или 332 в соответствии с индексом EU. Иллюстративные замены для увеличения аффинности FcγRIIb включают, но без ограничения, 234D, 234E, 234F, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y и 332E. Иллюстративные замены включают 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W и 328Y. Другие варианты Fc для увеличения связывания с FcγRIIb включают 235Y-267E, 236D-267E, 239D-268D, 239D-267E, 267E-268D, 267E-268E и 267E-328F. В частности, варианты S267E, G236D, S239D, L328F и I332E, включая двойной вариант S267E-L328F человеческого IgG1 имеют особое значение в специфическом увеличении аффинности в отношении ингибирующего FcγRIIb-рецептора. Chu et al. (2008) Mol. Immunol. 45:3926; публикация патентной заявки 2006/024298; WO 2012/087928. Увеличенная специфичность в отношении FcγRIIb (в отличие от FcγRIIA_{R131}) может быть получена путем добавления замены P238D и других мутаций (Mimoto et al. (2013) Protein. Eng. Des. & Selection 26:589; WO 2012/1152410), а также V262E и V264E (Yu et al. (2013) J. Am. Chem. Soc. 135:9723 и WO 2014/184545).

Константные домены тяжелой цепи не-IgG2 с шарнирными областями IgG2

В некоторых вариантах осуществления анти-ICOS антитела, описанные в настоящем документе, проявляют увеличенную агонистическую активность, по меньшей мере отчасти обусловленную модификациями, которые увеличивают связывание с FcγRIIb и/или специфичность в отношении FcγRIIb. Альтернативный подход состоит в конструировании Fc-области для обеспечения FcγR-независимого усиления агонизма. Примеры антител к другим мишеням с модифицированными доменами IgG2, обеспечивающими такой усиленный агонизм, описаны в WO 2015/145360 и White et al. (2015) Cancer Cell 27:138, раскрытия которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. В частности, дисульфидные связи расположены так, чтобы "закрывать" антитело в более компактную конформацию "h2B", что приводит к усиленному агонизму. Полученный усиленный агонизм является FcγR-независимым. (См., White et al. (2015) Cancer Cell 27:138). Такой FcγR-независимый агонизм является предпочтительным в лечении некоторых опухолей, например тех, которые имеют незначительное коли-

чество клеток, экспрессирующих FcγR+ (например, незначительное количество НК-клеток или макрофагов). В одном варианте осуществления обеспечены анти-ICOS антитела, содержащие последовательности CDR или варибельного домена, раскрытые в настоящем документе, связанные с константными областями тяжелой цепи не-IgG2 (например, IgG1), имеющими шарнирные области hIgG2, или их вариантами, включая варианты последовательности домена CH1. В одном варианте осуществления эти антитела "шарнира IgG2" проявляют повышенный агонизм по сравнению с антителами с полностью константной областью тяжелой цепи IgG1, и повышенный агонизм не зависит от перекрестного связывания, опосредованного Fcγ-рецептором. В некоторых вариантах осуществления эти анти-ICOS антитела шарнира IgG2 сохраняют по существу без изменений антигенсвязывающую аффинность. Также, в настоящем документе обеспечены способы усиления FcγR-независимого агонизма не-IgG2 анти-ICOS антител, содержащих замену не-IgG2 шарнира на шарнир IgG2. В некоторых вариантах осуществления модифицированная константная область тяжелой цепи содержит шарнир изотипа IgG2 ("шарнир IgG2") и домен CH1, CP2 и CH3, при этом по меньшей мере один из доменов CH1, CH2 и CH3 не относится к изотипу IgG2. Шарнир IgG2 может представлять собой человеческий шарнир IgG2 дикого типа (например, ERKCCVCEPPCPAPPVAG, как указано в SEQ ID NO: 96) или его вариант, который также придает повышенную агонистическую активность. В некоторых вариантах осуществления такие варианты шарнира IgG2 сохраняют ту же жесткость или твердость, что и шарнир IgG2 дикого типа. Жесткость шарнира может быть определена, например, путем компьютерного моделирования, электронной микроскопии, спектроскопии, такой как ядерный магнитный резонанс (ЯМР), рентгеновской кристаллографии (В-факторы) или ультрацентрифугирования для аналитического исследования скорости осаждения (AUC) для измерения или сравнения радиуса гирации антител, содержащих шарнир. В некоторых вариантах осуществления варианты шарнира IgG2 человека содержат замену(ы) одного или нескольких из четырех остатков цистеина (т.е. C219, C220, C226 и C229), например, серином. В одном варианте осуществления вариант шарнира IgG2 содержит мутацию C219S (например, ERKSCVCEPPCPAPPVAG, как указано в SEQ ID NO: 110). Другие варианты шарнира IgG2 содержат мутацию C220S, C226S или C229S, любая из которых может быть объединена с мутацией C219S).

Вариант петли IgG2 также может содержать элементы шарнирной последовательности не-IgG2 (химерный шарнир). В некоторых вариантах осуществления жесткость химерного шарнира по меньшей мере аналогична жесткости шарнира IgG2 дикого типа. Например, в одном варианте осуществления вариант петли IgG2 содержит нижний шарнир IgG1 дикого типа (См. табл. 2).

В табл. 4, приведенной ниже, представлены примеры последовательностей константной области тяжелой цепи "шарнира IgG2" человека, которые отличаются по изотипическому происхождению доменов CH1, CH2 и CH3. Как используется в настоящем документе, "шарнир IgG2-антитела" относится не только к антителам, содержащим шарнирные области, происходящие из IgG2, но также области CH1, происходящие из CH1 IgG2. Звездочка (*) в табл. 4 обозначает, что указанный домен может быть любого изотипа или может полностью отсутствовать. В некоторых вариантах осуществления модифицированная константная область тяжелой цепи содержит вариантный домен CH1, например, включая мутации A114C и/или T173C. Модифицированная константная область тяжелой цепи может также содержать вариантный домен CH2, например, включая мутации A330S и/или P331S.

Таблица 4. Конструкции константной области тяжелой цепи "шарнира IgG2" человека

CH1	Шарнир	CH2	CH3
*	IgG2	*	*
IgG1	IgG2	*	*
IgG2	IgG2	*	*
*	IgG2	IgG1	*
*	IgG2	IgG2	*
*	IgG2	*	IgG1
*	IgG2	*	IgG2
IgG1	IgG2	IgG1	*
IgG1	IgG2	IgG2	*
IgG2	IgG2	IgG1	*
IgG2	IgG2	IgG2	*
IgG1	IgG2	*	IgG1
IgG1	IgG2	*	IgG2

IgG2	IgG2	*	IgG1
IgG2	IgG2	*	IgG2
*	IgG2	IgG1	IgG1
*	IgG2	IgG1	IgG2
*	IgG2	IgG2	IgG1
*	IgG2	IgG2	IgG2
IgG1	IgG2	IgG1	IgG1
IgG1	IgG2	IgG1	IgG2
IgG1	IgG2	IgG2	IgG1
IgG1	IgG2	IgG2	IgG2
IgG2	IgG2	IgG1	IgG1
IgG2	IgG2	IgG1	IgG2
IgG2	IgG2	IgG2	IgG1
IgG2	IgG2	IgG2	IgG2

Примеры константных доменов антител, содержащих комбинации последовательностей IgG2 СН1 и шарнира с последовательностями других изоформ, и выбранные аминокислотные замены представлены ниже в табл. 5.

Таблица 5. Примеры константных областей тяжелой цепи "шарнира IgG2" человека

Конструкция	SEQ ID NO.	Описание
IgG1f	104	IgG1f дикого типа
IgG1.1f	109	стандартный инертный IgG1.1f
IgG2.3	105	форма IgG2 A (C219S)
IgG2.5	108	форма IgG2 B (C131S)
IgG2.3G1-KH	107	СН1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний СН2 IgG2.3, все остальные IgG1f
IgG2.5G1-KH	116	СН1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний СН2 IgG2.5, все остальные IgG1f
IgG2.3G1-AY	106	СН1 и верхний шарнир IgG2.3, все остальные IgG1f
IgG2.5G1-AY	115	СН1 и верхний шарнир IgG2.5, все остальные IgG1f
IgG1-G2.3G1-KH	119	СН1 IgG1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний СН2 IgG2.3, все остальные IgG1f
IgG1-G2.3G1-AY	118	СН1 IgG1, верхний шарнир IgG2.3, все остальные IgG1f
IgG2.3G1.1f-KH	110	СН1, нижний шарнир и нижний шарнир/верхний СН2 IgG2.3, все остальные IgG1.1f
IgG2.5G1.1f-KH	114	СН1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний СН2 IgG2.5, все остальные IgG1.1f
IgG1-deltaTHT	111	IgG1 с последовательностью THT, удаленной из шарнира
IgG2.3-plusTHT	112	IgG2.3 с последовательностью THT (из IgG1), добавленной в шарнир
IgG2.5-plusTHT	117	IgG2.5 с последовательностью THT (из IgG1), добавленной в шарнир
IgG2.3-plusGGG	113	IgG2.3 с гибкой последовательностью GGG, добавленной в шарнир

Дополнительные конкретные примеры константных доменов антител, содержащих комбинации последовательностей СН1 IgG2 и шарнира с последовательностями других изоформ, и выбранные аминокислотные замены представлены в табл. 6 ниже.

Таблица 6. Дополнительные примеры константных областей тяжелой цепи "шарнира IgG2" человека

Конструкция	SEQ ID NO:	Описание
G2-G1-G1-G1	120	CH1-домен IgG2, со всеми остальными IgG1.
G2.5-G1-G1-G1	121	Также, Cys>Ser мутант для снижения потенциальной дисульфидной гетерогенности
G1-G2.3-G2-G2	122	CH1-домен IgG1 со всеми остальными IgG2.3
G1-KRGEKSSNLF	123	Swap CH1 области в IgG1 с областями IgG2, отдельно или вместе.
G1-KRGEKS	124	
G1-SNLF	125	
IgG1-ITNDRTPR	126	
G1-SNLFPR	127	
G2-RKEKSGNSFL	128	Swap CH1 области в IgG2 с областями IgG1, отдельно или вместе.
G2-RKEKSG	129	
G2-NSFL	130	
IgG2-TIDNTRRP	131	
G2-NSFLRP	132	IgG1 с остатками CH2-домена IgG2
G1-G1-G2-G1-AY	133	
G1-G1-G2-G1-KH	134	IgG2 с остатками CH2-домена IgG1
G2-G2.3-G1-G2-KH	135	
G2.5-G2.3-G1-G2-KH	136	Swap шарнирные области между IgG1 и IgG2.
G2-G2.3-G1-G2-AY	137	
G2.5-G2.3-G1-G2-AY	138	
G1-G2.3-G1-G1-KH	139	
G2-G1-G2-G2-AY	140	
G2.5-G1-G2-G2-AY	141	
G1-G2-G1-G1-AY	142	
G2-G1-G2-G2-KH	143	
G2.5-G1-G2-G2-KH	144	Hinge truncations
IgG1-deltaHinge	145	
IgG2-deltaHinge	146	
IgG2.5-deltaHinge	147	
IgG1-deltaG237	148	
IgG2-plusG237	149	Другие
IgG2.4	150	
IgG2.3/4	151	

Анти-ICOS антитела, включая антитела, содержащие последовательности CDR и/или варибельного домена, раскрытые в настоящем документе, могут включать последовательности константного домена "шарнира IgG2", раскрытые в настоящем документе, например, для усиления FcγR-независимой агонистической активности. Примеры таких константных доменов шарнира IgG2 включают домены, раскрытые в табл. 5 (SEQ ID NOs: 104-108 и 110-119) и таблице 6 (SEQ ID NOs: 120-151), а также раскрытые в SEQ ID NOs: 101-108.

Удлинение периода полужизни

В некоторых вариантах осуществления анти-ICOS антитело модифицируют, чтобы увеличить его биологическое время полужизни, например, полужизни антитела в сыворотке. Различные подходы известны в данной области техники. Например, период полужизни антитела может быть удлинен путем увеличения аффинности связывания Fc-области в отношении FcRn. В одном варианте осуществления антитело изменяют внутри области CH1 или CL для того, чтобы содержать эпитоп связывания рецептора реутилизации, взятый из двух петель домена CH2 в Fc-области IgG, как описано в патентах США 5869046 и 6121022, Presta et al. Другие иллюстративные варианты Fc, которые увеличивают связывание с FcRn и/или улучшают фармакокинетические свойства, включают замены в положениях 259, 308 и 434, включая, например, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y и 434M. Другие варианты, которые увеличивают связывание Fc с FcRn, включают: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton et al. 2006 Journal of Immunology 176:346-356), 256A, 272A, 305A, 307A, 311A, 312A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al., Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604), 252F, 252Y, 252W, 254T, 256Q, 256E, 256D, 433R, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E,

433K/434F/436H (Dall'Acqua et al. *Journal of Immunology*, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua et al, 2006, *Journal of Biological Chemistry* 281:23514-23524). См. патент США 8367805.

Модификация определенных консервативных остатков в Fc IgG (I253, H310, Q311, H433, N434), таком как вариант N434A (Yeung et al. (2009) *J. Immunol.* 182:7663), была предложена в качестве способа увеличения FcRn-аффинности, тем самым увеличивая период полужизни антитела в кровотоке. (См., например, WO 98/023289). Комбинированный Fc-вариант, содержащий M428L и N434S, как было показано, увеличивает связывание FcRn и увеличивает время полужизни в сыворотке крови до пяти раз. (Zalevsky et al. (2010) *Nat. Biotechnol.* 28:157). Комбинированный Fc-вариант, содержащий модификации T307A, E380A и N434A, также продлевают время полужизни антител IgG1. (Petkova et al. (2006) *Int. Immunol.* 18:1759). Кроме того, также было показано, что комбинированные Fc-варианты, содержащие варианты M252Y-M428L, M428L-N434H, M428L-N434F, M428L-N434Y, M428L-N434A, M428L-N434M и M428L-N434S, продлевают время полужизни. (WO 2009/086320).

Кроме того, комбинированный Fc-вариант, содержащий M252Y, S254T и T256E, увеличивает время полужизни почти в 4 раза. (Dall'Acqua et al. (2006) *J. Biol. Chem.* 281:23514). Связанная с IgG1 модификация, которая обеспечивала увеличение FcRn-аффинности, но снижение pH-зависимости (M252Y-S254T-T256E-N433K-N434F), была использована для получения IgG1-конструкции ("MST-HN Abdeg") для использования в качестве конкурента с целью предотвращения связывания других антител с FcRn, что приводит к увеличению клиренса таких других антител, в качестве которых могут выступать как эндогенное IgG (например, в случае аутоиммунной реакции) или иное экзогенное (терапевтическое) моноклональное антитело. (Vaccaro et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1283; WO 2006/130834).

Другие модификации для повышения связывания FcRn описаны у Yeung et al. (2010) *J. Immunol.* 182:7663-7671; 6277375; 6821505; WO 97/34631; WO 2002/060919.

В некоторых вариантах осуществления гибридные изотипы IgG могут быть использованы для увеличения связывания FcRn и потенциально увеличения времени полужизни. Например, гибридный вариант IgG1/IgG3 может быть сконструирован путем замещения положений в IgG1, в областях CH2 и/или CH3, аминокислотами из IgG3 в положениях, где данные два изотипа различаются. Таким образом, может быть сконструирован гибридный вариант антитела IgG, который содержит одно или несколько замен, например, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R и 436F. В других вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, может быть сконструирован гибридный вариант IgG1/IgG2 путем замены положений в IgG2, в области CH2 и/или CH3, аминокислотами из IgG1 в положениях, где данные два изотипа различаются. Таким образом, может быть сконструирован гибридный вариант антитела IgG, который содержит одну или более замен, например, одну или более из следующих аминокислотных замен: 233E, 234L, 235L, 236G (со ссылкой на инсерцию глицина в положении 236) и 327A. См. патент США № 8629113. Был получен гибрид последовательностей IgG1/IgG2/IgG4, что предположительно увеличивает время полужизни в сыворотке и улучшает экспрессию. Патент США № 7867491 (номер последовательности 18 в нем).

Время полужизни в сыворотке крови антител, описанных в настоящем документе, также может быть увеличено путем пэгилирования. Антитело может быть пэгилировано, например, для увеличения биологического (например, в сыворотке) времени полужизни антитела. Для пэгилирования антитела, данное антитело или его фрагмент обычно подвергают взаимодействию с полиэтиленгликолем (PEG), таким как реакционноспособное сложноэфирное или альдегидное производное PEG, в условиях, в которых одна или несколько групп PEG присоединяется к антителу или фрагменту антитела. Предпочтительно, пэгилирование осуществляют с помощью реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой PEG (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером).

Используемый в настоящем документе термин "полиэтиленгликоль" включает любую из форм PEG, которые были использованы для дериватизации других белков, такую как моно(C1-C10)алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль, или малеимид полиэтиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое должно быть пэгилировано, представляет собой агликозилированное антитело. Способы пэгилирования белков известны в данной области и могут быть применены к антителам, описанным в настоящем документе. (См., например, EP 0154316 Nishimura et al. и EP 0401384 Ishikawa et al.

В некоторых случаях может быть желательно скорее уменьшить время полужизни антитела, а не увеличивать его. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, включают модификации для уменьшения их времени полужизни. Модификации, такие как I253A (Hornick et al. (2000) *J. Nucl. Med.* 41:355) и H435A/R, I253A или H310A (Kim et al. (2000) *Em. J. Immunol.* 29:2819) в Fc человеческого IgG1 могут уменьшать связывание FcRn, тем самым уменьшая время полужизни (увеличивая клиренс) для использования в ситуациях, когда предпочтительным является быстрое выведение, например, при медицинской визуализации. (См. также Kepanova et al. (2005) *Cancer Res.* 65:622). Другие средства для повышения клиренса включают форматирование антигенсвязывающих доменов по настоящему изобретению в виде фрагментов антител, не обладающих способностью связываться с FcRn, таким как Fab-фрагменты. Такая модификация может, например, уменьшить время полужизни в кровотоке антитела от нескольких недель до часов. Селективное пэгилирование фрагментов антител

можно затем использовать для увеличения времени полужизни фрагментов антител, если это необходимо. (Charman et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17: 780). Фрагменты антител могут быть также слиты с человеческим сывороточным альбумином, например, в конструкции слитого белка, чтобы увеличить время полужизни. (Yeh et al. (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 89:1904). Альтернативно, могут быть сконструированы биспецифические антитела с первым антигенсвязывающим доменом по настоящему изобретению и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывается с сывороточным альбумином человека (HSA). (См. WO 2009/127691 и ссылки на патенты, приведенные в нем). Альтернативно, к фрагментам антител могут быть добавлены специальные полипептидные последовательности, чтобы увеличить время полужизни, например, полипептидные последовательности "XTEN". (Schellenberger et al. (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:1186; *Int'l Pat. Appl. Pub.* WO 2010/091122).

Дополнительные варианты Fc

В некоторых вариантах осуществления при использовании константного домена IgG4, может быть предпочтительно включать замещение S228P, которое имитирует шарнирную последовательность в IgG1 и, тем самым, стабилизирует молекулы IgG4, например, уменьшая обмен плечами Fab между терапевтическим антителом и эндогенным IgG4 у пациента, подвергаемого лечению. (Labrijn et al. (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:767; Reddy et al. (2000) *J. Immunol.* 164:1925).

Потенциальный сайт расщепления протеазой в шарнирной области конструкций IgG1 может быть устранен модификациями D221G и K222S, что повышает стабильность антитела. (WO 2014/043344).

Аффинности и связывающие свойства варианта Fc для его лигандов (Fc-рецепторы) могут быть определены различными способами *in vitro* анализа (например, биохимические или иммунологические анализы), известными в данной области, включая, но без ограничения, равновесные способы (например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA)), или радиоиммуноанализ (RIA)), или кинетические анализы (например, анализ BIACORE® SPR), а также другие способы, такие как анализы непрямого связывания, тесты на конкурентное ингибирование, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), гель-электрофорез и хроматография (например, гель-фильтрация). Данные и другие способы могут использовать метку на одном или нескольких исследуемых компонентах и/или использовать множество способов обнаружения, включая, но без ограничения, хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинностей и кинетики связывания можно найти у Paul, W. E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), в котором основное внимание сфокусировано на антитело-иммуногенных взаимодействиях.

В других вариантах осуществления модифицируется гликозилирование антитела для увеличения или уменьшения эффекторной функции. Например, может быть получено агликозилированное антитело, у которого полностью отсутствует эффекторная функция с помощью мутирования консервативного остатка аспарагина в положении 297 (например, N297A), таким образом, отменяя связывание с компонентом и FcγRI. (Bolt et al. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:403. See also Tao & Morrison (1989) *J. Immunol.* 143:2595 (с использованием N297Q в IgG1 для устранения гликозилирования в положении 297)).

Хотя у агликозилированных антител обычно отсутствуют эффекторные функции, могут быть введены мутации, чтобы восстановить такую функцию. Агликозилированные антитела, например, полученные в результате мутаций N297A/C/D/ или H, или произведенные в системах (например, *E.coli*), которые не гликозилируют белки, могут подвергаться дополнительным мутациям для восстановления связывания с FcγR, например, S298G и/или T299A/G/или H (WO 2009/079242), или E382V и M428I (Jung et al. (2010) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 107:604).

Гликоконструирование также может быть использовано для изменения противовоспалительных свойств конструкции IgG путем изменения содержания α2,6-сиалильных групп в углеводных цепях, присоединенных в положении Asn297 областей Fc, при этом увеличение доли α2,6-сиалилированных форм приводит к усилению противовоспалительных эффектов. (См. Nimmerjahn et al. (2008) *Ann. Rev. Immunol.* 26:513). И, наоборот, уменьшение доли антител, имеющих α2,6-сиалилированные углеводы, может иметь преимущество в тех случаях, когда противовоспалительные свойства не желательны. Способы модификации содержания α2,6-сиалилированных углеводных групп в антителах, например, путем селективной очистки из α2,6-сиалилированных форм или путем ферментативной модификации, описаны в публикации патентной заявки США 2008/0206246. В других вариантах осуществления последовательность аминокислот в Fc-области может быть модифицирована, чтобы имитировать эффект α2,6-сиалилирования, например, путем включения модификации F241A. (WO 2013/095966). III.

Физические свойства антител

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, содержат один или более сайтов гликозилирования в варибельной области легкой или тяжелой цепи. Такие сайты гликозилирования могут привести к повышению иммуногенности антитела или изменению фармакокинетики антитела вследствие изменения связывания антигена (Marshall et al. (1972) *Ann. Rev. Biochem.* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J. Immunol.* 172:5489-94; Wallick et al. (1988) *J. Exp. Med.* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh et al. (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura et al. (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Гликозилирование, как известно, происходит в мотивах, содержащих последова-

тельность N-X-S/T. В некоторых вариантах осуществления антитело против huICOS не содержит гликозилирование вариабельной области. Такие антитела могут быть получены путем отбора антител, которые не содержат мотив гликозилирования в вариабельной области, либо мутированием остатков внутри области гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, не содержат сайтов изомерии аспарагина. Деамидирование аспарагина может происходить на последовательностях N-G-или D-G и приводит к получению остатка изоаспарагиновой кислоты, который вводит излом в полипептидную цепь и снижает его устойчивость (известно как эффект изоаспарагиновой кислоты).

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, имеют изоэлектрическую точку (pI) в диапазоне pH от 6 до 9,5. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, имеют pI в диапазоне pH от 7 до 9,5 или от 6 до 8. Антитела, имеющие pI в пределах желаемого диапазона pI, могут быть получены либо путем отбора антител с pI в диапазоне pH из группы кандидатов, либо мутированием поверхностных заряженных остатков конкретного антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, выбраны и/или сконструированы таким образом, чтобы они имели температуру первоначального разворачивания (T_{M1}) более 60°C, более 65°C или более 70°C. Температура плавления антитела может быть измерена с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (Chen et al (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) Immunol Lett. 68:47-52) или кругового дихроизма (Murray et al. (2002) J. Chromatogr. Sci. 40:343-9).

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, выбраны и/или сконструированы таким образом, чтобы они обладали предпочтительными свойствами деградации, например, медленной деградации *in vitro* и/или *in vivo*. Деградация антител может быть измерена с использованием капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS (Alexander A. J and Hughes D. E. (1995) Anal Chem. 67:3626-32). В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, выбраны и/или сконструированы таким образом, чтобы они обладали благоприятными агрегационными свойствами, например, антитела, которые демонстрируют минимальную агрегацию *in vitro* и/или *in vivo*, которая может вызывать нежелательный иммунный ответ и/или измененные или неблагоприятные фармакокинетические свойства. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, демонстрируют агрегацию на уровне 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, или 5% или менее по сравнению с агрегацией родительского антитела. Агрегация может быть измерена несколькими способами, включая эксклюзионную хроматографию (SEC), высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC) и рассеяние света. IV.

Молекулы нуклеиновой кислоты и рекомбинантные способы

Другой аспект, описанный в настоящем документе, относится к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют антитела против huICOS, описанные в настоящем документе. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в цельных клетках, например, клетке-хозяине, в клеточном лизате или в частично очищенном или по существу чистом виде. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "оказывается по существу чистой" при очистке от других клеточных компонентов или других загрязнений, например, других клеточных нуклеиновых кислот (например, другой хромосомной ДНК, например, хромосомной ДНК, которая связана с выделенной ДНК в природе) или белков, стандартными способами, включающими обработку щелочью/ДСН, разделение в CsCl, колоночную хроматографию, рестрикционные ферменты, электрофорез в агарозном геле и другие способы, хорошо известные в данной области техники. (См., F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York). Нуклеиновая кислота, описанная в настоящем документе, может представлять собой, например, ДНК или РНК и может содержать или не содержать интронную последовательность. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

Нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе, могут быть получены с использованием стандартных способов молекулярной биологии. Что касается антител, экспрессируемых гибридами (например, гибридами, полученными из трансгенных мышей, несущих гены иммуноглобулина человека, как описано дополнительно ниже), кДНК, кодирующие легкую и/или тяжелую цепи антитела, сделанные гибридомой, могут быть получены стандартными способами ПНР-амплификации или клонирования кДНК. Что касается антител, полученных из библиотеки генов иммуноглобулина (например, с использованием способов фагового дисплея), нуклеиновая кислота, кодирующая данное антитело, может быть извлечена из упомянутой библиотеки.

После получения ДНК-фрагментов, кодирующих сегменты V_H и V_L , ДНК-фрагменты могут быть подвергнуты дополнительной манипуляции при помощи стандартных способов рекомбинантных ДНК, например, для превращения генов вариабельной области в гены полноразмерной цепи антитела, в гены Fab-фрагмента или в ген scFv. В данных манипуляциях V_L - или V_H -кодирующий фрагмент ДНК функционально связан с другим ДНК-фрагментом, кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. Термин "функционально связанный", используемый в данном контексте, означает, что два фрагмента ДНК соединены таким образом, что аминокислотные последовательности,

кодированные такими двумя ДНК-фрагментами, остаются в рамке считывания.

Выделенная ДНК, кодирующая V_H -область, может быть превращена в полноразмерный ген тяжелой цепи путем функционального связывания V_H -кодирующей ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (шарнир, $CH1$, $CH2$ и/или $CH3$). Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека известны в данной области (см., например, Kabat, et al., 1991), и фрагменты ДНК, содержащие данные области, могут быть получены с помощью стандартной PCR-амплификации. Константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG (IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA, IgE, IgM или IgD, например, область IgG1. Что касается гена Fab-фрагмента тяжелой цепи, V_H -кодирующая ДНК может быть функционально связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную область тяжелой цепи $CH1$.

Выделенная ДНК, кодирующая V_L -область, может быть превращена в полноразмерный ген легкой цепи (а также ген легкой цепи Fab) путем функционального связывания V_L -кодирующей ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи, CL . Последовательности генов константной области легкой цепи человека известны в данной области (см., например, Kabat, et al., 1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NTH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, содержащие данные области, могут быть получены стандартной PCR-амплификацией. Константная область легкой цепи может быть константной областью каппа или ламбда.

Для получения гена scFv, V_H - и V_L -кодирующие ДНК-фрагменты функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность $(Gly_4-Ser)_3$ таким образом, что последовательности V_H и V_L могут быть экспрессированы в виде непрерывного одноцепочечного белка с областями V_L и V_H , соединенными гибким линкером (см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554).

V. Генерирование антител

Различные антитела согласно настоящему изобретению, например, те, которые связываются с тем же эпитопом, что и выбранные антитела против человеческого ICOS, раскрытые в настоящем документе, могут быть получены с использованием различных известных способов, таких как стандартный способ гибридизации соматических клеток, описанный Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975). Также можно использовать другие способы получения моноклональных антител, например, вирусную или онкогенную трансформацию В-лимфоцитов, способ фагового дисплея с использованием библиотеки генов антител человека.

Примером животной системы для получения гибридом является мышиная система. Получение гибридомы на мыши является очень хорошо устоявшейся процедурой. Протоколы иммунизации и способы выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в данной области техники. Партнеры слияния (например, мышинные миеломные клетки) и процедуры слияния также известны.

Химерные или гуманизированные антитела, описанные в настоящем документе, могут быть получены на основе последовательности мышинного моноклонального антитела, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующая иммуноглобулины тяжелой и легкой цепей, может быть получена из представляющей интерес мышинной гибридомы и сконструирована таким образом, что она содержит последовательности не-мышинного иммуноглобулина (например, человека) с использованием стандартных способов молекулярной биологии. Например, для получения химерного антитела мышинные вариабельные области могут быть связаны с константными областями человека с использованием способов, известных в данной области техники (см., например, патент США 4816567, Cabilly et al.). Для создания гуманизированного антитела мышинные CDR-области могут быть встроены в человеческую каркасную область с использованием способов, известных в данной области техники (см., например, Патент США 5225539, выданный Winter, и патенты США 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные Queen et al).

В одном варианте осуществления антитела, описанные в настоящем документе, представляют собой человеческие моноклональные антитела. Такие человеческие моноклональные антитела, направленные против человеческого ICOS, могут быть получены с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части иммунной системы человека, а не системы мышей. Эти трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, называемых в настоящем документе мышами HuMAb и мышами KM соответственно, и в целом называемых "мышами с Ig человека".

Мышь HuMAb® (Medarex, Inc.) содержит минилокусы гена иммуноглобулина человека, которые кодируют неупорядоченные последовательности тяжелой (μ и γ) и легкой цепи к иммуноглобулина человека, вместе с нацеленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы цепи μ и κ (см., например, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859). Соответственно, данные мыши проявляют уменьшенную экспрессию мышинного IgM или κ , и в ответ на иммунизацию, введенные трансгены тяжелой и легкой цепей человека подвергаются переключению класса и соматической мутации с получением моноклональных антител IgGk человека с высокой аффинностью (Lonberg, N. et al. (1994), выше; в обзоре Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D.

(1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, and Harding F. and Lonberg, N. (1995) Ann. NY. Acad. Sci. 764:536-546). Получение и использование мышей HuMab и геномные модификации, которые несут такие мыши, дополнительно описаны в работе Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; и Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851, каждая из которых специально включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. (См., также, патенты США 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; и 5770429; все на имя Lonberg и Kay; патент США 5545807, Surani et al.; публикации PCT WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все на имя Lonberg и Kay; и публикацию PCT WO 01/14424, Korman et al.)

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, выращены с использованием мыши, которая несет последовательности иммуноглобулина человека на трансгенах и трансхромосомах, такой как мышь, которая несет трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Такие мыши, называемые в настоящем документе "мышами КМ", подробно описаны в публикации PCT WO 02/43478, Ishida et al.

Дополнительно, в данной области техники доступны альтернативные системы трансгенных животных, экспрессирующие гены иммуноглобулина человека, и они могут быть использованы для получения анти-huICOS антител, описанных в настоящем документе. Например, может быть использована альтернативная трансгенная система, называемая Xenomouse (Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в патентах США 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963, Kucherlapati et al.

Кроме того, альтернативные трансхромосомные системы животных, экспрессирующие гены иммуноглобулина человека, доступны в данной области техники и могут быть использованы для получения анти-ICOS антител, описанных в настоящем документе. Например, могут быть использованы мыши, несущие как трансхромосому тяжелой цепи человека, так и трансхромосому легкой цепи человека, называемые "ТС мышами"; такие мыши описаны у Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Кроме того, в данной области были описаны коровы, несущие трансхромосомы тяжелой и легкой цепей человека (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894), и они могут быть использованы для получения анти-huICOS антител, описанных в настоящем документе.

Дополнительные мышинные системы, описанные в данной области техники для выращивания человеческих антител, например, человеческих анти-huICOS антител, включают (i) мышь VelocImmune® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), в которой эндогенные мышинные варибельные области тяжелой и легкой цепей могут быть заменены с помощью гомологичной рекомбинации варибельными областями тяжелой и легкой цепей человека, функционально связанными с эндогенными константными областями мыши, так, что химерные антитела (V человека/С мыши) выращиваются в мыши, а затем впоследствии превращаются в полностью человеческие антитела с использованием стандартных методик рекомбинантной ДНК; и (ii) мышь MeMo® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), где мышь содержит неперегруппированные варибельные области тяжелой цепи человека, но одну перегруппированную варибельную область обычной легкой цепи человека. Такие мыши и их применение для получения антител описаны, например, в WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861 и US 2012/0073004.

Моноклональные антитела человека, описанные в настоящем документе, могут быть также получены с использованием способов фагового дисплея для скрининга библиотек генов иммуноглобулинов человека. Такие способы фагового дисплея, предназначенные для выделения антител человека, известны в данной области техники. (См., например, патенты США 5223409; 5403484 и 5571698, Ladner et al.; патенты США 5427908 и 5580717, Dower et al.; патенты США 5969108 и 6172197, McCafferty et al.; и патенты США 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081, Griffiths et al.)

Человеческие моноклональные антитела, описанные в настоящем документе, могут быть также получены с использованием мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID), которым были введены иммунные клетки человека таким образом, что у данных мышей после иммунизации вырабатывалось человеческое антитело. Такие мыши описаны, например, в патентах США 5476996 и 5698767, Wilson et al.

Иммунизации

Для получения полностью человеческих антител к человеческому ICOS, мыши или трансгенные или трансхромосомные мыши, содержащие гены иммуноглобулинов человека (например, мыши HCo12, HCo7 или КМ) могут быть иммунизированы очищенным или обогащенным препаратом антигена ICOS и/или клеток, экспрессирующих ICOS, как описано для других антигенов, например, в работе Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 и WO 98/24884. Альтернативно, мыши могут быть иммунизированы ДНК, кодирующей человеческий ICOS. Предпочтительно, чтобы мыши находились в возрасте 6-16 недель после первой инфузии. Например, очищенный или обогащенный препарат (например, 5-50 мкг) рекомбинантного человеческого антигена

ICOS может быть использован для внутрибрюшинной иммунизации мышей. В том случае, когда иммунизация с использованием очищенного или обогащенного препарата антигена ICOS не приводит к образованию антител, мыши также могут быть иммунизированы клетками, экспрессирующими ICOS, например, клеточной линией, для содействия иммунным ответам.

Трансгенные мыши HuMAb могут быть первоначально иммунизированы внутрибрюшинно или подкожно (SC) антигеном в адьюванте Ribi с последующими иммунизациями IP/SC каждую вторую неделю (до общей сложности 10 недель) антигеном в адьюванте Ribi. Иммунный ответ можно контролировать в ходе протокола иммунизации, при этом образцы плазмы получают ретроорбитальными кровопусканиями. Плазма может быть подвергнута скринингу при помощи ELISA и FACS (как описано ниже), и мыши с достаточными титрами анти-ICOS иммуноглобулина человека могут быть использованы для слияний. Мыши могут быть подвергнуты внутривенному бустингу антигеном за 3 дня перед умерщвлением и удалением селезенки и лимфатических узлов. Могут быть проведены два-три слияния для каждой иммунизации. От 6 до 24 мышей можно иммунизировать для каждого антигена. В некоторых вариантах осуществления используются штаммы HCo7, HCo12 и KM. Кроме того, оба трансгена HCo7 и HCo12 могут быть введены вместе в одну мышью, имеющую два разных трансгена тяжелой цепи человека (HCo7/HCo12). Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к ICOS

Для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела, описанные в настоящем документе, спленоциты и/или клетки лимфатических узлов от иммунизированных мышей могут быть выделены и слиты с соответствующей иммортализованной клеточной линией, такой как линия мышинных миеломных клеток. Полученные гибридомы могут быть подвергнуты скринингу на продуцирование антигенспецифических антител. Например, суспензии отдельных клеток лимфоцитов селезенки от иммунизированных мышей могут быть слиты с Sp2/0 несекретирующими мышинными миеломными клетками (ATCC, CRL 1581) с 50% PEG. Клетки высевают в количестве приблизительно 2×10^5 в плоскодонном планшете для микротитрования с последующей двухнедельной инкубацией в селективной среде, содержащей 10% фетальную сыворотку Clone, 18% кондиционированной среды "653", 5% ориген (IGEN), 4 mM L-глутамин, 1 mM пируват натрия, 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-меркаптоэтанол, 50 ед/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина, 50 мг/мл гентамицина и 1X NAT (Sigma). Спустя приблизительно две недели, клетки могут быть культивированы в среде, в которой NAT заменена HT. Отдельные лунки затем могут быть подвергнуты скринингу при помощи ELISA на моноклональные IgM и IgG антитела человека. Как только происходит экстенсивный рост гибридомы, за средой можно наблюдать, как правило, спустя 10-14 дней. Гибридомы, секретирующие антитело, могут быть повторно высеяны, снова подвергнуты скринингу и, если они все еще являются положительными в отношении IgG человека, моноклональные антитела могут быть субклонированы по меньшей мере два раза с использованием лимитирующего разведения. Стабильные субклоны могут быть затем культивированы *in vitro* для получения небольших количеств антитела в среде для выращивания культуры ткани для снятия характеристик.

Для очистки моноклональных антител отобранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых центрифужных флаконах для очистки моноклональных антител. Супернатанты могут быть отфильтрованы и сконцентрированы перед аффинной хроматографией с использованием белка А-сефарозы (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Элюированный IgG может контролироваться гелем-электрофорезом и высокоэффективной жидкостной хроматографией для гарантии чистоты. Буферный раствор может быть заменен PBS, и концентрация может быть определена по OD₂₈₀ с использованием коэффициент экстинкции 1,43. Моноклональные антитела могут быть разделены на аликвоты и могут храниться при -80°C. VI. Производство антител

Получение трансфектом, продуцирующих моноклональные антитела к ICOS

Антитела согласно настоящему изобретению, включая как специфические антитела, для которых обеспечены последовательности, и другие, родственные анти-ICOS антитела могут быть также получены в трансфектом клетки-хозяина, например, с использованием комбинирования способов рекомбинантных ДНК и способов генной трансфекции, хорошо известных в данной области техники (Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Например, для экспрессии антител или фрагментов данных антител, ДНК, кодирующие частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, могут быть получены стандартными способами молекулярной биологии (например, PCR-амплификацией или клонированием кДНК с использованием гибридомы, которая экспрессирует представляющее интерес антитело), и такие ДНК могут быть вставлены в экспрессирующие векторы таким образом, что гены являются функционально связанными с регуляторными последовательностями транскрипции и трансляции. В данном контексте подразумевается, что термин "функционально связанные" означает, что ген антитела лигирован в вектор таким образом, что регуляторные последовательности транскрипции и трансляции в векторе выполняют их предназначенную функцию регуляции транскрипции и трансляции гена данного антитела. Экспрессирующий вектор и контролирующие экспрессию последовательности выбирают таким образом, чтобы они были совместимы с используемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела могут быть встроены в отдельные векторы или оба гена встроены в один и тот же экспрессирующий вектор. Гены антител встраивают в экспрессирующий вектор(ы) стандартными способами (например,

лигированием комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антитела и векторе, или лигированием тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют). Варибельные области легкой и тяжелой цепей антител, описанных в настоящем документе, могут быть использованы для создания полноразмерных генов антител любого изотипа антитела путем встраивания их экспрессирующие векторы, уже кодирующие константные области тяжелой цепи и константные области легкой цепи желаемого изотипа таким образом, что V_H -сегмент функционально связывается с C_H -сегментом(ами) в данном векторе, и V_L -сегмент функционально связывается с C_L -сегментом в данном векторе. Дополнительно или альтернативно, рекомбинантный экспрессирующий вектор может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела может быть клонирован в вектор таким образом, что сигнальный пептид связывается в рамке считывания с аминоконцом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е., сигнальный пептид из белка, не являющегося иммуноглобулином).

В дополнение к генам цепей антитела, рекомбинантные экспрессирующие векторы могут нести регуляторные последовательности, которые регулируют экспрессию генов цепей антитела в клетке-хозяине. Термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы регуляции экспрессии (например, сигналы полиаденилирования), которые регулируют транскрипцию или трансляцию генов цепей антител. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Специалистам в данной области техники будет понятно, что конструкция экспрессирующего вектора, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, уровень экспрессии желаемого белка, среди прочих факторов. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии клетки-хозяина млекопитающего включают вирусные элементы, которые определяют высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающего, такие как промоторы и/или энхансеры, полученные из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян 40 (SV40), аденовируса (например, основной поздний промотор аденовируса (AdMLP) и полиомы. Альтернативно, могут быть использованы невирусные регуляторные последовательности, такие как промотор убиквитина или промотор β -глобина. Кроме того, могут быть использованы регуляторные элементы, составленные из последовательностей из разных источников, такие как промоторная система $SR\alpha$, который содержит последовательности из раннего промотора SV40, и длинный концевой повтор вируса типа I T-клеточного лейкоза человека 1 (Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

В дополнение к генам цепей антитела и регуляторным последовательностям, рекомбинантные экспрессирующие векторы могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, сайты инициации репликации), и гены селективируемых маркеров. Ген селективируемого маркера облегчает отбор клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см. например, патенты США 4399216, 4634665 и 5179017, все на имя Axel et al.). Например, обычно ген селективного маркера придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую был введен данный вектор. Примеры селективируемых маркерных генов включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в dhfr-клетках-хозяевах с отбором/амплификацией в присутствии метотрексата) и ген пео (для отбора в присутствии G418).

Для экспрессии легкой и тяжелой цепей экспрессирующий вектор(ы), кодирующий тяжелую и легкую цепи, трансфицируют в клетку-хозяина стандартными способами. Различные формы термина "трансфекция" включают широкое разнообразие способов, обычно используемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например, электропорацию, осаждение фосфатом кальция, трансфекцию с использованием DEAE-декстрана и т.п. Хотя теоретически можно экспрессировать антитела, описанные в настоящем документе, в любых прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, наиболее предпочтительной является экспрессия антител в эукариотических клетках и, наиболее предпочтительно, в клетках-хозяевах млекопитающих, так как такие эукариотические клетки и, в частности, клетки млекопитающих, с большей вероятностью, чем прокариотические клетки, будут собирать и секретировать правильно свернутое и иммунологически активное антитело. Сообщалось, что прокариотическая экспрессия генов антител является неэффективной для получения высоких выходов активного антитела (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13). Антитела согласно настоящему изобретению также могут быть получены в гликоконструированных штаммах дрожжей. (Pichia pastoris. Li et al. (2006) Nat. Biotechnol. 24:210).

Иллюстративные клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител, описанных в настоящем документе, включают клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO) (включая dhfr-CHO-клетки, описанные Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, используемые с DHFR-селективируемым маркером, например, как описано R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 759:601-621), клетки миеломы NSO, клетки COS и клетки SP2. В частности, для применения с клетками миеломы NSO, другой иллюстративной системой экспрессии является система экспрессии гена GS, описанная в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841. При введении рекомбинантных экспресси-

рующих векторов, кодирующих гены антител, в клетки-хозяева млекопитающих, антитела получают культивированием клеток-хозяев в течение времени, достаточного для обеспечения экспрессии антитела в клетках-хозяевах или, более предпочтительно, секреции антитела в культуральную среду, в которой выращиваются клетки-хозяева. Антитела могут быть выделены из культуральной среды с использованием стандартных методов очистки белка.

N- и C-концы полипептидных цепей антитела согласно настоящему изобретению могут отличаться от ожидаемой последовательности вследствие обычно наблюдаемых посттрансляционных модификаций. Например, остатки C-концевого лизина часто отсутствуют в тяжелых цепях антител. (Dick et al. (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132). N-концевые остатки глутамин и, в меньшей степени, остатки глутамата, часто превращаются в остатки пироглутамата на обеих легкой и тяжелой цепях терапевтических антител. (Dick et al. (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97:544; Liu et al. (2011) *JBC* 286:11211; Liu et al. (2011) *J. Biol. Chem.* 286:11211).

Аминокислотные последовательности для различных агонистических анти-huICOS антител согласно настоящему изобретению представлены в перечне последовательностей, который представлен в обобщенном виде в таблице 35. По причинам, рассмотренным выше, C-концевой лизин не включен ни в одной из последовательностей в Перечне последовательностей для тяжелых цепей или константных доменов тяжелой цепи. Однако в альтернативном варианте осуществления каждая тяжелая цепь для анти-huICOS антител согласно настоящему изобретению и/или генетической конструкции, кодирующей такие антитела или их тяжелые или легкие цепи, включает данный дополнительный остаток лизина на C-конце тяжелой цепи(ей).

VII. Анализы

Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть подвергнуты тестированию на связывание с ICOS, например, при помощи стандартного ELISA. Например, планшеты для микротитрования покрывают очищенным ICOS при 1-2 мкг/мл в PBS, а затем блокируют 5%-ным бычьим сывороточным альбумином в PBS. Разведения антитела (например, разведения плазмы от ICOS-иммунизированных мышей) добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение 1-2 ч при 37°C. Планшеты промывают смесью PBS/Tween и затем инкубируют со вторичным реагентом (например, для антител человека или антител, содержащих константную область тяжелой цепи человека, поликлональными козьими антителами, специфическими в отношении IgG-Fc человека), конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 ч при 37°C. После промывания планшеты проявляют с субстратом ABTS (Moss Inc, product: ABTS-1000) и анализируют с помощью спектрофотометра при OD 415-495. Сыворотки от иммунизированных мышей затем дополнительно подвергают скринингу проточной цитометрией на связывание с клеточной линией, экспрессирующей человеческий ICOS, но не с контрольной клеточной линией, которая не экспрессирует ICOS. Вкратце, связывание анти-ICOS антител оценивают, инкубируя ICOS-экспрессирующие клетки CHO с анти-ICOS антителом в разбавлении 1:20. Клетки промывают и определяют связывание с помощью PE-меченного антитела к IgG человека. Анализы проточной цитометрии проводят с использованием проточной цитометрии FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Предпочтительно, мыши, которые развивают самые высокие титры, будут использоваться для слияний. Аналогичные эксперименты могут быть выполнены с использованием предназначенных для детекции анти-мышинных антител, если должны детектироваться мышинные анти-huICOS антитела.

Анализ ELISA, например, как описано выше, может быть использован для скрининга антител и, следовательно, гибридом, которые продуцируют антитела, которые проявляют положительную реактивность с иммуногеном ICOS. Гибридомы, которые продуцируют антитела, которые связываются, предпочтительно с высокой аффинностью, с ICOS, могут быть затем субклонированы и дополнительно охарактеризованы. Один клон от каждой гибридомы, который сохраняет реакционную способность родительских клеток (согласно ELISA), может быть затем выбран для создания банка клеток, а также для очистки антител.

Для очистки анти-ICOS антител отобранные гибридомы могут быть выращены во вращающихся колбах на два литра для очистки моноклональных антител.

Надосадочные жидкости могут быть отфильтрованы и сконцентрированы перед аффинной хроматографией с использованием белка А-сефарозы (Pharmacia, Piscataway, NJ). Элюированный IgG может контролироваться гель-электрофорезом и высокоэффективной жидкостной хроматографией для обеспечения чистоты. Буферный раствор может быть заменен PBS и концентрация может быть определена по OD₂₈₀ с использованием коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела могут быть разделены на аликвоты и могут храниться при -80°C.

Для определения того, связываются ли отобранные моноклональные анти-ICOS антитела с уникальными эпитопами, каждое антитело может быть биотинилировано с использованием коммерчески доступных реагентов (Pierce, Rockford, IL). Связывание биотинилированного mAb может быть детектировано с использованием меченного стрептавидинового зонда. Конкурентные исследования с использованием немеченных моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител могут быть проведены с использованием покрытых ICOS планшетов ELISA, как описано выше. Для определения изотипа очищенных антител, ELISA на определение изотипа могут быть проведены с использованием

реагентов, специфических в отношении антител конкретного изотипа. Например, для определения изотипа человеческого моноклонального антитела, лунки микротитрационного планшета могут быть покрыты 1 мкг/мл антитела против иммуноглобулина человека и оставлены при 4°C в течение ночи. После блокирования 1% BSA планшеты подвергают взаимодействию с 1 мкг/мл или менее испытываемых моноклональных антител или очищенных контролей изотипа, при температуре окружающей среды в течение от одного до двух часов. Затем лунки могут быть подвергнуты взаимодействию либо в отношении IgG1 человека, либо в отношении IgM человека, конъюгированными со щелочной фосфатазой зондами. Планшеты визуализируют и анализируют, как описано выше.

Для тестирования связывания моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими ICOS, может быть использована проточная цитометрия. Вкратце, клеточные линии, экспрессирующие мембраносвязанный ICOS (выращенные в стандартных условиях роста), смешивают с различными концентрациями моноклональных антител в PBS, содержащем 0,1% BSA, и оставляют при 4°C в течение 1 ч. После промывания клетки реагируют с меченым фикоэритрином (PE) анти-IgG антителом в тех же условиях, что и при первичном окрашивании антител. Образцы могут быть проанализированы с помощью прибора FACSscan, в котором свойства прямого светорассеяния и бокового светорассеяния используются для наблюдения за отдельными клетками, с определением связывания меченых антител. Может быть использован альтернативный анализ с использованием флуоресцентной микроскопии (в дополнение или вместо) анализу проточной цитометрии. Клетки могут быть окрашены так же, как описано выше, и исследованы с помощью флуоресцентной микроскопии. Данный способ позволяет визуализировать отдельные клетки, но может обладать пониженной чувствительностью в зависимости от плотности антигена.

Анти-huICOS антитела могут быть дополнительно испытаны на реактивность с антигеном ICOS при помощи вестерн-блота. Вкратце, клеточные экстракты, полученные из клеток, экспрессирующих ICOS, могут быть получены и подвергнуты электрофорезу в додецилсульфатполиакриламидном геле. После электрофореза разделенные антигены переносят на нитроцеллюлозные мембраны, блокируют 20% мышиной сывороткой и зондируют испытываемыми моноклональными антителами. Связывание IgG может быть детектировано с использованием комплекса анти-IgG антитело - щелочная фосфатаза и обнаружено с помощью таблеток субстрата BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Способы анализа аффинности связывания, перекрестной реактивности и кинетики связывания различных анти-ICOS-антител включают стандартные анализы, известные в данной области техники, например, анализ бислойную интерферометрию (BMI) и анализ BIACORE® поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием прибора BIACORE® 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Sweden).

В одном варианте осуществления анти-huICOS антитело специфически связывается с внеклеточной областью человеческого ICOS. В одном варианте осуществления антитело связывается с конкретным доменом (например, функциональным доменом) внутри внеклеточного домена ICOS. В одном варианте осуществления анти-huICOS антитело специфически связывается с внеклеточной областью ICOS человека и внеклеточной областью ICOS яванского макака. В одном варианте осуществления анти-huICOS антитело связывается с человеческим ICOS с высокой аффинностью. VIII. Мультиспецифические молекулы

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, могут представлять собой мультиспецифические, например, биспецифические или триспецифические молекулы. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, такие как мультиспецифические антитела, содержат два или более антигенсвязывающих участка, каждый из которых является специфическим в отношении другого эпитопа. Другой эпитоп может являться частью одного и того же или различных антигенов. В одном варианте осуществления один антигенсвязывающий участок является специфическим в отношении человеческого ICOS, а другой в отношении другого антигена. В одном варианте осуществления анти-huICOS антитело, описанное в настоящем документе, или его антигенсвязывающие фрагменты, связывается с другой антигенсвязывающей молекулой, например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или фрагментом антитела, или лигандом для рецептора), обладающим отличающейся специфичностью связывания, с образованием биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя различными участками связывания или молекулами-мишенями. В одном варианте осуществления антитело, описанное в настоящем документе, дериватизировано или связано с более чем одной другой антигенсвязывающей молекулой с образованием мультиспецифических молекул, которые связываются с более чем двумя различными участками связывания и/или молекулами-мишенями. Таким образом, в настоящем документе обеспечены биспецифические молекулы, содержащие по меньшей мере одну первую специфичность связывания в отношении ICOS и вторую специфичность связывания в отношении второго эпитопа-мишени. В варианте осуществления, описанном в настоящем документе, в котором биспецифическая молекула является мультиспецифической, молекула может дополнительно включать третью специфичность связывания.

В одном варианте осуществления биспецифические молекулы, описанные в настоящем документе, содержат в качестве специфичности связывания по меньшей мере одно антитело или фрагмент антитела,

включая, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv. Антитело может быть также димером легкой цепи или тяжелой цепи, или любого минимального фрагмента антитела, такого как Fv или любая одноцепочечная конструкция, как описано Ladner et al. в патенте США 4946778, содержание которого специально включено в настоящее описание посредством ссылки.

Хотя предпочтительными являются моноклональные антитела человека, другими антителами, которые могут быть использованы в биспецифических молекулах, описанных в настоящем документе, являются мышинные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела

Биспецифические молекулы, описанные в настоящем документе, могут быть получены конъюгацией составляющих специфичностей связывания с использованием способов, известных в данной области техники. Например, каждая специфичность связывания биспецифической молекулы может быть получена отдельно, и затем они могут быть конъюгированы друг с другом. Когда специфичностями связывания являются белки или пептиды, разнообразные связывающие или сшивающие агенты могут быть использованы для ковалентной конъюгации. Примеры сшивающих агентов включают белок А, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)-пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогаксан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см. например, Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Другие способы включают способы, описанные в работе Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83) and Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375). Предпочтительными конъюгирующими агентами являются SATA и сульфо-SMCC, оба доступны от Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Когда специфичностями связывания являются антитела, они могут быть конъюгированы через образование сульфгидрильной связи шарнирных областей C-концов двух тяжелых цепей. В особенно предпочтительном варианте осуществления шарнирная область модифицирована таким образом, что она содержит нечетное число сульфгидрильных остатков, предпочтительно один сульфгидрильный остаток, перед конъюгацией.

Альтернативно, обе специфичности связывания могут быть кодированы в одном и том же векторе и экспрессированы и собраны в одной и той же клетке-хозяине. Данный способ особенно применим, когда биспецифическая молекула имеет комбинацию специфичностей связывания, такую как (mAb×mAb), (mAb×Fab), (Fab× F(ab')₂) или (лиганд×Fab)-слитый белок. Биспецифической молекулой, описанной в настоящем документе, может являться одноцепочечная молекула, содержащая одно одноцепочечное антитело и детерминанту связывания, или одноцепочечная биспецифическая молекула, содержащая две детерминанты связывания. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в патенте США 5260203; патенте США 5455030; патенте США 4881175; патенте США 5132405; патенте США 5091513; патенте США 5476786; патенте США 5013653; патенте США 5258498; и патенте США 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями может быть подтверждено с использованием известных в данной области способов, например, твердофазным иммуоферментным анализом (ELISA), радиоиммуноанализом (RIA), FACS-анализом, биоанализом (например, ингибированием роста) или вестерн-блот-анализом. Каждый из этих анализов, как правило, детектирует присутствие комплексов белок-антитело, представляющих особый интерес, с использованием меченого реагента (например, антитела), специфического в отношении представляющего интерес комплекса. IX. Композиции

Далее обеспечены композиции, например, фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько анти-ICOS антител, или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в настоящем документе, составленных вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Соответственно, композиции согласно настоящему изобретению включают человеческие или гуманизированные анти-huICOS антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты), содержащие последовательности CDR, последовательности переменных областей тяжелой и/или легкой цепи, или полноразмерные последовательности тяжелой и/или легкой цепи, представленные в табл. 35. Композиции согласно настоящему изобретению также включают анти-huICOS антитела, имеющие последовательности, которые являются вариантами последовательностей, представленных в табл. 35. Например, такие антитела могут содержать последовательности, которые по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90 или 95%, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям CDR, последовательностям переменной области тяжелой и/или легкой цепи, или полноразмерным последовательностям тяжелой и/или легкой цепи, представленным в табл. 35.

Такие композиции могут также включать одно антитело или комбинацию (например, два или более различных) антител, или иммуноконъюгаты, или биспецифические молекулы, описанные в настоящем документе. Например, фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, может содержать комбинацию антител (или иммуноконъюгаты, или биспецифические антитела), которые связываются с разными эпитопами на антигене-мишени или которые имеют комплементарные активности.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, также могут быть введены в виде комбинированной терапии, т.е. анти-ICOS антитела в сочетании с другими агентами. Например,

комбинированная терапия может включать анти-ICOS антитело, описанное в настоящем документе, в комбинации по меньшей мере с одним другим противораковым и/или Т-клеточным стимулирующим (например, активирующим) агентом. Примеры терапевтических агентов, которые могут быть использованы в комбинированной терапии, описаны более подробно ниже в разделе о применении антител, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем документе, могут включать другие соединения, лекарственные средства и/или агенты, применяемые для лечения рака. Такие соединения, лекарственные средства и/или агенты могут включать, например, химиотерапевтические лекарственные средства, низкомолекулярные лекарственные средства или антитела, которые стимулируют иммунный ответ на данный вид рака. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит первое антитело, специфическое в отношении анти-huICOS, и второе антитело.

В некоторых вариантах осуществления первое антитело и второе антитело присутствуют в композиции в фиксированной дозе (т.е. в фиксированном соотношении). В других вариантах осуществления эта фиксированная доза лежит в диапазоне между по меньшей мере приблизительно 1:200 и по меньшей мере приблизительно 200:1, по меньшей мере приблизительно 1:150 и по меньшей мере приблизительно 150:1, по меньшей мере приблизительно 1:100 и по меньшей мере приблизительно 100:1, по меньшей мере приблизительно 1:75 и по меньшей мере приблизительно 75:1, по меньшей мере приблизительно 1:50 до и по меньшей мере приблизительно 50:1, по меньшей мере приблизительно 1:25 и по меньшей мере приблизительно 25:1, по меньшей мере приблизительно 1:10 и по меньшей мере приблизительно 10:1, по меньшей мере приблизительно 1:5 и по меньшей мере приблизительно 5:1, по меньшей мере приблизительно 1:4 и по меньшей мере приблизительно 4:1, по меньшей мере приблизительно 1:3 и по меньшей мере приблизительно 3:1 или по меньшей мере приблизительно 1:2 и по меньшей мере приблизительно 2:1 мг анти-huICOS антитела к мг второго антитела. В некоторых вариантах осуществления фиксированная доза составляет по меньшей мере примерно 1:1, примерно 1:2, примерно 1:3, примерно 1:4, примерно 1:5, примерно 1:6, примерно 1:7, примерно 1:8, примерно 1:9, примерно 1:10, примерно 1:15, примерно 1:20, примерно 1:30, примерно 1:40, примерно 1:50, примерно 1:60, примерно 1:70, примерно 1:80, примерно 1:90, примерно 1:100, примерно 1:120, примерно 1:140, примерно 1:160, примерно 1:180 или примерно 1:200 анти-huICOS антитела ко второму антителу. В некоторых вариантах осуществления фиксированная доза составляет по меньшей мере примерно 2:1, примерно 3:1, примерно 4:1, примерно 5:1, примерно 6:1, примерно 7:1, примерно 8:1, примерно 9:1, примерно 10:1, примерно 15:1, примерно 20:1, примерно 30:1, примерно 40:1, примерно 50:1, примерно 60:1, примерно 70:1, примерно 80:1, примерно 90:1, примерно 100:1, примерно 120:1, примерно 140:1, примерно 160:1, примерно 180:1 или примерно 200:1 мг первого антитела к мг второго антитела. Например, в одном варианте осуществления анти-huICOS антитело и второе антитело вводят, как описано в примере 18.

Дополнительные антитела включают, например, одно или несколько из анти-CTLA-4 антитела, анти-PD-1 антитела, анти-PD-L1 антитела, анти-TIGIT антитела, анти-OX40 антитела (также известного как CD134, TNFRSF4, ACT35 и/или TXGP1L), анти-LAG-3 антитела, анти-CD73 антитела, анти-CD137 антитела, анти-CD27 антитела или анти-CSF-1R антитела.

Как используется в настоящем документе, "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. В некоторых вариантах осуществления носитель является подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В некоторых вариантах осуществления носитель является подходящим для внутривенного введения. В других вариантах осуществления носитель является подходящим для подкожного введения. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая анти-ICOS антитело, доставляется подкожно с использованием технологии доставки лекарственного средства Halozyme's ENHANZE®, которая включает рекомбинантный человеческий фермент гиалуронидазу (гHuPH20), который временно расщепляет гиалуронан. В некоторых вариантах осуществления изобретения, технология доставки лекарственного средства ENHANZE® обеспечивает подкожные введения композиций, которые являются более быстрыми по сравнению с внутривенным введением. В других вариантах осуществления в зависимости от пути введения активное соединение, то есть антитело, иммуноконъюгат или биспецифическая молекула, может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические соединения, описанные в настоящем документе, могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходного соединения и не вызывает каких-либо нежелательных токсикологических эффектов (см., например, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Примеры таких солей включают кислотно-аддитивные соли и основно-аддитивные соли. Кислотно-аддитивные соли включают соли, образованные из нетоксичных неорганических кислот, таких

как хлористоводородная кислота, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, иодистоводородная, фосфористая и т.п., а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т.п. Основно-аддитивные соли включают соли, образованные из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также из нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, также может включать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) образующие хелаты металлов агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования материалов покрытий, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и применения поверхностно-активных веществ.

Данные композиции также могут содержать адьюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено как процедурами стерилизации, сурга, так и включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательным включение в композиции изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть осуществлена включением агентов, замедляющих абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Иллюстративные фармацевтически приемлемые носители в настоящем документе, кроме того, включают интерстициальные лекарственные диспергирующие агенты, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, человеческие растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как gHuPH20 (HYLENEX™, Baxter International, Inc.). Некоторые иллюстративные sHASEGP и способы применения, включая gHuPH20, описаны в патентных публикациях США 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном аспекте sHASEGP объединяют с одним или несколькими дополнительными гликозаминогликанами, такими как хондроитиназы.

Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением случаев, когда какая-либо общепринятая среда или агент является несовместимым с активным соединением, рассматривается его применение в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе. В композиции могут быть также включены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях приготовления и хранения. Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, с использованием покрытия, такого как лецитин, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в композиции изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть осуществлена путем включения в композицию агента, который замедляет абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина.

Стерильные инъекционные растворы могут быть приготовлены путем включения активного соединения в требуемом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости с последующей стерилизацией микрофильтрацией. Обычно дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный наполнитель, который содержит дисперсионную среду в качестве основы и требуемые другие ингредиенты из тех, которые описаны выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, предпочтительными способами приготовления являются сушка в вакууме и сушка вымораживанием (лиофилизация).

ция), которые дают порошок активного ингредиента с любым дополнительным желаемым ингредиентом из его предварительно стерильно-отфильтрованного раствора.

Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом-носителем для приготовления отдельной дозированной формы, будет варьироваться в зависимости от подлежащего лечению субъекта и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом-носителем для приготовления отдельной дозированной формы, обычно представляет собой такое количество композиции, которое дает терапевтический эффект. В расчете на сто процентов, такое количество может находиться в диапазоне от около 0,1 до около 99% активного ингредиента, например, от около 0,1 до около 70%, например, от около 1 до около 30% активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

В некоторых вариантах осуществления композиция включает анти-ICOS антитело, такое как антитело ICOS.33 IgG1f S267E, при концентрации 10 мг/мл. Композиция представляет собой стерильный, апирогенный, одноразовый, не содержащий консерванта, изотонический водный раствор для внутривенного введения. Композицию можно вводить в неразбавленном виде или дополнительно разбавлять введением 0,9% раствора хлорида натрия до требуемых концентраций белка перед вливанием. В некоторых вариантах осуществления анти-ICOS антитело включает следующие вспомогательные вещества: L-гистин, L-гистидина гидрохлорид моногидрат, сахарозу, пентетовую кислоту (также известную как диэтиленetriаминпентауксусная кислота), полисорбат 80 и воду для инъекций.

Режимы дозирования подбирают таким образом, чтобы обеспечить оптимальную желаемую ответную реакцию (например, терапевтическую реакцию). Например, может быть введен один болюс, несколько разделенных доз на протяжении времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в зависимости от случаев острой необходимости терапевтической ситуации. Парентеральные композиции особенно предпочтительно составлять в единичных дозированных формах для легкости введения и однородности дозы. Используемая в настоящем документе единичная дозированная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве разовой дозы для субъектов, подвергаемых лечению; каждая единица дозы содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, вместе с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для единичных дозированных форм, описанных в настоящем документе, продиктована (а) уникальными характеристиками активного соединения и конкретным терапевтическим эффектом, который должен быть достигнут, и зависит от них, и (b) ограничениями, присущими в области составления такого активного соединения, в отношении лечения чувствительности у индивидуумов.

Для введения антитела доза может находиться в диапазоне от около 0,0001 до 100 мг/кг и чаще от 0,01 до 5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозы могут составлять 0,3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или находятся в диапазоне 1-10 мг/кг. Альтернативно, введение антитела представляет собой постоянную дозу, которая может варьироваться от 2 до 800 мг, например дозу, составляющую 25, 80, 200 или 400 мг. Иллюстративная схема лечения включает введение один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз каждые четыре недели, один раз в месяц, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца, один раз каждые четыре месяца, один раз каждые пять месяцев или один раз каждые шесть месяцев. В некоторых вариантах осуществления схема лечения включает начальную дозу, а затем поддерживающую дозу в разном количестве дозы при интервальном введении доз.

В некоторых вариантах осуществления два или более моноклональных антител с разными специфичностями связывания вводят одновременно, и в этом случае доза каждого вводимого антитела находится в упомянутых диапазонах. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело вводят во многих случаях. Интервалы между отдельными дозами могут быть, например, недельными, один раз в три недели, один раз в четыре недели, месячными, каждые три месяца или один раз в год. Интервалы могут быть также нерегулярными, в зависимости от измерения уровней в крови антитела к антигену-мишени у пациента. В некоторых вариантах осуществления дозу корректируют для достижения концентрации антитела в плазме примерно 1-1000 мкг/мл и в некоторых способах около 25-300 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления антитело может быть введено в виде состава с замедленным высвобождением. Введение посредством составов с замедленным высвобождением может потребовать менее частого введения. Доза и частота введения варьируются в зависимости от периода полужизни антитела у пациента. Доза и частота введения могут варьироваться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактических применениях вводят относительно низкую дозу при относительно нечастых интервалах на протяжении длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение в течение всей оставшейся жизни. В некоторых вариантах осуществления для терапевтического лечения вводят относительно высокую дозу при сравнительно коротких интервалах. В некоторых вариантах осуществления относительно высокую дозу вводят до тех пор, пока прогрессирование заболевания не уменьшится или не прекратится, например, до тех пор, пока пациент не покажет частичное или полное ослабление симптомов заболевания. В некоторых вариантах осуществления профилактическое лечение проводят у пациента после терапевтического лечения.

Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, могут варьироваться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без проявления токсичности в отношении данного пациента. Выбранный уровень дозы будет зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность описанных в настоящем документе конкретных применяемых композиций или их сложных эфиров, солей или амидов, способ введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, массу и заболевание, общее состояние здоровья, и предыдущую историю болезни подвергаемого лечению пациента, а также подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

"Терапевтически эффективная доза" анти-ICOS антитела, описанного в настоящем документе, предпочтительно приводит к уменьшению выраженности симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждению ухудшения или потери трудоспособности вследствие заболевания. В контексте рака терапевтически эффективная доза предпочтительно предотвращает дальнейшее ухудшение физических симптомов, связанных с раком. Симптомы рака хорошо известны в данной области и включают, например, необычные особенности родинки, изменение внешнего вида родинки, включая асимметрию, границы, цвет и/или диаметр, недавно пигментированные участки кожи, аномальную родинку, затемненную область под ногтем, уплотнение молочной железы, изменения сосков, кисту молочной железы, боль в груди, смерть, потерю массы, слабость, чрезмерную усталость, затрудненное питание, потерю аппетита, хронический кашель, ухудшение одышки, кашель с кровью, кровь в моче, кровь в стуле, тошноту, рвоту, метастазы в печени, метастазы с легких, костные метастазы, брюшную полноту, вздутие, жидкость в брюшной полости, вагинальное кровотечение, запор, вздутие живота, перфорацию толстой кишки, острый перитонит (инфекция, лихорадка, боль), боль, кровь в рвоте, обильную потливость, лихорадку, высокое кровяное давление, анемию, диарею, желтуху, головокружение, озноб, мышечные спазмы, метастазы толстой кишки, метастазы легких, метастазы в мочевом пузыре, метастазы в печени, метастазы в кости, метастазы в почках и метастазы поджелудочной железы, трудности при глотании и т.п. Терапевтическая эффективность может наблюдаться сразу после первого введения агонистического анти-huICOS-моноклонального антитела согласно настоящему изобретению, или же она может наблюдаться только после некоторого периода времени и/или серии доз. Такая задержка эффективности наблюдается только после нескольких месяцев лечения, например, до 6, 9 или 12 месяцев.

Терапевтически эффективная доза может предотвращать или задерживать начало возникновения рака, это может быть желательным, когда присутствуют ранние или предварительные признаки заболевания. Соответственно, любой клинический или биохимический анализ, который контролирует любые из указанных выше признаков, может быть использован для определения того, является ли конкретное лечение терапевтически эффективной дозой для лечения рака. Специалист в данной области сможет определить такие количества на основе таких факторов, как размер субъекта, тяжесть симптомов у субъекта и конкретная композиция или путь введения.

Композицию, описанную в настоящем документе, можно вводить посредством одного или более способов введения с использованием одного или более различных способов, известных в данной области. Как будет понятно специалисту в данной области, способ и/или схема введения будут варьироваться в зависимости от желаемых результатов. Примеры способов введения антител, описанных в настоящем документе, включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутривнутрибрюшинный, подкожный, спинномозговой или другие парентеральные способы введения, например, путем инъекции или инфузии.

Альтернативно, описанное в настоящем документе антитело может вводиться непарентеральным способом, таким как местный, эпидермальный способ или способ введения через слизистую оболочку, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения могут быть составлены с носителями, которые будут защищать соединение против быстрого высвобождения, например, состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие способы изготовления таких составов запатентованы или обычно известны специалистам в данной области. См., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, известных в данной области техники. Например, в предпочтительном варианте осуществления терапевтическая композиция, описанная в настоящем документе, может быть введена с помощью безыгольного устройства для подкожных инъекций, такого как устройства, раскрытые в патентах США 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824; или 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей для при-

менения с анти-huICOS антителами, описанными в настоящем документе, включают патент США 4487603, в котором описан имплантируемый микроинфузионный насос для введения лекарственного средства с контролируемой скоростью; патент США 4486194, в котором раскрыто терапевтическое устройство для введения лекарственного средства через кожу; патент США 4447233, в котором описан насос для инфузии лекарственного средства для доставки лекарственного средства при точной скорости инфузии; патент США 4447224, в котором раскрыто имплантируемое инфузионное устройство для инфузии с переменным током для непрерывной доставки лекарственного средства; патент США 4439196, в котором описана система осмотической доставки лекарственного средства, имеющая многокамерные отделения; и патент США 4475196, в котором описана система осмотической доставки лекарственного средства. Эти патенты включены в настоящий документ в качестве ссылки. Многие другие подобные имплантаты, системы доставки и модули известны специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления анти-huICOS антитела, описанные в настоящем документе, могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить правильное распределение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Для гарантии того, что терапевтические соединения, описанные в настоящем документе, пересекают BBB (если желательно), они могут быть изготовлены, например, в липосомах. В отношении способов получения липосом, см., например, патенты США 4522811; 5374548; и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые селективно транспортируются в специфические клетки или органы и, таким образом, усиливают направленную доставку лекарственного средства (см. например, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Иллюстративные нацеливающие фрагменты включают фолат или биотин (см., например, патент США 5416016, выданный Low et al.); маннозиды (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); антитела (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); рецептор поверхностно-активного белка А (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994; *Immunomethods* 4:273).

В объем настоящего изобретения входят также наборы, содержащие композиции антител, описанных в настоящем документе, (например, антител человека, биспецифических или мультиспецифических молекул, или иммуноконъюгатов) и инструкции по применению. Кроме того, набор содержит по меньшей мере один дополнительный реагент, или одно или несколько дополнительных человеческих антител, описанных в настоящем документе. Наборы могут включать этикетку, указывающую предполагаемое применение содержимого набора. Термин "этикетка" включает любой написанный или записанный материал, поставляемый на наборе или с набором, или который иным образом прилагается к набору.

X. Способы применения

Антитела, композиции антител и способы, описанные в настоящем документе, имеют многочисленные применения *in vitro* и *in vivo*, включающие, например, усиление иммунного ответа путем стимуляции передачи сигнала ICOS. В одном варианте осуществления антитела, описанные в настоящем документе, представляют собой моноклональные человеческие или гуманизированные антитела. В одном варианте осуществления анти-huICOS антитела, описанные в настоящем документе (например, ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644), можно вводить в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или субъектам-людям для усиления иммунитета при различных заболеваниях. В конкретном варианте осуществления анти-huICOS антитела представляют собой агонистические антитела, то есть агонистические анти-huICOS антитела. В настоящем документе предлагаются способы модификации иммунного ответа у субъекта, включающие введение субъекту антитела, описанного в настоящем документе, или его антигенсвязывающего фрагмента, таким образом, что иммунный ответ у субъекта усиливается, стимулируется или повышающе регулируется. В одном варианте осуществления введение анти-huICOS антитела (т.е. агонистического анти-huICOS антитела) в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, усиливает совместную стимуляцию ответов Т-клеток. В одном варианте осуществления введение анти-huICOS антитела в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, стимулирует, усиливает или повышающе регулирует антигенспецифические Т-клеточные ответы на опухоль. Опухоль может представлять собой солидную опухоль или жидкую опухоль, например, гематологическую злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой иммуногенную опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль является неиммуногенной. В некоторых вариантах осуществления опухоль является PD-L1-положительной. В некоторых вариантах осуществления опухоль является PD-L1-отрицательной. Субъект может также быть вируснесущим субъектом, и иммунный ответ усиливается против вируса. В одном варианте осуществления введение анти-huICOS антитела в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, стимулирует, усиливает или повышающе регулирует CD4+ и CD8+ Т-клеточные ответы. Т-клетки могут представлять собой Teff-клетки, например, CD4+ Teff-клетки, CD8+ Teff-клетки, клетки Т-хелперы (T_H) и Т-цитотоксические (T_C) клетки.

В одном варианте осуществления способы приводят к усилению иммунного ответа у субъекта-человека, при этом такое усиление имеет желаемый эффект. В одном варианте осуществления субъектом-человеком являются пациенты-люди, имеющие нарушение, которое может быть подвергнуто лечению путем усиления иммунного ответа, например, иммунного ответа, опосредованного Т-клетками. В

конкретном варианте осуществления пациент-человек имеет рак. В одном варианте осуществления анти-huICOS антитела, описанные в настоящем документе, можно вводить вместе с представляющим интерес антигеном или антиген уже может присутствовать у субъекта, подлежащего лечению, например, опухольнесущего или вируснесущего субъекта. Когда антитела к ICOS вводят вместе с другим агентом, их можно вводить отдельно или одновременно.

Кроме того, обеспечены способы ингибирования роста опухолевой клетки у субъекта, включающие введение субъекту анти-huICOS антитела, описанного в настоящем документе, таким образом, что рост опухолевой клетки ингибируется у субъекта. Также, обеспечены способы лечения хронической вирусной инфекции у субъекта, включающие введение субъекту анти-huICOS антитела, описанного в настоящем документе, таким образом, что хроническая вирусная инфекция излечивается у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления анти-huICOS агонистическое антитело вводят субъекту, например пациенту-человеку, в качестве дополнительной терапии, вспомогательной терапии или неоадьювантной терапии. В некоторых вариантах осуществления лечение субъектов, имеющих рак, анти-huICOS антителом может привести к долгосрочному устойчивому ответу по сравнению с существующей стандартной терапией; долгосрочному выживанию, составляющему по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более лет, выживаемости без рецидивов, составляющей по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более лет. В некоторых вариантах осуществления лечение субъекта, имеющего рак, анти-huICOS антителом предотвращает рецидивы рака или задерживает рецидив рака, например, на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более лет. Лечение анти-ICOS антителом можно применять в качестве терапии первой, второй или последующей линии.

Данные и другие способы, описанные в настоящем документе, обсуждаются более подробно ниже.

Рак

В настоящем документе обеспечены способы лечения субъекта, имеющего рак, включающие введение субъекту анти-huICOS антитела, описанного в настоящем документе, таким образом, что субъекта лечат, например, таким образом, что рост раковых опухолей ингибируется или уменьшается и/или опухоли регрессируют. Анти-huICOS антитело можно применять отдельно для ингибирования роста раковых опухолей. Альтернативно, анти-huICOS антитело можно применять в сочетании с другим агентом, например, с другими иммуногенными агентами, стандартными способами лечения рака или другими антителами, как описано ниже. Также обеспечена комбинация с ингибитором PD-1, таким как анти-PD-1 или анти-PD-L1 антитело. Также обеспечена комбинация с ингибитором CTLA-4, таким как анти-CTLA-4 антитело. Также обеспечена комбинация с ингибитором PD-1 и ингибитором CTLA-4.

В одном аспекте в настоящем документе обеспечены способы лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества анти-huICOS антитела, описанного в настоящем документе, например, гуманизированной формы хомьячьего анти-ICOS антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В одном варианте осуществления анти-huICOS антитело может представлять собой химерное антитело, человеческое антитело или гуманизированное анти-huICOS антитело, например, любое из гуманизированных анти-huICOS антител, описанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления способы лечения рака, описанные в настоящем документе, включают введение гуманизированного анти-huICOS антитела, которое контактирует с человеческим ICOS в одном или нескольких аминокислотных остатках SEQ ID NO: 203 человеческого белка ICOS. В другом варианте осуществления способ включает введение антитела ICOS.33 IgG1f S267E. В другом варианте осуществления способ включает введение композиции, содержащей антитело ICOS.33 IgG1f S267E.

Примеры рака включают, но без ограничения, плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого (SCLC), немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), не NSCLC, глиому, рак желудочно-кишечного тракта, рак почки (например, светлоклеточный рак), рак яичников, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почек (например, почечную карциному (RCC)), рак предстательной железы (например, гормонорезистентную аденокарциному предстательной железы), рак щитовидной железы, нейробластому, рак поджелудочной железы, глиобластому (мультиформную глиобластому), рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак (или карциному) головы и шеи, рак желудка, опухоль зародышевых клеток, педиатрическую саркому, sinonasal natural killer, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому, такую как кожная или внутриглазная злокачественная меланома), рак костей, рак кожи, рак матки, рак анальной области, рак яичек, рак фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак мочевого пузыря, рак полового члена, солидные опухоли детского возраста, рак мочеточника, рак почечной лоханки, неоплазму центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль спинного мозга, рак головного мозга, включая глиому головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, рак эпидермиса, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, индуцированные окружающей средой злокачественные опухоли, включая индуцируемые асбестом, связанные с вирусом злокачественные опухоли (например, опухоль, связанная с вирусом папилломы человека (HPV)) и гематологические злокачественные опухоли, происходящие из любых из двух основных линий клеток крови, то

есть миелоидной клеточной линии (которая продуцирует гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или лимфоидной клеточной линии (которая продуцирует В, Т, NK и плазматические клетки), такие как все типы лейкозов, лимфомы и миеломы, например острый, хронический, лимфоцитарный и/или миелогенный лейкозы, такие как острый лейкоз (ALL), острый миелобластный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелогенный лейкоз (CML), недифференцированный AML (M0), миелобластный лейкоз (M1), миелобластный лейкоз (M2; с клеточным созреванием), промиелоцитарный лейкоз (M3 или M3 вариант [M3V]), миеломоноцитарный лейкоз (M4 или M4 вариант с эозинофилией [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкоз (M6), мегакариобластный лейкоз (M7), выделенная гранулоцитарная саркома и хлорлейкоз; лимфомы, такие как лимфома Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), В-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфоплазмацитоидная лимфома, моноцитотидная В-клеточная лимфома, лимфома ассоциированной со слизистыми оболочками лимфоидной ткани (MALT), анапластическая (например, Ki 1+) крупноклеточная лимфома, Т-клеточная лимфома/лейкоз взрослых, лимфома из клеток мантийной зоны, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, ангиоцентрическая лимфома, кишечная Т-клеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, Т-лимфобластная лимфома из клеток-предшественников, Т-клеточная -лимфобластная лимфома; и лимфобластный лейкоз (T-Lbly/T-ALL), лимфома периферических Т-клеток, лимфобластная лимфома, лимфолифферативные расстройства после трансплантации, истинная гистиоцитарная лимфома, первичная лимфома центральной нервной системы, первичная эффузионная лимфома, лимфобластная лимфома (LBL), гемопозитические опухоли лимфоидного происхождения, острый лимфобластный лейкоз, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфома, лимфома Беркитта, фолликулярная лимфома, диффузная гистиоцитарная лимфома (DHL), иммунобластная крупноклеточная лимфома, лимфобластная лимфома из предшественников В-клеток, кожная Т-клеточная лимфома (CTLC) (также называемая фунгоидный микоз или синдром Сезари), и лимфоплазмацитоидная лимфома (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; миеломы, такие как IgG миелома, миелома легкой цепи, несекретирующая миелома, тлеющая миелома (также называемая ленивой миеломой), одиночная плазмацитома и множественные миеломы, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточная лимфома; гемопозитические опухоли миелоидного происхождения, опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; саркома, тератокарцинома, опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, семиному, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарциному, гемопозитические опухоли лимфоидного происхождения, например, Т-клеточные и В-клеточные опухоли, включая, но без ограничения, Т-клеточные нарушения, такие как Т-пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), включая мелкоклеточный и мозговидный клеточный тип; большой гранулированный лимфоцитарный лейкоз (LGL), предпочтительно Т-клеточного типа; a/d T-NHL гепатоселезеночная лимфома; периферическая/пост-тимус Т-клеточная лимфома (плеоморфная и иммунобластная подтипы); ангиоцентрическая (носовая) Т-клеточная лимфома; рак головы или шеи, рак почки, рак прямой кишки, рак щитовидной железы; острая миелоидная лимфома, а также любые комбинации указанных видов рака. В одном варианте осуществления способы, описанные в настоящем документе, также можно применять для лечения метастатических злокачественных опухолей, рефрактерных злокачественных опухолей (например, рак, рефрактерный к предыдущей иммунотерапии, например, с блокирующим CTLA-4 и/или PD-1 антителом), и рецидивирующих злокачественных опухолей.

В одном варианте осуществления антитело против huICOS можно вводить в виде монотерапии. В одном варианте осуществления агонистическое антитело против huICOS вводят в качестве единственного иммуностимулирующего агента. В одном варианте осуществления агонистическое антитело против человеческого ICOS вводят пациенту с другим агентом. В одном варианте осуществления антитело против huICOS вводят с иммуногенным агентом. В одном варианте осуществления агонистическое антитело против человеческого ICOS вводят в сочетании с противораковой вакциной. В некоторых вариантах осуществления противораковая вакцина содержит раковые клетки, очищенные опухолевые антигены (включая рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al. (2004) J. Immunol. 173:4919-28). В некоторых вариантах осуществления противораковая вакцина представляет собой противораковую пептидную вакцину, которая в некоторых вариантах осуществления представляет собой персонализированную пептидную вакцину. В некоторых вариантах осуществления противораковая пептидная вакцина представляет собой мультивалентный длинный пептид, мультипептид, пептидный коктейль, гибридный пептид или вакцину на основе дендритных клеток, активированных пептидами (см., например, Yamada et al., Cancer Sci, 104:14-21, 2013). В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело против человеческого ICOS можно вводить в сочетании с адьювантом. Неограничивающие примеры противоопухолевых вакцин, которые можно применять, включают пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназа, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF. Разработано много экспериментальных стратегий вакцинации против опухолей (см. Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring:

60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; см. также Restifo, N. и Szol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition). В одной из таких стратегий вакцину готовят с использованием аутологичных или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что эти клеточные вакцины являются наиболее эффективными, когда опухолевые клетки трансдуцированы для экспрессии GM-CSF. Было показано, что GM-CSF является сильным активатором презентации антигена для противоопухолевой вакцинации. Dranoff et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 3539-43.

Другие противораковые вакцины могут включать белки из вирусов, вовлеченных в раковые заболевания человека, таких как папилломавирусы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и саркома капюши, ассоциированная с вирусом герпеса (KHSV). Другой формой опухолевых антигенов, который можно применять в сочетании с ингибированием ICOS, являются очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные из ткани самой опухоли. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток, и такие HSP являются высокоэффективными в отношении доставки в антигенпрезентирующие клетки для индукции противоопухолевого иммунитета (Suot & Srivastava (1995) Science 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) Science 278:117-120).

Дендритные клетки являются сильными антигенпредставляющими клетками, которые могут быть использованы для выработки антигенспецифических ответов. Дендритные клетки могут быть продуцированы *ex vivo* и нагружены разными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle et al. (1998) Nature Medicine 4: 328-332). Дендритные клетки также могут быть трансдуцированы генетическим путем для экспрессии этих опухолевых антигенов. Дендритные клетки были также слиты напрямую с опухолевыми клетками для целей иммунизации (Kugler et al. (2000) Nature Medicine 6:332-336). В качестве способа вакцинации, иммунизацию дендритными клетками можно эффективно сочетать с агонизмом ICOS для активации (высвобождения) более сильных противоопухолевых ответов.

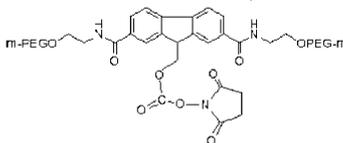
В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело против человеческого ICOS вводят в сочетании со стандартом лечения, например хирургической операцией, облучением и/или химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления анти-ICOS антитело может быть введено в сочетании с химиотерапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления анти-ICOS антитело вводят в сочетании с одним или несколькими из карбоплатина, цисплатина, паклитаксела, наб-паклитаксела, гемцитабина или FOLFOX. В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело против человеческого ICOS может быть введено в сочетании с карбоплатином или наб-паклитакселом. В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело против человеческого ICOS может быть введено в сочетании с карбоплатином и паклитакселом. В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело против человеческого ICOS может быть введено в сочетании с цисплатином и пеметрекседом. В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело против человеческого ICOS может быть введено в сочетании с цисплатином и гемцитабином. В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело против человеческого ICOS может быть введено в сочетании с FOLFOX. В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело против человеческого ICOS может быть введено в сочетании с FOLFIRI. В одном варианте осуществления анти-huICOS антитело вводят в комбинации с декрабозином для лечения меланомы. В некоторых вариантах осуществления цисплатин вводят внутривенно в дозе 100 мг/мл один раз каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело против человеческого ICOS может быть введено в сочетании с доксорубицином (адриамицином), цисплатином, сульфатом блеомицина, кармустином, хлорамбуцилом, дакарбазином и/или циклофосфамидом гидроксимочевинной. В некоторых вариантах осуществления адриамицин вводят внутривенно в дозе 60-75 мг/мл один раз каждые 21 день. В одном варианте осуществления анти-huICOS антитело вводят пациенту-человеку, который является резистентным к лечению по меньшей мере одним лекарственным средством, при этом введение анти-huICOS антитела уменьшает, ослабляет или отменяет резистентность по меньшей мере к одному лекарственному средству.

Комбинированные терапии, отмеченные выше, охватывают комбинированное введение (когда два или более терапевтических агентов включены в один и тот же состав или отдельные составы) и отдельное введение, и в этом случае введение антитела согласно изобретению может осуществляться до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента и/или адьюванта. Антитела согласно изобретению можно также применять в комбинации с лучевой терапией.

Другим примером такой комбинации является анти-huICOS антитело в сочетании с интерлейкином-2 (IL-2). В некоторых вариантах осуществления комбинация анти-huICOS антитела и IL-2 предназначена для лечения различных видов рака, включая лечение почечно-клеточного карциномы и меланомы. В некоторых вариантах осуществления анти-huICOS антитела, обсуждаемые в настоящем документе, комбинированы с агонистом пути IL-2 для лечения различных видов рака. Комбинация включает различные агонисты пути IL-2, такие как описанные в WO 2012/065086 (Nektar Therapeutics) и WO 2015/125159 (Nektar Therapeutics), полное содержание которых включено путем ссылки. В WO 2006/138572 (Nektar Therapeutics) обеспечены конъюгаты, имеющие разлагаемую связь и полимерные реагенты, пригодные

для получения таких конъюгатов, а также способы получения полимерных реагентов и конъюгатов, и включены в данное описание в качестве ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления комбинацию анти-huICOS антитела, как описано в настоящем документе, такого как ICOS.33 IgG1 S267E, и агониста пути IL-2, такого как NKTR-214, вводят пациентам для лечения рака. Как описано более подробно ниже, NKTR-214 получают путем конъюгации в среднем приблизительно шести полиэтиленгликолевых (PEG) реагентов на основе FMOC (флуоренилметилоксикарбонил хлорид), имеющих следующую структуру (mPEG2-C2-fmoc-20K-N-производное гидроксисукцинимидата, 20 кДа, ("mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS")):



с белком, имеющим следующую последовательность из 132 аминокислот:

PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEE 60

ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW 120

ITFSQSIISTLT 132 (SEQ ID NO: 219).

В WO 2012/065086 обеспечены конъюгаты фрагмента IL-2 и одного или нескольких непептидных водорастворимых полимеров, включая полиэтиленгликоль или его производное. В частности, в примере 2 (параграфы 202-204) в WO 2012/065086 описано пэгилирование rIL-2 с помощью mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS с получением структуры mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS, приведенной выше. В примере 1 (параграфы 63-66) в WO 2015/125159 описан расширенный подход к пэгилированию IL-2 с помощью mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS, что приводит к получению RSLAIL-2 (NKTR-214). NKTR-214 представляет собой цитокин, который разработан для направленного воздействия на CD122 (также известная как субъединица рецептора интерлейкина-2, IL-2RP), белок, обнаруженный на определенных клетках иммунной системы (например, CD8+ Т-клетках и NK-клетках), чтобы размножить эти клетки для стимуляции их противоопухолевых эффектов.

В некоторых вариантах осуществления анти-huICOS антитело может быть введено в комбинации с ингибитором ангиогенеза.

Другими комбинированными терапиями, которые могут привести к синергизму с агонизмом ICOS посредством гибели клеток, являются облучение, хирургическая операция и выключение эндокринной функции.

В некоторых вариантах осуществления анти-huICOS антитела, описанные в настоящем документе, можно вводить в сочетании с биспецифическими антителами. Биспецифические антитела могут быть использованы для нацеливания на два отдельных антигена. В одном варианте осуществления анти-huICOS антитела применяют в сочетании с биспецифическими антителами, которые нацеливают экспрессирующие Fc α - или Fc γ -рецептор эффекторные клетки на опухолевые клетки (см., например, патенты США 5922845 и 5837243). Например, биспецифические антитела против рецептора Fc/против опухолевого антигена (например, Her-2/neu) использовали для нацеливания макрофагов на участки опухоли. В одном варианте осуществления Т-клеточное плечо этих ответов увеличивается агонизмом ICOS с помощью анти-huICOS антитела. Альтернативно, антиген может быть доставлен непосредственно к DC с использованием биспецифических антител, которые связываются с опухолевым антигеном и специфическим в отношении дендритных клеток маркером клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления анти-huICOS антитела применяют в комбинации с антителами, которые снижают или инактивируют иммуносупрессивные белки, экспрессируемые опухолью, например антитела против TGF- β , антитела против IL-10 и антитела против лиганда Fas.

Хронические вирусные инфекции

В другом аспекте изобретение, описанное в настоящем документе, обеспечивает способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту анти-huICOS антитела или его антигенсвязывающего фрагмента таким образом, что происходит лечение у субъекта инфекционного заболевания.

Аналогично его применению в отношении опухолей, как обсуждалось выше, опосредованный антителами агонизм ICOS может быть использован самостоятельно или, в качестве адъюванта в комбинации с вакцинами для стимуляции иммунного ответа на патогены, токсины и аутоантигены. Примеры патогенов, для которых данный терапевтический подход может быть особенно полезным, включают патогены, для которых в настоящее время нет эффективной вакцины, или патогены, в случае которых обычные вакцины не до конца эффективны. Патогены включают, но без ограничения, ВИЧ, вирусы гепатита (A, B и C), вирусы гриппа, вирусы герпеса, возбудителей гиагриоза, возбудителей малярии, лейшманиоза, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Агонизм ICOS особенно применим в отношении установленных инфекций, вызываемых такими агентами, таких как ВИЧ, при которых течение инфекции сопровождается изменением антигенов. Данные новые эпитопы распознаются как чужеродные в момент введения антитела против человеческого ICOS, вызывая тем самым сильный ответ Т-клеток.

Некоторые примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, которые могут подвергаться лечению способами, описанными в настоящем документе, включают ВИЧ, вирус гепатит (А, В или С), вирус герпеса (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV, вирус Эпштейна-Барра), аденовирус, вирус гриппа, флавивирусы, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, коронавирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирус эпидемического паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус коварной оспы, вирус HTLV, вирус Денге, папилломавирус, вирус контактного моллюска, полиовирус, вирус бешенства, JC-вирус и вирус арбовирусного энцефалита.

Некоторые примеры патогенных бактерий, вызывающих инфекции, которые могут подвергаться лечению способами, описанными в настоящем документе, включают хламидии, бактерии рода *Rickettsial*, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и гонококки, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Legionella*, дифтерийные бактерии, *Salmonella*, бациллы, возбудитель холеры, возбудитель столбняка, возбудитель ботулизма, возбудитель сибирской язвы, возбудитель чумы, возбудитель лептоспироза и бактерии, вызывающие болезнь Лайма.

Некоторые примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, которые могут подвергаться лечению способами, описанными в настоящем документе, включают *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и т.д.), род *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

Некоторые примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, которые можно лечить способами, описанными в настоящем документе, включают *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

Описанные в настоящем документе способы введения антител против huICOS можно комбинировать с другими формами иммунотерапии, такими как лечение цитокинами (например, интерферонами, GM-CSF, G-CSF, IL-2) или терапия биспецифическими антителами.

Комбинированные терапии

В одном аспекте в настоящем документе обеспечены способы комбинированной терапии, например, для лечения рака, в которых анти-huICOS антитело (например, агонистическое анти-huICOS антитело) вводят совместно с одним или несколькими дополнительными агентами, например, антителами, которые являются эффективными в стимулировании иммунных ответов, чтобы тем самым дополнительно улучшить, стимулировать или активировать иммунные ответы у субъекта. В настоящем документе обеспечены способы лечения или замедления прогрессирования рака у индивидуума, включающие введение индивидууму анти-huICOS антитела (например, ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644) в сочетании с другим противораковым агентом или противоопухолевой терапией. В некоторых вариантах осуществления анти-huICOS антитело может быть введено в сочетании с химиотерапией или химиотерапевтическим агентом, или в сочетании с лучевой терапией или радиотерапевтическим агентом, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления анти-huICOS антитело может быть введено в сочетании. В некоторых вариантах осуществления анти-huICOS антитело может быть введено в сочетании с таргетной терапией или таргетным терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления анти-huICOS антитело может быть введено в сочетании с иммунотерапией или иммунотерапевтическим агентом, например, моноклональным антителом.

В некоторых вариантах осуществления анти-huICOS антитело, описанное в настоящем документе, может быть комбинировано с (i) агонистом другого костимулирующего рецептора и/или (ii) антагонистом ингибирующего сигнала на Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия, содержащая анти-huICOS антитело и агонист и/или антагонист, приводит к усиленному антигенспецифическому Т-клеточному ответу у субъекта. В некоторых вариантах осуществления анти-ICOS антитела, описанные в настоящем документе, могут быть введены в сочетании с агентом, который нацелен на костимулирующие и коингибирующие молекулы, которые являются членами суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), для увеличения иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления анти-ICOS антитела (например, ICOS.33 IgG1f S267E, 17C4, 9D5, 3E8, 1D7 и 2644), описанные в настоящем документе, могут быть введены в сочетании с агентом, который нацелен на лиганд костимулирующей или коингибирующей молекулы. Семейство мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, представляет собой семейство B7, которое включает B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6. Другим семейством мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является TNF-семейство молекул, которые связываются с родственными членами семейства рецепторов TNF, которые включают CD40, CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137/4-1BB, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1,

лимфотоксин α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, лимфотоксин α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR.

В другом аспекте анти-huICOS антитела можно применять в сочетании с антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF; или другие "иммуносупрессивные цитокины", или цитокины, которые стимулируют активацию Т-клеток), для стимуляции иммунного ответа, например, для лечения пролиферативных заболеваний, таких как рак.

В одном аспекте ответы Т-клеток стимулируются комбинацией анти-huICOS антитела, описанного в настоящем документе, и одного или нескольких из (i) антагониста белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибиторы иммунных контрольных точек), такого как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, Galectin 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectin-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4, и (ii) агониста белка, который стимулирует активацию Т-клеток, такого как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD40, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, DR3 и CD28H.

Примеры агентов, которые модулируют один из указанных выше белков и могут быть комбинированы с агонистическими анти-huICOS антителами, например, антителами, описанными в настоящем документе, для лечения рака, включают: YERVOY®/ипилилумаб или тремелилумаб (к CTLA-4), галиксимаб (к B7.1), BMS-936558 (к PD-1), пидилизумаб/CT-011 (к PD-1), KEYTRUDA®/пембролизумаб/MK-3475 (к PD-1), AMP224 (к B7-DC/PD-L2), BMS-936559 (к B7-H1), MPDL3280A (к B7-H1), CP-870893 или дацетузумаб/SGN-40 (CD40 - Kirkwood et al. (2012) C.A Cancer J. Clin. 62:309; Vanderheide & Glennie (2013) Clin. Cancer Res. 19:1035), AMG557 (к B7H2), MGA271 (к B7H3 - WO 11/109400), IMP321 (к LAG-3), урелумаб/BMS-663513 и PF-05082566 (к CD137/4-1BB), варлилумаб/CDX-1127 (к CD27), MEDI-6383 и MEDI-6469 (к OX40), RG-7888 (к OX40L - WO 06/029879), атацицепт (к TACI), муромонаб-CD3 (к CD3), ипилилумаб (к CTLA-4). Соответственно, в одном варианте осуществления анти-huICOS антитело (такое как ICOS.33 IgG1f S267E) комбинируют с анти-PD-1 антителом (таким как ниволумаб) и/или анти-CTLA-4 антителом (таким как ипилилумаб).

Другие молекулы, которые могут быть комбинированы с агонистическими анти-huICOS антителами для лечения рака, включают антагонисты ингибирующих рецепторов на NK-клетках или агонисты активирующих рецепторов на NK-клетках. Например, агонистические анти-huICOS антитела могут быть комбинированы с антагонистами KIR (например, лирилумаб).

Еще другие агенты для комбинированных терапий включают агенты, которые ингибируют или истощают макрофаги или моноциты, включая, но без ограничения, антагонисты CSF-1R, такие как антагонистические антитела CSF-1R, включая RG7155 (WO 11/70024, WO 11/107553, WO 11/131407, WO 13/87699, WO 13/119716, WO 13/132044) или FPA-008 (WO 11/140249; WO 13/169264; WO 14/036357).

В некоторых вариантах осуществления агонистические анти-huICOS антитела, описанные в настоящем документе, используют вместе с одним или несколькими из агонистических агентов, которые лигируют положительные костимулирующие рецепторы, блокирующих агентов, которые ослабляют передачу сигнала через ингибирующие рецепторы, и одним или несколькими агентами, которые системно увеличивают частоту противоопухолевых Т-клеток, агентами, которые преодолевают различные иммуносупрессивные пути в микроокружении опухоли (например, блокируют ингибирующее взаимодействие рецептора (например, взаимодействия PD-L1/PD-1), истощают или ингибируют Tregs (например, с использованием моноклонального анти-CD25 антитела (например, даклизумаб) или путем истощения *ex vivo* покрытых анти-CD25 антителом шариков), ингибируют метаболические ферменты, такие как IDO, или обращают в обратном направлении/предотвращают анергию или истощение Т-клеток) и агентами, которые вызывают врожденную иммунную активацию и/или воспаление в участках опухоли.

В настоящем документе обеспечены способы стимуляции иммунного ответа у субъекта, включающие введение субъекту агониста ICOS, например, антитела, и одного или нескольких дополнительных иммуностимулирующих антител, таких как антагонист PD-1, например, антагонистическое антитело, антагонист PD-L1, например, антагонистическое антитело, антагонист CTLA-4, например, антагонистическое антитело, и/или антагонист LAG3, например, антагонистическое антитело, так что у субъекта стимулируется иммунный ответ, например, для ингибирования роста опухоли или для стимуляции противовирусного ответа. В одном варианте осуществления субъекту вводят агонистическое анти-huICOS антитело и антагонистическое анти-PD-1 антитело. В одном варианте осуществления субъекту вводят агонистическое анти-huICOS антитело и антагонистическое анти-PD-L1 антитело. В одном варианте осуществления субъекту вводят агонистическое анти-huICOS антитело и антагонистическое анти-CTLA-4 антитело. В одном варианте осуществления по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело (например, антагонистическое анти-PD-1 антитело, антагонистическое анти-PD-L1 антитело, антагонистическое анти-CTLA-4 антитело и/или антагонистическое анти-LAGS антитело) представляет собой человеческое антитело. Альтернативно, по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело может представлять собой, например, химерное или гуманизированное антитело (например, полученное из мышинового или хомьячьего анти-PD-1, анти-PD-L1, анти-CTLA-4 и/или анти-LAG3 антитела).

В настоящем документе предлагаются способы лечения гиперпролиферативного заболевания (на-

пример, рака), включающие введение субъекту агонистического анти-huICOS антитела и антагонистического анти-PD-1 антитела. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) или колоректальный рак (CRC). В некоторых вариантах осуществления рак характеризуется опухолями (i) с повышенной экспрессией CD32A/CD32B (FcγRIIa/Fcγ) и/или (ii-a) повышенной экспрессией ICOS, или (ii-b) пониженной экспрессией ICOS-L, например, по данным проточной цитометрии или иммуногистохимии (ИХ). Типы опухолей с экспрессией RNA ICOS от умеренной до высокой включают рак головы и шеи, легких, шейки матки, почек, поджелудочной железы, молочной железы и колоректальный рак, что предполагает, что эти типы рака могут также проявлять повышенную экспрессию белка ICOS. В некоторых вариантах осуществления агонист вводят в субтерапевтической дозе, антитело против PD-1 вводят в субтерапевтической дозе, или оба вводят в субтерапевтической дозе. В настоящем документе обеспечены также способы изменения неблагоприятного события, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим агентом. В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту агонистического анти-huICOS антитела и субтерапевтической дозы анти-PD-1 антитела. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело, и агонистическое анти-huICOS антитело представляют собой гуманизированное моноклональное антитело, такое как антитело, содержащее CDR или вариабельные области антител, описанных в настоящем документе.

Анти-PD-1 антитела, которые известны в данной области, могут быть использованы в описанных в настоящем документе способах. Различные человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD-1 с высокой аффинностью, описаны в патенте США 8008449. Было показано, что человеческие антитела против PD-1, раскрытые в патенте США 8008449, проявляют одну или несколько из следующих характеристик: (a) связываются с человеческим PD-1 со значением K_D , равным 1×10^{-7} М или менее по данным анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием биосенсорной системы Biacore; (b) значительно не связываются с человеческим CD28, CTLA-4 или ICOS; (c) увеличивают пролиферацию Т-клеток в анализе реакции лимфоцитов в смешанной культуре (MLR); (d) увеличивают выработку интерферона- γ в анализе MLR; (e) увеличивают секрецию IL-2 в анализе MLR; (f) связываются с человеческим PD-1 и PD-1 яванского макака; (g) ингибируют связывание PD-L1 и/или PD-L2 с PD-1; (h) стимулируют антигенспецифические ответы памяти; (i) стимулируют ответы антител и (j) ингибируют рост опухолевых клеток *in vivo*. Антитела против PD-1, полезные в настоящем изобретении, включают моноклональные антитела, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и проявляют по меньшей мере одну, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере пять из предшествующих характеристик.

Другие моноклональные анти-PD-1 антитела описаны, например, в патентах США 6808710, 7488802, 8168757 и 8354509, публикациях США 2016/0272708 и публикациях PCT WO 2012/145493, WO 2008/156712, WO 2015/112900, WO 2012/145493, WO 2015/112800, WO 2014/206107, WO 2015/35606, WO 2015/085847, WO 2014/179664, WO 2017/020291, WO 2017/020858, WO 2016/197367, WO 2017/024515, WO 2017/025051, WO 2017/123557, WO 2016/106159, WO 2014/194302, WO 2017/040790, WO 2017/133540, WO 2017/132827, WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/106061, WO 2017/19846, WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/132825 и WO 2017/133540, полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб (также известный как OPDIVO®, 5C4, BMS-936558, MDX-1106 и ONO-4538), пембролизумаб (Merck; также известный как KEYTRUDA®, ламбролизумаб и MK-3475; см. WO 2008/156712), PDR001 (Novartis; см. WO 2015/112900), MEDI-0680 (AstraZeneca; также известный как AMP-514; см. WO 2012/145493), цемплимаб (Regeneron; также известный как REGN-2810; см. WO 2015/112800), JS001 (TAIZHOU JUNSHI PHARMA; см. Si-Yang Liu et al., J. Hematol. Oncol. 10:136 (2017)), BGB-A317 (Beigene; см. WO 2015/35606 и US 2015/0079109), INC5HR1210 (Jiangsu Hengrui Medicine; также известный как SHR-1210; см. WO 2015/085847; Si-Yang Liu et al., J. Hematol. Oncol. 10:136 (2017)), TSR-042 (Tesarо Biopharmaceutical; также известный как ANB011; см. WO2014/179664), GLS-010 (Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals; также известный как WBP3055; см. Si-Yang Liu et al., J. Hematol. Oncol. 10:136 (2017)), AM-0001 (Armo), STI-1110 (Sorrento Therapeutics; см. WO 2014/194302), AGEN2034 (Agenus; см. WO 2017/040790), MGA012 (Macrogenics, см. WO 2017/19846) или IB1308 (Innovent; см. WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/132825 и WO 2017/133540).

В одном варианте осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб. Ниволумаб является ингибитором иммунных контрольных точек, представляющий собой полностью человеческое антитело IgG4 (S228P) против PD-1, которое селективно предотвращает взаимодействие с лигандами PD-1 (PD-L1 и PD-L2), тем самым блокируя понижающую регуляцию противоопухолевых функций Т-клеток (патент США 8008449; Wang et al., 2014 Cancer Immunol Res. 2(9):846-56).

В другом варианте осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой пембролизумаб. Пембролизумаб является гуманизированным моноклональным антителом IgG4 (S228P), направленным про-

тив человеческого рецептора клеточной поверхности PD-1 (программируемой смерти-1 или программируемой клеточной смерти-1). Пембролизумаб описан, например, в патентах США 8354509 и 8900587.

Антитела против PD-1, используемые в раскрытых способах, также включают выделенные антитела, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и перекрестно конкурируют за связывание с человеческим PD-1 с любым анти-PD-1 антителом, раскрытым в настоящем документе, например, ниволумабом (см., например, патенты США 8008449 и 8779105; WO 2013/173223). В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело связывается с тем же эпитопом, что и любое из анти-PD-1 антител, описанных в настоящем документе, например ниволумаб. Способность антител перекрестно конкурировать за связывание с антигеном указывает на то, что эти моноклональные антитела связываются с той же самой областью эпитопа антигена и стерически затрудняют связывание других перекрестно конкурирующих антител с этой конкретной эпитопной областью. Предполагается, что эти перекрестно конкурирующие антитела обладают функциональными свойствами, очень похожими со свойствами эталонного антитела, например, ниволумаба, благодаря их связыванию с той же эпитопной областью PD-1. Перекрестно-конкурирующие антитела могут быть легко идентифицированы на основе их способности перекрестно конкурировать с ниволумабом в стандартных анализах связывания с PD-1, таких как анализ Вiascore, анализы ELISA или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

В некоторых вариантах осуществления антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с человеческим PD-1 или связываются с той же эпитопной областью человеческого анти-PD-1 антитела, что и ниволумаб, являются моноклональными антителами. Для введения субъектам-людям эти перекрестно конкурирующие антитела представляют собой химерные антитела, сконструированные антитела или гуманизированные антитела, или человеческие антитела. Такие химерные, сконструированные, гуманизированные или человеческие моноклональные антитела могут быть получены и выделены способами, хорошо известными в данной области.

Анти-PD-1 антитела, используемые в способах раскрытого изобретения, также включают антигенсвязывающие части вышеуказанных антител. Было наглядно продемонстрировано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела.

Анти-PD-1 антитела, подходящие для использования в раскрытых способах или композициях, представляют собой антитела, которые связываются с PD-1 с высокой специфичностью и аффинностью, блокируют связывание PD-L1 и/или PD-L2 и ингибируют иммуносупрессивный эффект сигнального пути PD-1. В любой из композиций или способов, раскрытых в настоящем документе, анти-PD-1 "антитело" включает антигенсвязывающую часть или фрагмент, который связывается с рецептором PD-1 и проявляет функциональные свойства, аналогичные свойствам целых антител, в отношении ингибирования связывания лиганда и повышающей регуляции иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающая часть перекрестно конкурируют с ниволумабом за связывание с человеческим PD-1.

В настоящем документе обеспечены способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), включающие введение субъекту агонистического анти-huICOS антитела и антагонистического анти-PD-L1 антитела. В некоторых вариантах осуществления агонистическое анти-huICOS антитело вводят в субтерапевтической дозе, анти-PD-L1 антитело вводят в субтерапевтической дозе или оба вводят в субтерапевтической дозе. В настоящем документе обеспечены способы изменения неблагоприятного события, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим агентом, включающие введение агонистического анти-huICOS антитела и субтерапевтической дозы анти-PD-L1 антитела субъекту. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления анти-PD-L1-антитело представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, и агонистическое анти-huICOS антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, такое как антитело, содержащее CDR или переменные области антител, раскрытых в настоящем документе.

Анти-PD-L1 антитела, которые известны в данной области, можно использовать в способах согласно настоящему изобретению. Примеры анти-PD-L1 антител, применимых в способах согласно настоящему изобретению, включают антитела, раскрытые в патенте США 9580507. Было продемонстрировано, что человеческие моноклональные анти-PD-L1 антитела, раскрытые в патенте США 9580507, проявляют одну или несколько из следующих характеристик: (a) связываются с человеческим PD-L1 со значением K_D , равным 1×10^{-7} М или менее по данным SPR с использованием биосенсорной системы Вiascore; (b) увеличивают пролиферацию Т-клеток в анализе смешанной реакции лимфоцитов (Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)); (c) увеличивают выработку интерферона- γ в анализе MLR; (d) увеличивают секрецию IL-2 в анализе MLR; (e) стимулируют ответы антител; и (f) изменяют на обратный эффект регуляторных Т-клеток на эффекторные и/или дендритные Т-клетки. Анти-PD-L1 антитела, используемые в настоящем изобретении, включают моноклональные антитела, которые специфически связываются с человеческим PD-L1 и проявляют по меньшей мере одну, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере пять из предшествующих характеристик.

В некоторых вариантах осуществления анти-PD-L1 антитело представляет собой BMS-936559 (также известное как 12A4, MDX-1105; см., например, патент США 7943743 и WO 2013/173223), атезолизу-

маб (Roche; также известный как TECENTRIQ®; MPDL3280A, RG7446; см. US 8217149; см., также, Herbst et al. (2013) J Clin Oncol 31(suppl): 3000), дурвалумаб (AstraZeneca; также известный как IMFINZI™, MEDI-4736; см. WO 2011/066389), авелумаб (Pfizer; также известный как BAVENCIO®, MSB-0010718C; см. WO 2013/079174), STI-1014 (Sorrento; см. WO 2013/181634), CX-072 (Cytomx; см. WO 2016/149201), KN035 (3D Med/Alphamab; см. Zhang et al., Cell Discov. 7:3 (March 2017), LY3300054 (Eli Lilly Co.; см., например, WO 2017/034916) или CK-301 (Checkpoint Therapeutics; см. Gorelik et al., AACR:Abstract 4606 (Apr 2016)).

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 представляет собой атезолизумаб (TECENTRIQ®). Атезолизумаб является полностью гуманизированным моноклональным антителом IgG1 против PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 представляет собой дурвалумаб (IMFINZI™). Дурвалумаб представляет собой человеческое моноклональное антитело IgG1-каппа против PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 представляет собой авелумаб (BAVENCIO®). Авелумаб представляет собой человеческое моноклональное антитело IgG1-лямбда против PD-L1.

В других вариантах осуществления моноклональное анти-PD-L1 антитело представляет собой 28-8, 28-1, 28-12, 29-8, 5H1 или любую их комбинацию.

Анти-PD-L1 антитела, используемые в раскрытых способах, также включают выделенные антитела, которые специфически связываются с PD-L1 человека и перекрестно конкурируют за связывание с человеческим PD-L1 с любым анти-PD-L1 антителом, раскрытым в настоящем документе, например, атезолизумабом, дурвалумабом и/или авелумабом. В некоторых вариантах осуществления анти-PD-L1 антитело связывается с тем же эпитопом, что и любое из анти-PD-L1 антител, описанных в настоящем документе, например атезолизумаб, дурвалумаб и/или авелумаб. Способность антител перекрестно конкурировать за связывание с антигеном указывает на то, что эти антитела связываются с одной и той же эпитопной областью антигена и стерически затрудняют связывание других перекрестно конкурирующих антител с этой конкретной эпитопной областью. Предполагается, что эти перекрестно конкурирующие антитела имеют функциональные свойства, очень похожие на свойства эталонного антитела, например атезолизумаба и/или авелумаба, благодаря их связыванию с той же эпитопной областью PD-L1. Перекрестно конкурирующие антитела могут быть легко идентифицированы на основании их способности перекрестно конкурировать с атезолизумабом и/или авелумабом в стандартных анализах связывания PD-L1, таких как анализ Вiasoge, анализы ELISA или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

В некоторых вариантах осуществления антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с человеческим PD-L1 или связываются с той же эпитопной областью человеческого анти-PD-L1 антитела, что и атезолизумаб, дурвалумаб и/или авелумаб, являются моноклональными антителами. Для введения субъектам-людям эти перекрестно конкурирующие антитела представляют собой химерные антитела, сконструированные антитела или гуманизированные антитела, или человеческие антитела. Такие химерные, сконструированные, гуманизированные или человеческие моноклональные антитела могут быть получены и выделены способами, хорошо известными в данной области.

Анти-PD-L1 антитела, используемые в способах раскрытого изобретения, также включают антиген-связывающие части вышеуказанных антител. Было наглядно продемонстрировано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела.

Анти-PD-L1 антитела, подходящие для использования в раскрытых способах или композициях, представляют собой антитела, которые связываются с PD-L1 с высокой специфичностью и аффинностью, блокируют связывание PD-1 и ингибируют иммуносупрессивный эффект сигнального пути PD-1. В любой из композиций или в любом из способов, раскрытых в настоящем документе, "антитело" против PD-L1 включает антигенсвязывающую часть или фрагмент, который связывается с PD-L1 и проявляет функциональные свойства, аналогичные свойствам целых антител, в отношении ингибирования связывания рецептора и повышающей регуляции иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающая часть перекрестно конкурирует с атезолизумабом, дурвалумабом и/или авелумабом за связывание с человеческим PD-L1.

В одном варианте осуществления агонистическое анти-huICOS антитело согласно настоящему изобретению комбинировано с антагонистом сигнализации PD-1/PD-L1, таким как антагонист PD-1 (например, ниволумаб, также известный как MDX1106, как описано в WO 06/121168) или антагонист PD-L1, в комбинации с третьим иммунотерапевтическим агентом (например, анти-ICOS антителом, таким как ICOS.33 IgG1f S267E, в сочетании с ниволумабом и ипилимумабом). В одном варианте осуществления третий иммунотерапевтический агент представляет собой антагонистическое антитело к CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитело представляет собой YERVOY® (ипилиумаб или антитело 10D1, описанное в публикации PCT WO 01/14424), или тремелиумаб (ранее тицилиумаб, CP-675,206). В одном варианте осуществления третий иммунотерапевтический агент представляет собой антагонист GITR или антагонист OX-40, такой как антитела против GITR или против OX40, раскрытые в

настоящем документе. В одном варианте осуществления третий иммунотерапевтический агент представляет собой агонист G1TR, такой как агонистическое антитело G1TR. Подходящие антитела к G1TR включают, например, BMS-986153, BMS-986156, TRX-518 (WO 06/105021, WO 09/009116) and MK-4166 (WO11/028683). В одном варианте осуществления третий иммунотерапевтический агент представляет собой антагонист IDO. Подходящие антагонисты IDO включают, например, INCB-024360 (WO 2006/122150, WO 07/75598, WO 08/36653, WO 08/36642), индоксимод или NLG-919 (WO 09/73620, WO 09/1156652, WO 11/56652, WO 12/142237).

В настоящем документе обеспечены способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), включающие введение субъекту агонистического анти-huICOS антитела, описанного в настоящем документе, и антагонистического антитела к CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления агонистическое анти-huICOS антитело вводят в субтерапевтической дозе, анти-CTLA-4 антитело вводят в субтерапевтической дозе или оба вводят в субтерапевтической дозе. В настоящем документе обеспечены способы изменения неблагоприятного события, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим агентом, включающие введение агонистического анти-huICOS антитела и субтерапевтической дозы анти-CTLA-4 антитела субъекту. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек.

Анти-CTLA-4 антитела, которые известны в данной области, можно применять в способах согласно настоящему изобретению. Анти-CTLA-4 антитела согласно настоящему изобретению связываются с человеческим CTLA-4 таким образом, что нарушается взаимодействие CTLA-4 с человеческим рецептором B7. Поскольку взаимодействие CTLA-4 с B7 преобразовывает сигнал, приводя к инактивации Т-клеток, несущих рецептор CTLA-4, нарушение взаимодействия эффективно индуцирует, усиливает или продлевает активацию таких Т-клеток, тем самым индуцируя, усиливая или продлевая иммунный ответ.

Человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с CTLA-4 с высокой аффинностью, раскрыты в патенте США 6984202. Другие моноклональные антитела против CTLA-4 описаны, например, в патентах США 5977318, 6051227, 6883736 и 7034121, а также в международных публикациях WO 2012/122444, WO 2007/113648, WO 2016/196237 и WO 2000/037504, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Было показано, что человеческие моноклональные анти-CTLA-4 антитела, раскрытые в патенте США 6984202, проявляют одну или несколько из следующих характеристик: (а) специфически связываются с человеческим CTLA-4 с аффинностью связывания, выраженной в виде равновесной константы ассоциации (K_a), составляющей по меньшей мере около 10^7 M^{-1} или около 10^9 M^{-1} , или примерно от 10^{10} M^{-1} до 10^{11} M^{-1} , или выше, по данным анализа на Biacore; (b) кинетическая константа ассоциации (k_a) составляет по меньшей мере около 10^3 , около 10^4 или около $10^5 \text{ м}^{-1} \text{ с}^{-1}$; (c) кинетическая константа диссоциации (k_d) составляет по меньшей мере около 10^3 , около 10^4 или около $10^5 \text{ м}^{-1} \text{ с}^{-1}$ и (d) ингибирует связывание CTLA-4 с B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86). Анти-CTLA-4 антитела, применимые для настоящего изобретения, включают моноклональные антитела, которые специфически связываются с человеческим CTLA-4 и проявляют по меньшей мере одну, по меньшей мере две или по меньшей мере три из предшествующих характеристик.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой ипилимумаб (также известный как YERVOY®, MDX-010, 10D1; см. патент США 6984202), МК-1308 (Merck, AGEN-1884 (Agenus Inc.; см. WO 2016/196237) или тремелиумаб (AstraZeneca; также известный как тицилиумаб, CP-675,206; см. WO 2000/037504 и Ribas, Update Cancer Ther. 2(3): 133-39 (2007)). В конкретных вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитело представляет собой ипилимумаб.

В конкретных вариантах осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой ипилимумаб для применения в способах, раскрытых в настоящем документе. Ипилимумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG1, которое блокирует связывание CTLA-4 с его лигандами B7, тем самым стимулируя активацию Т-клеток и улучшая общую выживаемость (OS) у пациентов с прогрессирующей меланомой.

В конкретных вариантах осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой тремелиумаб.

В конкретных вариантах осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой МК-1308.

В конкретных вариантах осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой AGEN-1884.

Анти-CTLA-4 антитела, используемые в раскрытых способах, также включают выделенные антитела, которые специфически связываются с человеческим CTLA-4 и перекрестно конкурируют за связывание с человеческим CTLA-4 с любым анти-CTLA-4 антителом, раскрытым в настоящем документе, например, ипилимумабом и/или тремелиумабом. В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитело связывается с тем же эпитопом, что и любое из анти-CTLA-4 антител, описанных в настоящем документе, например, ипилимумабом и/или тремелиумабом. Способность антител перекрестно конкурировать за связывание с антигеном указывает на то, что эти антитела связываются с одной и той же эпитопной областью антигена и стерически затрудняют связывание других перекрестно конкурирующих антител с этой конкретной эпитопной областью. Предполагается, что эти перекрестно конкурирующие антитела имеют функциональные свойства, очень схожие со свойствами эталонного антитела, например, ипилимумаба и/или тремелиумаба, благодаря их связыванию с той же эпитопной областью CTLA-4. Перекрестно конкурирующие антитела могут быть легко идентифицированы на основании их способно-

сти перекрестно конкурировать с ипилимумабом и/или тремелимумабом в стандартных анализах связывания CTLA-4, таких как анализ на Bioss, анализы ELISA или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

В некоторых вариантах осуществления антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с человеческим CTLA-4 или связываются с той же эпитопной областью человеческого анти-CTLA-4 антитела, что и ипилимумаб и/или тремелимумаб, представляют собой моноклональные антитела. Для введения субъектам-людям эти перекрестно конкурирующие антитела представляют собой химерные антитела, сконструированные антитела или гуманизированные антитела или человеческие антитела. Такие химерные, сконструированные, гуманизированные или человеческие моноклональные антитела могут быть получены и выделены способами, хорошо известными в данной области.

Анти-CTLA-4 антитела, применимые в способах раскрытого изобретения, также включают антигенсвязывающие части вышеуказанных антител. Было наглядно продемонстрировано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела.

Анти-CTLA-4 антитела, подходящие для использования в раскрытых способах или композициях, представляют собой антитела, которые связываются с CTLA-4 с высокой специфичностью и аффинностью, блокируют активность CTLA-4 и нарушают взаимодействие CTLA-4 с человеческим рецептором B7. В любой из композиций или в любом из способов, раскрытых в настоящем документе, "антитело" против CTLA-4 включает антигенсвязывающую часть или фрагмент, который связывается с CTLA-4 и проявляет функциональные свойства, схожие со свойствами целых антител в отношении ингибирования взаимодействия CTLA-4 с человеческим рецептором B7 и повышающей регуляции иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающая часть перекрестно конкурируют с ипилимумабом и/или тремелимумабом за связывание с человеческим CTLA-4.

В одном варианте осуществления агонистическое анти-huICOS антитело согласно настоящему изобретению комбинировано с анти-CTLA-4 антителом в сочетании с третьим иммунотерапевтическим агентом. В одном варианте осуществления третий иммунотерапевтический агент представляет собой антагонист G1TR или антагонист OX-40, такой как антитела против G1TR или против OX40, раскрытые в настоящем документе. В одном варианте осуществления третий иммунотерапевтический агент представляет собой агонист G1TR, такой как агонистическое антитело к G1TR. Подходящие антитела к G1TR включают, например, BMS-986153, BMS-986156, TRX-518 (WO 06/105021, WO 09/009116) и MK-4166 (WO 11/028683). В одном варианте осуществления третий иммунотерапевтический агент представляет собой антагонист IDO. Подходящие антагонисты IDO включают, например, INCB-024360 (WO 2006/122150, WO 07/75598, WO 08/36653, WO 08/36642), индоксимод или NLG-919 (WO 09/73620, WO 09/1156652, WO 11/56652, WO 12/142237).

В настоящем документе обеспечены способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), включающие введение субъекту агонистического анти-huICOS антитела и анти-LAG-3 антитела. В других вариантах осуществления агонистическое анти-huICOS антитело вводят в субтерапевтической дозе, анти-LAG-3 антитело вводят в субтерапевтической дозе или оба вводят в субтерапевтической дозе. В настоящем документе обеспечены способы изменения неблагоприятного события, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим средством, включающие введение агонистического анти-huICOS антитела и субтерапевтической дозы анти-LAG-3 антитела субъекту. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, и агонистическое анти-huICOS антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, такое как антитело, содержащее CDR или переменные области антител, раскрытых в настоящем документе. Примеры анти-LAG3 антител включают антитела, содержащие CDR или переменные области антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5, которые описаны в патентных публикациях США US 2011/0150892 и WO 2014/008218. В одном варианте осуществления анти-LAG-3 антитело представляет собой BMS-986016. Другие анти-LAG-3 антитела, которые можно использовать, включают IMP731, описанное в US 2011/007023, или IMP-321. Анти-LAG-3 антитела, которые конкурируют или связываются с тем же эпитопом, что и любое из этих антител, также можно использовать в комбинированных способах лечения.

В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело связывается с человеческим LAG-3 с K_D 5×10^{-8} М или менее, связывается с человеческим LAG-3 с K_D 1×10^{-8} М или менее, связывается с человеческим LAG-3 с K_D 5×10^{-9} М или менее, или связывается с человеческим LAG-3 с K_D в диапазоне от 1×10^{-8} М до 1×10^{-10} М или менее.

Введение агонистических анти-huICOS антител, описанных в настоящем документе, и антагонистов, например антагонистических антител, к одному или нескольким вторым антигенам-мишеням, таким как LAG-3 и/или CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, может усиливать иммунный ответ на раковые клетки у пациента. Виды злокачественных опухолей, рост которых может быть ингибирован с использованием антител согласно настоящему раскрытию, включают виды рака, обычно отвечающие на иммунотерапию. Примеры видов рака для лечения с помощью комбинированной терапии, описанной в настоя-

щем документе, включают, но без ограничения, перечисленные выше при обсуждении монотерапии агонистическими анти-huICOS антителами.

В некоторых вариантах осуществления комбинацию терапевтических антител, обсуждаемых в настоящем документе, можно вводить одновременно в виде единой композиции в фармацевтически приемлемом носителе или одновременно в виде отдельных композиций, в которых каждое антитело находится в фармацевтически приемлемом носителе. В другом варианте осуществления комбинацию терапевтических антител можно вводить последовательно. Например, анти-CTLA-4 антитело и агонистическое анти-huICOS антитело можно вводить последовательно, например, анти-CTLA-4 антитело вводят первым и агонистическое анти-huICOS антитело вводят вторым, или агонистическое анти-huICOS антитело вводят первым и анти-CTLA-4 антитело вводят вторым. Дополнительно или альтернативно, анти-PD-1 антитело и агонистическое анти-huICOS антитело можно вводить последовательно, например, анти-PD-1 антитело вводят первым и агонистическое анти-huICOS антитело вводят вторым, или агонистическое анти-huICOS антитело вводят первым и анти-PD-1 антитело вводят вторым. Дополнительно или альтернативно, анти-PD-L1 антитело и агонистическое анти-huICOS антитело можно вводить последовательно, например, анти-PD-L1 антитело вводят первым и агонистическое анти-huICOS антитело вводят вторым, или агонистическое анти-huICOS антитело вводят первым и анти-PD-L1 антитело вводят вторым. Дополнительно или альтернативно, анти-LAG-3 антитело и агонистическое анти-huICOS антитело можно вводить последовательно, например, анти-LAG-3 антитело вводят первым и агонистическое анти-huICOS антитело вводят вторым, или агонистическое анти-huICOS антитело вводят первым и анти-LAG-3 антитело вводят вторым.

Кроме того, если вводят последовательно более чем одну дозу комбинированной терапии, порядок последовательного введения может быть обратным или может сохраняться один и тот же порядок введения в каждой временной точке введения, последовательные введения могут быть комбинированы с совместными введениями или любой их комбинацией. Например, первое введение комбинации анти-CTLA-4 антитела и агонистического анти-huICOS антитела может быть совместным, второе введение может быть последовательным с анти-CTLA-4 антителом первым и агонистическим анти-huICOS антителом вторым, и третье введение может быть последовательным с агонистическим анти-huICOS антителом первым и анти-CTLA-4 антителом вторым и т.д. Дополнительно или альтернативно первое введение комбинации анти-PD-1 антитела и агонистического анти-huICOS антитела может быть совместным, второе введение может быть последовательным с анти-PD-1 антителом первым и агонистическим анти-huICOS антителом вторым, и третье введение может быть последовательным с агонистическим анти-huICOS антителом первым и анти-PD-1 антителом вторым и т.д. Дополнительно или альтернативно, первое введение комбинации анти-PD-L1 антитела и агонистического анти-huICOS антитела может быть совместным, второе введение может быть последовательным с анти-PD-L1 антителом и агонистическим анти-huICOS антителом вторым, и третье введение может быть последовательным с агонистическим анти-huICOS антителом первым и анти-PD-L1 антителом вторым и т.д. Дополнительно или альтернативно, первое введение комбинации анти-LAG-3 антитела и агонистического анти-huICOS антитела может быть совместным, второе введение может быть последовательным с анти-LAG-3 антителом первым и агонистическим анти-huICOS антителом вторым, и третье введение может быть последовательным с агонистическим анти-huICOS антителом первым и анти-LAG-3 антителом вторым и т.д. Другая репрезентативная схема дозирования может включать первое введение, которое является последовательным с агонистическим анти-huICOS антителом первым и анти-CTLA-4 антителом вторым (и/или анти-PD-1 антителом и/или анти-PD-L1 антителом, и/или анти-LAG-3 антителом) вторым, и следующие введения могут быть одновременными.

В одном варианте осуществления агонистическое анти-huICOS антитело в качестве единственного иммунотерапевтического агента или комбинацию агонистического анти-huICOS антитела и одного или нескольких дополнительных иммунотерапевтических антител (например, анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1, и/или анти-PD-L1, и/или анти-LAG-3 антитело) можно дополнительно комбинировать с иммуногенным агентом, таким как раковые клетки, очищенные опухолевые антигены (включая рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетки и клетки трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Неограничивающие примеры противоопухолевых вакцин, которые можно применять, включают пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназу, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (обсуждаемые далее ниже). Агонист ICOS и одно или несколько дополнительных антител (например, блокада CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3) также можно дополнительно комбинировать со стандартными терапиями рака. Например, агонист ICOS и одно или несколько дополнительных антител (например, блокада CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3) можно комбинировать с химиотерапевтическими схемами лечения. В одном варианте осуществления агонистическое анти-huICOS антитело вводят пациенту с анти-CTLA-4 антителом и/или анти-PD-1 антителом, и/или анти-PD-L1 антителом, и/или анти-LAG-3 антителом в сочетании с декарбазином для лечения меланомы. В одном варианте осуществления агонистическое анти-huICOS антитело вводят пациенту с анти-CTLA-4 антителом и/или анти-PD-1 антителом, и/или анти-PD-L1 антителом,

и/или анти-LAG-3 антителом в сочетании с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения рака, включая меланому. Без привязки к какой-либо теории, комбинированное использование агонизма ICOS и антагонизма CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 с химиотерапией может функционировать синергетически, поскольку цитотоксическое действие большинства химиотерапевтических соединений может привести к повышению уровней опухолевого антигена на пути презентации антигена. Другие комбинированные терапии, которые могут приводить к синергизму с комбинированным агонизмом ICOS с антагонизмом CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3, или без него, посредством цитотоксичности, включают облучение, хирургическое вмешательство или выключение эндокринной функции. В другом варианте осуществления ингибиторы ангиогенеза могут быть комбинированы с анти-huICOS антителом и антагонизмом CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3.

В одном варианте осуществления анти-huICOS антитело в качестве единственного иммунотерапевтического агента или комбинацию анти-huICOS антитела и антител, блокирующих CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3, также можно применять в сочетании с биспецифическими антителами, которые нацеливают экспрессирующие рецептор Fc α или Fc γ эффекторные клетки на опухолевые клетки. См., например, патенты США 5922845 и 5837243. Биспецифические антитела могут быть использованы для нацеливания на два отдельных антигена. Т-клеточная ветвь этих ответов будет увеличиваться с использованием комбинирования агонизма ICOS и блокады CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3.

В одном варианте осуществления анти-ICOS антитело в качестве единственного иммунотерапевтического агента или комбинацию анти-ICOS антитела и дополнительного иммуностимулирующего агента, например, анти-CTLA-4 антитела и/или анти-PD-1 антитела, и/или анти-PD-L1 антитела, и/или анти-LAG-3 антитела можно использовать в сочетании с противоопухолевым агентом, таким как RITUXAN® (ритуксимаб), HERCEPTIN® (трастузумаб), BEXXAR® (тоситумомаб), ZEVALIN® (ибритумомаб), CAMPATH® (алемтузумаб), LYMPHOCIDE® (эпртузумаб), AVASTIN® (бевацизумаб) и TARCEVA® (эрлотиниб). В качестве примера и без привязки к какой-либо теории лечение противораковым антителом или противораковым антителом, конъюгированным с токсином, может привести к гибели раковых клеток (например, опухолевых клеток), что может потенцировать иммунный ответ, опосредованный иммуностимулирующим агентом, например анти-ICOS антителом, анти-TIGIT антителом, анти-CTLA-4 антителом, анти-PD-1 антителом, анти-PD-L1 антителом или анти-LAG-3 антителом. В одном варианте осуществления лечение гиперпролиферативного заболевания (например, раковой опухоли) может включать противораковый агент, например, антитело, в комбинации с агонистическим анти-huICOS антителом и, необязательно, дополнительным иммуностимулирующим агентом, например, анти-CTLA-4 антителом и/или анти-PD-1 антителом, и/или анти-PD-L1 антителом, и/или анти-LAG-3 антителом, одновременно или последовательно, или любой их комбинации, которые могут потенцировать противоопухолевые иммунные ответы хозяином.

В настоящем документе обеспечены способы уменьшения, ослабления или устранения неблагоприятного события, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания (например, рака) иммуностимулирующим агентом, включающие введение субъекту агонистического анти-huICOS антитела с анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1, и/или анти-PD-L1, и/или анти-LAG-3 антителом или без него. В одном варианте осуществления способ обеспечивает уменьшение встречаемости индуцированных иммуностимулирующим терапевтическим антителом колита или диареи путем введения пациенту неабсорбируемого стероида. Как используется в настоящем документе, "неабсорбируемый стероид" представляет собой глюкокортикоид, который проявляет экстенсивный метаболизм первого прохождения таким образом, что после метаболизма в печени биодоступность стероида является низкой, т.е. меньше, чем около 20%. В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, неабсорбируемым стероидом является будесонид. Будесонид является локально действующим глюкокортикостероидом, который экстенсивно метаболизируется, прежде всего, печенью после перорального приема. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) является зависимой от pH и времени пероральной формой будесонида, разработанной для оптимизации доставки лекарственного средства в подвздошную кишку и через ободочную кишку. ENTOCORT EC® одобрен в США для лечения болезни Крона легкой и средней степени тяжести, включающей подвздошную и/или восходящую ободочную кишку. Обычная пероральная доза ENTOCORT EC® для лечения болезни Крона составляет от 6 до 9 мг/сутки. ENTOCORT EC® высвобождается в кишечнике перед абсорбцией и сохраняется в слизистой оболочке кишечника. После прохождения его через ткань-мишень слизистой оболочки кишечника, ENTOCORT EC® интенсивно метаболизируется системой цитохрома P450 в печени до метаболитов с незначительной глюкокортикоидной активностью. Таким образом, биодоступность является низкой (около 10%). Низкая биодоступность будесонида приводит к улучшенному терапевтическому индексу по сравнению с другими глюкокортикоидами с менее экстенсивным метаболизмом первого прохождения. Будесонид приводит к меньшим побочным эффектам, включая меньшую гипоталамическую-гипофизарную супрессию, чем у системно действующих кортикостероидов. Однако продолжительное введение ENTOCORT EC® может привести к системным эффектам глюкокортикоидов, таким как супрессия гиперкортицизма и надпочечников. См. PDR 58th ed. 2004; 608-

610.

В одном варианте осуществления анти-ICOS антитело с антагонистом CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3, или без него (т.е. иммуностимулирующих терапевтических антител против ICOS и необязательно анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1, и/или анти-PD-L1, и/или анти-LAG-3 антител) в сочетании с неабсорбируемым стероидом можно дополнительно комбинировать с салицилатом. Салицилаты включают агенты 5-ASA, такие как, например, сульфасалазин (AZULFIDINE®, Pharmacia & UpJohn); олсалазин (DIPENTUM®, Pharmacia & UpJohn); балсалазид (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); и месаламин (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

В соответствии со способами, описанными в настоящем документе, салицилат, вводимый в комбинации с анти-huICOS антителом, вместе или без антител против CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3, и неабсорбируемым стероидом, может включать любое перекрывающееся или последовательное введение салицилата и неабсорбируемого стероида с целью уменьшения заболеваемости колитом, индуцированным иммуностимулирующими антителами. Таким образом, например, способы уменьшения заболеваемости колитом, индуцированным иммуностимулирующими антителами, описанными в настоящем документе, включают введение салицилата и неабсорбируемого стероида одновременно или последовательно (например, салицилат вводят через 6 часов после введения неабсорбируемого стероида), или любой их комбинации. Кроме того, салицилат и неабсорбируемый стероид можно вводить одним и тем же путем (например, оба вводят перорально) или различными способами (например, салицилат вводят перорально, а неабсорбируемый стероид вводят ректально), которые могут отличаться от способов, используемых для введения анти-huICOS и анти-CTLA-4, и/или анти-PD-1, и/или анти-PD-L1, и/или анти-LAG-3 антител.

Агонистические анти-huICOS антитела и комбинированные терапии антителами, описанные в настоящем документе, могут быть также использованы в сочетании с другими хорошо известными терапиями, которые выбраны из-за их конкретной применимости в отношении показания, подлежащего лечению (например, рак). Комбинации агонистических анти-huICOS антител, описанных в настоящем документе, могут быть использованы последовательно с известным фармацевтически приемлемым агентом(ами).

В одном варианте осуществления описанные в настоящем документе агонистические анти-huICOS антитела и терапии с комбинированными антителами могут быть использованы в комбинации (например, одновременно или по отдельности) с дополнительным лечением, таким как облучение, химиотерапия (например, с использованием камптотецина (CPT-11), 5-фторурацила (5-FU), цисплатина, доксорубицина, иринотекана, паклитаксела, гемцитабина, цисплатина, паклитаксела, карбоплатин/паклитаксела (таксола), доксорубицина, 5-fu или камптотецина + аро21/TRAIL (6X combo)), одним или несколькими ингибиторами протеасом (например, бортезомиб или MG132), одним или несколькими ингибиторами Bcl-2 (например, антагонистами BH3I-2' (ингибитор bcl-xl), ингибиторами индоламин-диоксигеназы-1 (IDO1) (например, INCB24360), AT-101 (R-(-)-производное госсипола), АВТ-263 (малая молекула), GX-15-070 (обатоклакс) или MCL-1 (белок-1 дифференцировки клеток миелоидного лейкоза)), антагонистами iAP (ингибитор белков апоптоза) (например, smac7, smac4, низкомолекулярный миметик smac, синтетические smac-пептиды (см. Fulda et al., Nat Med 2002;8:808-15), ISIS23722 (LY2181308) или AEG-35156 (GEM-640)), ингибиторами HDAC (гистондеацетилазы), антителами к CD20 (например, ритуксимаб), ингибиторами ангиогенеза (например, бевацизумаб), антиангиогенными средствами, нацеленными на VEGF и VEGFR (например, AVASTIN®), синтетическими тритерпеноидами (см. Hu et al., Cancer Research 2005;65:4799-808), модуляторами c-FLIP (клеточный ингибирующий FLICE белок) (например, природные и синтетические лиганды PPAR γ (активированный пролифератором пероксисом рецептор γ), 5809354 или 5569100), ингибиторами киназы (например, сорафениб), трастузумаб, цетуксимаб, темсиролimus, ингибиторами mTOR, такими как рапамицин и темсиролimus, бортезомиб, ингибиторами JAK2, ингибиторами HSP90, ингибиторами PI3K-AKT, леналидомид, ингибиторами GSK3P, ингибиторами IAP и/или генотоксическими лекарственными средствами.

Описанные в настоящем документе агонистические анти-huICOS антитела и терапии с комбинированными антителами могут дополнительно использоваться в комбинации с одним или несколькими антипролиферативными цитотоксическими средствами. Классы соединений, которые могут быть использованы в качестве антипролиферативных цитотоксических средств, включают, но без ограничения, следующие:

Алкилирующие средства (включая, но без ограничения, азотистый иприт, производные этиленмина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены): урациловый иприт, хлорметин, циклофосфамид (CYTOXAN™) фосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтиленмеламин, триэтилендиофосфорамин, бусульфан, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

Антиметаболиты (включающие, без ограничения, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндеаминазы): метотрексат, 5-фторурацил, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабина фосфат, пентостатин и гемцитабин.

Подходящие антипролиферативные агенты для комбинирования с агонистическими анти-huICOS антителами, без ограничения, таксаны, паклитаксел (паклитаксел коммерчески доступен в виде TAX-OL™), доцетаксел, дискодермолид (DDM), диктиостатин (DCT), пелорузид А, эпотилоны, эпотилон А, эпотилон В, эпотилон С, эпотилон D, эпотилон Е, эпотилон F, фураноэпотилон D, дезоксиэпотилон В1, [17]-дегидродезоксипотилон В, [18]дегидродезоксипотилоны В, С12,13-циклопропилэпотилон А, С6-С8 соединенный мостиковой связью эпотилон А, транс-9,10-дегидроэпотилон D, цис-9,10-дегидроэпотилон D, 16-десметилэпотилон В, эпотилон В10, дисдермомолид, патупилон (ЕРО-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-ЕРО, АВJ-789, ХАА296А (дискодермолид), TZT-1027 (соблидотин), ILX-651 (тасидотин гидрохлорид), халихондрин В, эрибулин мезилат (Е-7389), хемиастерлин (НТИ-286), Е-7974, цирптофицины, LY-355703, иммуноконъюгаты майтанзиноидов (DM-1), МКС-1, АВТ-751, Т1-38067, Т-900607, SB-715992 (испинесиb), SB-743921, МК-0731, STA-5312, элеутеробин, 17-бета-ацетокси-2-этокси-6-оксо-В-гомо-эстра-1,3,5(10)-триен-3-ол, циклострептин, изолаулималид, лаулималид, 4-эпи-7-дегидрокси-14,16-дидеметил-(+)-дискодермолиды и криптотилон 1, в дополнение к другим стабилизирующим микротрубочки агентами, известным в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления может быть желательно привести аберрантно пролиферирующие клетки в состояние покоя в сочетании с лечением или перед лечением агонистическими анти-huICOS антителами, описанными в настоящем документе, например, путем введения пациенту гормонов и стероидов (включая синтетические аналоги), таких как 17а-этинилэстрадиол, диэтилстильбэстрол, тестостерон, преднизон, флюоксиместерон, дромостанолон пропионат, тестолактон, мегестролацетат, метилпреднизолон, метилтестостерон, преднизолон, триамцинолон, хлортрианизен, гидроксипрогестерон, аминоклутетимид, эстрамустин, медроксипрогестерон ацетат, лейпролид, флутамид, торемифен, ZO-LADEX™. При использовании способов или композиций, описанных в настоящем документе, другие агенты, используемые для модуляции роста опухоли или метастазов в клинических условиях, такие как антимииметики, также можно вводить по желанию.

Способы безопасного и эффективного введения химиотерапевтических агентов известны специалистам в данной области. Кроме того, их введение описано в стандартной литературе. Например, введение многих химиотерапевтических агентов описано в Physicians' Desk Reference (PDR), например 1996 edition (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки на него.

Химиотерапевтический агент(ы) и/или лучевая терапия могут применяться в соответствии с терапевтическими протоколами, известными в данной области техники. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что введение химиотерапевтического агента(ов) и/или применение лучевой терапии могут варьировать в зависимости от подвергаемого лечению заболевания и известных эффектов химиотерапевтического агента(ов) и/или лучевой терапии на это заболевание. Кроме того, в соответствии со знаниями квалифицированного врача терапевтические протоколы (например, количество дозировок и время введения) могут варьировать в зависимости от наблюдаемых эффектов вводимых терапевтических агентов на пациента и с учетом наблюдаемых ответов заболевания на вводимые терапевтические агенты.

Результаты

Ответ опухоли определяли, например, с помощью модифицированного критерия оценки ответа солидных опухолей (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST), установленного NCI.

Что касается целевых опухолевых поражений, ответы на терапию могут включать следующее:

<p>Полный ответ (Complete Response (CR)) (RECIST V1.1)</p>	<p>Исчезновение всех целевых опухолевых поражений. Любые патологические лимфатические узлы (независимо от того, целевые или нецелевые) должны иметь уменьшение по короткой оси до < 10 мм.</p>
<p>Частичный ответ (Partial Response (PR)) (RECIST V1.1)</p>	<p>Уменьшение суммы диаметров целевых опухолевых поражений по меньшей мере на 30%, принимая в качестве эталона сравнения исходные суммарные диаметры.</p>
<p>Прогрессирование заболевания (Progressive Disease (PD)) (RECIST V1.1)</p>	<p>Увеличение суммы диаметров целевых опухолевых поражений по меньшей мере на 20%, принимая в качестве эталона сравнения наименьшую сумму, полученную во время исследования (включает в себя исходную сумму, если она является наименьшей на протяжении исследования). В дополнение к относительному увеличению на 20%, сумма должна также демонстрировать абсолютное увеличение, составляющее не менее 5 мм. (Примечание: появление одного или более новых поражений также считается прогрессированием).</p>
<p>Стабильное заболевание (Stable Disease (SD)) (RECIST V1.1)</p>	<p>Нет ни достаточного уменьшения в размере, чтобы претендовать на PR, ни достаточного увеличения, чтобы претендовать на PD, принимая в качестве эталона сравнения наименьшие суммарные диаметры на протяжении</p>

	исследования.
Связанный с иммунным ответом полный ответ (Immune-related Complete Response (irCR)) (irRECIST)	Исчезновение всех целевых опухолевых поражений. Любые патологические лимфатические узлы (независимо от того, целевые или нецелевые) должны иметь уменьшение по короткой оси до < 10 мм.
Связанный с иммунным ответом частичный ответ (Immune-related Partial Response (irPR)) (irRECIST)	Уменьшение суммы диаметров целевых опухолевых поражений и всех новых измеряемых опухолевых поражений (т.е. процентное изменение в опухолевой массе) по меньшей мере на 30%, принимая в качестве эталона сравнения исходные суммарные диаметры. Примечание: появление новых измеряемых опухолевых поражений раскладывается в общую опухолевую массу, но не квалифицируется автоматически как прогрессирование заболевания, пока сумма диаметров не увеличивается на $\geq 20\%$ по сравнению с низшим значением.
Связанное с иммунным ответом прогрессирование заболевания (Immune-related Progressive Disease (irPD)) (irRECIST)	По меньшей мере 20%-ное увеличение в опухолевой массе (т.е. сумма диаметров целевых опухолевых поражений, а также любые новые измеримые опухолевые поражения), принимая в качестве эталона сравнения наименьшую сумму на протяжении исследования (это включает в себя исходную сумму, если она является наименьшей на протяжении исследования). В дополнение к относительному увеличению на 20%, сумма должна также продемонстрировать абсолютное увеличение, составляющее не менее 5 мм. Оценки опухоли с использованием критериев, связанных с иммунным ответом, для прогрессирования заболевания включает вклад новых измеряемых опухолевых поражений. Каждое чистое процентное изменение в опухолевой массе в пересчете на оценку учитывает размер и кинетику роста как старых, так и новых опухолевых поражений по мере их появления.
Связанное с иммунным ответом стабильное заболевание (Immune-related Stable Disease (irSD)) (irRECIST)	Нет ни достаточного уменьшения в размере, чтобы претендовать на irPR, ни достаточного увеличения, чтобы претендовать на irPD, принимая в качестве эталона сравнения наименьшие суммарные диаметры на протяжении исследования.

В отношении нецелевых опухолевых поражений ответы на терапию могут включать следующее:

Полный ответ (CR) (RECIST V1.1)	Исчезновение всех нецелевых опухолевых поражений. Все лимфатические узлы должны быть непатологическими по размеру (<10 мм по короткой оси).
He-CR/He-PD (RECIST V1.1)	Постоянство одного или более чем одного нецелевого опухолевого поражения(й).
Прогрессирование заболевания (PD) (RECIST V1.1)	<i>Однозначное прогрессирование</i> существующих нецелевых опухолевых поражений. Появление одного или более новых поражений также считается прогрессированием.
Связанный с иммунным ответом полный ответ (irCR) (irRECIST)	Исчезновение всех нецелевых опухолевых поражений. Все лимфатические узлы должны быть непатологическими по размеру (< 10 мм по короткой оси).
Связанное с иммунным ответом прогрессирование заболевания (irPD) (irRECIST)	Увеличение числа или размера нецелевого опухолевого поражения(й) не представляет собой прогрессирование заболевания до тех пор, если/пока опухолевая масса не увеличивается на 20% (т.е. сумма диаметров с наименьшим значением целевых опухолевых поражений и любых новых измеряемых опухолевых поражений увеличивается на необходимое количество). Нецелевые опухолевые поражения не учитываются при определении Стабильного заболевания и Частичного ответа.

Пациенты, подвергнутые лечению в соответствии со способами, раскрытыми в настоящем документе, преимущественно испытывают улучшение по меньшей мере одного проявления рака. В одном варианте осуществления улучшение измеряется по уменьшению количества и/или размера поддающихся измерению опухолевых поражений. В другом варианте осуществления поражения могут быть измерены на рентгеновских снимках органов грудной клетки или пленках КТ или МРТ. В другом варианте осуществления может быть использовано цитологическое или гистологическое исследование для оценки ответа на терапию.

В одном варианте осуществления подвергаемый лечению пациент проявляет полный ответ (CR), частичный ответ (PR), стабильное заболевание (SD), связанное с иммунным ответом полное заболевание (irCR), связанный с иммунным ответом частичный ответ (irPR) или связанное с иммунным ответом стабильное заболевание (irSD). В другом варианте осуществления подвергаемый лечению пациент испытывает уменьшение размеров опухоли и/или уменьшение скорости роста, т.е. подавление роста опухоли. В другом варианте осуществления пролиферация нежелательных клеток уменьшается или подавляется. В еще одном варианте осуществления возможно происходить одно или более из следующего: число раковых клеток может быть уменьшено; размер опухоли может быть уменьшен; инфильтрация раковых клеток в периферические органы может быть ингибирована, заторможена, замедлена или остановлена; метастазирование опухолей может быть замедлено или ингибировано; рост опухоли может быть ингибирован; рецидив опухоли может быть предотвращен или отсрочен; один или несколько симптомов, связанных с раком, могут быть ослаблены до некоторой степени.

В других вариантах осуществления введение эффективных количеств анти-ICOS антитела (или комбинаций анти-ICOS антитела и по меньшей мере одного дополнительного антитела, например, анти-PD-1 антитела или анти-CTLA-4 антитела) в соответствии с любым из способов, обеспеченных в настоящем документе, приводит к уменьшению размера опухоли, сокращению количества метастатических поражений, появляющихся со временем, полной ремиссии, частичной ремиссии или стабилизации заболевания. В других вариантах осуществления способы лечения обеспечивают более высокий показатель частоты клинической эффективности (Clinical benefit rate) (CBR = CR+ PR+ SD≥6 месяцев) по сравнению с частотой клинической эффективности, достигаемая с помощью взятого в отдельности анти-ICOS антитела (или любого из взятых в отдельности комбинированных антител). В других вариантах осуществления улучшение частоты клинической эффективности составляет около 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80% или более по сравнению с анти-ICOS антителом (или любым из комбинированных антител), взятых в отдельности.

Вакцинные адьюванты

Описанные в настоящем документе анти-huICOS антитела можно применять для усиления антиген-специфических иммунных ответов путем совместного введения анти-huICOS антитела с представляющим интерес антигеном, например, вакциной. Соответственно, в настоящем документе обеспечены способы усиления иммунного ответа на антиген у субъекта, включающие введение субъекту: (i) антигена; и

(ii) анти-huICOS антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, таким образом, чтобы иммунный ответ на антиген у субъекта усилился. Антигеном может являться, например, опухолевый антиген, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген из патогена. Неограничивающие примеры таких антигенов включают те, которые обсуждались в разделах выше, такие как опухолевые антигены (или опухолевые вакцины), обсуждаемые выше, или антигены из вирусов, бактерий или других патогенов, описанных выше.

Детекция и диагностика

В другом аспекте в настоящем документе обеспечены способы детекции присутствия антигена ICOS человека в образце или измерения количества антигена ICOS человека, включающие приведение в контакт образца и контрольного образца с анти-ICOS антителом, например, моноклональным антителом против человеческого ICOS или его антигенсвязывающим фрагментом, которое специфически связывается с человеческим ICOS, в условиях, которые обеспечивают возможность образования комплекса между антителом или его фрагментом и человеческим ICOS. Затем детектируют образование комплекса, при этом различие в образовании комплекса между образцом по сравнению с контрольным образцом указывает на присутствие антигена ICOS человека в образце. Кроме того, анти-ICOS антитела, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для очистки ICOS человека посредством иммуноаффинной очистки.

Настоящее раскрытие дополнительно иллюстрировано следующими примерами, которые не должны рассматриваться как ограничивающие. Содержание всех фигур и всех ссылок, последовательностей Genbank, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в настоящей заявке, специально включено в настоящий документ посредством ссылки.

Примеры

Ниже приведены неограничивающие примеры антител, композиций и способов согласно изобретению. Понятно, что различные другие варианты осуществления могут применяться на практике в соответствии с общим описанием, приведенным в настоящем документе.

Пример 1. Получение полностью человеческих анти-huICOS антител

В настоящем документе раскрыты полностью человеческие моноклональные анти-huICOS антитела и полностью человеческие антитела, которые связываются с одним и тем же эпитопом и/или перекрестно блокируют связывание полностью человеческих анти-ICOS антител. Такие антитела могут быть генерированы с использованием трансгенных мышей, которые экспрессируют гены антител человека, как описано в следующем примере.

А. Технология гибридом с использованием мыши HuMab® и/или мыши Kunming (KM)®

Генерирование анти-ICOS антител

Человеческие моноклональные анти-ICOS антитела генерировали путем иммунизации линии HC2/KCo7 трансгенных мышей HuMab® ("HuMab®" представляет собой торговую марку Medarex, Inc., Princeton, New Jersey) и мышей KM (линия мышей KM® содержит трансхромосому SC20, как описано в WO 02/43478) 1) растворимым антигеном человеческого ICOS и 2) линией клеток Hek293T, которая была трансфицирована геном человеческого ICOS, который экспрессирует человеческий ICOS, линией клеток яичника китайского хомячка (CHO), которая экспрессирует ICOS, и линией клеток 300-19, которая экспрессирует ICOS. Мышей HuMab и KM линии HC2/KCo7 получали, как описано в патентах США 5770429 и 5545806, полные раскрытия которых включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Антиген и иммунизация

Антигенами являлись растворимый белок слияния, содержащий внеклеточный домен ICOS, слитый с Fc-доменом антитела (рекомбинантный химерный белок человеческого ICOS - мышинный Fc), клетки Hek293T, клетки CHO или клетки 300-19, которые были трансфицированы для поверхностной экспрессии человеческого ICOS. Антигены смешивали в системе адьюванта RTBI монофосфориллипидом А (MPL) плюс TDM (Sigma) для иммунизации. Описанных выше мышей иммунизировали растворимым белком ICOS в 15-25 мкг растворимого рекомбинантного антигена ICOS в PBS, или 1×10^7 клеток CHO, клеток Hek293T или клетках 300-19, трансфицированных для поверхностной экспрессии человеческого ICOS, в PBS, смешанные 1:1 с адьювантом. Мышам вводили 200 мкл приготовленных антигенов в брюшную полость или подкожно, или в подушечку стопы каждые два-четыре дня. Мышам вводили 100-200 мкл рекомбинантного мышинного IL21 после иммунизации антигенами ICOS. Мышам, у которых развивались титры анти-ICOS-антитела, делали внутривенную инъекцию и/или инъекцию в подушечку стопы 10-20 мкг растворимого рекомбинантного антигена ICOS, или 5×10^6 клеток CHO или клеток 300-19, трансфицированных для поверхностной экспрессии человеческого ICOS, или плюс внутривенную инъекцию 15 мкг рекомбинантного мышинного белка IL21 в 100 мкл PBS за три-два дня до слияния. Мышинные лимфатические узлы и/или селезенки собирали, и выделенные клетки лимфатических узлов и/или спленоцитов использовали для получения гибридомы.

Отбор мышей HuMab® или KM®, которые продуцировали анти-ICOS-антитела

Для отбора мышей HuMab® или KM®, которые продуцировали ICOS-связывающие антитела, сыроворотки иммунизированных мышей проверяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа

(ELISA). Вкратце, планшеты для микротитрования покрывали очищенным рекомбинантным человеческим ICOS-мышиним Fc при концентрации 1-2 мкг/мл в PBS; 50 мкл/лунку инкубировали при 4°C в течение ночи, затем блокировали 200 мкл/лунку 5% куриной сыворотки в PBS/Tween (0,05%). Разведения плазмы от иммунизированных ICOS мышей добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение одного часа при температуре окружающей среды. Планшеты промывали PBS/Tween и затем инкубировали с козьим поликлональным антителом против Fc IgG человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение одного часа при комнатной температуре. После промывания планшеты проявляли с помощью субстрата ABTS (Moss Inc., продукт: ABTS-1000) и определяли на спектрофотометре показатель оптической плотности (OD) 415-495. Затем сыворотку от иммунизированных мышей дополнительно подвергали скринингу с помощью проточной цитометрии на связывание с клеточной линией, которая экспрессировала человеческий ICOS, но не контрольной клеточной линией, которая не экспрессировала ICOS. Вкратце, связывание анти-ICOS антител оценивали путем инкубации ICOS-экспрессирующих клеток CHO или клеток 300-19 с анти-ICOS антителом в разведении 1:20. Клетки промывали, и связывание детектировали с помощью меченного фикоэритрином (PE) антитела против человеческого IgG. Анализ методом проточной цитометрии проводили с использованием проточного цитометра FACScan™ (Becton Dickinson, San Jose, CA). Мышей, которые развили наиболее высокие титры анти-ICOS-антител, использовали для слияний. Слияния проводили, как описано ниже. Гибридомные супернатанты тестировали на активность против ICOS с помощью ELISA и проточной цитометрии с использованием флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS).

Получение гибридом

Мышине спленциты и/или лимфоциты, выделенные у мышей NuMab® и/или KM®, сливали с мышинной клеточной миеломной линией с использованием электрослияния на основе электрического поля при помощи крупнокамерного электропоратора Cyto Pulse для слияния клеток (Cyto Pulse Sciences, Inc. Глен Берни, MD). Вкратце, суспензии отдельных клеток лимфоцитов селезенки от иммунизированных мышей сливали с равным количеством не секретирующих мышинных миеломных клеток Sp2/0 (ATCC, клеточные линии CRL 1581). Клетки высевали при плотности примерно 2×10^4 клеток/лунку в плоскодонные планшеты для микротитрования и затем инкубировали в течение приблизительно двух недель в селективной среде, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку, 10% кондиционированную среду P388D1 (ATCC, CRL TIB-63), 3-5% ориген (IGEN) в DMEM (Mediatech, CRL 10013, с высоким содержанием глюкозы, L-глутамином и пируватом натрия) плюс 5 мМ HEPES, 0,055 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 мг/мл гентамицин и 1x среда гипоксантин-аминоптерин-тимидин (HAT) (Sigma, CRL P-7185). Через одну-две недели клетки культивировали в среде, в которой среда HAT была заменена средой, содержащей гипоксантин и тимидин (HT). По истечении 10-14 дней после высевания клеток супернатанты из отдельных лунок подвергали скринингу сначала на содержание антител к гамма и каппа человека. Супернатанты, которые были оценены положительно на антитела к гамма и каппа человека, затем последовательно подвергали скринингу с помощью ELISA и FACS на человеческие моноклональные антитела IgG против ICOS. Секретирующие антитела гибридомы переносили в 24-луночные планшеты, снова подвергали скринингу и, если они все еще были положительными в отношении человеческих моноклональных антител против ICOS, субклонировали по меньшей мере дважды путем серийных разведений. Стабильные субклоны затем культивировали *in vitro* с получением незначительных количеств антитела в среде для культивирования тканей для дальнейшего снятия характеристик. Полученные человеческие моноклональные антитела затем очищали колоночной хроматографией на белке А. Выделенные антитела, представляющие особый интерес, обозначали как 17C4, 9D5, 3E8, 1D7-a и 1D7-b, как описано в табл. 7 ниже.

Таблица 7. Выделенные антитела

Название антитела	SEQ ID NO CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи	SEQ ID NO CDR 1, 2 и 3 легкой цепи	SEQ ID NO вариабельного домена тяжелой цепи	SEQ ID NO вариабельного домена легкой цепи
17C4	18, 19 и 20	21, 22 и 23	16	17
9D5	26, 27 и 28	29, 30 и 31	24	25
3E8	34, 35 и 36	37, 38 и 39	32	33
1D7 - a	42, 43 и 44	45, 46 и 47	40	41
1D7 - b	42, 43 и 44	49, 50 и 51	40	48

В. Система дисплея мРНК PROfusion®

Мышей KM #333819 и #333821 иммунизировали клетками CHO, сверхэкспрессирующими человеческий ICOS, и затем собирали селезенку и лимфатические узлы. Тотальную РНК экстрагировали из клеток селезенки и лимфатических узлов и обратно транскрибировали с использованием праймеров, специфических к константным областям антител. кДНК антител использовали для создания библиотеки одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv), которая экспрессировалась в дисплее мРНК, где каждый белок scFv был слит с его кодирующей мРНК через пуромициновую связь. Библиотеку отбирали на основе 10 нМ рекомбинантного человеческого ICOS-Fc, любые связанные молекулы извлекали с использованием захвата магнитными частицами Protein G и амплифицировали посредством полимеразной цепной

реакции (PCR) для перехода в следующий цикл. Всего было проведено шесть циклов, после чего значительный сигнал связывания с ICOS наблюдали с помощью количественной PCR (qPCR). Конечную популяцию секвенировали и уникальные переменные области клонировали в векторы экспрессии IgG. Белки IgG экспрессировали с использованием транзientной трансфекции клеток Нек293Т для создания материала для связывания и функциональных анализов. Было отобрано антитело IgG-2644, как описано в табл. 8 ниже.

Таблица 8. Антитело IgG-2644

Название антитела	SEQ ID NO CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи	SEQ ID NO CDR 1, 2 и 3 легкой цепи	SEQ ID NO переменного домена тяжелой цепи	SEQ ID NO переменного домена легкой цепи	SEQ ID NO домена тяжелой цепи	SEQ ID NO домена легкой цепи
2644	191, 192 и 193	194, 195 и 196	186	189	185	188

Пример 2. Генерирование гуманизованных анти-ICOS антител

Определение последовательности хомячьего антитела против ICOS C398.4A Хомячье моноклональное антитело против крысиного ICOS, моноклональное антитело C398.4A (анти-Н4/ICOS), называемое в настоящем документе как "родительское хомячье антитело" или антитело "С398.4А", получали от BioLegend®. Антитело C398.4A секвенировали с использованием масс-спектрометрии. В частности, C398.4A денатурировали в 5,3 М гуанидин-НСl, восстанавливали дитиотреитолом (40 мМ) и алкилировали йодацетамидом (80 мМ). После обессоливания на колонке для обессоливания Zeba с отсечением по MW 6 кДа антитело ферментативно расщепляли трипсином, химотрипсином, пепсином, Lys-C, AspN или GluC и анализировали методом масс-спектрометрии. Пептидное картирование и MS/MS использовали для идентификации полученных пептидов и для подтверждения аминокислотной последовательности. Массы интактных тяжелых и легких цепей получали путем отщепления гликана с помощью PNGaseF, восстановления антитела дитиотреитолом и алкилирования йодоуксусной кислотой. Полученные цепи антител анализировали методом LC-MS.

Полученные данные по фрагментации пептидов сопоставляли с пользовательской базой данных белков, состоящей из трех последовательностей легкой и тяжелой цепей антител для *Cricetulus migratorius*, присутствующих в GenBank, а также с последовательностями антител, определенными собственными силами посредством РНК-секвенирования моноклональных антител, полученных от армянских хомячков. Поиск в базе данных идентифицировал локус гена последовательности GenBank CMU17870 (Accession U17870) как схожий с легкой цепью C398.4A. Аминокислотные замены в CDR3 и каркасной области наблюдались в последовательности C398.4A при сравнении с последовательностью легкой цепи CMU17870. Поиск в базе данных идентифицировал локус гена последовательности GenBank CMU17166 (Accession U17166) как схожий с переменной областью тяжелой цепи C398.4A. J-область соответствовала идентифицированной своими силами хомячьей последовательности HA-VH-7. Константная область тяжелой цепи соответствовала тому же изотипу, что и антитело HL4E10 (Accession HM369133). Было определено, что D-область является новой и была идентифицирована путем *de novo* секвенирования данных фрагментации пептидов. Аминокислотные замены в CDR1, CDR2, CDR3 и переменной каркасной области наблюдали при сравнении с последовательностями тяжелой цепи CMU17166 и HA-VH-7.

Генерирование и оценка химерного антитела ICOS.4 на основе антитела C398.4A

Белковую последовательность антитела C398.4A обратно транслировали в последовательность кДНК. Остаток изолейцина/лейцина (I/L) в положении 96 в D-области (CDRH3) экспрессировали либо с изолейцином, либо с лейцином в этом положении. Переменные области клонировали в векторы экспрессии, содержащие сигнальную последовательность и константные области человеческого IgG1f, и трансфицировали в клетки CHO-S для экспрессии химерного человеческого антитела, ICOS.4. Химерное антитело очищали, используя 2 л супернатанта, каждый с использованием колонки 250 мл Protein A на системе АКТА Avant, и подвергали скринингу на активность в анализе CHO-ОКТ3-CD32a/CD25-CD4+ Т-клеток. Анализ CHO-ОКТ3-CD32a/CD25-CD4+ Т-клеток представлял собой совместную культуру облученных (задержанных по росту) клеток CHO, трансфицированных низким уровнем одноцепочечного CD3 (клон ОКТ3) и более высоким уровнем CD32A (для перекрестного связывания антитела) с CD25-истощенными CD4+ Т-клетками при соотношении CHO:Т-клетки, равном 1:4. Клеточную линию CHO выращивали в смесительных колбах и облучали в день проведения анализа. Т-клетки отбирали из свежей лейкоцитарной пленки (Stanford Blood Bank) с использованием набора для выделения CD4+ Т-клеток RosetteSep® (номер по каталогу 15062) с последующим истощением CD25+ клеток с использованием CD25-микрошариков Miltenyi® (номер по каталогу 130-092-983), следуя содержащимся в наборе инструкциям по истощению на AutoMACS®.

Антитело к ICOS или изотипический контроль титровали из 5 мкг/мл путем 5-кратных серийных разведений, при этом каждое разведение производили в трех повторах. Культуры высевали в плоскодонные ТС-обработанные 96-луночные планшеты Costar® с плотностью 5×10^4 Т-клеток и $1,25 \times 10^4$ клеток

СНО в 200 мкл полной среды (RPMI-1640 (Corning®, номер по каталогу 10-040-СМ) + 10% фетальная бычья сыворотка (FBS) (Gibco®, номер по каталогу 25140) + 1× Pen Strep (Corning, номер по каталогу 30-002-CL) + 10 мМ HEPES (Corning, номер по каталогу 25-000-CL) + 1 мМ пируват натрия (Corning, номер по каталогу 25-000Cl) + 1×MEM (Corning, номер по каталогу 25030-CL)) на лунку и инкубировали в течение трех дней при 37°C и 5% CO₂.

Супернатанты культур (50 мкл/лунку) собирали на День 3 для анализа концентраций интерферона-гамма с использованием гомогенного флуоресцентного анализа с временным разрешением (HTRF) (Cisbio®), считывания с использованием микропланшетного ридера Rubystar® и расчета концентраций из стандартной кривой с использованием программного обеспечения Softmax Pro®. Антитело ICOS.4 тестировали в функциональном Т-клеточном анализе с использованием СНО-ОКТ3-CD32 и CD4+CD25-Т-клеток с антителом, титрованным для сравнения относительных уровней дозозависимой костимуляции, измеряемой секрецией интерферона-гамма. ICOS.4 показало значение EC50, равное 0,018 мкг/мл.

Выбор изотипа

На выбор изотипа для иммуноонкологических терапевтических антител и, в частности, для мишеней-агонистов, влияют два различных соображения после связывания с FcR. Как подробно описано Ravetch и коллегами (Li and Ravetch, Science 2011;333:1030-4; Often et al., J Immunol. 2008;181:6829-36), связывание антител с активирующими рецепторами может привести к антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) или антителозависимому клеточному фагоцитозу (ADCP) клеток, экспрессирующих мишень. С другой стороны, связывание антител преимущественно с ингибирующим FcR может опосредовать мультивалентное перекрестное связывание сигналов рецептора и агониста. Поскольку ICOS может экспрессироваться на высоком уровне на CD8+ и CD4+ Teff в микроокружении опухоли, использование изотипа, который может опосредовать ADCC или ADCP, считалось менее привлекательным вариантом. In vitro ADCC-активность анти-ICOS антител также дает основание предполагать, что анти-ICOS антитела являлись высоко компетентными в отношении опосредования ADCC, и поддерживает идею о том, что следует избегать ADCC-индуцирующих изотипов. Антитела, которые увеличивают аффинность человеческого IgG1 в отношении CD32B, наоборот рассматривались в качестве альтернативных изотипов. Рассматриваемые изотипы представляли собой мутацию S267E IgG1, мутации SELF и мутации V12 человеческого IgG1, как показано в табл. 3 выше. Все эти мутации увеличивают аффинность в отношении CD32B и в разной степени в отношении CD32A, при этом уменьшая аффинность в отношении CD16 (как показано в табл. 9). Было спрогнозировано, что это уменьшение понижает ADCC-активность, так как вероятно FcR опосредует истощение Т-клеток в опухоли.

Таблица 9. Сравнение связывающих свойств дикого типа и варианта S267E человеческого IgG1 (мкМ Kd)

Белок	IgG1f	IgG1f-S267E
CD16-V	97	950
CD16-F	200	>5000
CD32A-H131	530	650
CD32A-R131	960	31
CD32B	3400	87
CD64	0.2	0.2
C1q	+	++

Активность in vitro в анализе SEB с использованием CD4+ Т-клеток и В-клеток показала более высокую активность антитела IgG1f S267E по сравнению с человеческим IgG1 и другими изотипами, описанными выше. На основании данных этих функциональных экспериментов IgG1f S267E был выбран в качестве ведущего антитела. Одной сложностью в выборе IgG1f S267E являлось то, что этот изотип связывается с компонентом C1q с более высокой аффинностью, чем человеческий IgG1, что представляло возможный повышенный риск комплемент-зависимого цитолиза (CDC). Удивительно, что IgG1f S267E не имело повышенной активности CDC по сравнению с человеческим IgG1 в тестах in vitro. Таким образом, мутация S267E не привела к повышенному риску CDC.

Гуманизация антитела ICOS. 4

Антитело ICOS.4 гуманизировали путем прививки хомячьих CDR на гены человеческой зародышевой линии (фиг. 3), VH3-15 отбирали для тяжелой цепи и VKI 018 отбирали для легкой цепи на основании гомологии каркасных последовательностей. Человеческую зародышевую линию FW4, JK3, также отбирали для легкой цепи на основании гомологии последовательностей. Человеческую зародышевую линию FW4, JH4, отбирали для тяжелой цепи на основании сходства последовательностей, и она не содержала остатков, которые могут представлять потенциальный риск предрасположенности (liability risk). Панель из 26 антител оценивали в анализе СНО-ОКТ3-CD32A/CD4 + CD25- Т-клеток, при этом диапазон антител начинался при 0,2 мкг/мл и титровался путем четырехкратных разведений, для идентификации гуманизированных последовательностей, которые сохраняют связывание, сходное с родительским хомячьим антителом (С398.4А, т.е. родительским хомячьим антителом, имеющим последовательности областей тяжелой и легкой цепей, указанные в SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно).

Была идентифицирована одна замена аминокислотного остатка (Т94А) для восстановления связывания гуманизированного CDR-привитого антитела, и она расположена на стыке FR3 и CDRH3. Кроме

того, три химерных антитела с вызывающими подверженностью заболеванию мутациями (liability mutations) в последовательности D56, G57 также оценивали, чтобы увидеть, может ли потенциальный сайт изомеризации в VL быть удален без влияния на активность. Замена остатка D56E была выбрана для устранения потенциального сайта изомеризации (D56, G57) в легкой цепи и встроена в гуманизованную последовательность. Гуманизованные антитела подвергали скринингу с изотипом IgG1f, однако ICOS.33 IgG1f S267E повторно экспрессировали с использованием изотипа IgG1f S267E. Описание полученных антител приведено ниже в табл. 10.

Таблица 10. Сводные данные по полученным антителам

	Название антитела	Описание
1	C398.4A	Родительское хомячье антитело
2	ICOS.1 mG1	Мышиное антитело IgG1 против мышного ICOS, полученное из крысиного 17G9 (не связывается с человеческим ICOS)
3	ICOS.4	Химерное антитело с переменными областями C398.4A, полученное в виде четырех различных вариантов (перечисленных ниже)
4a	ICOS.4 mG1	Мышиный вариант IgG1 ICOS.4
4b	ICOS.4 mlgG2a	Мышиный вариант IgG2a ICOS.4
4c	ICOS.4 hg1	Человеческий вариант IgG1 ICOS.4
4d	ICOS.4 hg1 SE	Человеческий вариант IgG1 ICOS.4 с мутацией S267E
5	ICOS.33	Гуманизованное (изотип IgG1) ICOS.4 с родительскими CDR, привитыми на человеческую каркасную область, и мутациями T94A и D56E
6	ICOS.33 IgG1f S267E	ICOS.33 с заменой S267E
7	ICOS.34 G1f	Гуманизованное (изотип IgG1) ICOS.4 с родительскими CDR, привитыми на человеческую каркасную область (также называется как «C398.4A-03»)
8	ICOS.35 G1f	ICOS.34 плюс мутация T94A

Набор из четырех гуманизованных антител на основе C398.4A тестировали в функциональном анализе CHO-ОКТ3-CD32a/CD4+CD25- Т-клеток, сравнивая с исходным хомячьим химерным антителом, как описано ниже в примере 3. ICOS.33 IgG1f S267E выбирали для дальнейшего снятия характеристик и разработки. Последовательности переменных областей тяжелых и легких цепей для ICOS.33 IgG1f S267E показаны в SEQ ID NO: 5 и 6, соответственно, и на фиг. 4.

Пример 3. Выбор антитела

Анализ CHO-scFv-CD3-CD32A/CD25-CD4+ Т-клеток

Первоначальный функциональный анализ для скрининга проводили с использованием клеток CHO, экспрессирующих одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) анти-CD3 (ОКТ3) и CD32A человека, для стимуляции первичных человеческих Т-клеток. Этот анализ включал совместное культивирование облученных (задержанных по росту) клеток CHO, трансфицированных низким уровнем одноцепочечного переменного фрагмента CD3 (клон ОКТ3) и более высоким уровнем CD32A (для перекрестного связывания с антителом), с CD25-истощенными CD4+ Т-клетками при соотношении CHO:Т-клетки, равном 1:4. Клеточную линию CHO выращивали в смесительных колбах и облучали в день проведения анализа. Т-клетки собирали из свежей лейкоцитарной пленки (Stanford Blood Bank) с использованием набора для выделения CD4+ Т-клеток RosetteSep®. CD25+ истощали с использованием CD25-микрошариков Miltenyi, следуя инструкциям, содержащимся в наборе, по истощению на AutoMACS.

Антитело к ICOS или изотипический контроль (т.е. антитело такого же изотипа, что и антитело к ICOS, но которое не связывает ни один природный человеческий белок, например, антитела против гемоцианина лимфы улитки (KLH), дифтерийного токсина и др.) титровали из 5 мкг/мл путем 5-кратных серийных разведений, при этом каждое разведение производили в трех повторах, используя Т-клетки от двух доноров. Культуры помещали в плоскодонные TC-обработанные 96-луночные планшеты (Costar) с 5×10^4 Т-клетками и $1,25 \times 10^4$ CHO-клетками в 200 мкл полной среды на лунку и инкубировали в течение трех дней при 37°C и 5% CO₂.

Супернатанты культур (50 мкл/лунку) собирали на День 3 для анализа концентраций интерферона-гамма (IFN-γ), используя гомогенный флуоресцентный анализ с временным разрешением (HTRF) (Cisbio®). Концентрации определяли с использованием микропланшетного ридера Rubystar и рассчитывали из стандартной кривой с использованием программного обеспечения Softmax Pro. Затем в каждую лунку планшета вносили 0,5 мкКи меченого тритием тимидина в течение восьми часов и замораживали. Клетки собирали в фильтровальные планшеты (Perkin Elmer) для анализа включения меченого тритием тимидина для оценки пролиферации.

FcR CD32A обеспечивало перекрестное связывание антител независимо от подтипа Fc антитела.

Это перекрестное связывание обеспечивает активацию Т-клеток посредством агонизма ICOS, что приводит к усиленной пролиферации и высвобождению цитокинов по сравнению с клетками, обработанными изотипическим контролем. Эта активность наблюдалась на CD8+, CD4+ и CD25- CD4+ Т-клетках. Из-за превосходного отношения сигнал-шум в анализе истощенных CD25-CD4+ Т-клеток эти клетки использовали для скрининга гибридом. Наиболее эффективные антитела были отобраны для субклонирования, очистки и дальнейшего снятия характеристик. Родительское хомячье моноклональное антитело было включено в анализ панели антител. Как описано выше, активность в анализе CHO-CD3-CD32 была использована для выбора ведущей панели антител, которые были повторно экспрессированы в виде антител IgG1 человека или других модифицированных версий человеческого IgG1. ICOS.33 IgG1f S267E проявило дозозависимую индукцию секреции IFN- γ и пролиферацию в анализе CHO-scFv-CD3-CD32A/CD25-CD4+ Т-клеток, как показано на фиг. 5. Среднее значение EC50 этого эффекта составило 0,083 нМ ($\pm 0,067$, n = 6) для пролиферации и 0,083 нМ ($\pm 0,074$, n = 6) для индукции IFN- γ . Индукция пролиферации варьировалась от 2-кратной до 5-кратной при трех самых высоких концентрациях, протестированных в общей сложности у 6 доноров, тогда как индукция IFN- γ варьировалась от 2-кратной до 9-кратной в таких же экспериментах по сравнению с контролем. Предыдущие эксперименты с использованием CHO-scFv-CD3 (без CD32A) подтвердили, что перекрестное связывание необходимо для агонистической активности всех подвергнутых тестированию антител к ICOS.

Анализ CD25-CD4+ Т-клеток и В-клеток-SEB

Дальнейшее снятие характеристик функциональной активности анти-ICOS антител проводили с использованием стафилококкового энтеротоксина В (SEB) в качестве стимула Т-клеточного рецептора (TCR) и добавления анти-ICOS антител для тестирования на активацию. Когда в анализе использовали клетки периферической крови человека (PBMC), анти-ICOS антитела не проявляли функциональной активности. Однако когда CD4+ Т-клетки (CD25-истощенные или общие CD4+ Т-клетки) использовали вместе с очищенными В-клетками, анти-ICOS-антитела показали повышенную секрецию гамма-интерферона (IFN- γ) по сравнению с контрольными антителами.

Этот анализ включал совместное культивирование аутологичных CD25-CD4+ Т-клеток и В-клеток. SEB добавляли до конечной фиксированной концентрации 85 нг/мл, чтобы обеспечить субмаксимальную стимуляцию, и антитело к ICOS титровали, чтобы продемонстрировать дозозависимый эффект активации. Целью данного анализа являлась оценка способности антител к ICOS усиливать активацию Т-клеток в контексте первичного активирующего сигнала (SEB+ В-клетки), о чем свидетельствуют уровни индукции IFN- γ . Полезно индуцировать более высокие уровни IFN- γ , поскольку он является показателем Т-клеточной активации, отражающим активность различных антител, проявляющих агонизм рецептора ICOS, и IFN- γ является известным медиатором противоопухолевого иммунитета.

Т-клетки выделяли путем положительного отбора из двух свежих лейкоцитарных пленок с последующим отделением частиц для генерирования нетронутых CD4+ Т-клеток (Invitrogen). Затем CD25+ клетки истощали из CD4+ Т-клеток с использованием CD25-микрошариков (Miltenyi), следуя инструкциям в наборе по истощению с использованием AutoMACS. Отрицательные фракции из выделений CD4 затем использовали для выделения аутологичных В-клеток с использованием шариков Miltenyi CD20, следуя инструкциям в наборе по положительному отбору с использованием AutoMACS.

Т-клетки высевали в плоскодонные ТС-обработанные 96-луночные культуральные планшеты при плотности 5×10^4 клеток/луночку с аутологичными В-клетками в количестве $3-5 \times 10^4$ клеток/луночку (в зависимости от выхода от каждого донора) с включенным SEB для конечная концентрация 85 нг/мл. Антитело к ICOS или изотипический контроль титровали из 5 мкг/мл путем 5-кратных серийных разведений в общей сложности для семи точек, каждую из которых тестировали в трех повторах. Анализ проводили в полной среде с конечным объемом 200 мкл/луночку. Планшеты инкубировали в течение 3 дней при 37°C и 5% CO₂.

Супернатанты культур (50 мкл/луночку) собирали на День 3 для анализа концентраций IFN- γ с использованием анализа HTRF (Cisbio). Концентрации определяли с использованием микропланшетного ридера Rubystar и рассчитывали из стандартной кривой с использованием программного обеспечения Softmax Pro.

В экспериментах по совместному культивированию с SEB сравнивали выработку IFN- γ для анти-ICOS антител ICOS.33 IgG1f, ICOS.33 IgG1f S267E, 9D5 IgG1f, 9D5 IgG1f S267E, 2644 IgG1f S267E и контрольного Ig1f контрольного антитела KLH (фиг. 6). Гуманизованное ведущее антитело ICOS.33 с мутацией S267E (ICOS.33 IgG 1f S267E, обозначенном на фиг. 6 сплошным треугольником, направленным вниз) индуцировало более высокие уровни IFN- γ , чем такое же антитело с Fc дикого типа (ICOS.33 IgG1f). Другие протестированные антитела сравнения, то есть 95D IgG1f, 9D5 IgG1f S267E и 2644 IgG1, также проявили более низкую активность, чем ICOS.33 IgG1f S267E. Контрольное IgLf KLH не проявило никакой активности. Антитело ICOS.33 IgG1f S267E увеличило выработку IFN- γ в 2,3 раза по сравнению с контрольным антителом дозозависимым образом в совместных культурах CD25-CD4+ Т-клеток и В-клеток, стимулированных субоптимальной дозой SEB. В общей сложности 20 доноров протестировали с использованием этого анализа, все из которых показали самую высокую агонистическую активность по

ICOS.33 IgG1f S267E со значением EC50, равным 0,020 нМ ($\pm 0,018$).

Активность антител к ICOS на фолликулярных Т-хелперных клетках (Tfh) тестировали таким способом. По сравнению с контрольным антителом 1D12 после добавления анти-ICOS антител 9D5 и ICOS.4 наблюдалась повышенная секреция IL-10. Tfh-клетки сортировали из PBMC после обогащения путем отбора CD4 (набор Invitrogen) путем окрашивания CD4-обогащенных клеток на CD4, CD14, CXCR5, CD45RA и CD123, и сортировки по клеткам Tfh (CD4 + CXCR5 + CD45RA-CD123-CD14-) с использованием Aria II FACS. Наивные В-клетки выделяли из CD4-негативной фракции с использованием набора Miltenyi kit. Tfh и наивные В-клетки совместно культивировали в плоскостных TC 96-луночных планшетах при плотности 5×10^4 клеток/лунку и стимулировали SEB в течение 2 дней, затем секрецию IL-10 и IFN γ измеряли с помощью ELISA (BD), и было показано, что она усиливается антителами к ICOS. Эта усиленная секреция цитокинов не требует экзогенного сшивающего агента и может быть усилена путем включения мутации S267E в человеческий IgG1 (фиг. 7A и 7B).

COS.33 IgG1f S267E выбирали для дальнейшей разработки из-за его способности стимулировать продукцию IFN- γ в анализе FcR CHO и индуцировать пролиферацию клеток (фиг. 5), а также из-за его более высокой функциональной активности в анализе SEB по сравнению с другими подвергнутыми тестированию анти-ICOS антителами (фиг. 6).

Пример 4. Отмена антителом ICOS.33 IgG1f S267E супрессии регуляторных Т-клеток

Целью данного исследования является определение эффекта ICOS.33 IgG1f S267E на пролиферацию эффекторных Т-клеток (Teff) и Treg-опосредованную супрессию.

Планшеты с U-образным дном покрывали в течение 3 ч при 37°C анти-CD3 (3 мкг/мл) в комбинации с ICOS.33 IgG1f S267E (10 мкг/мл) или анти-KLH, изотипическим контролем, который не связывает белок ICOS (10 мкг/мл), в PBS. CD4+ Т-клетки выделяли из цельных свежих лейкоцитарных пленок, используя смесь для обогащения CD4+ Т-клеток Rosette Sep в сочетании с разделением фиколл-пак (Ficoll-Paque), следуя инструкциям производителя RosetteSep. Обогащенные CD4+ Т-клетки окрашивали конъюгированными с флуорофором моноклональными антителами, направленными против CD4, CD25, CD127, CD45RA и CD45RO, в буфере для сортировки FACS. Затем CD4+ Т-клетки сортировали на клеточные популяции Teff (CD4+CD25^{lo}CD127^{hi}), RA+Treg (CD4+CD25^{hi}CD127^{lo}/CD45RA+/CD45RO-) и RO+Treg (CD4+CD25^{hi}CD127^{lo}/CD45RA-/CD45RO+) с использованием сортера клеток FACS Aria II. Сортированные Treg метили красителем для оценки пролиферации CellTrace™ Violet (CTV) в соответствии с инструкциями производителя при концентрации 5 мкМ. Сортированные Teffs метили красителем для оценки пролиферации CellTrace CFSE™ (CFSE) в соответствии с инструкциями производителя, за исключением того, что его использовали при более высоком разведении, равном 1,25 мкМ, для уменьшения цитотоксических эффектов, наблюдаемых в предыдущих экспериментах.

Пятьдесят тысяч сортированных и CFSE-меченных Teff в 100 мкл полной среды добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета, покрытого анти-CD3 и ICOS.33 IgG1f S267E или изотипическим контролем. Их получали с анти-CD28, добавленным при 2 мкг/мл (для конечной концентрации 1 мкг/мл), или без него. Затем в каждую лунку добавляли титрующие количества сортированных и CTV-меченных Treg в 100 мкл полной среды, начиная с 5×10^4 Treg (1:1 Treg к Teff) и уменьшая 2-кратно в последующих лунках (1:2, 1:4 и т.д.).

Культуры инкубировали в течение шести дней при 37°C, после чего клетки окрашивали красителем Fixable Viability Dye Ghost Red-780 для исключения мертвых клеток. Данные проточной цитометрии собирали с использованием проточного цитометра BD FACSCanto II. Процент пролиферации Teff определяли с помощью программного обеспечения для анализа методом проточной цитометрии FACSDiva. Процент пролиферации Teff определяли путем гейтирования Teff, которые разбавляли свой краситель для оценки пролиферации CellTrace CFSE после по меньшей мере одного круга деления.

Этот пример показал, что ICOS.33 IgG1f S267E изменило Treg-опосредованную супрессию и усилило пролиферацию Teff, как показано на фиг. 8A и 8B. Значения, показанные в легенде на фиг. 8A и 8B, представляют собой отношения Teff:Teg. Соответственно, значение 1 означает отношение 1 Teff к 1 Treg, значение 2 означает 2 Teff к 1 Treg и т.д., по существу титруя вниз по Treg. При соотношении 1:1 ICOS.33 IgG1f S267E показало приблизительно 4-кратное увеличение пролиферации и однозначное изменение RA+ Treg-опосредованной супрессии. Также, наблюдалось 7-кратное увеличение пролиферации и однозначное изменение RO+ Treg-опосредованной супрессии, измеренное по разнице в проценте делящихся Teff между изотипическим контролем и антителом к ICOS. По мере того как Tregs оттитровывали, наблюдалось пропорциональное снижение наблюдаемой супрессии, и в отсутствие Treg наблюдалось примерно 1,5-кратное увеличение процента разделенных Teff по сравнению с изотипическим контролем. Эффект в присутствии Treg может являться результатом уменьшения восприимчивости Teff к супрессии Treg или уменьшения подавляющей способности Treg. Полезно, чтобы ICOS.33 IgG1f S267E изменяло Treg-опосредованную супрессию и усиливало пролиферацию Teff, так как было показано, что ICOS.33 IgG1f S267E стимулировало иммунный ответ.

Пример 5. In vitro Fc-эффекторная функция ICOS.33 IgG1f S267E

Целью данного исследования являлась оценка антителозависимой клеточной цитотоксичности

(ADCC) и активностей ICOS.33 IgG1f S267E в отношении связывания фактора комплемента C1q.

Мечение клеток-мишеней кальцеином AM

CD4+ Т-клетки от Донора 2 (Stanford Blood ID WO 70516511239) выделяли, активировали и метили кальцеином AM. Вкратце, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) очищали из гепаринизированной лейкоцитарной пленки центрифугированием в градиенте плотности и промывали забуференным фосфатом солевым раствором (PBS), дополненным 2% FBS (HyClone). CD4+ Т-клетки выделяли путем отрицательного отбора с использованием набора для разделения на основе магнитных шариков (StemCell Technologies) и автоматического сепаратора клеток RoboSep (StemCell Technologies). После выделения CD4+ Т-клеток, CD25+ Treg истощали с использованием набора для разделения на основе магнитных шариков (Miltenyi Biotec). Очищенные CD4+ Т-клетки повторно суспендировали при $2,5 \times 10^6$ клеток/мл в среде R10 и активировали с помощью набора для активации/размножения Т-клеток (Miltenyi Biotec) по одному шарикку на две клетки в течение трех дней при 37°C. На 3-й день клетки подсчитывали, пеллетировали и ресуспендировали при 1×10^6 клеток/мл в PBS в конической пробирке объемом 15 мл. Реагент кальцеин AM готовили путем добавления 20 мкл сверхчистого DMSO в пробирку с реагентом, содержащую 50 мкг лиофилизированного реагента. Объем, равный 2 мкл восстановленного кальцеина AM, добавляли к суспендированным клеткам на каждый 1 мл объема. Клетки перемешивали на вортексе и помещали в инкубатор при 37°C на 30 мин. После периода инкубации меченые клетки-мишени трижды промывали средой для анализа ADCC и их концентрацию доводили до 10^5 клеток/мл в среде для анализа.

Анализ антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) с использованием активированных CD4+ Т-клеток в качестве мишеней

Первичные человеческие NK-эффекторные клетки очищали из свежих PBMC от двух разных доноров (BDC Доноры 9 и 12) и стимулировали IL-2. Вкратце, PBMC очищали из гепаринизированных образцов цельной крови центрифугированием в градиенте плотности и промывали PBS, дополненным 2% FBS (HyClone). NK-клетки выделяли из PBMC путем отрицательной селекции с использованием набора для разделения на основе магнитных шариков (Miltenyi Biotec) и сепаратора autoMACs Separator (Miltenyi Biotec). Очищенные NK-клетки ресуспендировали при 1×10^6 клеток/мл в среде MyeloCult, дополненной 500 МЕ/мл IL-2 и инкубировали в течение ночи при 37°C.

На следующий день активированные NK-эффекторные клетки дважды промывали в среде для анализа, и их концентрацию доводили до $4,33-5 \times 10^5$ клеток/мл в среде для анализа. Меченые клетки-мишени (50 мкл/лунку) добавляли в 96-луночный планшет с U-образным дном, содержащий 50 мкл/лунку тестируемого или контрольного антитела. Затем добавляли активированные эффекторные NK-клетки (100 мкл/лунку), чтобы получить конечное соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням (E:T), равное 10:1, и конечную концентрацию антител в диапазоне от 0,0002 мкг/мл до 1 мкг/мл. Затем планшет помещали в увлажненный инкубатор при 37°C на 2 ч. Супернатант (50 мкл/лунку) переносили в оптический 96-луночный черный планшет и интенсивность флуоресценции считывали на планшетном ридере EnVision, настроенном на фильтры возбуждения 485 и испускания 535.

Клетки-мишени, инкубированные с эффекторными клетками в отсутствие антитела, обеспечивали контроль для фона независимого от антитела лизиса (спонтанный лизис), тогда как клетки-мишени, лизированные 20 мкл или 100 мкл/лунку буфера Delfia Lysis, представляли максимальное высвобождение в анализе.

Процент антителозависимого лизиса клеток рассчитывали на основе средней интенсивности флуоресценции (MFI) по следующей формуле:

(тестируемая MFI - среднее фоновое значение)/(среднее максимальное значение - среднее фоновое значение)×100.

Процентные значения лизиса клеток-мишеней наносили на график для каждого антитела с использованием программного обеспечения Prism v5.01 от GraphPad Inc.

Результаты

ADCC, опосредованная первичными NK-клетками, с активированными CD4+ Т-клетками в качестве мишеней

Анти-ICOS антитело ICOS.33 IgG1f S267E тестировали на его способность индуцировать ADCC ICOS-экспрессирующих CD4+ Т-клеток в качестве мишеней и сравнивали с ADCC, индуцированной ICOS.33 IgG1. Два эксперимента проводили с использованием клеток-мишеней и парами доноров NK-клеток. В каждом случае ICOS.33 IgG1f S267E с модифицированным изотипом IgG1 индуцировало меньшую ADCC активированных CD4+ Т-клеток, чем ICOS.33 IgG1. Данные этих экспериментов приведены в обобщенном виде в табл. 11 и на фиг. 9А и 9В.

Таблица 11. Сравнение ADCC, опосредованной анти-ICOS IgG1 и модифицированными изотипами IgG1

Донор CD4+ клеток-мишеней	Донор эффекторных клеток	Антитело	Концентрация (мкг/мл)	Процент лизиса клеток-мишеней				
				Лунка 1	Лунка 2	Лунка 3		
2	12	ICOS.33 IgG1f S267E	1,0000	31	16	42		
			0,0625	20	23	26		
			0,0039	6	1	7		
		ICOS.33 IgG1	1,0000	57	56	55		
			0,0625	52	47	45		
			0,0039	42	38	29		
				Изотипический контроль	1,0000	16	13	18
		2	9	ICOS.33 IgG1f S267E	1,0000	41	-11	16
					0,2500	8	22	1
0,0625	1				10	-5		
0,0156	21				-3	-4		
0,0039	17				-1	1		
0,0010	7				9	-6		
0,0002	8				20	-10		
ICOS.33 IgG1	1,0000				36	43	62	
	0,2500				48	29	51	
	0,0625				61	47	51	
	0,0156				59	34	45	
	0,0039				41	-3	59	
	0,0010				46	20	27	
					Изотипический контроль	1,0000	-3	2

Анализ связывания с C1q

Связывание ICOS.33 IgG1f S267E с человеческим C1q исследовали с помощью ELISA. Все антитела наносили на планшет с высокой степенью связывания для иммунологического анализа при 10 мкг/мл в PBS при 50 мкл на лунку. Был включен контроль неспецифического связывания с лунками, покрытыми только PBS. Планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующий день планшет и все реагенты уравнивали до комнатной температуры; все последующие стадии проводили при комнатной температуре. Незанятые сайты связывания белка блокировали SmartBlock® при 200 мкл на лунку в течение 30 мин. Планшет промывали 3 раза промывочным раствором (PBS + 0,05% Tween-20) при 200 мкл/лунку. Возрастающие дозы человеческого C1q (от 48,00 до 0,76 мкМ) в буфере для анализа ELISA добавляли при 50 мкл/лунку. Планшет инкубировали в течение 2 ч и трижды промывали промывочным раствором. Связывание человеческого C1q с иммобилизованными антителами детектировали с помощью биотинилированного мышинового mAb против C1q, разведенного 1:1000 в буфере для анализа ELISA, и инкубировали в течение 1 ч. После трехкратной промывки планшета добавляли Streptavidin-Poly-HRP, разведенный 1:5000 в буфере для конъюгата, при 50 мкл/лунку и инкубировали в течение 30 мин. Заключительный этап промывки был завершен, и планшет проявляли субстратом TMB при 50 мкл/лунку в течение 5 мин. Оптическую плотность считывали при 650 нм на микропланшетном ридере SpectraMax 340PC384 Microplate Reader (Molecular Device). Данные наносили на график с использованием Prism, Version 5.01.

Результаты

ICOS.33 IgG1f S267E связывается с компонентом человеческого комплемента C1q. Анти-ICOS антитело ICOS.33 IgG1f S267E тестировали на его способность связываться с компонентом человеческого комплемента C1q по сравнению с ICOS.33 IgG1 в анализе ELISA. Было обнаружено, что ICOS.33 IgG1f S267E связывается с человеческим C1q с более высокой аффинностью, чем ICOS.33 IgG1. Данные показаны в обобщенном виде на фиг. 10 и в табл. 12.

Таблица 12. ICOS.33 IgG1f S267E связывается с человеческим C1q

C1q, (МКГ/МЛ)	OD 650 нм						Фоновое значение
	ICOS.33 IgG1			ICOS.33 IgG1f S267E			
20.000	0.8363	0.8463	0.8704	0.9977	1.0367	1.0318	0.1168
10.000	0.7742	0.7153	0.7053	0.9207	1.0096	0.8919	n/a
5.000	0.5254	0.4921	0.5139	0.7107	0.7528	0.7405	n/a
2.500	0.3531	0.3600	0.3591	0.5393	0.5667	0.5590	n/a
1.250	0.2561	0.2298	0.2309	0.4255	0.4460	0.4259	n/a
0.625	0.1724	0.1616	0.1630	0.3306	0.3415	0.3302	n/a
0.313	0.1249	0.1260	0.1230	0.2843	0.2784	0.2815	n/a

Заключение

COS.33 IgG1f S267E с модифицированным IgG1 индуцировало меньшее ADCC-опосредованное уничтожение ICOS-экспрессирующих CD4+ Т-клеток, однако связывалось с более высокой аффинностью с человеческим C1q, чем анти-ICOS-антитело с IgG1 дикого типа.

Пример 6. Противоопухолевая активность *in vivo*

Противоопухолевая активность антимышиного ICOS в качестве монотерапии или в сочетании с другими агентами

Вариации изотипа антител, специфических в отношении рецепторов Т-клеточной поверхности (как костимулирующих, так и коингибирующих), могут изменять противоопухолевую активность. Были созданы мышиные Fc варианты изотипов 17G9 и ICOS.4, и экспрессированы в виде мышинных изотипов IgG2a. Оба показали превосходную противоопухолевую активность по сравнению с мышинными вариантами IgG1, как описано ниже. Хотя, без привязки к какой-либо теории, это вероятно было связано с истощением регуляторных Т-клеток (Treg) в участке опухоли, а также распространением эффекторных Т-клеток (Teff) за счет опосредованного антителами агонизма ICOS. Исследования на мышцах с использованием 17G9 Ab также показали понижающую регуляцию рецептора ICOS на популяциях Т-клеток в селезенке и в опухоли. Наблюдалось, что экспрессия ICOS была ниже у мышей, обработанных изотипами Ab, которые связываются с FcR (mIgG1 и mIgG2a), при этом уровни рецепторов оставались без изменений у мышей, обработанных не связывающимся с FcγR Ab (mIgG1 D265A, также называемым как "ICOS.1 D265A"). Зависимость от взаимодействия с FcγR позволяет предположить, что для этой понижающей регуляции требуется перекрестное связывание. Важно отметить, что противоопухолевая активность была продемонстрирована даже в том случае, когда рецептор был понижающе регулирован.

Предполагалось, что варианты мышинного IgG1 как 17G9 (ICOS.1), так и родительского хомячьего антитела (ICOS.4) обладают агонистической активностью благодаря способности связываться с FcRII (ингибирующим рецептором). Как показано в табл. 13, оба варианта мышинного IgG1 продемонстрировали противоопухолевую активность на детектируемом, но более низком уровне по сравнению с изотипом IgG2a, и меньшее уменьшение Treg в опухоли. Напротив, анти-ICOS-антитело, которое не связывается с FcR (17G9-IgG1-D265A), не показало противоопухолевую активности. Несмотря на то, что истощающий изотип, такой как мышинный IgG2a, показал более высокую противоопухолевую активность, чем агонистический mIgG1, высокая экспрессия ICOS на Teff делает этот механизм действия менее благоприятным, если рассматривать его в сочетании с другим лечением, таким как лечение анти-CTLA-4 антителом, которое, как ожидается, истощает Treg более избирательно. В соответствии с обнаружениями *in vitro* лучшей агонистической активности в изотипах с мутацией S267E, эти изотипы также показали немного более высокую или эквивалентную противоопухолевую активность по сравнению с человеческим IgG1 у трансгенных мышей с человеческим FcR.

Таблица 13. Обобщенные данные исследований на эффективность с использованием антимышиного ICOS в качестве монотерапии или в сочетании с другими агентами

Опухоль	mAbs	Противоопухолевая активность
Тстой кишки CT26	Анти-ICOS родительское-mIgG2a или mIgG1 (ICOS.4) Анти-PD-1 4H2-mIgG1-D265A Анти-CTLA-4 9D9-mIgG2b	Монотерапия анти-ICOS IgG2a 69% TGI, 1/10 TF и ICOS IgG1 15% TGI, 0/10 TF Монотерапия 5% TGI, 0/10 TF в сочетании с анти-ICOS IgG1 83% TGI, 3/10 TF Монотерапия 15% TGI, 0/9 TF в сочетании с анти-ICOS IgG1 48% TGI, 0/9 TF
Тстой кишки MC38	Анти-ICOS родительское-mIgG2a или mIgG1 или анти-ICOS 17G9 крысиное IgG2b Анти-PD-1 4H2 mIgG1-D265A	Монотерапия ICOS крысиным IgG2b 25% TGI 0/9 TF и анти-ICOS IgG1 6% TGI, 0/10 TF Монотерапия 73% TGI, 1/9 TF в сочетании с анти-ICOS крысиным IgG2b 92% TGI, 5/9 TF
Тимомы EG7	Анти-ICOS родительское-mIgG2a или mIgG1	Монотерапия ICOS IgG2a 69% TGI, 2/8 TF и анти-ICOS IgG1 11% TGI, 1/8 TF
Саркома 1956	Анти-ICOS родительское-mIgG2a или mIgG1	Монотерапия анти-ICOS IgG2a 94% TGI, 0/8 TF и анти-ICOS IgG1 50% TGI, 2/10 TF
Фибросаркомы SA1N	Анти-ICOS родительское-mIgG2a или mIgG1	Монотерапия анти-ICOS IgG2a 84% TGI, 6/10 TF и анти-ICOS IgG1 55% TGI, 5/10 TF

Противоопухолевая активность вариантов Fc IgG1 ICOS

Чтобы определить, ведет ли себя человеческое антитело IgG1 S267E аналогично мышинным антителам IgG1, но с более высокой активностью в отношении связывания FcR с CD32 и вовлечения агонисти-

ческого рецептора, провели дополнительные эксперименты на опухолевых моделях. В частности, для оценки вариантов изоформ анти-человеческого ICOS у мышей, трансгенных по Fc-рецептору человека (FcR), были сконструированы следующие антитела:

(а) анти-ICOS hIgG1 - моноклональное антитело к мышинному ICOS, химерное хомячье/мышинное антитело против мышинного ICOS, изотип IgG1 (ICOS.4 hgl);

(б) анти-ICOS hIgG1 SE - моноклональное антитело к мышинному ICOS, химерное хомячье/мышинное антитело против мышинного ICOS, изотип IgG1 SE (ICOS.4 hgl SE), которое имеет мутацию, позволяющую ему связываться с CD32R и CD32B лучше, чем немодифицированная версия; и

(с) изотипический контроль IgG1 - полностью человеческий изотипический контроль IgG1 (DT-1D12 hgl).

Клетки мышинной карциномы толстой кишки MC38 имплантировали подкожно в правые бока мышей. Мышей разделяли на три лечебные группы и дозировали 60 мкг (1) анти-ICOS IgG1 или (2) анти-ICOS IgG1 SE, или (3) изотипического контрольного антитела IgG1 (т.е. антитела того же изотипа, что и антитело к ICOS, но которое не связывается ни с одним из природных мышинных белков, например, антитела против KLH, дифтерийного токсина и др.) на Дни 7, 10 и 14 после имплантации. Массу тела и размер опухоли измеряли два раза в неделю до окончания исследования на День 52. Если опухоли достигали $\geq 2000 \text{ мм}^3$ или казались изъязвленными, животное подвергали эвтаназии. Повышение противоопухолевой активности наблюдали при обработке анти-ICOS IgG1 SE mAb в дозе 60 мкг на мышь; среднее ингибирование роста опухоли (TGI) составило 76% по сравнению с 63% для анти-ICOS IgG1 без модификации SE, как показано в табл. 14 и на фиг. 11А-С. Значительных изменений массы тела, связанных с лечением, или каких-либо явных признаков клинической токсичности не наблюдалось.

Результаты

В модели трансгенных мышей с человеческим FcR введение моноклональных антител ICOS IgG1 SE и ICOS IgG1 привело к среднему ингибированию роста опухоли (TGI), составляющему 76% и 63%, соответственно (как показано в табл. 14). Пять полных регрессий наблюдалось в каждой группе при тестируемом уровне дозы (60 мкг/мышь) (табл. 14 и фиг. 11А-С). Физических признаков токсичности или потери массы тела не наблюдалось.

Таблица 14. Противоопухолевая активность Fc-вариантов IgG1 ICOS

Лечение (мкг/мышь)	Средний % TGI на	
	День 30	Полные регрессии ^а
Изотипический контроль IgG1, 60 мкг	N/A	0/9
Анти-ICOS.4 hgl ^б , 60 мкг	63	5/9
Анти-ICOS.4 hgl ^с SE, 60 мкг	76	5/9

^аПолная регрессия = мышь с опухолями $< 20 \text{ мм}^3$ по меньшей мере для 3 измерений в последний день исследования.

^бICOS.4 с человеческим IgG1

^сICOS.4 с человеческим IgG1 и мутацией S267E

Заключения

В исследовании на модели сингенной опухоли Равеча (сводные данные в табл. 15) обе анти-ICOS монотерапии стимулировали умеренную противоопухолевую активность, при этом анти-ICOS IgG1 SE показало немного более высокую эффективность на День 30 (76% против 63% среднего значения TGI) (табл. 14). Значительных изменений в массе тела, связанных с лечением, или явных признаков клинической токсичности не наблюдалось. В целом, анти-ICOS монотерапии стимулировали противоопухолевую активность, при этом анти-ICOS IgG1 SE показало немного более высокую эффективность на День 30 (76% против 63% среднего значения TGI). Оба лечения привели к тому, что пять мышей оторгли свои опухоли. Значительных изменений в массе тела, связанных с лечением, или явных признаков клинической токсичности не наблюдалось.

Тип исследования/ Виды/Линия	Схема введения/ Способ введения/ Продолжительность иссл/ Носитель/ Лек.форма	Диапазон доз (мкг/мышь)	Животных на группу (M/F)
Противоопухолевая активность модель опухоли MC38 / трансгенные C57/B6 мыши с FcγR человека	Антитела вводили IP после имплантации на Дни 7, 10 и 14	60 мкг/мышь	9 на группу,
	Изотипический контроль IgG1 человека		группы со смешанным полом
	Анти-ICOS 4 hgl Анти-ICOS 4 hgl SE		

Фармакологические исследования

Пример 7. Опухолевая модель Sa1N

Мышиную модель фибросаркомы Sa1N использовали для оценки противоопухолевой активности химерных моноклональных антител против ICOS. ICOS.4 mIgG1 является хорошим суррогатом для

ICOS.33 IgG1s S267E, так как этот вариант ICOS.4 связывается преимущественно с мышинным ингибирующим Fc-рецептором. Поскольку модель опухоли выполняют у мыши, экспрессирующей мышинный Fc-рецептор, это делает вариант ICOS.4 хорошим суррогатом для человеческого антитела. Вариант ICOS.4 mIgG2a является хорошим суррогатом для антитела ICOS.33 IgG1, так как этот вариант ICOS.4 больше схож с человеческим IgG1, поскольку он связывается с мышинными активирующими Fc-рецепторами. Кроме того, эти варианты являлись особенно подходящими в качестве суррогатов, поскольку не требовалось никаких модификаций в их вариабельных областях, которые уже вступили в перекрестную реакцию с мышинным и человеческим белком ICOS. Напротив, анти-ICOS.1 мышинное IgG1 (mIgG1) D265A не связывается с FcR. Антитело IgG1, которое не связывается с белком ICOS, использовали в качестве изотипического контроля.

Для оценки противоопухолевой активности в модели фибросаркомы Sa1N после обработки химерными суррогатными моноклональными антителами против ICOS клетки Sa1N имплантировали подкожно в правые бока мышей. Мышам вводили mAb в пяти лечебных группах на Дни 7, 10 и 14 после имплантации:

- (1) химерное анти-ICOS.1 мышинное IgG1 (mIgG1) D265A,
- (2) анти-ICOS.4 mIgG1
- (3) анти-ICOS.4 hIgG1,
- (4) анти-ICOS.4 mIgG2a или
- (5) изотипический контроль IgG1, каждое в дозе 10 мг/кг.

На День 15 опухоли и селезенку собирали у четырех мышей на группу для анализа методом иммунологического мониторинга. У остальных мышей измеряли массу тела и размер опухоли два раза в неделю до окончания исследования на День 56. Если опухоли были ≥ 2000 мм³ или казались изъязвленными, животных подвергали эвтаназии.

На День 23 после имплантации, последний день, когда можно было рассчитать медиану ингибирования роста опухоли (TGI) на основании 60% животных в лечебных группах, которые остаются живыми, лечебная эффективность анти-ICOS изотипов в отношении опухолей Sa1N была очевидной при сравнении с лечением изотипическим контролем. Медианные значения TGI составили 21% (ICOS.1 mIgG1 D265A), 55% (ICOS.4 mIgG1), 69% (ICOS.4 hIgG1) и 84% (ICOS.4 mIgG2a). Токсичности не наблюдалось ни в одной из лечебных групп, что подтверждается средними и медианными значениями потери массы тела, остающимися ниже 20%.

Данные иммунологического мониторинга указывают на различные уровни внутриопухолевого истощения Treg во всех анти-ICOS изотипах. Кроме того, повышенные уровни внутриопухолевых CD8+ Т-клеток наблюдались во всех обработках анти-mICOS.4.

Ответы опухолей частично коррелировали с сокращением Treg на День 15, что согласуется с относительным связыванием этих mAb с Fc-рецепторами. Эти данные свидетельствуют о том, что анти-ICOS mAb, которое снижает уровень Treg, будет более активным, чем то, которое не снижает.

Противоопухолевое лечение

На День 7 после имплантации (02 февраля 2015 г.) 70 мышей были рандомизированы в пять групп по 14 мышей в зависимости от объема опухоли (L×W×H/2). Средние объемы опухолей составляли приблизительно 134 мм³ для каждой группы. На Дни 7, 10 и 14 вводили изотипический контроль или назначенное mAb. Дозы мышам вводили интраперитонеально (IP).

Иммунологический мониторинг популяций Т-клеток

Для дальнейшего исследования противоопухолевой активности на клеточном уровне проводили иммунологический мониторинг для изучения поднаборов иммунных клеток в опухолевых участках и определения наличия связи между лечением антителами и изменениями в популяциях лимфоидных клеток. На День 15 оператор вивария извлекал у четырех животных из каждой лечебной группы опухоли и селезенки. Сначала ткани обрабатывали на gentleMACS Octo Dissociator™ (Miltenyi, San Diego, CA) и затем окрашивали на различные Т-клеточные маркеры. Образцы анализировали проточной цитометрией на цитометре Fortessa (BD Biosciences, San Jose, CA).

Мониторинг после лечения

Опухоли и массу тела мышей измеряли два раза в неделю до окончания исследования. Опухоли измеряли в трех измерениях с помощью электронного цифрового штангенциркуля и данные записывали в электронном виде с использованием программного обеспечения StudyDirector от Studylog Systems (South San Francisco, CA). Мышей ежедневно проверяли на предмет положения тела, состояния шерсти и изменений дыхания, а также вялость. Мышей умерщвляли, когда опухоли достигали конечной точки 2000 мм³ или казались изъязвленными.

Результаты

Ответ опухоли

Последним днем, когда все мыши в исследовании оставались живыми, был День 14 после имплантации, последний день IP дозирования. В результате среднее ингибирование роста опухоли (TGI) не могло быть рассчитано. На День 23 после имплантации, последний день, когда можно было рассчитать ме-

диану TGI, лечебная эффективность анти-ICOS изотипов на опухолях Sa1N была очевидной по сравнению с обработкой изотипическим контролем. Медианные значения TGI составили 21% (ICOS.1 mIgG1 D265A), 55% (ICOS.4 mIgG1), 69% (ICOS.4 hIgG1) и 84% (ICOS.4 mIgG2a).

Кривые роста опухоли по лечебным группам показаны на фиг. 12A-E. TGI обобщено по лечебным группам в табл. 16. Кривые среднего и медианного роста опухоли по лечебным группам представлены на фиг. 13A и 13B.

Таблица 16. Рост опухолей по лечебным группам

Лечебная группа	День 14		День 23	
	Средний объем опухоли (мм ³)	TGI (%)	Медианный объем опухоли (мм ³)	TGI (%)
Изотипический контроль mIgG1, 10 мг/кг	387	N/A	621	N/A
Анти ICOS.1 mIgG1 D265A, 10 мг/кг	295	24	493	21
Анти ICOS.4 mIgG1, 10 мг/кг	326	16	282	55
Анти ICOS.4 hIgG1, 10 мг/кг	322	17	190	69
Анти ICOS.4 mIgG2a, 10 мг/кг	264	32	101	84

Различия в эффективности между анти-ICOS изотипов показали иерархию mIgG2a>hIgG1>mIgG1>IgG1 D265A. Инертный вариант mIgG1 D265A, который не может связываться с FcR, проявил некоторую противоопухолевую активность с медианным значением TGI 21% на День 23. Немодифицированный изотип mIgG1, который может связываться с ингибирующим Fc-рецептором, FcγRIIB, может усиливать агонизм, и в этом исследовании показал медианное значение TGI 55% на День 23. В соответствии с их более высокими значениями TGI, изотипы mIgG2a и hIgG1 могут связываться с мышинными активирующими рецепторами и опосредовать ADCC или антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) Treg, экспрессирующих ICOS. Кроме того, пониженные уровни внутриопухолевых Treg были связаны с увеличенной регрессией опухоли в мышинных моделях опухоли. Токсичности не наблюдалось ни в одной лечебной группе, так как изменения средней и медианной массы тела составили ниже 20%.

Изменения в популяции Т-клеток

Истощение Treg наблюдалось на День 15 в группах, обработанных вариантами mIgG2a и hIgG1 анти-ICOS.4 mAb, поскольку процентное содержание Foxp3⁺ клеток было значительно ниже в этих группах, чем в группе изотипического контроля, как показано на фиг. 14A-D. Такая же тенденция наблюдалась в группе, подвергнутой лечению не истощающим анти-ICOS антителом (mIgG1). Кроме того, увеличенные уровни CD4⁺ эффекторных Т-клеток (Teff) наблюдались во всех лечебных группах в следующем порядке: mIgG1>hIgG1>mIgG2a. Это наблюдение дает основание предположить, что некоторые CD4⁺ Teff, которые вероятно являются ICOS⁺, могли быть истощены изотипом mIgG2a, который имеет самый высокий истощающий потенциал. Повышенные уровни внутриопухолевых CD8⁺ Т-клеток также наблюдались во всех обработках анти-mICOSA

Заключение

Как показано в табл. 17, в поэтапной модели сингенной опухоли Sa1N химерные анти-ICOS изотипы стимулировали различные уровни противоопухолевой активности, варьирующиеся от 21 до 84% медианы TGI на День 23. Противоопухолевые активности вариантов изотипов в этом исследовании оценивались следующим образом: mIgG2a > hIgG1 > mIgG1 > mIgG1 D265A. Ответы опухолей частично коррелировали с истощением Treg на День 15, что согласуется с относительным связыванием этих mAb с Fc-рецепторами.

Результаты этого исследования показали, что выбор изотипа является важной детерминантой лечения антителами против ICOS. Изотип mIgG2a против ICOS, который связывает активирующие Fcγ-рецепторы, эквивалентно изотипу IgG1 человека, был способен истощать внутриопухолевые Treg и показал наибольшую эффективность в отношении ингибирования роста опухоли. Химерные варианты изотипа против ICOS стимулировали различные уровни противоопухолевой активности. Ответы опухолей частично коррелировали с истощением Treg на День 15, что согласуется с относительным связыванием этих mAb с Fc-рецепторами. Результаты дают основание предположить, что mIgG2a способствует лучшей противоопухолевой активности.

Таблица 17. Фармакологические исследования in vivo

Тип исследования/ Виды/Линия	Схема введения/ Способ введения/ Продолжительность исследования/ Носитель/ Лек.форма	Диапазон доз (мкг/мышь)	Животных на группу (M/F)
Противоопухолевая активность варианта анти-ICOS изотипа в модели опухоли Sa1N с иммунологическим мониторингом подборок иммунных клеток intratumorally / A/J мышей	Антитела вводили IP после имплантации на Дни 7, 10 и 14, Мышиный IgG1 изотипический контроль, Анти-ICOS 1 mIgG1 D265A, Анти-ICOS 4 mIgG1, Анти-ICOS 4 hIgG1, Анти-ICOS 4 mIgG2a	10 мг/кг	14 на группу, F

Пример 8. Комбинация анти-ICOS антител и анти-PD-1 антитела Исследование 1.

Для оценки противоопухолевой активности в модели колоректальной карциномы CT26 после обработки суррогатным моноклональным антителом против ICOS, ICOS.4 (мышинный вариант IgG1 родительского хомячьего антитела), в различных дозах и/или анти-PD-1 mAb клетки CT26 имплантировали подкожно в правые бока мышей. Когда опухоли достигали 31 мм³, мышей рандомизировали в девять лечебных групп по 10-14 мышей в каждой. Каждой мышце в постимплантационные Дни 7, 10 и 14 вводили mAb или изотипический контроль (т.е. антитело того же изотипа, но не связывающее ни один природный мышинный белок, например, антитела против KLN, дифтерийный токсин, и др.).

Мышей взвешивали и опухоли измеряли два раза в неделю до окончания исследования на День 35. Если опухоли были ≥ 2000 мм³ или казались изъязвленными, животных подвергали эвтаназии. На День 15 после имплантации четырех мышей в четырех лечебных группах умерщвляли для сбора селезенки и опухоли. Ткани обрабатывали в одноклеточные суспензии, и клетки окрашивали с использованием антител для проточной цитометрии для анализа популяций Т-клеток.

На День 21 после имплантации, последний день, когда можно было рассчитать среднее ингибирование роста опухоли (TGI) относительно изотипического контрольного антитела, значения TGI для анти-ICOS монотерапии составили 37 и 33% при 3 мг/кг и 10 мг/кг, соответственно; значение TGI для анти-PD-1 монотерапии составило 22%. Когда анти-ICOS в дозе 10, 3 или 1 мг/кг комбинировали с анти-PD-1 mAb, наблюдались медианные значения TGI > 54%. Когда анти-ICOS в дозе 0,3, 0,1 или 0,03 мг/кг комбинировали с анти-PD-1 mAb, наблюдались медианные значения TGI <40%, но > 20%. Токсичности не наблюдалось ни в одной лечебной группе.

Лечение антителами

На День 7 после имплантации клеток CT26 120 мышей рандомизировали в 10 групп по 10-14 мышей в каждой в зависимости от объема опухоли. Группы имели средний объем опухоли приблизительно 31 мм³. Мышам вводили антитела на Дни 7, 10 и 14.

Мониторинг после лечения

Мышей ежедневно проверяли на предмет изменения в положении тела, шерсти и дыхании, а также вялость. Животных взвешивали по меньшей мере два раза в неделю и подвергали эвтаназии, если потеря веса составляла $\geq 20\%$. Бока каждого животного проверяли на наличие и размер опухолей по меньшей мере два раза в неделю до смерти, эвтаназии или окончания периода исследования. Опухоли измеряли в трех измерениях (длина [L], ширина [W] и высота [H]) с помощью электронных цифровых штангенциркулей и записывали. Объемы опухолей рассчитывали по формуле: Объем = (L×W×H×0,5). Ответ на лечение измеряли как функцию ингибирования роста опухоли (TGI) и рассчитывали следующим образом: (эталон, мм³ - тестируемый образец, мм³)/ эталон, мм³ ×100. Когда опухоль достигала объема, превышающего приблизительно 2000 мм³, или оказалась изъязвленной, животное умерщвляли.

Иммунологический мониторинг популяций Т-клеток

Чтобы исследовать эффект антител к ICOS на популяции Т-клеток, ткани собирали от четырех мышей в каждой из четырех лечебных групп на День 15 после имплантации. Селезенки и опухоли гомогенизировали на gentleMACS Octo Dissociator™ (Miltenyi, San Diego, CA). Одноклеточные суспензии окрашивали на Т-клеточные маркеры с использованием антител, конъюгированных с флуорохромом. Флуоресценцию антител определяли проточной цитометрией на цитометре Fortessa cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA), и результаты анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (FlowJo, LLC, Ashland, OR).

Статистический анализ

Рассчитывали среднее стандартное отклонение (SD) и медианные значения размеров опухолей и значения средней массы тел. Среднее значение рассчитывали, когда 100% исследуемых животных оставались живыми; и медианное значение рассчитывали, когда по меньшей мере 60% исследуемых живот-

ных оставались живыми. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) использовали для определения того, были ли статистически достоверно различными средние значения между лечебными группами; значения $p \leq 0,05$ считались достоверно различными. Программное обеспечение GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software, LaJolla, CA) использовали для построения графиков и определения статистических различий между группами. Кривые роста опухолей для отдельных мышей по лечебным группам можно видеть на фиг. 15А-Ж. Кривые среднего и медианного роста опухолей по лечебным группам представлены на фиг. 16А и 16В.

Результаты

Ингибирование роста опухоли

На День 21 после имплантации опухоли, последний день, когда можно было рассчитать медиану TGI, мыши, обработанные анти-IC08.4 mIgG1 в качестве монотерапии в дозе 10 мг/кг, показали 33% медианного TGI по сравнению с мышами, обработанными контрольным антителом mIgG1. Мыши, подвергнутые монотерапии анти-IC0S.4 mIgG1 в дозе 3 мг/кг, показали 37% TGI, и подвергнутые монотерапии анти-PD-1 4H2 mAb, показали 22% TGI. В конце периода исследования (День 35) количество мышей, не имеющих опухоли, составило 0 из 10 в группе контрольного антитела, 0 из 10 в группе анти-PD-1, 1 из 10 в группе анти-IC0S.4 mIgG1 при дозе 10 мг/кг, и 0 из 10 в группе анти-IC0S.4 mIgG1 при дозе 3 мг/кг. Комбинация антимышиного PD-1 с анти-IC0S.4 mIgG1 в различных дозах (10, 3 или 1 мг/кг) показала противоопухолевую активность, превосходящую активность любой монотерапии (значения TGI 54%, 60% и 66%, соответственно). Количество мышей, не имеющих опухоли, в конце исследования было одинаковым в этих группах (1 из 10 мышей без опухолей), за исключением дозы 3 мг/кг, при которой 4 из 10 мышей было без опухолей. Кроме того, медиану TGI также рассчитывали через 21 день, используя относительное различие в площади под кривой эффекта между контрольной и лечебными группами (табл. 18).

Таблица 18. Ингибирование роста опухоли по лечебным группам (относительно изотопического контроля)

Лечебная группа	День 35		День 21	
	Мыши без опухоли	Медиана объема опухоли (мм ³)	Медиана TGI ^a	Медиана TGI (через 21 день) ^b
10 мг/кг mIgG1 контрольное mAb	0/10	558	-	-
10 мг/кг анти-PD-1 4H2 mAb	0/10	433	22%	11%
10 мг/кг анти-IC0S.4 mIgG1 mAb	0/10	376	33%	42%
3 мг/кг анти-IC0S.4 mIgG1 mAb	0/10	349	37%	29%
10 мг/кг анти-IC0S.4 mIgG1 mAb + 10 мг/кг анти-PD-1 4H2 mAb	1/10	256	54%	42%
3 мг/кг анти-IC0S.4 mIgG1 mAb + 10 мг/кг анти-PD-1 4H2 mAb	4/10	222	60%	44%
1 мг/кг анти-IC0S.4 mIgG1 mAb + 10 мг/кг анти-PD-1 4H2 mAb	1/10	190	66%	48%
0,3 мг/кг анти-IC0S.4 mIgG1 mAb + 10 мг/кг анти-PD-1 4H2 mAb	0/10	377	32%	14%
0,1 мг/кг анти-IC0S.4 mIgG1 mAb + 10 мг/кг анти-PD-1 4H2 mAb	2/10	333	40%	28%
0,03 мг/кг анти-IC0S.4 mIgG1 mAb + 10 мг/кг анти-PD-1 4H2 mAb	0/10	452	19%	21%

^a% Медиана TGI рассчитана на День 21

^b% Медиана TGI (через 21 день) рассчитывали с использованием относительного различия в площади под кривой эффекта между контрольной и лечебной группой через 21 день

Иммунологический мониторинг

Иммунологический мониторинг проводили на День 15 день после имплантации в определенных лечебных группах (фиг. 17А-Д). Истощение Foxp3⁺ Treg на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TIL) наблюдалось в группах, получавших монотерапию анти-IC0S.4 mIgG1 (10 мг/кг и 3 мг/кг) (фиг. 17А). Мыши, обработанные анти-PD-1 mIgG1, не показали уменьшения Treg в TIL. Группы, обработанные анти-PD1 mIgG1 или анти-IC0S.4 в дозе 3 мг/кг, также показали увеличение поднабора CD8⁺ Т-клеток в TIL (фиг. 17В). При дозе 10 мг/кг монотерапия анти-IC0S.4, по-видимому, показала аналогичные уровни этого поднабора по сравнению с контрольной группой.

Уровни Ki-67, маркера клеточной пролиферации, были повышены в поднаборе CD4⁺ эффекторных Т-клеток после монотерапии анти-IC0S.4 mIgG1 в дозе 3 мг/кг (фиг. 17С). Также было обнаружено, что

процент гранзим В-положительных клеток, маркеру цитолитической активности на CD8+ Т-клетках, был выше в группах, получавших либо анти-ICOS mIgG1 в дозе 3 мг/кг, либо только анти-PD-1 (фиг. 17D).

Заключение

В поэтапной сингенной модели опухоли CT26 анти-ICOS.4 mIgG1 в качестве монотерапии показало более высокое TGI, когда анти-ICOS.4 mIgG1 вводили в дозе 3 мг/кг (37% TGI на День 21, 0 из 10 мышей без опухолей) по сравнению с 10 мг/кг (33% TGI на День 21, 0 из 10 мышей без опухолей). Данные иммунологического мониторинга показали более высокий процент CD8+ Т-клеток, более высокие уровни Ki-67 в CD4+ эффекторах и более высокие уровни гранзима В в CD8+ Т-клетках в лечебной группе, получавшей анти-ICOS mIgG1 в дозе 3 мг/кг, чем в лечебной группе, получавшей дозу 10 мг/кг. Эти данные дают основание предположить, что для анти-ICOS монотерапии доза 3 мг/кг обладает более высокой противоопухолевой активностью, чем доза 10 мг/кг.

Комбинированная терапия анти-ICOS.4 mIgG1 mAb в дозе 10 мг/кг, 3 мг/кг и 1 мг/кг с анти-PD-1 mIgG1 привела к медианным значениям TGI > 54%, при этом 1 из 10 мышей не имела опухоль в этих лечебных группах, за исключением группы, получавшей анти-ICOS.4 в дозе 3 мг/кг, в которой 4 из 10 мышей не имели опухоли. Эти результаты указывают на сопоставимые уровни противоопухолевой активности анти-ICOS mIgG1 в сочетании с терапиями анти-PD-1 mIgG1 при трех самых высоких дозах.

Исследование 2.

Это исследование было разработано для оценки противоопухолевой активности в модели колоректальной карциномы CT26 после лечения суррогатным моноклональным антителом против ICOS, ICOS.4 (мышинный IgG1 вариант родительского хомячьего антитела) при различных дозах и/или анти-PD-1 mAb. Клетки CT26 имплантировали подкожно в правые бока мышей. Когда опухоли достигали 45 мм³, мышей рандомизировали в девять лечебных групп по 15-20 мышей в каждой. Каждой мышце в постимплантационные Дни 9, 12 и 15 дней вводили mAb или нерелевантный изотипический контроль. Мышей взвешивали и опухоли измеряли два раза в неделю до окончания исследования на День 51. Если опухоли были ≥ 2000 мм³ или казались изъязвленными, животных подвергали эвтаназии. Пробы цельной крови собирали у мышей в различные моменты времени (День 9, День 15 и День 16 после имплантации опухоли) для анализа. На День 16 после имплантации опухоли от пяти мышей из восьми лечебных групп умерщвляли для извлечения селезенки и опухоли. Ткани обрабатывали в одноклеточную суспензию, и клетки окрашивали с использованием антител для проточной цитометрии для анализа популяций Т-клеток.

На День 29 после имплантации опухоли, последний день, когда можно было рассчитать среднее ингибирование роста опухоли (TGI) относительно изотипического контрольного антитела, значения TGI для анти-ICOS монотерапии составили 5% при 30 мг/кг и 33% при 3 мг/кг; анти-PD-1 монотерапия показала значение TGI 74%. Когда анти-ICOS в дозе 30, 10, 3 или 1 мг/кг комбинировали с анти-PD-1 mAb, наблюдались средние значения TGI > 74%. Токсичности не наблюдалось ни в одной лечебной группе.

Лечение антителами

На День 9 после имплантации опухоли 200 мышей рандомизировали в 9 групп по 15-20 мышей в каждой в зависимости от объема опухоли. Группы имели средний объем опухоли приблизительно 45 мм³. Мышам вводили антитела на Дни 9, 12 и 15.

Мониторинг после лечения

Мышей ежедневно проверяли на предмет изменения в положении тела, шерсти и дыхании, а также вялость. Животных взвешивали по меньшей мере два раза в неделю и подвергали эвтаназии, если потеря веса составляла $\geq 20\%$. Бока каждого животного проверяли на наличие и размер опухолей по меньшей мере два раза в неделю до смерти, эвтаназии или окончания периода исследования. Опухоли измеряли в трех направлениях (длина [L], ширина [W] и высота [H]) с помощью электронных цифровых штангенциркулей и записывали. Объемы опухолей рассчитывали по формуле: Объем = (L×W×H×0,5). Ответ на лечение измеряли как функцию ингибирования роста опухоли (TGI) и рассчитывали следующим образом: (эталон, мм³ - тестируемый образец, мм³) / эталон, мм³ × 100. Когда опухоль достигала объема, превышающего приблизительно 2000 мм³, или оказалась изъязвленной, животное умерщвляли.

Иммунологический мониторинг популяций Т-клеток

Различные способы использовали для изучения эффекта антитела ICOS на популяции Т- и В-клеток. Пробы цельной крови брали у мышей в различные моменты времени (День 9, День 15 и День 16) и затем обрабатывали для анализа. Кроме того, ткани собирали от пяти мышей в каждой из восьми лечебных групп на День 16 после имплантации. Селезенки и опухоли гомогенизировали на gentleMACS Octo Dissociator™ (Miltenyi, San Diego, CA). Одноклеточные суспензии окрашивали на Т-клеточные маркеры с использованием антител, конъюгированных с флуорохромом. Флуоресценцию антител определяли проточной цитометрией на цитометре Fortessa cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA), и результаты анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (FlowJo, LLC, Ashland, OR).

Статистический анализ

Рассчитывали среднее стандартное отклонение (SD) и медианные значения размеров опухолей и значения средней массы тел. Среднее значение рассчитывали, когда 100% исследуемых животных оставались живыми; и медианное значение рассчитывали, когда по меньшей мере 60% исследуемых живот-

ных остались живыми. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) использовали для определения того, были ли статистически достоверно различными средние значения между лечебными группами; значения $p \leq 0,05$ считались достоверно различными. Программное обеспечение GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA) использовали для построения графиков и определения статистических различий между группами. Кривые роста опухолей для отдельных мышей по лечебным группам можно видеть на фиг. 18А-Ж. Кривые среднего и медианного роста опухолей по лечебным группам представлены на фиг. 19А и 19В.

Результаты

Ингибирование роста опухоли

На День 29 после имплантации опухоли, последний день, когда можно рассчитать среднее значение TGI, лечебная эффективность терапий моноклональными антителами (mAb) против ICOS в отношении опухоли СТ26 наблюдалась как при монотерапии, так и в комбинации с анти-PD-1 mAb (табл. 19). Мыши, получавшие монотерапию анти-ICOS.4 mIgG1 в дозе 3 мг/кг, показали 33% TGI, и монотерапия анти-PD-1 4H2 mAb показала 74% TGI. В конце периода исследования (День 51) число мышей, не имеющих опухоли, составило 0 из 10 в группе контрольного антитела, 8 из 15 в группе анти-PD-1 и 1 из 15 при всех дозах анти-ICOS.4 mIgG1 (30, 10 или 3 мг/кг). Комбинация анти-PD-1 с анти-ICOS.4 mIgG1 при различных дозах (30, 10, 3 и 1 мг/кг) показала противоопухолевую активность, превышающую или равную противоопухолевой активности монотерапии (значения TGI 74, 80, 87 и 78% соответственно). Количество мышей, не имеющих опухоли, в конце исследования варьировало от 8 до 11 из 15 в четырех группах комбинированного лечения.

Таблица 19. Ингибирование роста опухоли по лечебным группам (относительно изотипического контроля)

Лечебная группа	День 29	
	Средний объем опухоли (мм ³)	Средний % TGI
30 мг/кг mIgG1 контрольное mAb	1248	N/A
5 мг/кг анти-PD-1 4H2 mAb	327	74%
30 мг/кг анти-ICOS.4 mIgG1 mAb	1182	5%
10 мг/кг анти-ICOS.4 mIgG1 mAb	N/A	N/A
3 мг/кг анти-ICOS.4 mIgG1 mAb	838	33%
30 мг/кг анти-ICOS.4 mIgG1 mAb	328	74%
+ 5 мг/кг анти-PD-1 4H2 mAb		
10 мг/кг анти-ICOS.4 mIgG1 mAb	252	80%
+ 5 мг/кг анти-PD-1 4H2 mAb		
3 мг/кг анти-ICOS.4 mIgG1 mAb	158	87%
+ 5 мг/кг анти-PD-1 4H2 mAb		
1 мг/кг анти-ICOS.4 mIgG1 mAb	271	78%
+ 5 мг/кг анти-PD-1 4H2 mAb		

Иммунологический мониторинг

Иммунологический мониторинг проводили в различные моменты времени после имплантации в определенных лечебных группах (фиг. 20А-Д). На День 16 после имплантации опухоли наблюдалось истощение FoxP3+ Treg на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TIL) во всех группах, получавших анти-ICOS.4 mIgG1 mAb (фиг. 20А и 20В). Несущие опухоль СТ26 мыши, получавшие лечение только анти-PD-1 mIgG1, не показали уменьшения TIL Treg. Несмотря на вариабельность, количество CD8+ Т-клеток увеличилось на TIL во всех лечебных группах по сравнению с контролем (фиг. 20Д).

Уровни белка Ki-67, маркера клеточной пролиферации, увеличились в поднаборе CD4+ эффекторных Т-клеток после монотерапии анти-PD-1 (умеренное увеличение) или анти-ICOS.4 mIgG1 (высокое увеличение) (фиг. 21А-С). Дальнейшее повышение уровней Ki-67 наблюдалось в группах комбинированного лечения анти-PD-1 и анти-ICOS.4 mIgG1.

ICOS-L, лиганд для ICOS, показал более высокие уровни средней интенсивности флуоресценции (MFI) на В-клетках после обработки анти-ICOS.4 антителами. Уровни MFI ICOS-L также были повышены в цельной крови, взятой на День 9, День 15 и День 16 после имплантации опухоли, и в селезенке на День 16 после имплантации опухоли. По-видимому имеется тенденция, когда самая высокая доза анти-ICOS.4 mIgG1 имеет самую высокую MFI для ICOS-L (фиг. 22А-Д).

При обращении на уровни ICOS, после лечения антителами наблюдалась утрата экспрессии рецептора на CD4+ Т-клетках. Это было наиболее очевидно в опухоли TILS (табл. 20). Более высокие дозы анти-ICOS.4 mIgG1 коррелировали с более низкими уровнями ICOS. Введение доз антител (изотипический контроль при 30 мг/кг и анти-PD-1 mIgG1 D265A при 5 мг/кг; анти-ICOS.4 mAb при уровнях доз 1, 3, 10 и 30 мг/кг) осуществляли путем внутрибрюшинной инъекции на Дни 9, 12 и 15 после им-

плантации клеток СТ26. Цельную кровь собирали в различные моменты времени (день 9, день 15 и день 16 после имплантации), и опухоль собирали на день 16 после имплантации у пяти мышей в определенных лечебных группах. Иммунологический мониторинг с помощью проточной цитометрии выполняли на обработанных образцах.

Таблица 20. Экспрессия ICOS на CD4+ Т-клетках

Анализи- руемая ткань	День после импланта- ции	mIgG1 (30 мг/кг массы тела)	ICOS.4 mIgG1 [% ICOS]		
			30 мг/кг массы тела [% ICOS]	10 мг/кг массы тела	3 мг/кг массы тела
РВМС	9	100%	67%	75%	86%
РВМС	15	100%	65%	50%	65%
РВМС	16	100%	-	43%	50%
Опухоль	16	100%	-	18%	15%

Заключение

Как показано в табл. 21, в поэтапной сингенной модели опухоли СТ26 лечение с помощью анти-ICOS.4 mIgG1 mAb показало противоопухолевую активность как в виде отдельного агента, так и в комбинации с анти-PD-1 mAb. В качестве монотерапии аналогичные уровни противоопухолевой активности наблюдались, когда анти-ICOS.4 mIgG1 вводили в дозе 30, 10 или 3 мг/кг, хотя доза 3 мг/кг обеспечивала самое высокое среднее значение TGI (33%) на День 29. Данные иммунологического мониторинга показали увеличенное истощение FoxP3+ Treg (опухоль), более высокий процент CD8+ Т-клеток (опухоль), более высокие уровни белка Ki 67 в эффекторах CD4+ (опухоль), более высокие уровни ICOS-L в В-клетках (цельная кровь и селезенка) и утрату экспрессии ICOS в CD4+ Т-клетках (цельная кровь и селезенка) при всех дозах в группах, получавших анти-ICOS.4 mIgG1. Эти данные показали, что анти-ICOS монотерапия обладает удовлетворительной эффективностью в этой модели опухоли.

Терапия анти-PD-1 mIgG1 обладала очень высокой активностью в этом эксперименте. Комбинированная терапия анти-ICOS.4 mIgG1 mAb в дозе 30, 10 мг/кг, 3 мг/кг и 1 мг/кг с анти-PD-1 mIgG1 привела к средним значениям TGI ≥ 74%, при этом 8-11 из 15 мышей не имели опухолей в этих лечебных группах. Эти результаты показали сопоставимые уровни противоопухолевой активности анти-ICOS mIgG1 в комбинации с анти-PD-1-терапией mIgG1 при всех дозах. Повышенная противоопухолевая эффективность в модели СТ26 наблюдалась при комбинировании анти-ICOS и анти-PD-1 mAb. Ингибирование роста опухоли составило ≥ 74% для каждой из четырех доз (1, 3, 10, 30 мг/кг) в анти-ICOS лечебных группах в комбинации с анти-PD-1, при этом по меньшей мере 8 из 15 мышей не имели опухолей в каждой из этих групп. Ингибирование роста опухоли анти-ICOS mAb в качестве единственного агента составило 33%, при этом у 1 из 15 мышей отсутствовала опухоль при введении в дозе 3 мг/кг. Иммунологический мониторинг также показал более низкий уровень FoxP3+ Treg, более высокий процент CD8+ Т-клеток, более высокие уровни Ki-67 в CD4+ эффекторах, более высокие уровни ICOS-L в В-клетках и более низкие уровни экспрессии рецепторов ICOS при анти-ICOS монотерапии.

Таблица 21. Неклинические фармакологические исследования in vivo

Тип исследования/ Видь/Линия	Схема введения/Способ введения/ Продолжительность исследования/ Носитель/ Лек.форма	Диапазон доз (мкг/мышь)	Животных на группу (M/F)
Противоопухолевая активность анти-ICOS mAb в комбинации с анти-PD-1 mAb в модели опухоли СТ26 с иммунологическим мониторингом поднаборов иммунных клеток / мыши Balb/c	Антитела вводили IP на Дни 9, 12 и 15 после имплантации, Изотипический контрольный мышинный IgG1, анти-ICOS 4 mIgG1, анти-PD-1 клон 4H2 mIgG1	1-30 мг/кг	15-20 на группу, F

Пример 9. Противоопухолевая активность анти-ICOS антитела в комбинации с анти-CTLA-4 в опухолевой модели СТ26

Краткое описание

Для оценки противоопухолевой активности в модели колоректальной карциномы СТ26 после лечения суррогатным моноклональным антителом против ICOS, обладающим различными Fc, ICOS.4 (вариант мышинного IgG1 или IgG2 родительского хомячьего антитела), и/или анти-CTLA-4 mAb, клетки СТ26 имплантировали подкожно в правые бока мышей. Когда опухоли достигали 96 мм³, мышей рандомизировали на шесть лечебных групп по 10-15 мышей в каждой группе. Каждой мышке вводили дозу mAb на Дни 13, 16 и 20 после имплантации или изотипический контроль (т.е. антитела такого же изотипа, но не

связывающие ни один природный мышинный белок, например, антитела против KLN, дифтерийного токсина, и др.). Мышей взвешивали и опухоли измеряли два раза в неделю до окончания исследования на День 66. Если опухоли были $\geq 2000 \text{ мм}^3$ или казались изъязвленными, животных подвергали эвтаназии.

На День 30 после имплантации, последний день, когда можно рассчитать медиану ингибирования роста опухоли (TGI) относительно изотипического контрольного антитела, значения TGI для монотерапии анти-ICOS составили 15 и 69% с вариантами mIgG1 и mIgG2a (например, химерное мышинное антитело с последовательностями V_H/V_L SEQ ID NO: 3 и 4 + IgG1 или IgG2), соответственно; анти-CTLA-4 монотерапия показала значение TGI, равное -7%. Когда анти-ICOS mAb комбинировали с анти-CTLA-4 mAb, средние значения TGI наблюдались равными 40% (mIgG1) и 79% (mIgG2a). Токсичности не наблюдалось ни в одной лечебной группе.

Экспериментальные процедуры Тестируемые антитела и контроли

Были сконструированы следующие антитела:

- (a) мышинное антитело IgG1 против мышинного ICOS - анти-ICOS.4 mAb, изотип мышинного IgG1, экспрессировали из клеточных линий яичника китайского хомячка (CHO);
- (b) мышинное антитело IgG2a против мышинного ICOS - анти-ICOS.4 mAb, изотип мышинного IgG2a, экспрессировали из клеточных линий CHO;
- (c) мышинное антитело IgG2b против мышинного CTLA-4 9D9 - моноклональное антитело к мышинному CTLA-4 клон 9D9, изотип мышинного IgG2b, экспрессировали из трансфицированной клеточной линии CHO и составляли в PBS; и
- (d) мышинный изотипический контроль IgG1 - полностью мышинное антитело IgG1, не связывающееся с ICOS; приготовлено при 10 мг/кг в PBS.

Получение опухолевых клеток

Клетки мышинной карциномы толстой кишки CT26 получали от Американской коллекции типовых культур (ATCC, Catalog CRL-2638) и поддерживали *in vitro* в стерильной культуре, содержащей модифицированную по Дульбекко среду Игла (DMEM) + 10% инактивированную нагреванием фетальную телячью сыворотку (FBS), в течение менее чем 10 пассажей. Клетки подтверждали как не содержащие вирусы путем тестирования продукции мышинных антител.

Имплантация опухоли

Клетки CT26 культивировали в среде RPMI-1640 (HyClone/GE Healthcare, Logan UT, номер по каталогу 10-040-СМ, партия 16915003), дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой (FBS) (Gibco, Life Technologies, номер по каталогу 26140-079, партия 1704315). Клетки разделяли 1:10 каждые три-четыре дня. В правый бок каждой мыши подкожно имплантировали 1×10^6 клеток CT26 в 0,2 мл PBS с использованием 1-см шприца с иглой 26 G1/2.

Лечение антителами

На день 13 после имплантации клеток CT26 120 мышей рандомизировали в шесть групп по 10-15 мышей в каждой в зависимости от объема опухоли. Группы имели средний объем опухоли приблизительно 96 мм^3 . Мышам вводили антитела на Дни 13, 16 и 20.

Мониторинг после лечения

Мышей ежедневно проверяли на предмет изменения в положении тела, шерсти и дыхании, а также вялость. Животных взвешивали по меньшей мере два раза в неделю и подвергали эвтаназии, если потеря веса составляла $\geq 20\%$. Бока каждого животного проверяли на наличие и размер опухолей по меньшей мере два раза в неделю до смерти, эвтаназии или окончания периода исследования. Опухоли измеряли в трех направлениях (длина [L], ширина [W] и высота [H]) с помощью электронных цифровых штангенциркулей и записывали. Объемы опухолей рассчитывали по формуле: Объем = $(L \times W \times H \times 0,5)$. Ответ на лечение измеряли как функцию ингибирования роста опухоли (TGI) и рассчитывали следующим образом: (эталон, мм^3 - тестируемый образец, мм^3)/эталон, $\text{мм}^3 \times 100$. Когда опухоль достигала объема, превышающего приблизительно 2000 мм^3 , или оказалась изъязвленной, животное умерщвляли.

Результаты

Как показано в табл. 22, на День 30 после имплантации опухоли, последний день, когда можно рассчитать медиану TGI, лечебную эффективность терапий анти-ICOS mAb на опухолях CT26 наблюдали как в виде монотерапии, так и в сочетании с анти-CTLA-4 mAb. Мыши, получавшие анти-ICOS.4 варианты в качестве монотерапии, показали 15% медианы TGI (mIgG1) и 69% TGI (mIgG2a). Комбинация анти-CTLA-4 mAb (-7% TGI) привела к более высоким значениям медианы TGI, поскольку анти-ICOS.4 mIgG1 вариант имел 40% TGI, и анти-ICOS.4 mIgG2a вариант имел 79% TGI. В конце периода исследования (День 66) количество мышей, не имеющих опухолей, было 0 для всех групп. Кривые роста опухолей для отдельных мышей по лечебным группам показаны на фиг. 23A-F. Введение доз антител (изотипический контроль в дозе 20 мг/кг; анти-CTLA-4 mIgG2b, анти-ICOS.4 mIgG1 и анти-ICOS.4 mIgG2a в дозе 10 мг/кг) осуществляли путем внутрибрюшинной инъекции на Дни 13, 16 и 20 после имплантации клеток CT26.

Кривые среднего и медианного роста опухоли по лечебным группам представлены на фиг. 24A и

24В. Токсичности не наблюдалось ни в одной лечебной группе, так как изменения средней и медианной массы тела составили ниже 20%.

Таблица 22. Ингибирование роста опухоли по лечебным группам

Лечебная группа	День 30	
	Медиана объема опухоли (мм ³)	Медиана % TGI
изотипический контроль mIgG1, 20 мг/кг	1981	N/A
Анти-ICOS.4 mIgG1, 10 мг/кг	1686	15%
Анти-ICOS.4 mIgG2a, 10 мг/кг	614	69%
Анти-CTLA-4 9D9 mIgG2b, 10 мг/кг	2114	-7%
Анти-ICOS.4 mIgG1, 10 мг/кг + Анти-CTLA-4 9D9 mIgG2b, 10 мг/кг	1195	40%
Анти-ICOS.4 mIgG2a, 10 мг/кг + Анти-CTLA-4 9D9 mIgG2b, 10 мг/кг	410	79%

Выводы

Как показано в табл. 23, в постадийной модели сингенной опухоли CT26 обе монотерапии анти-ICOS Fc-вариантом (т.е. вариант ICG.4 мышинового IgG1 или IgG2 родительского хомячьего антитела) стимулировали умеренную противоопухолевую активность, при этом анти-ICOS.4 mIgG2a показало более высокую эффективность, чем анти-ICOS.4 mIgG1 на День 30 (69% против 15% медианы TGI). Комбинация анти-ICOS.4 терапий с анти-CTLA-4 mAb повысила эффективность, при этом медиана TGI увеличилась до 79% (mIgG2a) и 40% (mIgG1). Никаких значительных изменений в массе тела не было связано с лечением, и не было никаких явных признаков клинической токсичности. Анти-ICOS монотерапии стимулировали противоопухолевую активность, при этом анти-ICOS.4 mIgG2a показало более высокую противоопухолевую эффективность на День 30 (69% против 15% медианы TGI). Противоопухолевая эффективность увеличилась при комбинировании с лечением анти-CTLA-4 mAb, при этом группа, получавшая комбинированную терапию анти-ICOS.4 mIgG2a показала 79% TGI и анти-ICOS.4 mIgG1 показала 40% TGI.

Таблица 23. Фармакологические исследования in vivo

Тип исследования/ Виды/Линия	Схема введения/Способ введения/ Продолжительность исследования/ Носитель/ Лек.форма	Диапазон доз (мкг/мышь)	Животных на группу (M/F)
Противоопухолевая активность анти-ICOS mAb в комбинации с CTLA-4 mAb в модели опухоли CT26 / мыши Balb/c	Антитела вводили IP на Дни 13, 16 и 20 после имплантации, 66 дней, Изотипический контрольный мышинный IgG1, анти-ICOS 4 mIgG1, анти-ICOS 4 mIgG2a, анти-CTLA-4 9D9 mIgG2b, в PBS	10-20 мг/кг	10-15 на группу, F (самки)

Пример 10. Аффинность, связывание, биофизические свойства, повышенная стабильность и иммуногенность

Характеристика свойств связывания

CD4+ Т-клетки человека, РВМС яванского макака, и мышинные и крысиные спленоциты активировали путем инкубации с видоспецифическим, связанным с планшетом анти-CD3 антителом (покрывали в 6-луночном планшете 2 мл/луночку раствора при концентрации 4 мкг/мл в PBS в течение 3 ч при 37°C и дважды промывали 1 мл среды), и растворимым видоспецифическим анти-CD28 антителом при концентрации 1 мкг/мл в свежей среде, содержащей 1-2×10⁶ клеток/мл, в течение 3-4 дней. Следует отметить, что РВМС яванского макака, а также мышинные и крысиные спленоциты становятся в основном Т-клетками после трех-четырёх дней CD3/CD28-активации. Клетки собирали, подсчитывали, центрифугировали и ресуспендировали в окрашивающем буфере +100 мкг/мл мышинового IgG для блокирования в течение 15 мин при комнатной температуре. ICOS.33 IgG1f S267E титровали от 2 мкг/мл путем 4-кратных серийных разведений до 0,002 мкг/мл в окрашивающем буфере и инкубировали с активированными клетками человека, яванского макака, крысы или мыши в течение 30 мин при 4-8°C в планшете U-образным дном. Затем клетки дважды промывали в 150-200 мкл окрашивающего промывочного буфера и ресуспендировали в 50 мкл APC-козьего анти-человеческого IgG (Fc-гамма), разведенного 1:200 в окрашивающем буфере, осторожно перемешивали на вортексе и инкубировали 30 мин при 4-8°C в темноте. Затем клетки один раз промывали в 200 мкл окрашивающего промывочного буфера, ресуспендировали в нем и анализировали на проточном цитометре FACS Canto.

Как показано на фиг. 25А и 25В, ICOS.33 IgG1f S267E демонстрирует сильное связывание с Т-клетками человека, яванского макака, крысы и мыши со значениями EC50, которые существенно не различаются между тремя видами.

Кроме того, avidность связывания ICOS.33 IgG1f S257E сравнивали с двумя различными конкурентными анти-ICOS антителами. Вкратце, антитела инкубировали с активированными CD4+ Т-клетками на льду в течение тридцати минут. Затем клетки промывали, и связанные антитела детектировали с помощью античеловеческого-IgG-PE вторичного реагента. Сигнал измеряли с помощью проточной цитометрии и рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции. Как показано на фиг. 26А-В, ICOS.33. IgG1f S267E продемонстрировало более высокую avidность связывания с активированными CD4+ Т-клетками, рассчитанную по EC50, по сравнению с двумя конкурирующими антителами. Как обсуждалось в настоящем документе, термин "EC50" в контексте анализа *in vitro* с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которая индуцирует ответ, составляющий 50% от максимального ответа, т.е. посередине между максимальным ответом и исходным ответом. На фиг. 26А значение EC50 для ICOS.33 IgG1f S267E составило около 0,07 мкг/мл, тогда как значение EC50 для конкурентного антитела 1 составило около 1,4 мкг/мл, и значение EC50 для конкурентного антитела 2 составило около 0,4 мкг/мл. Иными словами, значение EC50 для ICOS.33 IgG1f S267E было примерно в 20 раз меньше, чем значение EC50 для конкурентного антитела 1, и примерно в 6 раз меньше, чем значение EC50 для конкурентного антитела 2. На фиг. 26В значение EC50 для ICOS.33 IgG1f S267E составило около 0,08 мкг/мл, тогда как значение EC50 для конкурентного антитела 1 составило около 2,4 мкг/мл, и значение EC50 для конкурентного антитела 2 составило около 1,0 мкг/мл. Иными словами, значение EC50 для ICOS.33 IgG1f S267E было примерно в 30 раз меньше, чем значение EC50 для конкурентного антитела 1, и примерно в 12 раз меньше, чем значение EC50 для конкурентного антитела 2.

Исследования аффинности

Поскольку мономерный человеческий ICOS был недоступен, эксперименты по определению истинной аффинности ICOS.33 IgG1f S267E проводили с использованием Fab-фрагмента ICOS.33 IgG1f S267E (партия PC-1804-04) и человеческого ICOS Fc (R&D Systems, 169-CS-050) антигена с помощью прибора Biacore™ T200. Эксперименты по связыванию проводили при 37°C для достижения (или моделирования) аффинности антитела к антигену в условиях *in vivo*. Чип CM4 ковалентно покрывали анти-hFc реагентом для захвата от Biacore. Поверхность блокировали этилендиамином. Затем человеческий ICOS с меткой Fc захватывали на чипе CM4, и Fab-фрагмент ICOS.33 IgG1f S267E протекал по нему при концентрациях 0,91, 2,7, 25, 74, 667 и 2000 нМ.

Константу скорости ассоциации (k_{on}) и константу скорости диссоциации (k_{off}) наносили на график в зависимости от времени и единиц ответа (RU) с использованием программного обеспечения VIAevaluation software, Version 3.2. Данные соответствовали модели Ленгмюра 1:1. Отношение k_{off}/k_{on} представлено константой диссоциации (K_D) комплекса антитело-антиген. Чип Biacore регенерировали с помощью 50 мМ раствора гидроксида натрия при скорости потока 100 мкл/мин. Аффинность антитела к антигену человеческого ICOS, измеренная с помощью Fab-фрагмента ICOS.33 IgG1f S267E, составила от 52 нМ до 65 нМ.

Биофизический анализ

Идентичность ICOS.33 IgG1f S267E подтверждали жидкостной хроматографией/масс-спектрометрией (LC-MS). Для измерения массы тяжелой и легкой цепей образец дегликозилировали, восстанавливали и алкилировали в соответствии со стандартным способом тестирования и анализировали с использованием прибора Waters LCT Premier ESI-TOF. Масса легкой и тяжелой цепей ICOS.33 IgG1f S267E была эквивалентна их прогнозируемым оценкам массы 23795 и 50161 Да, соответственно, на основе аминокислотной последовательности, полученной из последовательности ДНК.

Идентичность антитела определяли с помощью анализа последовательности по Эдману. N-концевое аминокислотное секвенирование тяжелых и легких цепей антител выполняли с помощью автоматического анализатора белковой последовательности ABI Precise. Наблюдаемые N-концевые аминокислотные последовательности ICOS.33 IgG1f S267E соответствовали предсказанным аминокислотным последовательностям для легкой и тяжелой цепей.

Используя систему Agilent 2100 BioAnalyzer, было определено, что ICOS.33 IgG1f S267E мигрировал при приблизительно 160 кДа в невосстанавливающих (NR) условиях. В восстанавливающих условиях (R) тяжелая цепь мигрировала при приблизительно 60 кДа, а легкая цепь мигрировала при приблизительно 25 кДа.

Чистоту ICOS.33 IgG1f S267E определяли с помощью капиллярного электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (CE-SDS). Образцы анализировали с помощью системы Beckman Coulter Proteome Lab PA 800 plus в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях. ICOS.33 IgG1f S267E содержало 93,45% интактного IgG по CE-SDS в невосстанавливающих условиях. Были обнаружены следующие фрагменты антител: легкая цепь (1,85%), тяжелая-легкая цепь (0,45%), две тяжелые цепи (0,88%) и две тяжелые и одна легкая цепь (3,37%). Чистота ICOS.33 IgG1f S267E составила 96,51% (62,22% тяжелой цепи + 34,29% легкой цепи) по CE-SDS в восстанавливающих условиях.

ICOS.33 IgG1f S267E характеризовали с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC) для определения уровня гетерогенности продукта. ICOS.33 IgG1f S267E показало низкую гетерогенность с 98,1% основного пика, 0,4% пика перед основным пиком и 1,5% хвостового плеча, что указы-

вает на низкую химическую или конформационную гетерогенность.

Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (cIEF) использовали для характеристики ICOS.33 IgG1f S267E для заряженных изоформ. Образец анализировали с использованием анализатора iCE модели iCE3. ICOS.33 IgG1f S267E показало изоэлектрическую точку (pI) в диапазоне от 7,30 до 7,72 с основным пиком при 7,72 (45,19%). Другие пики наблюдались при 7,30 (7,51%), 7,40 (16,21%) и 7,56 (31,10%). Наблюдаемый диапазон pI находился в пределах нормального диапазона, ожидаемого для образцов антител IgG1.

Эксклюзионную хроматографию (SEC; гель-фильтрационную) в сочетании с многоугловым рассеянием света (MALS) выполняли для определения содержания мономеров и распределения MW основных примесей ICOS.33 IgG1f S267E. Было обнаружено, что ICOS.33 IgG1f S267E содержит более 99,8% мономера. Определение MW с помощью MALS показало, что мономерный компонент имел MW 144300 Да. Очень незначительное количество агрегата имело кажущуюся MW 626800 Да.

Идентификацию белков по "отпечаткам пептидных масс" и секвенирование проводили путем анализа расщепленных пептидов с помощью LC-MS на хроматографе Waters Acquity UPLC с колонкой Acquity UPLC BEH C18, 1,7 мкм (2,1×150 мм; Waters Corporation), соединенной с масс-спектрометром LTQ-Orbitrap XL. Идентификация последовательностей тяжелой и легкой цепей составила 100% с использованием данных MS/MS различных расщеплений, включая трипсин, химо трипсин и пепсин. Секвенирование пептидов подтвердило, что аллотипом являлся человеческий IgG1, и соответствовал ожидаемой аминокислотной последовательности, как предсказано последовательностью ДНК. Было подтверждено, что единственным участком N-гликозилирования является N297 на тяжелой цепи. Было обнаружено, что дисульфидные связи соответствуют ожидаемым для человеческого моноклонального антитела IgG1. Мутация S267E, созданная для усиления связывания рецептора CD32b, также была идентифицирована в последовательности.

Профиль олигосахаридов N-связанных сахаров, присутствующих на ICOS.33 IgG1f S267E, определяли с помощью капиллярного электрофореза с лазерно-индуцированной флуоресценции (cLIF) с использованием прибора Beckman MDQ. N-связанные гликаны, присутствующие на ICOS.33 IgG1f S267E, содержали смесь асиало-биантеннарных Сахаров без фукозы, которая варьировалась в зависимости от уровня включения галактозы. Основными гликановыми структурами являлись G0F (30,64%) и G1F (43,65%) и, в меньшей степени, G2F (19,07%).

VP-капиллярный дифференциальный сканирующий калориметр использовали для определения термической стабильности и обратимости антитела. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Origin 7. Термическая стабильность находилась в пределах приемлемого диапазона для типичного человеческого моноклонального антитела. В экспериментах по термическому сканированию многие антитела показали три разрешимые температуры плавления; первая связана с разворачиванием домена CH2, вторая связана с разворачиванием домена Fab, и третья связана с разворачиванием домена CH3. ICOS.33 IgG1f S267E показало термограмму с этими тремя температурами разворачивания: 65,2°C (Tm1), 83,2°C (Tm2), 86,3°C (Tm3). Термическая обратимость является маркером способности белка сворачиваться обратно в свою нативную конформацию после возмущения, в данном случае тепла. Эксперименты по термической обратимости при 83,2°C (вторая температура плавления) показали обратимость 55,2%, на основании чего можно предположить, что антитело обладает устойчивыми свойствами рефолдинга.

Данные по стабильности ICOS.33 IgG1f S267E приведены в обобщенном виде в табл. 24.

Таблица 24. Стабильность ICOS.33 IgG1f S267E

Свойство	Способ	Результаты
Замораживание/Оттаивание (1ч при -80°C, 1ч при RT x 6)	UV, SEC	Риск F/T стабильности не выявлен
Профиль растворимости/концентрации	UV, SEC	По меньшей мере 50 мг/мл в буфере (20 мМ гистидин, pH6,0, 260 мМ сахара)
Исследование стабильности при перемешивании	350 об/мин при RT в буфере (20 мМ гистидин, pH6,0, 260 мМ сахара) +/- 0,05%PS80 в течение 7 дней (50 и 10 мг/мл)	Агрегации не наблюдалось

Пример 11. Аффинность связывания ICOS.33 IgG1f S267E с FcγR человека с помощью поверхностного плазменного резонанса

Связывание FcγR человека с ICOS.33 IgG1f S267E изучали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и сравнивали с контрольным анти-ICOS антителом IgG1f. Антитела были захвачены на сенсорной поверхности белка А и серии титрования FcγR вводили в качестве аналитов.

Для этих исследований белок А иммобилизовали на проточных ячейках 1-4 сенсорного чипа CM5 с использованием стандартной химии этил(диметиламинопропил)карбодиимида (EDC)/N-гидроксисукцинимид (NHS) с блокированием этаноламином в рабочем буфере, содержащем 10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% сурфактант р20, до плотности ~ 3000 RU. ICOS.33 IgG1f S267E (3 мкг/мл) или контрольное антитело hIgG1f (3 мкг/мл) захватывали на поверхности белка А до плотности ~ 400-500 RU и связывание FcγR аналитов тестировали в рабочем буфере, состоящем из 10

мМ NaPO₄, 130 мМ NaCl, 0,05% p20, pH 7,1 буфера (PBS-T) при 25°C, используя время ассоциации 120 с и время диссоциации 180 с при скорости потока 30 мкл/мин. Для определения кинетики и аффинности связывания тестировали серии концентраций FcγR (разведение 3:1) от 1 мкМ до 0,15 нМ (белки CD64) или от 10 мкМ до 1,5 нМ (все другие FcγR). Кинетические данные соответствовали либо модели Ленгмюра 1:1, либо равновесной модели с использованием оценочного программного обеспечения Biacore T200.

Данные сенсограммы, которые продемонстрировали очень высокие скорости ассоциации и диссоциации со связыванием в равновесном состоянии, аппроксимировали к модели аффинности в равновесном состоянии 1:1, при этом данные, которые продемонстрировали более медленную кинетику, аппроксимировали к модели Ленгмюра 1:1. Данные при концентрациях одного анализита (hCD64 при 0,11 мкМ и hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158, hCD16a-F158, hCD16b-NA1 и hCD16b-NA21 при 1,1 мкМ) сравнивали для контрольного анти-ICOS антитела и ICOS.33 IgG1f S267E, при этом ICOS.33 IgG1f S267E показало более высокое связывание и более медленную скорость диссоциации для нескольких из FcγR, при этом hCD32a-R131 и hCD32b имели наиболее заметные увеличения в связывании и более медленные скорости диссоциации.

Кинетические и аффинные значения наилучшего соответствия приведены в табл. 25. Эти данные количественно продемонстрировали, что мутация S267E изменяет аффинность связывания для нескольких FcR по сравнению с контрольным антителом hIgG1f. Например, связывание с hCD32a-R131 улучшилось от значения K_D 1500 нМ (контроль hIgG1f) до 34 нМ (ICOS.33 IgG1f S267E), что соответствовало улучшению более чем в 40 раз, а связывание с hCD32b улучшилось от значения K_D, равного более 5000 нМ (контроль hIgG1f) до 170 нМ (ICOS.33 IgG1f S267E), что соответствовало улучшению по меньшей мере в 29 раз. Связывание с супо CD32a и CD32b было ниже, чем наблюдалось для CD32a и CD32b человека.

Таблица 25. Данные по кинетике и аффинности для связывания ICOS.33 IgG1f S267E с FcγR человека

Лиганд	FcγR	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (нМ)	Модель
Анти-ICOS контрольное антитело	hCD64	1,1 x 10 ⁶	6,0 x 10 ⁻⁵	0,1	1:1 Аппр.Ленгмюра
	hCD32a-H131			1100	Афф-ть в стац.сост.
	hCD32a-R131			1500	Афф-ть в стац.сост.
	hCD32b			>5000	Афф-ть в стац.сост.
	hCD16a-V158			560	Афф-ть в стац.сост.
	hCD16a-F158			>5000	Афф-ть в стац.сост.
	hCD16B-NA1			3500	Афф-ть в стац.сост.
	hCD16B-NA2			>5000	Афф-ть в стац.сост.
ICOS.33 IgG1fS267E	hCD64	1,6 x 10 ⁶	5,1 x 10 ⁻⁵	0,03	1:1 Аппр.Ленгмюра
	hCD32a-H131			840	Афф-ть в стац.сост.
	hCD32a-R131			34	Афф-ть в стац.сост.
	hCD32b			170	Афф-ть в стац.сост.
	hCD16a-V158			1400	Афф-ть в стац.сост.
	hCD16a-F158			>5000	Афф-ть в стац.сост.
	hCD16B-NA1			1400	Афф-ть в стац.сост.
	hCD16B-NA2			>5000	Афф-ть в стац.сост.
	cyCD64			88	1:1 Аппр.Ленгмюра
	cyCD32a			4000	Афф-ть в стац.сост.
	cyCD32b			2300	Афф-ть в стац.сост.
	cyCD16			1700	Афф-ть в стац.сост.

Пример 12 Фармакокинетические параметры (PK) ICOS.33 IgG1f S267E

Параметры PK, полученные в результате исследования PK/PD и переносимости с однократным введением с использованием ICOS.33 IgG1f S267E, приведены в обобщенном виде в табл. 26. Воздействие было дозопропорциональным в диапазоне от 1 мг/кг до 10 мг/кг, при этом период полувыведения составил 13-14 дней. Антитела против препарата (ADA) были обнаружены через семь дней после введения дозы у трех из четырех яванских макак в группе, получавшей дозу 1 мг/кг, и продолжали увеличиваться вплоть до 42 дней после введения дозы. Увеличение сигнала ADA соответствовало быстрому клиренсу антитела у этих обезьян, и эта часть данных, зависящих от ADA, не была включена в анализ PK-данных.

Таблица 26. Фармакокинетические параметры ICOS.33 IgG1f S267E после внутривенного (IV) введения яванским макакам

Исследование	Номер обезьяны	Доза (мг/кг)	Площадь под кривой (AUC)(0-INF) (мкМ × d)	T½ (период полувыведения) (дни)	Клиренс (CLT) (мл/сутки/кг)	Объем в стац.сост. (Vss) (мл/кг)
DT15107	4 (2 самки / 2 самца)	1	2.2 ± 0.4	13 ± 2.8	3.1 ± 0.46	57 ± 3.9
	4 (2 самки / 2 самца)	10	23 ± 3.8	14 ± 3.3	2.9 ± 0.48	66 ± 11

Фармакокинетика мышинового суррогатного антитела у мышей

Фармакокинетику суррогатного mAb против мышинового ICOS (ICOS.4, вариант мышинового IgG1 родительского хомячьего антитела) после однократной внутривенной дозы 1 мг/кг и однократного внутрибрюшинного введения (в дозе 0,1, 1 и 10 мг/кг) оценивали у не несущих опухоли мышей BALB/c, представляющих собой лабораторный штамм домашней мыши-альбиноса. Антитело показало более чем допропорциональное увеличение воздействия в диапазоне доз 1 мг/кг-10 мг/кг, как показано в табл. 27. Период полувыведения варьировался от 0,53 суток при самой низкой дозе 1 мг/кг до 1,5 суток при самой высокой дозе 10 мг/г. Нелинейная PK у мышей, по-видимому, обусловлена, по меньшей мере отчасти, мишень-опосредованным распределением препарата.

Таблица 27. Фармакокинетические параметры ICOS.4 мышинового IgG1 после внутрибрюшинного введения мышам

Способ введения	Доза (мг/кг)	Cmax (нМ)	AUC(0-INF) (мкМ × d)	T1/2 (сутки)	CLT (мл/сутки/кг)	Vss (мл/кг)
IV	1		0,15	0,65	43,2	101,4
IP	0,1	4,1	0,005	0,55		
IP	1	51	0,187	0,53		
IP	10	703	3,3	1,5		

Пример 13. Перекрестная реактивность и окрашивание тканей

Анализы связывания продемонстрировали, что аффинность (EC50) ICOS.33 IgG1f S267E к активированным CD4+ Т-клеткам была сходной у мышей, крыс, яванских макаков и людей.

В анализе тканевой перекрестной реактивности FITC-конъюгированное ICOS.33 IgG1f S267E наносили на замороженные срезы (фиксированные ацетоном или ацетоном/формалином) из 20 нормальных человеческих тканей, каждой от одного до четырех доноров. Специфическое окрашивание наблюдалось в поднаборах лимфоцитов в лимфоидных тканях (тимус, миндалины и селезенка) и в богатых лимфоидных тканях (желудок и тонкая кишка), а также рассеянных очень редко мононуклеарных клетках (MNC) в нескольких тканях (щитовидная железа, кожа, легкое, матка и яичко), которые в значительной степени связаны с лежащим в основе воспалением. Положительное мечение не наблюдалось в головном мозге, мозжечке, сердце, печени, почках, поджелудочной железе, периферических нервах, толстой кишке, гипофизе и предстательной железе. В лимфоидных тканях положительные лимфоциты в основном распределены в мозговом веществе тимуса, в светлой зоне терминального центра и межфолликулярной области миндалин. Эти результаты согласуются с предыдущей иммуногистохимией (ИHC) с использованием родительского антитела ICOS.4.

ICOS.33 IgG1f S267E-FITC окрашивание также оценивали иммуногистохимическим методом (ИHC) на замороженных срезах из 10 нормальных тканей яванского макака, включая головной мозг, сердце, печень, легкие, почки, селезенку, тимус, миндалины, кожу и яичко. В целом, картины окрашивания были сходными с тканями человека. Специфическое окрашивание наблюдалось в поднаборах лимфоцитов в лимфоидных тканях (миндалины, селезенка и тимус). Непрогнозируемого окрашивания в исследованных тканях не было обнаружено.

Пример 14. Высвобождение цитокинов, активация комплемента и переносимость

Высвобождение цитокинов в цельной крови человека, обработанной ICOS. 33 IgG1fS267E

Это исследование было разработано для оценки ответов цитокинов в клетках периферической крови человека после обработки ICOS.33 IgG1f S267E на свежих образцах цельной крови.

Свежую нормальную натрий-гепаринизированную цельную кровь (100 мкл) добавляли в 96-луночные круглодонные планшеты. В лунки добавляли 100 мкл ICOS.33 IgG1f S267E или ICOS.33, разведенного в бессывороточной среде AIM-V, изотипического контрольного анти-KLH-hIgG1-2F5 mAb или анти-CD28 mAb TGN (5.11A1) с получением конечной концентрации антител 10 мкг/мл на лунку и конечного объема 200 мкл на лунку. В лунки добавляли SEB (100 мкл), разведенный в среде AIM-V, с получением конечной концентрации 100 нг/мл SEB и конечного объема 200 мкл на лунку. В лунки добавляли CD3-CD28 (100 мкл), разведенные в среде AIM-V, с получением конечной концентрации 1 мкг/мл CD3-CD28 и конечного объема 200 мкл на лунку. В лунки добавляли LPS (100 мкл), разведенный в среде AIM-V, с получением конечной концентрации 10 мкг/мл LPS и конечного объема 200 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в инкубаторе в атмосфере в атмосфере 5-7% CO₂ в течение 20 ч при 37°C. Супернатанты культуры плазматических клеток из каждой лунки собирали через 20 ч и хранили

при -20°C . Образцы отправляли в BMS Lawrenceville, NJ (LVL) в контейнере с сухим льдом для проведения анализа.

Для оценки секреции цитокинов 12 мкл предварительно смешанных стандартов, контролей и образцов переносили в аналитические планшеты. Магнитные шарики (6 мкл) добавляли в каждый 384-луночный планшет, затем герметизировали и инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре на планшетном шейкере. После двух часов инкубации магнитные шарики дважды промывали и в каждую лунку добавляли 6 мкл детектирующих антител. Планшеты снова герметично закрывали и инкубировали при комнатной температуре на планшетном шейкере. Стрептавидин-фикоэритрин (6 мкл) добавляли в каждую лунку, содержащую детектирующие антитела, затем инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре и дважды промывали с использованием устройства для отмывки планшетов. Проточную жидкость (80 мкл) добавляли в каждую лунку, и шарики ресуспендировали в течение пяти минут на планшетном шейкере. Образцы на планшете считывали с использованием системы Bioplex 3D Instrument Array System. Необработанные данные измеряли как среднюю интенсивность флуоресценции (MFI). Концентрацию (пг/мл) рассчитывали с помощью программного обеспечения Xponent.

Панель из 75 цитокинов оценивали в крови от восьми нормальных доноров-людей на высвобождение цитокинов, опосредованное ICOS.33 IgG1f S267E. Добавление ICOS.33 IgG1f S267E к донорской цельной крови не опосредовало секрецию цитокинов по сравнению с изотипическим контролем. Эти данные показали, что лечение ICOS.33 IgG1f S267E не приводит к синдрому высвобождения цитокинов (CRS) в цельной крови.

Исследование токсичности при интервальном внутривенном введении доз у обезьян

Это исследование проводили для определения потенциальной токсичности и биологической активности ICOS.33 IgG1f S267E при внутривенном введении обезьянам либо один раз в неделю, либо один раз каждые три недели в течение периода, составляющего один месяц, для оценки обратимости любых наблюдаемых изменений, определения системных воздействий ICOS.33 IgG1f S267E, оценки иммунных ответов и получения данных, поддерживающих применение ICOS.33 IgG1f S267E у людей. ICOS.33 IgG1f S267E вводили внутривенно в виде медленной болюсной инъекции в дозах 0 (носитель, один раз в неделю на Дни 1, 8, 15, 22 и 29), 1,5 мг/кг (один раз каждые 3 недели на Дни 1 и 22), 15 мг/кг (один раз в неделю) или 75 мг/кг (один раз в неделю) в группах, состоящих из пяти самок обезьян и пяти самцов обезьян. Все дозы вводили при 2 мл/кг в наполнителе/носителе, состоящем из 20 мМ гистидина, 260 мМ сахарозы, 50 мМ диэтилтриаминпентауксусной кислоты и 0,05% (мас./об.) полисорбата 80 (pH 6,0). В качестве потенциальных фармакодинамических показателей, по меньшей мере частично, всех обезьян иммунизировали гемоцианином лимфы улитки (KLH, иммуноген для стимуляции первичного ответа), вирусными векторами Аденовирус-5 (Ad5)-Gag и Ad5-Nef (иммуноген для стимуляции антигенспецифического CD8 T-клеточного ответа) и столбнячным анатоксином (иммуноген для стимуляции вторичного ответа) на День 1. Например, иммунизация столбнячным анатоксином позволяет увеличить число T-клеток, специфических в отношении столбнячного анатоксина, и позволяет оценить PK/PD антигенспецифической популяции.

Критерии для оценки включали выживаемость, токсикокинетику, клинические наблюдения (включая поведение, связанное с потребностью в пище), массу тела, физические (включая дыхательные, сердечно-сосудистые и неврологические) и офтальмологические обследования, оценки клинической патологии, оценку иммуногенности (анти-ICOS.33 IgG1f S267E антитела; ADA), иммунотоксикологические и фармакологические оценки (включая занятость рецептора и экспрессию рецептора на CD4 хелперных T-клетках, T-клеточно-зависимый ответ антител (TDAR) на KLH или анатоксин столбняка, фенотипирование лимфоцитов периферической крови, активацию T-клеток, фенотипирование антигенспецифических T-клеток и вторичный ответ *ex vivo* на KLH, Gag или Nef пептиды), массу органов, а также анализ методом макро- и микроскопической патологии. Запланированные вскрытия проводились через 1 месяц (три/группа/пол) и после 8-недельного периода восстановления (два/группа/пол).

После повторного дозирования средние системные воздействия ICOS.33 IgG1f S267E (AUC [0-T]) увеличивались приблизительно дозопропорционально от 15 мг/кг до 75 мг/кг (один раз в неделю) без существенных различий, связанных с полом, наблюдаемых при всех дозах. После повторного дозирования в дозе 1,5 мг/кг (один раз каждые три недели) средние системные воздействия ICOS.33 IgG1f S267E (AUC [0-504 ч]) были ниже (0,4x), чем после дозирования на День 1, тогда как значения AUC (0-168 ч) после повторного дозирования в дозе 15 и 75 мг/кг (QW) были несколько выше (в 2,1-2,6 раза), чем после дозирования на День 1, предполагая накопление.

Вызванные лечением ответы ADA были обнаружены у 8 и 2 из 10 обезьян на группу при дозе 1,5 мг/кг (один раз каждые три недели) и 15 мг/кг (один раз в неделю), соответственно, на День 8 или после него. Во время фазы восстановления ADA были обнаружены только у обезьян при дозе 1,5 мг/кг. После повторного дозирования концентрации ICOS.33 IgG1f S267E в сыворотке у обезьян с ADA были, как правило, неизмеряемыми (т.е. < нижнего предела количественного определения; LLOQ) или ниже, чем у обезьян без ADA при 1,5 и 15 мг/кг, и присутствие ADA способствовало снижению среднего значения AUC при 1,5 мг/кг.

Токсикокинетические сводные данные для ICOS.33 IgG1f S267E представлены в табл. 28.

Таблица 28. Токсикокинетические сводные данные - средние значения, объединенные по полу

Параметр	Период	1,5 мг/кг	ICOS.33IgG1fS267E	75 мг/кг (QW)
		(Q3W)	15 мг/кг (QW)	
Cmax	День 1	42,6	377	2,019
	День 22	39,2/47,4 ^a	680/733 ^a	3,790
AUC(0-168 ч) (мкг.ч/мл)	День 1	3,520	34,200	176,000
	День 22	2,860 ^b /4,610 ^a	71,800/84,600 ^a	452,000
AUC(0-504 ч) (мкг.ч/мл)	День 1	6,240 ^c	NA	NA
	День 2	2,510 ^d /NA ^a	NA	NA

^a Значения рассчитывали с включением/исключением данных от животных с детектируемыми вызванными лечением ADA на День 8 или/и после Дня 8 (через 168 ч после первой дозы).

^b Среднее значение системного воздействия усредняли из индивидуальных значений AUC(0-72 ч) и AUC(0-168 ч)

^c Среднее значение системного воздействия усредняли из индивидуальных значений AUC(0-168 ч), AUC(0-336 ч) и AUC(0-504 ч)

^d Среднее значение системного воздействия усредняли из индивидуальных значений AUC(0-72 ч), AUC(0-168 ч), AUC(0-336 ч) и AUC(0-504 ч)

NA = Не применимо

ICOS.33 IgG1f S267E хорошо переносилось при всех дозах без связанных с ICOS.33 IgG1f S267E клинических наблюдений или эффектов на массу тела, физические (включая дыхательные, сердечно-сосудистые и неврологические) и офтальмологические оценки, гематологию, коагуляцию, химический состав сыворотки, анализ мочи, массу органов и макро- или микроскопическую патологию. Кроме того, не наблюдалось связанных с ICOS.33 IgG1f S267E эффектов на Т-клеточнозависимый ответ антител (TDAR) на столбнячный анатоксин, абсолютное число цитотоксических Т-клеток, В-клеток и НК-клеток, подтипов Т-клеток (включая наивные CD4 Т-клетки, эффекторные CD4 Т-клетки памяти, CD25+ активированные CD4 Т-клетки, HLA-DR+ активированные CD4 Т-клетки, наивные CD8 Т-клетки, эффекторные CD8 Т-клетки памяти, CD25+ активированные CD8 Т-клетки и HLA-DR+ активированные CD8 Т-клетки), пролиферацию CD8+ Т-клеток и вторичные ответы *ex vivo* при любой тестируемой дозе.

Признаки ICOS.33 IgG1f S267E-опосредованных эффектов отмечались при всех дозах. Экспрессия рецептора ICOS на CD4 хелперных Т-клетках была близка к 0% через 4 ч после дозирования на День 1 при всех дозах, что свидетельствует о понижающей регуляции и/или интернализации рецептора ICOS, и в целом оставалась низкой в течение периода дозирования и восстановления при ≥ 15 мг/кг. Низкая экспрессия рецептора ICOS препятствовала оценке по существу занятости рецептора ICOS. При дозе 1,5 мг/кг, вводимой один раз каждые три недели, экспрессия рецептора ICOS на CD4 хелперных Т-клетках начала восстанавливаться после Дня 8, увеличилась до 41% перед дозированием на День 22, снизилась до 4% после дозирования на День 22 и увеличилась до 42% на День 29. Полное восстановление экспрессии рецептора наблюдалось ко Дню 43 (91%). Занятость рецептора, как правило, коррелировала с экспрессией рецептора (например, 71% и 85% RO на Дни 22 [перед дозированием] и 29). Как правило, уровни экспрессии рецептора ICOS обратно коррелировали с концентрациями ICOS.33 IgG1f S267E в сыворотке. Это согласуется с заключением, что антитело ICOS.33 IgG1f S267E вызвало утрату рецептора.

Имела место дозозависимая супрессия специфических к гемоцианину лимфы улитки (KLH) ответов IgM (до 52% на День 8) и IgG (до 78% на День 29) по сравнению с контролем-носителем. Супрессия Т-клеточно-зависимого ответа антител на KLH с помощью ICOS.33 IgG1f S267E может представлять альтернативный способ действия и наблюдалась в предыдущем исследовании на яванских макаках. Хотя и без привязки к какому-либо механизму, супрессия TDAR агонистом костостимулирующего пути ICOS может быть связана с нарушенным агонизмом Т-хелперных клеток в результате ранней и устойчивой понижающей регуляции экспрессии ICOS.

Другие связанные с ICOS.33 IgG1f S267E эффекты при всех или некоторых уровнях доз во время периода дозирования и/или восстановления включали уменьшение среднего абсолютного числа общих Т-клеток и CD4 хелперных Т-клеток, процентное содержание CD4 регуляторных Т-клеток, процентное содержание CD4+ Т-клеток центральной памяти, процентное содержание CD8+ Т-клеток центральной памяти, процентное содержание Ki67+ CD4+ Т-клеток и процентное содержание Gag+ и Nef+ CD8 Т-клеток.

В заключение, ICOS.33 IgG1f S267E клинически переносился обезьянами в течение одного месяца при внутривенных дозах ≤ 75 мг/кг, вводимых один раз в неделю. Связанные с ICOS.33 IgG1f S267E эффекты отмечались при всех дозах, как это продемонстрировано изменениями экспрессии и занятости рецептора ICOS, супрессией Т-клеточно-зависимого ответа антител на KLH, пониженными уровнями некоторых поднаборов Т-клеток, пониженной CD4-Т-клеточной активацией и пониженным процентным содержанием антигенспецифических CD8 Т-клеток. Многие из этих изменений все еще проявлялись к концу периода восстановления при ≥ 15 мг/кг QW, что соответствовало продолжению воздействия

ICOS.33 IgG1f S267E в течение периода восстановления и последующей устойчивой понижающей регуляции экспрессии рецептора ICOS при этих дозах. Более низкая доза в 1,5 мг/кг, вводимая один раз каждые три недели, привела к более низким концентрациям в сыворотке ICOS.33 IgG1f S267E после первой дозы и обеспечила восстановление рецептора на клеточной поверхности перед второй дозой. Не было никаких неблагоприятных обнаружений, связанных с ICOS.33 IgG1f S267E. Таким образом, уровень ненаблюдаемого неблагоприятного воздействия (NOAEL) считался равным 75 мг/кг (среднее значение AUC[0-168 ч] 452,000 мкг.ч/мл). Кроме того, для потенциального определения максимальной рекомендуемой начальной дозы для человека доза 75 мг/кг также считалась самой высокой неопасной токсической дозой (HNSTD).

Исследование фармакокинетики вводимых внутривенно однократных доз и занятости рецептора у обезьян

Фармакокинетику ICOS.33 IgG1f S267E оценивали у обезьян, не подвергавшихся воздействию белка. Всех обезьян иммунизировали внутримышечно 2,5 мг гемочианина лимфы улитки (KLH). После иммунизации обезьянам вводили внутривенно ICOS.33 IgG1f S267E в 20 мМ гистидине (pH 6,0), 250 мМ сахарозном буфере, 50 мкМ пентетической кислоты (DPTA) и 0,05% полисорбата 80 в дозах 0,1 мг/кг или 10 мг/кг (N = 2/пол для носителя и группы 1 и 10 мг/кг) через бедренную вену. Серийные образцы крови (около 0,5 мл) собирали перед дозированием и через 6, 24, 72, 168, 240, 336, 408, 504, 672, 840 и 1008 часов после дозирования. Образцы крови оставляли для свертывания и затем центрифугировали при 4°C (1500-2000×g) с получением сыворотки. Образцы сыворотки хранили при -20°C и для анализа помещали на сухой лед. Образцы, не подвергнутые анализу в день получения, хранили замороженными в морозильной камере, настроенной на поддержание температуры ≤-70°C, до проведения анализа.

Образцы сыворотки яванских макаков анализировали с использованием надлежащего иммунологического анализа Gygos® для детекции ICOS.33 IgG1f S267E. Биотинилированный человеческий ICOS mG1 (партия № 22Oct2015-Biotin) использовали в качестве молекулы захвата для ICOS.33 IgG1f S267E. Образцы, стандарты и QC доводили до конечной концентрации матрицы, равной 10% сыворотки яванского макака и загружали в Gyrolab. Использовали метод Wash 2 V2 Wizard с Gyrolab Bioaffy 200 CD. После заключительных стадий промывки захваченное ICOS.33 IgG1f S267E детектировали с использованием меченого Alexa 647 мышиного анти-Нн IgG Fc-специфического моноклонального антитела, клон 10C7 (партия № 15C3483473-10C7A) в качестве молекулы детектирования. Концентрацию ICOS.33 IgG1f S267E в образцах сыворотки яванского макака рассчитывали по интенсивности флуоресценции, измеренной с помощью Gyrolab, с использованием 4-параметрической логистической (4-PL) калибровочной кривой, генерированной из калибраторов ICOS.33 IgG1f S267E.

Диапазон калибровочной кривой ICOS.33 IgG1f S267E составлял от 3 до 30000 нг/мл в сыворотке яванского макака. Верхний и нижний пределы количественного определения составили 30000 нг/мл и 3 нг/мл, соответственно (т.е. ULOQ 30000 нг/мл, LLOQ 3 нг/мл). Образцы для контроля качества готовили при концентрации 20, 200, 2000 и 20000 нг/мл в сыворотке яванского макака и анализировали на каждом CD для обеспечения приемлемых результатов анализа. Калибраторы, QC и образцы разводили в 10 раз в РТВ. Результаты анализа находились в приемлемом диапазоне: % CV стандартов был ниже 25%, а восстановление QC находилось в пределах ±30% от номинальных значений.

Образцы сыворотки обезьян анализировали с помощью ABO/BAS, Lawrenceville, New Jersey, с использованием надлежащего электрохемилюминесцентного иммуноанализа на платформе Meso Scale Discovery (MSD) на присутствии анти-ICOS.33 IgG1f S267E ADA. Супернатант клеточного антиидиотипического мышиного антитела ICG.33 IgG1f S267E использовали для получения положительного контроля (PC). Биотинилированное ICOS.33 IgG1f S267E использовали в качестве молекулы захвата, и ICOS.33 IgG1f S267E, меченное Sulfo Tag, использовали в качестве реагента для обнаружения. Биотинилированное ICOS.33 IgG1f S267E и меченное Sulfo Tag ICOS.33 IgG1f S267E разводили в РТВ и объединяли с получением мастер-микса с конечной концентрацией биотинилированного ICOS.33 IgG1f S267E 1000 нг/мл и 1000 нг/мл Sulfo Tag-меченного ICOS.33 IgG1f S267E. Образцы разбавляли при 10% минимально необходимого разведения (MRD) в мастер-миксе и инкубировали при 22°C в течение 2 ч. Затем мастер-микс переносили в покрытый стрептавидином планшет MSD при 50 мкл/лунку. После еще 1 ч инкубации при 22°C планшет промывали и добавляли буфер для считывания MSD. Затем планшет сразу же считывали с использованием MSD Sector Imager 6000. Присутствие детектируемых анти-ICOS.33 IgG1f S267E антител в образцах сыворотки обезьян определяли, используя отношение сигнала образца к отрицательному сигналу образца.

Образцы сыворотки обезьян анализировали с помощью BAR, Lawrenceville, New Jersey. Образцы сыворотки яванского макака анализировали на "общее" ICOS.33 IgG1f S267E с использованием жидкостной хроматографии с обращенной фазой с прямым расщеплением трипсином с tandemной масс-спектрометрией (LC/MS/MS). Образцы сыворотки обезьян также анализировали на дезамидированное и немодифицированное ICOS.33 IgG1f S267E в положении N329 с использованием иммуноаффинного обогащения в сочетании с захватом мишени LC/MS/MS. Стандартные кривые, определяющие диапазон анализа, готовили в коммерчески полученной сыворотке яванского макака и анализировали с образцами для

исследования в качестве полного аналитического набора. Концентрации для "общего" ICOS.33 IgG1f S267E представляли в мкг/мл посредством электронной таблицы Excel для токсикокинетической и фармакокинетической интерпретации.

Значения PK-параметров рассчитывали с использованием некомпартментного метода анализа (Phoenix WinNonlin 6.4, Certara, Princeton, New Jersey). Значения воздействия ниже нижнего предела количественного определения (LLOQ: <10 нг/мл (0,07 нМ) для ICOS.33 IgG1f S267E) не использовали в анализе. Площадь под кривой от момента времени 0 до момента отбора последнего образца (AUC (0-T)) рассчитывали с использованием комбинации линейного и логарифмического метода трапеций.

PK-параметры ICOS.33 IgG1f S267E после однократной внутривенной дозы в 1 мг/кг и 10 мг/кг для яванских макак приведены в табл. 29. После внутривенного введения концентрации ICOS.33 IgG1f S267E в плазме показали биэкспоненциальный спад. Ускоренный клиренс наблюдался у трех из четырех обезьян в группе, получавшей 1 мг/кг, после Дня 7. В результате, для анализа использовали только данные по концентрации-времени вплоть до Дня 14 для всех животных в группе, получавшей дозу 1 мг/кг, и сообщалось, что AUC (0-14d) устраняет влияние ADA.

Тестирование на иммуногенность образцов плазмы показало, что у пяти из восьми обезьян, включенных в исследование, развивались ADA, и что обезьяны с более высокими уровнями ADA показали более быстрый клиренс при дозе 1 мг/кг. AUC (0-42d) сообщалось для группы, получавшей 10 мг/кг. ICOS.33 IgG1f S267E продемонстрировало близкое к дозопропорциональному увеличению C_{max} и AUC (0-T) и AUC (0-INF). При увеличении дозы в соотношении 1:10 значение C_{max} у самцов и самок обезьян увеличилось при соотношении 1:8 и 1:8, соответственно; и значение AUC (0-T) увеличилось при соотношении 1:16 и 1:11 соответственно, и значение AUC (0-INF) увеличилось при соотношении 1:11 и 1:11, соответственно.

Концентрации интактного ICOS.33 IgG1f S267E и дезамидированного продукта после внутривенного введения дозы 10 мг/кг количественно определяли с использованием LCMS/MS. Концентрации дезамидированного продукта составляли от 0,5 до 8% от общего ICOS.33 IgG1f S267E во всех измеренных временных точках. Значение AUC (0-42 день) для дезамидированного продукта составило 2,9% от воздействия общего ICOS.33 IgG1f S267E.

Таблица 29. Сводные данные по фармакокинетическим параметрам

Параметр	ICOS.33IgG1fS267E					
	1 мг/кг ^{a,c}			10 мг/кг ^{b,c}		
	М	F	Среднее	М	F	Среднее
C _{max} (мкМ)	0,168±0,006	0,161±0,006	0,165±0,006	1,4±0,019	1,3±0,046	1,38±0,02
T _{1/2} (дни)	14 ± 3	11 ± 0,7	13 ±2,7	14 ± 5,2	14 ± 2,3	14 ±2,7
AUC(0-T) (мкМ·день)	1,28 ± 0,2	1,5 ± 0,7	1,2 ± 0,1	21 ± 0,5	16,9 ± 0,5	19 ± 0,5
AUC(0-INF) (мкМ·день)	2,3 ± 0,5 ^d	2 ± 0,09 ^d	2,17 ± 0,2 ^d	25,9 ± 2,5	20,4 ± 2,3	23 ± 3,8

^a AUC(0-T) ограничивается 14 днями в группе, получавшей дозу 1 мг/кг

^b AUC(0-42d) представлена для животных в группе, получавшей дозу 10 мг/кг

^c Число обезьян = 2/пол

^d >20% AUC экстраполировано

Хотя *in vitro* наблюдалось увеличенное связывание C1q, отсутствие явных клинических признаков в исследовании однократной дозы у обезьян и отсутствие гемодинамических эффектов на "cardiovascular instrumented" модели обезьян свидетельствует о низком риске активации комплемента. ICOS.33 IgG1f S267E хорошо переносилось при внутривенном введении в виде однократной дозы 1 мг/кг или 10 мг/кг яванским макакам с пропорциональным дозе увеличением воздействия. Неблагоприятных результатов клинической лабораторной диагностики не наблюдалось.

Пример 15. Конкуренция анти-ICOS антител за связывание

Эксперименты по эпитопспецифической сортировке выполняли для определения, какие анти-ICOS-антитела конкурируют с какими другими за связывание с huICOS. Эпитоп-специфическая сортировка представляет собой процесс, в котором используется конкурентный иммуноанализ для тестирования антител парным комбинаторным способом, и антитела, которые конкурируют за одну и ту же область связывания, то есть за один и тот же или перекрывающийся эпитоп антигена, объединяют в семейства (bins). Парную конкуренцию между анти-huICOS-антителами определяли следующим образом. Эталонное антитело (т.е. ICOS.33, 20N4, 27B9, 23B6, 12D10, 23A10, 15B7, 12F3, 13B4, 17H9, 26E11, 23H5, 6D1, 12A9, 5C4, 10B10, 17C4, 1D7, 21E1, 9F11, 15H11, 25B10, 8A10, 4D11, 6D5, 7C6, 26E9, 3E8, 16H4, 25E4 или 2644) связывали с поверхностью сенсорного чипа, тестируемое антитело предварительно инкубировали с полипептидной конструкцией huICOS в смеси и предварительно инкубированную смесь пропускали над

сенсорным чипом для определения степени, до которой тестируемое антитело препятствует связыванию полипептидной конструкции huICOS с эталонным антителом на поверхности чипа. Конкурентные эксперименты выполняли с использованием инструмента BIACORE® Surface Plasmon Resonance (SPR). В частности, эталонное анти-huICOS-антитело иммобилизовали на поверхностях чипа Sensor Chip CM5 (Серии S, GE Healthcare, номер по каталогу BR-1005-30), проточной ячейке 2, проточной ячейке 3 и проточной ячейке 4 (5000 резонансных единиц, RU) и проточную ячейку 1 использовали в качестве отрицательного контроля. Тестируемое антитело (т.е. ICOS.33, 20H4, 27B9, 23B6, 12D10, 23A10, 15B7, 12F3, 13B4, 17H9, 26E11, 23H5, 6D1, 12A9, 5C4, 10B10, 17C4, 1D7, 21E1, 9F11, 15H11, 25B10, 8A10, 4D11, 6D5, 7C6, 26E9, 3E8, 16H4, 25E4 или 2644) разбавляли до 120 мкг/мл (2X) при начальной концентрации. Серии разведений тестируемого антитела выполняли путем разбавления 1:3 концентрации антитела буфером для семи различных концентраций и контрольного образца (с 0 мкг/мл) для получения кривой титрования. Серии концентраций каждого антитела делили пополам. В первой половине серий концентраций добавляли 40 нМ (2X) антигена ICOS человека (например, huICOS/Fc) с получением серий конечных концентраций (60 мкг/мл - 0,0 мкг/мл) и 20 нМ конечной концентрации антигена в каждой лунке. Во второй половине серий концентраций вместо антигена добавляли буфер с получением антитела, разбавленного до той же концентрации, и эту половину обрабатывали как контрольную. Комплексы тестируемых анти-ICOS-антител и huICOS/Fc инкубировали в течение 2 ч. 40 мкл комплексов вводили на покрытую эталонным антителом поверхность со скоростью 30 мкл/мин. Использовали инструмент BIACORE® T200 SPR и рабочий буфер в HBE-EP, GE Healthcare, номер по каталогу BR-1001-88, фильтровали, дегазировали, 0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 NaCl, 3 мМ EDTA, 0,005% сурфактант P20. Поверхность регенерировали с помощью 25 мМ NaOH (код заказа: BR-1003-58, GE Healthcare) при 100 мкл/мин в течение 5 с. Данные анализировали с использованием Microsoft Excel, где концентрацию тестируемых антител наносили на график против соответствующей единицы ответа с получением кривых титрования.

Эксперименты по конкурентному связыванию показали, что антитела ICOS.33, 20H4, 27B9, 23B6, 12D10, 23A10, 15B7, 12F3, 13B4, 17H9, 26E11, 23H5, 6D1, 12A9, 5C4, 10B10, 17C4, 1D7, 21E1, 9E11, 15H11 25B10, 8A10, 4D11, 6D5, 7C6 и 26E9 перекрестно конкурируют друг с другом и блокируют связывание лиганда (B7-H2; ICOS-L) с huICOS. Антитела 3E8, 16H4 и 25E4 перекрестно конкурируют друг с другом, но не блокируют связывание лиганда с huICOS. Напротив, хотя было обнаружено, что антитело 2644 перекрестно конкурирует с антителом 3E8, оно также способно блокировать связывание лиганда с ICOS.

Пример 16. Картирование эпитопов анти-ICOS-антитела

Картирование эпитопов анти-ICOS антител с помощью дрожжевого дисплея

Эпитопы для анти-huICOS антител 3E8 и ICOS.4 определяли посредством отображения случайным образом мутагенизированных вариантов внеклеточного домена человеческого ICOS (остатки 21-134 NP_036224.1, предоставленные в виде SEQ ID NO: 173) на клетках дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), и сортировки данных клеток дрожжей на основе их связывания или неспособности связываться с определенными антителами. Отобранные клетки дрожжей амплифицировали и подвергали дополнительным кругам отбора на основе их способности связываться с тестируемыми анти-ICOS антителами (См., например, Chao et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 342:539). Последовательности для вариантов huICOS определяли для полученных дрожжей и анализировали эффекты каждого остатка на связывание антитела. Эпитоп связывания для антител по настоящему изобретению определяется в виде локуса в пределах последовательности huICOS, где одиночные аминокислотные мутации нарушают связывание с анти-huICOS антителами согласно настоящему изобретению.

Вкратце, PCR пониженной точности использовали для клонирования ДНК, кодирующей человеческий ICOS (кодирующие остатки 21-134 SEQ ID NO: 1), в конструкции, делающие возможной экспрессию вариантов huICOS в виде аминоконцевых участков слитых белков, дополнительно содержащие последовательность метки с-тус и белок Aga1p клеточной стенки дрожжей. Такие конструкции, при экспрессии в дрожжах (*Saccharomyces cerevisiae*), отображают варианты полипептидов huICOS на поверхности дрожжевых клеток, прикрепленные к поверхности клетки с помощью полипептида Aga1p. Метку с-тус использовали в качестве положительного контроля для отображения huICOS-слитых белков на данной дрожжевой клетке. Затем эти дрожжевые клетки дополнительно сортировали на те, которые экспрессировали правильно свернутые huICOS-слитые белки (как определено по связыванию контрольного мышинового анти-huICOS антитела, детектируемого меченым аллофикоцианином (APC) козым анти-мышинным вторичным IgG), но не связывались с антителами по настоящему изобретению (как определено детекцией с меченым фикоэритрином (PE) козым антителом к человеческому IgG в качестве вторичного антитела). Эти отобранные дрожжевые клетки объединяли, амплифицировали и использовали в последующем круге отбора. Последовательность huICOS определяли для конструкций из дрожжей, оставшихся после отбора.

Популяции дрожжей, связывающиеся с ICOS.4 и 3E8, демонстрируют различные паттерны мутации, что указывает на то, что эти два антитела распознавали разные эпитопы. Аналогичные эксперименты проводили с антителом 9D5, которое блокирует связывание ICOS-лиганда с ICOS и которое конкури-

рует с ICOS.4. Для экспериментов с 9D5 использовали молекулярную модель трехмерной структуры ICOS, основанную на кристаллической структуре комплекса CTLA-4/B7-2 (например, Stampfer et al. (2001) Nature 410:608), чтобы различать, какие аминокислотные остатки замаскированы и какие экспонированы на поверхности, чтобы определить, какие из выбранных мутаций являются наиболее вероятными антителоспецифическими контактными остатками (т.е. остатками эпитопа), а не простыми разрушающими структуру мутациями. Идентифицированные с помощью дрожжевого дисплея эпитопы для ICOS.4, 3E8 и 9D5 представлены в табл. 30. Эпитопы в табл. 30 представлены в виде перечня остатков в huICOS SEQ ID NO: 1, который включает сигнальную последовательность из 20 аминокислот. Соответственно, номера остатков для зрелого huICOS (т.е. белка ICOS без сигнальной последовательности) будут остатками, указанными в табл. 30, уменьшенными на 20 (например, V48 с сигнальными последовательностями или V28 без сигнальной последовательности).

Таблица 30. Эпитопы анти-ICOS mAb

Клон	ICOS остатки (SEQ ID NO: 1)
ICOS.4	V48, Q50, G70, S71, G72, F114, D115, P116, P117, P118, L123
3E8	D64, K78, S79, L80, K81, F82, S85
9D5	P45, I47, P117, P118, K120

Аналогичные эксперименты по дрожжевому дисплею проводили с ICOS-L (B7-H2) вместо анти-ICOS mAb для определения, какие остатки на ICOS являются критическими для взаимодействия ICOS/ICOS-L, т.е. сайт связывания для ICOS-L на ICOS. Было определено, что сайт связывания ICOS-L находится у остатков Q50, K52, F114, P117, P118 и F119 ICOS, как указано в SEQ ID NO: 1. Проверка эпитопов для анти-ICOS mAb в табл. 30 дает основание предположить, что ICOS.4 и 9D5 должны блокировать связывание ICOS-L, тогда как 3E8 может не блокировать, что согласуется с тем, что наблюдалось экспериментально (как обсуждалось в примере 15 выше).

Картирование эпитопа анти-ICOS антител с помощью HDX-MS

Эксперименты по обмену дейтерием с антителами ICOS.4 и 9D5 подтвердили, что область из S112 и L123 контактирует, когда ICOS связывается с ICOS-L, что указывает на функциональную эпитопную область остатков 112-123 ICOS (SEQ ID NO: 1), или SIFDPPPFKVTL (SEQ ID NO: 203). Эта область перекрывается с С-концевой частью эпитопа, определенной с помощью дрожжевого дисплея, и представляет наибольшую группу остатков вдоль первичной последовательности.

Эпитопы для анти-huICOS антител ICOS.4 и 9D5 определяли с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS), см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996), как описано в настоящем документе. ICOS-Fc смешивали с mAb в соотношении 1:1 и HDX-MS запускали в течение 1, 10 мин, 4 ч в двух повторах.

Результаты показывают, что ICOS.4 и 9D5 связываются с одним и тем же прерывистым эпитопом, который показан ниже (эпитоп подчеркнут) и на фиг. 1.

```

MKSGLWYFFLFCLRIKVLTEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGQ 60
ILCDLTKTKGSGNTVSIKSLKFCBSQLSNNSVSPFLYNLDHSHANYFCNLSIFDPPPFK 120
VTLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVVVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEY 180
MEMRAVNTAKKSRRLTDVTL 199
(SEQ ID NO:1)

```

Пример 17. Экспрессия ICOS в периферической крови и опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах от пациентов с раком легкого, почки и толстой кишки

Понимание экспрессии ICOS на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах (TIL) в различных типах опухолей и популяциях пациентов помогло идентифицировать соответствующие признаки заболевания и популяцию пациентов для эффективной терапии ICOS.33 IgG1f S267E, особенно в сочетании с агентами против PD-1, такими как ниволумаб. Частота и величина экспрессии ICOS и PD-1 в клетках периферической крови и TIL (CD8+ и CD4+ Т-клетках) были профилированы в образцах немелкоклеточного рака легкого, почечно-клеточной и колоректальной карциномы (CRC).

Свежие опухолевые ткани и соответствующие образцы периферической крови получали от пациентов с раком легкого, раком почки или CRC (ConversantBio, MT Group, Benaroya) и погружали на ночь при 4°C в Hypothermosol FRS (Biolife Solutions) и ACD Solution A (BD Biosciences), соответственно. Все образцы обрабатывали и окрашивали в период 24 ч после операции. Ткани опухолей взвешивали и диссоциировали с использованием набора для диссоциации Miltenyi (Miltenyi, номер по каталогу 130-095-929), при этом клетки периферической крови выделяли после лизиса красных кровяных клеток (RBC) в буфере для лизиса RBC (BioLegend, номер по каталогу 420301). Клеточные суспензии (из опухолевой ткани или периферической крови) дважды промывали HBSS (без Ca, без Mg), окрашивали красителем NIR Viability Dye (Molecular Probes by Life Technologies, Catalog L34976), блокировали сывороткой АВ человека в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко (dPBS) и вносили в лунки, содержащие смеси антител (табл. 31), для инкубации на льду в темноте в течение 45 мин. Затем клетки дважды промывали смесью dPBS/BSA/азид Na, фиксировали и пермеабелизировали с использованием буферного набора FOXP3 (BioLegend, номер по каталогу 421403). Контроли "флуоресценция минус один" (FMO) готовили

для всех антител и использовали для определения положительных клеточных популяций. Образцы анализировали на проточном цитометре Fortessa (BD Biosciences) и данные анализировали с использованием программного обеспечения Flow Jo (Tree Star).

Как показано в табл. 31, была разработана панель для изучения экспрессии множества маркеров, и была проанализирована экспрессия ICOS на CD8+ и CD4+ Т-клетках.

Таблица 31. Антитела, используемые для иммунофлуоресцентного окрашивания для поднаборов Т-клеток

Маркер	Клон	Флуорофор	Поставщик	Номер по каталогу
CD3	SK7	BUV 395	BD Biosciences	564001
CD4	OKT4	BV 785	BioLegend	317442
FOXP3	206D	AF647	BioLegend	320114
CD25	4E3	PE-e610	eBioscience	61-0257-42
CD152	BN13	BV 421	BD Biosciences	562743
CD45	HL30	AF700	BD Biosciences	560566
Viability	--	Near IR	ThermoFisher Scientific	L10119
2B4	C1.7	AF488	BioLegend	329506
CD8a	SK1	BV605	BD Biosciences	564116
ICOS	C398.4A	BV510	BioLegend	313525
CD56	NCAM16.2	BV650	BioLegend	318343
PD-1	EH12.1	PE	BioLegend	560795

Для окрашивания Treg, Teff, В-клеток и НК-клеток свежие опухоли рака головы и шеи, легкого, CRC и эндометрия помещали в 6-луночный планшет, лежащий на льду, погружали в 1-2 мл среды для диссоциации. Опухоли разрезали на маленькие кусочки и опухолевый раствор помещали в гомогенизатор Dounce для диссоциации. Опухолевые растворы фильтровали через фильтр 70 мкм с дополнительной средой для диссоциации и центрифугировали. Полученные клетки ресуспендировали в окрашивающем буфере. Свежий образец ткани метастатической опухоли сальника диссоциировали с использованием набора для диссоциации Miltenyi (Miltenyi, номер по каталогу 130-095-929). Замороженные образцы опухолей оттаивали и по каплям добавляли ДНКазу (2 мл раствора ДНКазы). Оттаявшую среду (8 мл, нагретую в бане при 37°C) добавляли к раствору опухоли и ДНКазы, и фильтровали через фильтр 70 мкм. Клетки центрифугировали и ресуспендировали в окрашивающем буфере.

Экспрессию ICOS на TIL оценивали с помощью анализа FACS. Полученные из опухолей клеточные суспензии блокировали окрашивающим буфером, содержащим Near-IR Dead Cell Stain. Поверхностные маркеры клеточных популяций окрашивали антителами (как показано в табл. 32) для определения положительных клеточных популяций с последующим внутриклеточным окрашиванием FOXP3 после фиксации и пермеабиллизации. Данные проточной цитометрии собирали с использованием проточного цитометра Fortessa X-20. После гейтирования параметров маркеров FSC-SSC-Live/Dead для исключения дедбриса и мертвых клеток определяли частоту ICOS+ клеток для поднаборов CD4+ Teff, Treg, CD8+ Т-клеток, В-клеток и НК-клеток. Анализ Cd4+ методом проточной цитометрии выполняли с помощью программного обеспечения FlowJo.

Таблица 32. Антитела, используемые для иммунофлуоресцентного окрашивания В-клеток, НК-клеток и поднаборов Т-клеток

Конъюгат	Мишень	Компания	Каталог	Клон
Alexa Fluor® 700	CD8	BioLegend	301028	RPA-T8
BUV395	CD8	BD Biosciences	563795	RPA-T8
BUV737	CD14	BD Biosciences	564444	M5E2
BUV805	CD4	BD Biosciences	564910	SK3
BV421	ICOS	BioLegend	313524	C398.4A
BV510	CD45	BioLegend	304036	HL30
BV510	CD45RA	BioLegend	304142	HL100
BV605	CD11c	BioLegend	301636	3.9
BV650	CD15	BioLegend	323034	W6D3
BV650	CD45	BD Biosciences	563717	HL30
BV711	PD1	BD Biosciences	564017	EH12.1
BV786	CD3	BD Biosciences	563800	SK7
PE/Cy5	CD19	BioLegend	302210	HLB19
PE/Cy7	FOXP3	eBioscience	25-4777-42	236A/E7
PE-eFluor® 610	CD56	eBioscience	61-0567-42	CMSSB
PerCP/Cy5.5	HLADR	BD Biosciences	560652	G46-6

Экспрессию ICOS оценивали с использованием анти-ICOS C398.4a клона в образцах цельной крови от 16 здоровых доноров и 14 пациентов с раком легкого, 22 пациентов с RCC и 14 пациентов с CRC. По сравнению со здоровыми донорами показатели частоты ICOS+ CD4+ Т-клеток, полученных от пациентов, имеющих рак, были более высокими (табл. 33, $P < 0,001$ для всех групп пациентов, имеющих рак, по сравнению со здоровыми донорами, тест Манна-Уитни). Показатели частоты ICOS+ CD8+ Т-клеток от пациентов с RCC были значительно более высокими по сравнению со здоровыми донорами (табл. 33, $P < 0,01$, тест Манна-Уитни). В образцах крови от пациентов, имеющих рак легкого и CRC, процентное со-

держание ICOS+ CD8+ Т-клеток также было более высоким, чем в образцах от здоровых доноров, без достижения статистической значимости (табл. 33).

Поскольку наблюдались более высокие показатели частоты, чем сообщалось в литературе, и поскольку клон С398.4а положительно окрашивал больше Т-клеток, чем другой обычно используемый клон ISA-3,6,7,8,9,10, показатели частоты клеток, экспрессирующих высокие уровни ICOS (ICOS^{hi}) также были подвергнуты анализу. В соответствии с работами на эту тему, CD8+ Т-клетки экспрессировали минимальные количества ICOS^{hi}, сопоставимые с фоновыми (табл. 33). Однако в случае CD4+ Т-клеток показатели частоты клеток ICOS^{hi} варьировались в среднем от 3,0% у здоровых доноров до 4,9% у пациентов с RCC (табл. 33, RCC по сравнению со здоровыми: P<0,05, тест Манна-Уитни).

Затем экспрессию ICOS оценивали в TIL 11 пациентов с раком легких, 21 пациента с RCC и 8 пациентов с CRC. Показатели частоты ICOS+ CD4+ и ICOS+ CD8+ TIL были сходными для разных типов опухолей (табл. 34). Как и в периферической крови, была измерена высокая экспрессия ICOS CD4+ и CD8+ TIL Т-клетками. В среднем, больший процент CD4+ Т-клеток экспрессировал высокие уровни ICOS, чем CD8+ Т-клеток (табл. 34). Также измеряли коэкспрессию ICOS и PD-1 в TIL. Высокие уровни PD-1 (PD-1^{hi}) экспрессировались ICOS^{hi} CD4+ TIL с большой вариабельностью между пациентами (табл. 34). По сравнению с ICOS^{hi} CD4+ TIL более высокая доля ICOS^{hi} CD8+ Т-клеток коэкспрессировала высокие уровни PD-1 (табл. 34).

Таблица 33. Средние показатели частоты \pm SD ICOS+ и ICOS^{hi} CD4+ и CD8+ Т-клеток в образцах периферической крови от здоровых доноров и пациентов с раком

	Здоровые (N=16)	NSCLC (N=14)	RCC (N=22)	CRC (N=14)
% ICOS+ CD4+Т-клетки	21 \pm 7	43 \pm 15	39 \pm 16	42 \pm 19
% ICOS+ CD8+Т-клетки	14 \pm 8	23 \pm 14	25 \pm 12	23 \pm 14
% ICOS ^{hi} CD4+Т-клетки	3,0 \pm 1,8	3,5 \pm 1,8	4,9 \pm 2,9	3,7 \pm 2,4
% ICOS ^{hi} CD8+Т-клетки	0,9 \pm 0,7	0,9 \pm 0,8	1,3 \pm 0,9	0,9 \pm 0,7

Сокращения:

ICOS^{hi}: Клетки, экспрессирующие высокие уровни ICOS; N: Количество образцов; SD: Стандартное отклонение; NSCLC: Немелкоклеточный рак легкого; RCC: Почечно-клеточная карцинома; CRC: Колоректальная карцинома

Таблица 34. Средние показатели частоты \pm SD ICOS+, ICOS^{hi} и PD-1^{hi} ICOS^{hi} CD4+ и CD8+ Т-клеток в TIL от пациентов с раком

	NSCLC (N=11)	RCC (N=21)	CRC (N=8)
% ICOS+ CD4+Т-клетки	59 \pm 21	53 \pm 19	63 \pm 14
% ICOS+ CD8+Т-клетки	35 \pm 19	35 \pm 20	27 \pm 21
% ICOS ^{hi} CD4+Т-клетки	28 \pm 15	19 \pm 20	29 \pm 12
% ICOS ^{hi} CD8+Т-клетки	8,3 \pm 7,2	6,5 \pm 8,5	4,8 \pm 4,5
% PD-1 ^{hi} ICOS ^{hi} CD4+Т-клетки	43 \pm 18	48 \pm 23	33 \pm 17
% PD-1 ^{hi} ICOS ^{hi} CD8+Т-клетки	63 \pm 16	71 \pm 29	62 \pm 23

Сокращения:

SD: Стандартное отклонение; ICOS^{hi}: Клетки, экспрессирующие высокие уровни ICOS; PD-1: Клетки, экспрессирующие высокие уровни PD-1; TIL: Опухоль-фильтрующие лимфоциты; NSCLC: Немелкоклеточный рак легкого; RCC: Почечно-клеточная карцинома; CRC: Колоректальная карцинома; N: Количество образцов

Образцы опухолей человека от пациентов с двумя аденокарциномами легких, одной аденокарциномой эндометрия, одним метастазом сальника серозно-папиллярной карциномы, одним метастазом печени колоректальной аденокарциномы и одной плоскоклеточной карциномой головы и шеи диссоциировали и окрашивали для анализа проточной цитометрией экспрессии ICOS на различных популяциях лимфоцитов. Из пяти различных популяций лимфоцитов (CD4+ T_{eff}, T_{reg}, CD8+ Т-клетки, В-клетки, NK-клетки) CD4+ T_{eff} и T_{reg} экспрессировали ICOS с самыми высокими показателями частоты. В клеточных популяциях, которые экспрессировали ICOS (CD4 T_{eff}, T_{reg}, CD8 Т-клетки и NK-клетки), T_{reg} экспрессировали больше ICOS на каждую клетку по сравнению с другими типами клеток.

Таким образом, ICOS экспрессировался на более высоких уровнях на CD4+ Т-клетках, чем в CD8+ Т-клетках периферической крови и TIL. Экспрессия ICOS была различной у пациентов и была сходной для трех протестированных типов опухолей. В среднем 33-48% ICOS^{hi} CD4+ TIL и 62-71% ICOS^{hi} CD8+ TIL коэкспрессировали высокие уровни PD-1. Кроме того, T_{reg} экспрессировали более высокие уровни ICOS, чем CD4+ T_{eff}s, CD8+ Т-клетки, NK-клетки и В-клетки в микроокружении опухоли человека.

Пример 18. Когортное исследование по эскалации и комбинированию доз для оценки безопасности и переносимости, фармакокинетики и эффективности ICOS.33 IgG1f S267E, взятого в отдельности или в сочетании с одним или несколькими анти-PD-1 антителами, одним или несколькими анти-PD-L1 антителами и/или одним или несколькими анти-CTLA-4 антителами у пациентов с солидными опухолями на поздней стадии

Фазы 1/2 открытого исследования ICOS.33 IgG1f S267E, вводимого в качестве монотерапии или в комбинации с анти-PD-1 антителом, анти-PD-L1 антителом и/или анти-CTLA-4 антителом (например, ниволумабом и/или ипилимумабом), проводили у участников с солидными опухолями на поздней стадии.

Исследование включало следующие части:

- 1) монотерапия с эскалацией доз (Когорты предварительной безопасности (Preliminary Safety Cohorts) и Часть А);
- 2) комбинированная терапия с эскалацией доз с применением ниволумаба (Часть В) или ипилимумаба (Часть С); и
- 3) фаза лечения максимально переносимой дозой (dose expansion phase) с применением ниволумаба (Часть D) или ипилимумаба (Часть Е).

Цели исследования

Первичной целью данного исследования является оценка безопасности и переносимости ICOS.33 IgG1f S267E, вводимого отдельно и в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом, у участников с солидными опухолями на поздней стадии.

Вторичные цели включают исследование предварительной эффективности ICOS.33 IgG1f S267E, вводимого отдельно и в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом, у участников с солидными опухолями на поздней стадии; характеристику ПК ICOS.33 IgG1f S267E, вводимого отдельно и в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом у участников с солидными опухолями на поздней стадии; характеристику иммуногенности ICOS.33 IgG1f S267E, вводимого отдельно и в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом у участников с солидными опухолями на поздней стадии; и мониторинг связывания с мишенью ICOS.33 IgG1f S267E, вводимого отдельно и в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом, у участников с солидными опухолями на поздней стадии.

Кроме того, поисковые цели включают изучение связи между противоопухолевой активностью и измерениями специфических биомаркеров в опухолевой ткани и в периферической крови до лечения и после введения ICOS.33 IgG1f S267E, взятого в отдельности и в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом; характеристику взаимосвязи(ей) между ПК ICOS.33 IgG1f S267E, взятого в отдельности и в комбинации с ПК ниволумаба или ПК ипилимумаба, и безопасностью, эффективностью и/или клиническими биомаркерами; оценку общей выживаемости (OSR) у участников, получавших ICOS.33 IgG1f S267E, взятое в отдельности и в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом; характеристику ПК и иммуногенности ниволумаба и ипилимумаба при введении в комбинации с ICOS.33 IgG1f S267E; характеристику иммуногенности ниволумаба и ипилимумаба при введении в комбинации с ICOS.33 IgG1f S267E; оценку потенциального эффекта ICOS.33 IgG1f S267E на откорректированный интервал QT (QTc); и изучение связей между выбранными биомаркерами периферической крови и частотой нежелательных явлений (AE) и серьезных нежелательных явлений (SAE).

Общий дизайн

Схема дизайна исследования показана на фиг. 27.

Монотерапия состоит из двух разных когорт:

Когорты предварительной безопасности (Preliminary Safety Cohorts): ICOS.33 IgG1f S267E вводили в виде монотерапии в дозе 2 мг и 8 мг один раз каждые четыре недели в течение 24 недель.

Часть А: ICOS.33 IgG1f S267E вводили в дозе 25, 80, 200, 400 и 800 мг один раз каждые четыре недели в течение 24 недель.

Части В и С состоят из когорт, получавших различную комбинированную терапию, включающих:

В1: ICOS.33 IgG1f S267E вводили один раз каждые 12 недель + ниволумаб 480 мг один раз каждые 4 недели при начальном уровне дозы ICOS.33 IgG1f S267E, рекомендованной моделью Байесовской логистической регрессии (BLRM)-Copula и имеющимися данными ПК/PD из Части А.

В2: ICOS.33 IgG1f S267E вводили один раз каждые 4 недели + ниволумаб 480 мг один раз каждые 4 недели при уровне дозы ICOS.33 IgG1f S267E, рекомендованной моделью Байесовской логистической регрессии (BLRM)-Copula (BLRM-RD) и имеющимися данными ПК/PD из части А.

С1: ICOS.33 IgG1f S267E вводили один раз каждые 12 недель + ипилимумаб 3 мг/кг один раз каждые 4 недели при начальном уровне дозы ICOS.33 IgG1f S267E, рекомендованной моделью Байесовской логистической регрессии (BLRM)-Copula и имеющимися данными ПК/PD из части А.

С2: ICOS.33 IgG1f S267E вводили один раз каждые 4 недели + ипилимумаб 3 мг/кг один раз каждые 4 недели при уровне дозы ICOS.33 IgG1f S267E, рекомендованной моделью Байесовской логистической регрессии (BLRM)-Copula и имеющимися данными ПК/PD из части А.

Набор в части В1 и С1 проводили одновременно. Набор в части В2 и С2 проводили только в том случае, если для оптимизации дозы и/или выбора схемы требовались дополнительные данные по безопасности, ПК или PD.

Дозы ICOS.33 IgG1f S267E для частей В и С (комбинация с ниволумабом или ипилимумабом) определялись с использованием всех доступных данных по безопасности (клинической и лабораторной), ПК и биомаркерам связывания с мишенью/фармакодинамическим биомаркерам, а также рекомендаций по моделированию в рамках моделирования Байесовских иерархических сетей, т.е. модель BLRM-Copula, пу-

тем включения профилей токсичности одного агента как ICOS.33 IgG1f S267E (Когорты предварительной безопасности и часть А), так и ниволумаба или ипилимумаба, и любые доступные профили токсичности комбинаций из частей В и С (для последующих доз ICOS.33 IgG1f S267E в Частях В и С), моделирование PK/PD, и не превышали максимальную введенную дозу (MAD) монотерапии ICOS.33 IgG1f S267E в Когортах предварительной безопасности и части А. Уровень дозы ICOS.33 IgG1f S267E, рекомендованный моделью BLRM-Copula, т.е. BLRM-RD, определяется как общее понятие, таким образом, что BLRM-RD для любой когорты всегда основывается на всей доступной и самой последней информации.

Ни в один момент доза ICOS.33 IgG1f S267E, вводимая в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом (части В и С), не превышала дозу ICOS.33 IgG1f S267E, определенную как безопасная в группе, получавшей монотерапию с эскалацией доз (часть А), либо ни в один момент во время комбинированной терапии в частях В и С доза ICOS.33 IgG1f S267E не превышала самую высокую дозу, определенную как переносимая в группе, получавшей монотерапию с эскалацией доз (часть А). Кроме того, начальный уровень дозы ICOS.33 IgG1f S267E, применяемого в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом (части В и С), был на один уровень дозы ниже, чем доза при монотерапии (часть А), которая прошла период DLT.

Части В1 и С1 состоят из PK/фармакодинамического подисследования, нацеленного на изучение кинетики понижающей регуляции и повторной экспрессии ICOS-рецептора (и/или изменения выбранных биомаркеров связывания с мишенью/фармакодинамических биомаркеров) после введения ICOS.33 IgG1f S267E в присутствии многократных доз ниволумаба один раз каждые 4 недели (Часть В1) или ипилимумаба один раз каждые 4 недели (часть С1).

Различные дозы ICOS.33 IgG1f S267E вводили в частях В1 и С1:

Дозы, которые индуцируют или, согласно прогнозу, будут индуцировать различные уровни понижающей регуляции рецептора ICOS, включая по меньшей мере одну дозу, которая индуцирует почти полную понижающую регуляцию рецептора (и/или изменение выбранных биомаркеров связывания с мишенью/фармакодинамических биомаркеров) на протяжении по меньшей мере 4 недель. Эти уровни доз позволяют охарактеризовать кинетику повторной экспрессии рецептора ICOS после почти полной понижающей регуляции в течение периода времени, равного, меньшего и/или превышающего интервалы дозирования, используемые в части А. Понимание кинетики рецептора ICOS может обеспечить информацию об интервалах дозирования тестируемого ICOS.33 IgG1f S267E для будущего исследования(й).

BLRM-RD: Уровни доз определяли на основе всех доступных данных по безопасности (клинической и лабораторной) и PK, а также изменений маркеров связывания с мишенью в периферической крови (например, понижающая регуляция ICOS на Т-клетках и ICOS+ В-клетках) из предыдущих и завершенных частей текущих когорт, и/или модели BLRM/BLRM-Copula, когда это применимо.

После 24 недель лечения в виде монотерапии или двух лет комбинированной терапии участник может иметь право на повторное лечение. Для части А сканы собираются централизованно и могут быть просмотрены путем независимой центральной оценки в слепом режиме (BICR) позднее или в любое время в ходе исследования. Для частей В и С сканы собираются централизованно для пересмотра в реальном времени путем BICR.

Физические осмотры, измерения основных показателей состояния организма, 12-канальная ЭКГ и клинично-инструментальные оценки выполняли в определенные моменты на протяжении интервалов дозирования.

Участников тщательно контролировали в отношении АЕ на протяжении всего исследования. Кровь собирали для анализов PK во время визитов последующего наблюдения на 30, 60 и 100 день после введения исследуемого препарата.

Участники завершали четыре фазы исследования: скрининг, лечение, последующее наблюдение для оценки безопасности и последующее наблюдение для оценки ответа/выживаемости, как описано ниже. Общая продолжительность участия в исследовании составила около 2 лет.

Вакцина против столбняка

Все пациенты в частях А, В и С получали одобренную вакцину против столбняка. Введение мощного сенсибилизирующего антигена, такого как столбнячный анатоксин, подготавливает иммунную систему, индуцирует иммунный ответ и способствует более иммуногенному состоянию.

Способность ICOS.33 IgG1f S267E усиливать вторичный иммунный ответ будет определяться путем мониторинга антител к столбняку, а также пролиферативными и цитокиновыми ответами CD4+ Т-клеток после вакцинации против столбняка. Приблизительно 70% населения в целом имеют защитные антитела к столбняку. Однако клеточные иммунные ответы обычно выявляются в периферической крови через месяц после вакцинации против столбняка. Столбняк использовали в качестве репортерного антигена у онкологических пациентов, получающих иммунотерапию вакцинами, и его можно легко контролировать. Следовательно, вакцинация против столбняка может обеспечить мощный вторичный иммунный ответ с помощью ICOS.33 IgG1f S267E, взятого в отдельности и в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом.

Скрининг

Фаза скрининга длилась до 28 дней и проходила до первого введения исследуемого препарата. Во время фазы скрининга устанавливается первоначальное соответствие участника критериям и подписывается форма информированного согласия. Биопсии опухолей собирают у всех участников, централизованно оценивают на экспрессию ICOS с помощью иммуногистохимии, и результаты оценивают перед введением первой дозы исследуемого препарата. Участников набирают с использованием интерактивной технологии связи (IRT).

Фаза лечения

Фаза лечения в Когорте предварительной безопасности и части А состоит из шести четырехнедельных циклов лечения (1 цикл = 28 дней). В Когорте предварительной безопасности и части А каждый цикл лечения состоял из монотерапии ICOS.33 IgG1f S267E в течение в общей сложности 24 недель.

Уровни доз для частей В и С определяли на основании всех доступных данных по безопасности (клинической и лабораторной) и РК, а также изменений маркеров связывания с мишенью в периферической крови (например, понижающая регуляция ICOS на Т-клетках и ICOS+ В-клетках) из предыдущей и завершившей части текущих когорт, и руководствовались моделью BLRM/BLRM-Copula, по мере необходимости.

В частях В1 и С1 использовали четырехнедельные циклы, то есть ICOS.33 IgG1f S267E + ниволумаб или ипилиумаб вводили, начиная со Дня 1 Цикла 1. Ниволумаб и ипилиумаб вводили на День 1 каждого цикла. ICOS.33 IgG1f S267E вводили один раз каждые 12 недель или на День 1 каждого третьего цикла (День 1 Цикла 1, День 1 Цикла 4, День 1 Цикла 7 и т.д.). Участники в частях В1 и С1 продолжали лечение в общей сложности до 2 лет.

Фаза лечения в частях В2 и С2 состояла из ICOS.33 IgG1f S267E + ниволумаб или ипилиумаб, вводимых на День 1 каждого цикла в течение общей сложности до 2 лет, и набор участников производили только в том случае, если требовались дополнительные данные по безопасности, РК или PD для оптимизации дозы и/или режима введения.

После каждого цикла лечения решение о лечении участника дополнительными циклами исследуемого препарата основывалось на оценках опухолей, проводимых каждые 12 недель (один раз каждые 12 недель ± 1 неделя) и завершаемых до первой дозы в следующем цикле. Конечные точки прогрессирования или ответа опухоли оценивали согласно критериям оценки ответа опухолей на лечение (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST) v1.1 или рекомендациям рабочей группы по проведению клинических исследований по раку предстательной железы (Prostate Cancer Working Group 3 (PCGW3)) (Scher et al., 2016. Trial Design and Objectives for Castration-Resistant Prostate Cancer: Updated Recommendations From the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group 3. Clin Oncol. 34(12): 1402-1418).

Лечение после прогрессирования с помощью дополнительных циклов исследуемого препарата допускалось до максимум 24 недель для части А и двух лет для частей В, С, D и E у отдельных участников с первоначально определенным PD согласно RECIST v1.1 или PCGW3 (только предстательная железа) после обсуждения и соглашения между руководителем клинического исследования и медицинским наблюдателем/ответственным исполнителем о том, что оценка польза/риск служит аргументом в пользу продолжения введения исследуемого препарата (например, участники продолжают испытывать клиническую пользу по оценкам исследователя, переносят лечение и отвечают другим конкретным критериям).

Участники с ответом неподтвержденного прогрессирующего заболевания (PD), стабильным заболеванием (SD), частичным ответом (PR) или полным ответом (CR) в конце данного цикла переходили на следующий цикл лечения. Участникам, как правило, разрешалось продолжать лечение в рамках исследования до появления одно из следующего:

- 1) завершение максимального количества циклов,
- 2) подтвержденное PD,
- 3) клиническое ухудшение, предполагающее отсутствие вероятности дальнейшей пользы от лечения,
- 4) непереносимость терапии или
- 5) участник, удовлетворяющий критериям прекращения лечения в рамках исследования.

Отдельным участникам с подтвержденным CR предоставлялась возможность прекращения лечения в рамках исследования в каждом конкретном случае после специальной консультации и соглашения между руководителем клинического исследования и медицинским наблюдателем/ответственным исполнителем в ситуациях, когда соотношение польза/риск оправдывало прекращение лечения в рамках исследования.

Последующее наблюдение для оценки безопасности

После завершения 24 недель лечения в рамках исследования для части А (или максимум до 48 недель, при необходимости) или двух лет для частей В, С, D и E (или максимум до четырех лет, при необходимости), принималось решение о прекращении участия участника в исследовании (например, после завершения лечения [ЕОТ]), и все участники вступали в период последующего наблюдения для оценки безопасности.

Для участников, которые завершили все запланированные циклы терапии, визит ЕОТ является та-

ким же, как и последний запланированный и завершающий лечение визит и началом визита последующего наблюдения для оценки безопасности на неделе 1. Для участников, которые не завершили все запланированные циклы лечения в рамках исследования, визит ЕОТ является самым последним визитом в период лечения (со всеми доступными данными по безопасности и ответам) и считался началом визита последующего наблюдения для оценки безопасности.

После визита ЕОТ всех участников оценивали на наличие новых АЕ в течение по меньшей мере 100 дней после последней дозы лечения в рамках исследования. Последующие визиты для наблюдения за АЕ происходили на Дни 30, 60 и 100 после последней дозы или день прекращения участия в исследовании (± 7 дней). Все участники должны завершить 3 контрольных визита последующего наблюдения для оценки безопасности, независимо от того, начали ли они новое противораковое лечение или нет, кроме тех участников, которые отозвали свое согласие на участие в исследовании.

Последующее наблюдение для оценки выживаемости

После завершения визитов последующего наблюдения для оценки безопасности все участники, получавшие монотерапию и комбинированную терапию, вступили в период последующего наблюдения для оценки выживаемости. Участников наблюдали приблизительно каждые 3 месяца (12 недель) до смерти, "выпадения" из поля зрения, отзыва информированного согласия или завершения исследования, в зависимости от того, что наступит раньше. Продолжительность этой фазы составила до двух лет после первой дозы лечения в рамках исследования, хотя в отдельных случаях, если очевидны признаки эффективности, рассматривается более длительный период наблюдения. Последующее наблюдение для оценки ответа

После завершения периода последующего наблюдения для оценки безопасности участники с текущим SD, PR или CR на момент визита ЕОТ переходили в период последующего наблюдения для оценки ответа. Этот период происходил одновременно с периодом последующего наблюдения для оценки выживаемости упомянутых участников. Участники продолжали проходить рентгенологическую и клиническую оценку опухолей примерно каждые 3 месяца (12 недель) до смерти, "выпадения" из поля зрения, отзыва информированного согласия или завершения исследования, в зависимости от того, что наступит раньше. Радиологические оценки опухолей для участников, имеющих продолжающееся улучшение клинических показателей, продолжали проводить после завершения участниками фазы оценки выживаемости в рамках исследования. Участников, которые имели прогрессирование заболевания после начального курса лечения в рамках исследования, не оценивали на ответ после визита ЕОТ, и им разрешалось получать другую направленную на опухоль терапию по мере необходимости. Если участник прерывал лечение по какой-либо причине, отличной от PD, радиологическое последующее наблюдение проводили до тех пор, пока участник не получит дополнительное лечение. Лечение с помощью дополнительных циклов после 24 недель

Все участники получали лечение в течение 24 недель в виде монотерапии или комбинированной терапии, если критерии прекращения лечения не были достигнуты ранее. Все участники, завершающие лечение с продолжающимся контролем заболевания (CR, PR или SD) или неподтвержденным PD, допускались к дополнительным 24 неделям лечения в рамках исследования для части А или в общей сложности двум годам для комбинированной терапии в каждом конкретном случае после тщательной оценки и обсуждения с BMS медицинским наблюдателем/ответственным исполнителем для определения, поддерживает ли соотношение риск/польза проведение дальнейшего лечения в рамках исследования. После завершения дополнительного периода лечения в рамках исследования все участники переходили в период последующего наблюдения для оценки безопасности.

Лечение после прогрессирования

Лечение после прогрессирования разрешалось у отдельных участников с первоначальным PD, определенным согласно RECIST v1.1 или PCGW3 (только для предстательной железы), после обсуждения и соглашения с BMS медицинским наблюдателем/ответственным исполнителем о том, что оценка польза/риск свидетельствует в пользу продолжения введения исследуемого препарата (например, участники продолжают испытывать клиническую пользу по оценкам исследователя, переносят лечение и отвечают другим критериям).

Участники повторно давали согласие с приложением формы информированного согласия (ICF) для продолжения лечения после прогрессирования. Лечение после прогрессирования требует продолжения оценок опухоли. Повторное лечение в период последующего наблюдения для оценки ответа

Повторное лечение разрешалось в данном исследовании при прогрессировании заболевания во время периода последующего наблюдения. Участники, завершающие приблизительно 24 недели лечения в рамках исследования (или до максимально 48 недель, при необходимости) для части А и приблизительно два года лечения в рамках исследования (или до максимально 4 лет, при необходимости) для частей В, С, D и E или менее, в случае прерывания лечения вследствие CR, которые вступили в период последующего наблюдения для оценки ответа с продолжающимся контролем заболевания (CR, PR или SD) и без какой-либо значительной токсичности, допускаются к повторному лечению после последующего подтвержденного прогрессирования заболевания в течение 12 месяцев после последней дозы исследуемого препарата в каждом конкретном случае после тщательной оценки и обсуждения с BMS медицин-

ским наблюдателем/ответственным исполнителем для определения, поддерживает ли соотношение риск/польза проведение дополнительного лечения в рамках исследования, и продолжает ли участник отвечать критериям включения для лечения исследуемым препаратом.

Участники, отвечающие критериям для повторного лечения, подвергаются лечению с помощью первоначально назначенного режима монотерапии или комбинированной терапии (например, такой же дозы и режима дозирования, проводимого в течение первых 24 недель), если только впоследствии не будет установлено, что эта доза(ы) и режим превышают последний показатель BLRM-RD, и в этом случае участник получает лечение BLRM-RD. Участники, вступающие в эту фазу, следуют графику процедур. Образцы для ПК и фармакодинамики собирают реже (перед введением дозы в каждом цикле лечения). Во время повторного лечения собирают образцы фармакодинамических биомаркеров, полученных из крови.

Тип участника и характеристики целевого заболевания

а) Участники должны быть не моложе 18 лет и иметь гистологическое или цитологическое подтверждение метастатического и/или неоперабельного колоректального рака (CRC), плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), аденокарциномы предстательной железы (PRC) и уротелиального рака (UCC) с поддающимся измерению заболеванием согласно RECIST v1.1 или PCGW3 (только для предстательной железы) и иметь как минимум 1 поражение, доступное для биопсии в дополнение к целевому поражению.

б) Наличие по меньшей мере 1 поражения с измеримым заболеванием, как определено в RECIST v1.1 или PCGW3 (только для предстательной железы) для солидных опухолей для оценки ответа. Участники с поражениями в ранее облученной области в качестве единственного участка измеримого заболевания разрешаются для включения при условии, что поражение(я) продемонстрировало явное прогрессирование и может быть измерено.

в) Участники должны были получить, а затем прогрессировать или быть толерантными по меньшей мере к 1 стандартному режиму лечения в условиях поздней стадии или метастазирования, если такая терапия существует, и рассматривались для всех других потенциально эффективных терапий до включения.

г) Участники, ранее подвергавшиеся лечению любым средством, специально нацеленным на ингибирование путей контрольных точек (таких анти-PD-1, анти-PD-L1 или анти-CTLA-4), допускались после периода отмывания, составляющего любое время, превышающее 4 недели с момента последнего лечения.

Типы опухолей

а) Колоректальный рак (CRC)

i) Гистологически подтвержденный CRC, который является метастатическим или рецидивирующим с документально подтвержденным прогрессированием заболевания;

ii) Подтвержденная документально микросателлитная нестабильность, репарация неспаренных оснований, KRAS и BRAF статус, если известно;

iii) Требование к предшествующей терапии: участники должны были получить по меньшей мере 1, но не более чем 3 предшествующих терапии для метастатического и/или неоперабельного заболевания (или иметь прогрессирование в течение 6 месяцев после адъювантной терапии);

iv) Участник должен иметь неизлечимое метастатическое заболевание (т.е. пациенты с заболеванием, которое является потенциально излечимым путем хирургической резекции, не допускаются к лечению).

б) Плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC) (полость рта, глотка, гортань)

i) Гистологически подтвержденный неизлечимый местно-распространенный, рецидивирующий или метастатический HNSCC (полость рта, глотка, гортань), стадия III или IV и не поддающийся местной терапии с целью излечения (хирургическое вмешательство или лучевая терапия с химиотерапией или без нее).

ii) Должен иметь документально подтвержденный статус и подтип HPV, в частности, HPV16 и HPV18.

iii) Участники должны были получить и затем прогрессировать или быть нетолерантными или рефракторными по меньшей мере к 1, но не более чем к 2 предшествующим режимам системной терапии (например, химиотерапии на основе платины) для лечения метастатического или местно-распространенного нерезектабельного заболевания на поздней стадии.

iv) Предшествующая излечивающая радиационная терапия должна быть завершена по меньшей мере за 4 недели до введения исследуемого препарата. Предшествующая фокальная паллиативная радиационная терапия должна быть завершена по меньшей мере за 2 недели до введения исследуемого препарата.

в) Немелкоклеточный рак легкого (NSCLC)

i) Участники должны иметь гистологическое или цитологическое подтверждение NSCLC (согласно седьмой International Association for the Study of Lung Cancer [IASLC]) с плоскоклеточной или неплоскоклеточной гистологией, который находится на поздней стадии (метастатический и/или неоперабельный).

(1) Участники должны иметь по меньшей мере 1, но не более 2, предшествующих системных терапий NSCLC Поддерживающая, адъювантная или неоадъювантная (химиотерапия или химиорадиация) терапия не считаются дополнительной линией лечения.

(2) Участникам должны были предложить химиотерапию на основе платины для NSCLC. Химиотерапия на основе платины могла проводиться в условиях адъювантной, неоадъювантной или химиорадиационной терапии. Участники с рецидивирующим/метастатическим заболеванием, которое рецидивировало в течение 6 месяцев после завершения такого лечения, считаются подходящими для лечения в рамках лечения. Предшествующая адъювантная или неоадъювантная химиотерапия разрешается, если последнее введение предшествующего режима происходило по меньшей мере за 4 недели до включения в исследование.

(3) Предшествующая радикальная химиорадиация местно-распространенного заболевания также допускается, если последнее проведение химиотерапии или радиотерапии (в зависимости от того, какую терапию проводили последней) имело место по меньшей мере за 4 недели до включения в исследование.

(4) Участники с известными мутациями гена EGFR или реаранжировками гена ALK должны получать ингибиторы EGFR или ALK, соответственно. Мутационный статус EGFR, ALK, KRAS и ROS1 должен быть документально подтвержден, если таковой известен.

d) Аденокарцинома предстательной железы (PRC)

i) Гистологическое или цитологическое подтверждение аденокарциномы предстательной железы.

ii) Участники получали лечение путем орхиэктомии или получают аналог гормона, стимулирующего высвобождение лютеинизирующего гормона и имеют уровень тестостерона ≤ 50 нг/дл.

iii) Метастатический процесс по любой 1 из следующих форм: компьютерная томография (СТ), магнитно-резонансная томография (MRI) и сканирование костей.

e) Уротелиальная карцинома (UCC)

i) Гистологическое или цитологическое подтверждение метастатической или хирургически неоперабельной переходно-клеточной карциномы уротелия с вовлечением мочевого пузыря, мочеиспускательного канала, мочеточника или почечной лоханки. Дозолимитирующая токсичность (DLT) ICOS.33 IgG1fS267E.

В целях обеспечения повышения дозы, DLT определяли на основании частоты, интенсивности и продолжительности неблагоприятных явлений (AE), для которых не выявлено четкой альтернативной причины. Период DLT составляет 35 дней (5 недель).

В Когортах предварительной безопасности участники, которые получали 1 дозу ICOS.33 IgG1f S267E и завершили исследование, или которые прервали лечение из-за DLT в 4-недельный период DLT, рассматриваются как участники, оцениваемые на DLT для монотерапии ICOS.33 IgG1f S267E.

В части А участники, которые получали 2 дозы ICOS.33 IgG1f S267E и завершили исследование, или которые прервали лечение из-за DLT в 5-недельный период DLT, считаются участниками, оцениваемыми на DLT для монотерапии ICOS.33 IgG1fS267E.

В частях В, С, D и E участники, получающие 1 дозу ICOS.33 IgG1f S267E или 2 дозы либо ниволумаба, либо ипилиумаба, или участники, которые прервали лечение вследствие DLT во время 5-недельного периода оценки DLT после комбинированного лечения, рассматриваются как оцениваемые на DLT участники для комбинированного лечения. Участники, которые покинули исследование во время периода оценки DLT или получили менее 2 доз по причинам, отличным от DLT в монотерапии (часть А) или 1 дозу в комбинированной терапии (часть В, С, D, E), не рассматриваются как DLT-оцениваемые участники и не заменяются новым участником с тем же уровнем дозы. Участники в части А, у которых была задержка дозы во время периода оценки DLT по причинам, отличным от DLT, считаются DLT-оцениваемыми участниками, если они получали как минимум 2 дозы терапии.

В целях управления участниками любое AE, которое соответствует критериям DLT, независимо от цикла, в котором оно возникает, вызывает прекращение лечения в рамках исследования. Участники, которые покинули исследование во время 5-недельного периода оценки DLT по причинам, отличным от DLT, могут быть заменены новым участником при таком же уровне дозы. Частоту возникновения DLT во время 5-недельного периода оценки DLT учитывают при принятии решения об увеличении дозы и для определения BLRM-RD. Неблагоприятные явления (AE), возникающие после периода DLT, рассматриваются в целях определения BLRM-RD по соглашению между спонсором, медицинским наблюдателем/ответственным исполнителем и исследователями.

Участники, испытывающие DLT, входят в период последующего наблюдения для оценки безопасности. DLT, возникающие после периода наблюдения в отношении DLT в течение 4 недель для Когорт предварительной безопасности или после периода наблюдения в отношении DLT в течение 5 недель для частей А, В и С, учитывают при определении максимальной вводимой дозы (MAD) для комбинированной части.

Данное исследование показало, что вводимые анти-ICOS антитела являются безопасными и эффективными в лечении рака.

Пример 19. Комбинированные эффекты увеличения доз анти-ICOS антитела на рост опухоли

Эффект увеличения доз агонистического анти-ICOS антитела, ICOS.33 IgG1f S267E, в комбинации

с анти-PD-1 антителом оценивали по ингибированию роста опухоли в мышинной модели. Как показано на фиг. 28, комбинация показала пониженную эффективность при более высоких дозах, т.е. "хук-эффект", при котором близкие к насыщающим или насыщающие концентрации антитела приводят к снижению эффективности по сравнению с эффективностью антитела при более низких концентрациях, т.е. концентрациях, которые не приводят к насыщению.

Вкратце, мышей (массой в среднем около 20 мг) с установленными опухолями CT26 лечили либо анти-PD-1 монотерапией, либо в комбинации с ICOS.33 IgG1f S267E. Повышение дозы анти-ICOS начинали с 0,1 мг/кг с трехкратным увеличением до 10 мг/кг (или с максимальной дозой приблизительно 200 мкг/на мыш, фиксированная доза). Антитело против PD-1 вводили в дозе 10 мг/кг (или максимальной дозе приблизительно 200 мкг/мыш, фиксированная доза). Анти-ICOS и анти-PD1-антитело вводили по одной схеме (т.е. каждые 4 дня, начиная с Дня 7) после имплантации опухоли.

Как показано на фиг. 28, максимальное ингибирование роста опухоли (TGI) при комбинированной терапии анти-ICOS и анти-PD1 наблюдалось при более низкой дозе анти-ICOS антитела (3 мг/кг), чем при максимальной протестированной дозе (10 мг/кг), демонстрируя снижение TGI при дозах, превышающих 3 мг/кг, т.е. максимальная эффективность достигается при субнасыщающих дозах.

Таблица 35 Обобщенная информация по перечню последовательностей		
SEQ ID NO	Название последовательности	Последовательность
1	Человеческий ICOS (NP_036224.1)	MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI 40 LCKYPDIVQQ FKMQLLKGQ ILCDLTKTKG SGNVTSIKSL 80 KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD HSHANYFCN LSIFDPPPFK 120 VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF VVVCILGCIL 160 ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY MFMRAVNTAK KSRLTDVTL 199
2	Человеческий ICOS-L (NP_001269979.1)	MRLGSPGLLF LFFSSLRADT QEKEVRAMVG SDVELSCACP 40 EGSRFDLNDV YVYWQTSESK TVVYHIPQN SLENVDSRY 80 RNRALMSPAG MLRGDFSLRL FNVTPQDEQK FHCLVLSQSL 120 GFQEVLSVEV TLHVAANFSV PVSAPHSPS QDELTFCTCS 160 INGYPRPNVY WINKTDNSLL DQALQNDTVF LNMRLGLYDVV 200 SVLRIARTPS VNIGCCIEUV LQQLNLTVGS QTGNDIGERD 240 KITENPVSTG EKNAATWSIL AVLCLLVVA VAIGWVCRDR 280 CLQHSYAGAW AVSPETELTE SWNLLLLLS 309
3	Тяжелая цепь	EVQLVESGGG LVKPAAGSLTL SCVASGFTFS DYFMHWVRQA 40

	родительского хомячьего антитела	PGKGLEWVAV IDTKSFNYAT YYSDLVKGRF TVSRDDSQGM 80 VYLQMNLRK EDTATYYCTA TIAVPYYFDY WGQGTMTVTS 120 SATFTAPSVY PLAPACDSTT STTNTVTLGC LVKGYFPEPV 160 TVSWNSGALT SGVHTFPSVL HSGLYSLSSS VTPVSSTWPS 200 QTVTCNVAHP ASSTKVDKKI VPGDGGGCKP CTCPGPEVSS 240 VFIFPPKPKD VLTISLSPKV TCVVVDISQD DPEVQFSWFI 280 DGKEVHTAVT QPREEQFNST YRMVSVLPIL HQDWLNGKEF 320 KCKVNSPAPF VPIEKTISKR RGQLQVPQVY TMPPPKEQLT 360 QSQVSLTCMI KGFYPEDIDV AWQKNGQPEQ SFKNTPEVLD 400 TDETYFLYSK LDVKKDDWEK GDTFTCSVVH EALHNNHTEK 440 TLSQRPGK 448
4	Легкая цепь родительского антитела	DIQMTQSPSS LPASLGDRVT INCQASQDIS NYLSWYQQKP 40 GKAPKLLIYY TNLADGVPS RFGSGSGRDR YSFTISSLES 80 EDIGSYCQQ YYNYRTFGPG TKLEIKRADA KPTVSIFFPS 120 SEQLGTGSAT LVCVNNFYF KDINVKWKVD GSEKRDGVLD 160 SVTDQDSKDS TYLSSTLSL TKADYERHNL YTCEVTHKTS 200 TAAIVKTLNR NEC 213
5	Варибельный домен тяжелой цепи ICOS.33 IgG1f S267E	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYFMHWVRQA 40 PGKGLEWVGV IDTKSFNYAT YYSDLVKGRF TISRDDSNT 80 LYLQMNLSKT EDTAVYYCTA TIAVPYYFDY WGQGTMTVTS 120 S 121
6	Варибельный домен легкой цепи ICOS.33 IgG1f S267E	DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCQASQDIS NYLSWYQQKP 40 GKAPKLLIYY TNLAEVPS RFGSGSGTD FTFTISSLQP 80 EDIATYYCQQ YYNYRTFGPG TKVDIK 106
7	Тяжелая цепь ICOS.33 IgG1f S267E	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYFMHWVRQA 40 PGKGLEWVGV IDTKSFNYAT YYSDLVKGRF TISRDDSNT 80 LYLQMNLSKT EDTAVYYCTA TIAVPYYFDY WGQGTMTVTS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVT 160 SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ 200 TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCPAPELLG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMSRT PEVTCVVVDV EHEDEPKVFN 280 WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG 320 KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP 400 VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSKS VMHEALHNNH 440 TQKSLSLSPG 450
8	Легкая цепь ICOS.33 IgG1f S267E	DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCQASQDIS NYLSWYQQKP 40 GKAPKLLIYY TNLAEVPS RFGSGSGTD FTFTISSLQP 80 EDIATYYCQQ YYNYRTFGPG TKVDIKRTVA APSVFIFFPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYF REAKVQWKVD NALQSGNSQE 160 SVTEQDSKDS TYLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL 200 SSPVTKSFNR GEC 213
9	ICOS.33 IgG1f S267E CDRH1	DYFMH 5
10	ICOS.33 IgG1f S267E CDRH2	VIDTKSFNYA TYYSDLVKG 19
11	ICOS.33 IgG1f S267E CDRH3	TIAVPYYFDY 10
12	ICOS.33 IgG1f	QASQDISNYL S 11

	S267E CDRL1	
13	CDRL2 родительского хомячьего антитела	YTNLLAD 7
14	ICOS.33 IgG1f S267E CDRL2	YTNLLAE 7
15	ICOS.33 IgG1f S267E CDRL3	QQYYNYRT 8
16	Вариабельный домен тяжелой цепи 17C4	MDILCSTLLL LTVPSWVLSQ VTLRESGPAL VKPTQTLTTLT 40 CTFSGFSLST SGMCVSWIRQ PPGKALEWLA LIDWDDDKFY 80 STSLKTRLTI SKDTSKNQVV LTMNMDPVD TATYYCARMS 120 TPTYYGLDVW GQGTTVTVSS 140
17	Вариабельный домен легкой цепи 17C4	MRVLAQLLGL LLLCFPGARC DIQMTQSPSS LSASVGDVRT 40 ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 80 RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPLTFGG 120 GTKVEIK 127
18	17C4 CDRH1	TSGMCVS 7
19	17C4 CDRH2	LIDWDDDKFY STSLKT 16
20	17C4 CDRH3	MSTPTYGLD V 11
21	17C4 CDRL1	RASQGISSWL A 11
22	17C4 CDRL2	AASSLQS 7
23	17C4 CDRL3	QQYNSYPLT 9
24	Вариабельный домен тяжелой цепи 9D5	MDTLCSTLLL LTIPSWVLSQ ITLKESGPTL VKPTQTLTTLT 40 CTFSGFSLGT SGLGVGWIRQ PPGKALEWLA FIYWDDDKRY 80 SPSLKSRLLTI TKDTSKNQVV LTMNMDPVD TATYYCAHRR 120 GFFDYWGQGT LVTVSS 136
25	Вариабельный домен легкой цепи 9D5	MRVLAQLLGL LLLCFPGARC DIQMTQSPSS LSASVGDVRT 40 ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 80 RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPLTFGG 120 GTKVEIK 127
26	9D5 CDRH1	TSGLGVG 7
27	9D5 CDRH2	FIYWDDDKRY SPSSLKS 16
28	9D5 CDRH3	RRGFFDY 7
29	9D5 CDRL1	RASQGISSWL A 11
30	9D5 CDRL2	AASSLQS 7
31	9D5 CDRL3	QQYNSYPLT 9
32	Вариабельный домен тяжелой	MEFGLTWVFL VALLRGVQCQ VQLVESGGGV VQPGMSLRLS 40 CAASGFTFST YGMQWVRQAP GKGLEWTVI WHDGSHKDYA 80

	цепи 3E8	DSVKGRFTIS RDNSKNTMYL QMNSLRAEDT AVYYCARDRQ 120 TGEgyFDfWG QGTLVTVSS 139
33	Вариабельный домен легкой цепи 3E8	MRVLAQLLGL LLLCFPGARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT 40 ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 80 RfSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPYTFGQ 120 GTKLEIK 127
34	3E8 CDRH1	TYGMQ 5
35	3E8 CDRH2	VIWHDGSHKD YADSVKG 17
36	3E8 CDRH3	DRQTGEGYFD F 11
37	3E8 CDRL1	RASQGISSWL A 11
38	3E8 CDRL2	AASSLQS 7
39	3E8 CDRL3	QQYNSYPYT 9
40	Вариабельный домен тяжелой цепи 1D7	MDTLCSTLLL LTIPSWVLSQ ITLKESGPTL VKPTQTLTTL 40 CTFSGFSLGS NGLGVGWIRQ PPGKALEWLA LIYWDDDKRY 80 SPSLKSRLTI TKDSSKNQVV LTMNMDPVD TATYYCAHRN 120 SGFDYWGQGI LVTVSS 136
41	Вариабельный домен легкой цепи-а 1D7	MRVLAQLLGL LLLCFPGARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT 40 ITCRASQGFs SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 80 RfSGSGSCTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPYTFcQ 120 GTKLEIK 127
42	1D7 CDRH1	SNGLGVG 7
43	1D7 CDRH2	LIYWDDDKRY SPSLKS 16
44	1D7 CDRH3	RNSGFDY 7
45	1D7 CDRL1-a	RASQGFSSWL A 11
46	1D7 CDRL2-a	AASSLQS 7
47	1D7 CDRL3-a	QQYNSYPYT 9
48	Вариабельный домен легкой цепи-б 1D7	MRVLAQLLGL LLLCFPGARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT 40 ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 80 RfSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPLTFGG 120 GTKVEIK 127
49	1D7 CDRL1-b	RASQGISSWL A 11
50	1D7 CDRL2-b	AASSLQS 7
51	1D7 CDRL3-b	QQYNSYPLT 9
52	Константный домен тяжелой	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSGV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80

	цепи hulG1f	YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LDSDGSEFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT 320 QKSLSLSPG 329
53	Константный домен тяжелой цепи hulG1f S267E ("SE")	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVE HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LDSDGSEFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT 320 QKSLSLSPG 329
54	Константный домен тяжелой цепи hulG1f S267E/L328F ("SELF")	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVE HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA FPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LDSDGSEFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT 320 QKSLSLSPG 329
55	Константный домен тяжелой цепи hulG1f P238D	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 120 DSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LDSDGSEFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT 320 QKSLSLSPG 329
56	Константный домен тяжелой цепи hulG1f P238D/P271G ("V4")	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 120 DSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDGEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LDSDGSEFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT 320 QKSLSLSPG 329
57	Константный домен тяжелой цепи hulG1f P238D/P271G ("V4") D270E	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 120 DSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEEGEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280

		LDS DGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPG 329
58	Константный домен тяжелой цепи hulgG1f E233D/P238D/P271G/A330R ("V7")	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPDLLGG 120 DSVFLFPPKP KDTLMI SRTP EVTCVVVDVS HEDGEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPRPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LDS DGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPG 329
59	Константный домен тяжелой цепи hulgG1f G237D/P238D/H268D/P271G ("V8")	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGD 120 DSVFLFPPKP KDTLMI SRTP EVTCVVVDVS DEDGEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LDS DGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPG 329
60	Константный домен тяжелой цепи hulgG1f G237D/P238D/P271G/A330R ("V9")	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGD 120 DSVFLFPPKP KDTLMI SRTP EVTCVVVDVS HEDGEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPRPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LDS DGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPG 329
61	Константный домен тяжелой цепи hulgG1f G237D/P238D/P271G/A330R ("V9") D270E	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGD 120 DSVFLFPPKP KDTLMI SRTP EVTCVVVDVS HEDGEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPRPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LDS DGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPG 329
62	Константный домен тяжелой цепи hulgG1f G237D/P238D/H268D/P271G/A330R ("V11")	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGD 120 DSVFLFPPKP KDTLMI SRTP EVTCVVVDVS DEDGEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPRPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LDS DGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPG 329
63	Константный домен тяжелой	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80

	цепи huIgG1f E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R ("V12")	YICNVNHNKPS NTRVDRVPEP KSCDKTHTCP PCPAPDLLGD 120 DSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS DEDGEVKNFW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQDNLNGK 200 EYKCKVSNKA LPRPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LSDSGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFESCV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPG 329
64	Константный домен легкой цепи huKappa	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ 40 WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE 80 KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC 107
65	Сигнальная последовательность	MRAWIFFLLC LAGRALA 17
66	С-концевой CH1 IgG1 (то же самое для IgG3 (17-15-15), IgG3 (17-15-15), IgG3 (17-15), IgG3 (15-15-15), IgG3 (15) и IgG4)	VDKRV 5
67	Верхний шарнир IgG1	EPKSCDKTHT 10
68	Средний шарнир IgG1	CPPCP 5
69	Нижний шарнир IgG1 (то же самое для IgG3 (17-15-15-15), IgG3 (17-15-15), IgG3 (17-15), IgG3 (15-15-15), IgG3 (15) и IgG4)	APPELLGG 7
70	С-концевой CH1 IgG2	VDKTV 5
71	Средний шарнир IgG2	CCVECPPCP 9
72	Нижний шарнир IgG2	APPVAG 6
73	Верхний шарнир IgG3 (17-15-15-15) (то же самое для IgG3 (17-15-15) и IgG3 (17-15))	ELKTPPLGDTT HT 12
74	Средний шарнир IgG3 (17-15-15-15)	CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC 40 DTPPPCPRCP 50

75	Средний шарнир IgG3 (17-15-15)	CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCP 35
76	Средний шарнир IgG3 (17-15)	CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP 20
77	Верхний шарнир IgG3 (15-15-15) (то же самое для IgG3(15))	EPKS 4
78	Средний шарнир IgG3 (15-15-15)	CDTTPPCPRC PEPKSCDTPP PCPRCPEPKS CDTTPPCPRC 40 P 41
79	Средний шарнир IgG3 (15)	CDTTPPCPRC P 11
80	Верхний шарнир IgG4	ESKYGPP 7
81	Средний шарнир IgG4	CPSCP 5
82	Нижний шарнир IgG4	APEFLGG 7
83	СН1 человеческого IgG1 дикого типа	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSGV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKKV 98
84	СН1 человеческого IgG2 дикого типа	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSGV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTV 98
85	СН2 человеческого IgG1 дикого типа	PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 40 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 80 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAK 103
86	СН2 человеческого IgG1 с A330S/P331S	PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 40 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 80 EYKCKVSNKA LPSSIEKTIS KAK 103
87	СН3 человеческого IgG1 дикого типа	GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 40 WESNGQPENN YKTPPVLDLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG 80 NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPG 106
88	IgG1-IgG2-IgG1f	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSGV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKKVER KCCVECPPCP APELLGGPSV 120 FLFPPPKKDT LMISRTPPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD 160 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 200 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK 240 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDLDS 280 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS 320 LSLSPG 326
89	IgG1-IgG2CS-	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40

	IgG1f	WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKKVER KSCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPPVLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL 320 SLSFG 325
90	IgG1-IgG2-IgG1f	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKKVER KCCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNAKALPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPPVLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL 320 SLSFG 325
91	IgG1-IgG2CS-IgG1f	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKKVER KSCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNAKALPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPPVLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL 320 SLSFG 325
92	IgG1-IgG2-IgG1f2	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKKVER KCCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPPVLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL 320 SLSFG 325
93	IgG1-IgG2(C219S)-IgG1f2	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKKVER KSCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPPVLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL 320 SLSFG 325
94	IgG2-IgG1f2	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KCCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPPVLDSD 280

		GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL 320 SLSFG 325
95	IgG2(C219S)- IgG1f2	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVVHDKPS NTKVDKTVR KSCVECPPC APPVAGPSVF 120 LFPKPKDRTL MISRTPEVTC VVDVSHEDP EVKFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNAKLPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQPEPENNY KTTTPVLDS 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL 320 SLSFG 325
96	Шарнир человеческого IgG2 дикого типа	ERKCCVECPP CPAPPVAG 18
97	Шарнир человеческого IgG2 с C219S	ERKSCVECPP CPAPPVAG 18
98	Шарнир IgG2/IgG1	ERKCCVECPP CPAPELLGG 19
99	Шарнир IgG2 (C219S)/IgG1	ERKSCVECPP CPAPELLGG 19
100	Шарнир человеческого IgG1 дикого типа	EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GG 22
101	Шарнир IgG1.1 (L234A/L235E/ G237A)	EPKSCDKTHT CPPCPAPEAE GA 22
102	CH2 человеческого IgG2 дикого типа	PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW 40 YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSFLT VVHQDWLNGK 80 EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTK 103
103	CH3 человеческого IgG2 дикого типа	GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 40 WESNGQPEPEN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG 80 NVFSCSVMEH ALHNHYTQKS LSLSPGK 107
104	IgG1f с С- концевым К	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSFLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNOVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGOP ENNYKTTTPV 280 LDSGDSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFCSCV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPGK 330
105	IgG2.3	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVVHDKPS NTKVDKTVR KSCVECPPC APPVAGPSVF 120 LFPKPKDRTL MISRTPEVTC VVDVSHEDP EVQFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNAKLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240

		QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQPPENNY KTFPPMLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL 320 SLSFGK 326
106	IgG2.3G1-AY	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KSCVECPPCP APPELLGGPSV 120 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD 160 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 200 CKVSNKALPA PIEKTISKAK QPREPQVYT LPPSREEMTK 240 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTFPPVLDSD 280 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMEH ALHNHYTQKS 320 LSLSPGK 327
107	IgG2.3G1-KH	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KSCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQPPENNY KTFPPVLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL 320 SLSFGK 326
108	IgG2.5	ASTKGPSVFP LAPSSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KCCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQPPENNY KTFPPMLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL 320 SLSFGK 326
109	IgG1.1f	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPAEAGA 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPSSIEKTIS KARGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTFPPV 280 LDS DGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPGK 330
110	IgG2.3G1.1f-KH	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KSCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNKALPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQPPENNY KTFPPVLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL 320 SLSFGK 326
111	IgG1-deltaTHT	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40

		WNSGALTSVG HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKCPPCP APELLGGPSV 120 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD 160 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 200 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTK 240 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL 280 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS 320 LSLSPGK 327
112	IgG2.3- plusTHT	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVVHDKPS NTKVDKTVER KSCVETHTCP PCPAPPVAGP 120 SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVDVSH EDPEVQFNWY 160 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TFRVSVLTV VHQDWLNGKE 200 YKCKVSNKGL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM 240 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPML 280 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ 320 KSLSLSPGK 329
113	IgG2.3- plusGGG	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVVHDKPS NTKVDKTVER KSCVEGGGCP PCPAPPVAGP 120 SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVDVSH EDPEVQFNWY 160 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TFRVSVLTV VHQDWLNGKE 200 YKCKVSNKGL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM 240 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPML 280 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ 320 KSLSLSPGK 329
114	IgG2.5G1.1f- KH	ASTKGPSVFP LAPSSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVVHDKPS NTKVDKTVER KCCVECPCCP APPVAGPSVF 120 LFPKPKDNL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNAKALPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL 320 SLSPGK 326
115	IgG2.5G1-AY	ASTKGPSVFP LAPSSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVVHDKPS NTKVDKTVER KCCVECPCCP APELLGGPSV 120 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD 160 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 200 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTK 240 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL 280 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS 320 LSLSPGK 327
116	IgG2.5G1-KH	ASTKGPSVFP LAPSSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVVHDKPS NTKVDKTVER KCCVECPCCP APPVAGPSVF 120 LFPKPKDNL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240

		QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQQPENNY KTFPPVLDS 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL 320 SLSFGK 326
117	IgG2.5- plusTHT	ASTKGPSVFP LAPSSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KCCVETHTCP PCPAPPVAGP 120 SVFLFPPKPK DTLMISRTP ETCVVVDVSH EDPEVQFNWY 160 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TFRVSVLTV VHQDWLNGKE 200 YKCKVSNKGL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM 240 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPML 280 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ 320 KSLSLSPGK 329
118	IgG1-G2.3G1- AY	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKRVK KSCVECPPCP APELLGGPSV 120 FLFPPKPKDT LMISRTEPVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD 160 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 200 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK 240 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLD 280 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMEHA ALHNHYTQKS 320 LSLSPGK 327
119	IgG1-G2.3G1- KH	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKRVK KSCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPKPKKDTL MISRTEPVT VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNAKALPA IEKTISKAK QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQQPENNY KTFPPVLDS 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL 320 SLSFGK 326
120	G2-G1-G1-G1	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KSCDKHTTCP PCPAPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP ETCVVVDVSH HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LSDSGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPGK 330
121	G2.5-G1-G1-G1	ASTKGPSVFP LAPSSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KSCDKHTTCP PCPAPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP ETCVVVDVSH HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LSDSGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPGK 330
122	G1-G2.3-G2-G2	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40

		WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHHKPS NTKVDKRVEP KSCVECPVPC APPVAGPSVF 120 LFPKPKDRTL MISRTPEVTC VVDVSHEDP EVQFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNGKLPAP IEKTIKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPMLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL 320 SLSFGK 326
123	G1-KRGESSNLF	ASTKGPSVFP LAPSSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YICNVNHHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LSDSGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPGK 330
124	G1-KRGEGS	ASTKGPSVFP LAPSSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LSDSGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPGK 330
125	G1-SNLF	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YICNVNHHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LSDSGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPGK 330
126	IgG1-ITNDRTPR	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YTCNVNHHKPS NTKVDKTVER KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LSDSGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPGK 330
127	G1-SNLFPR	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YICNVNHHKPS NTKVDKRVER KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAGQPREPQ VYTLPPSREE 240

		MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LDSGDSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKSLSLSPG 329
128	G2- RKEGSGNSFL	ASTKGPSVFP LAPCSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSGV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YTCNVDPHKPS NTKVDKTVER KSCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNGKLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPEMLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCVMHEA LHNHYTQKSL 320 SLSPGK 326
129	G2-RKEGSG	ASTKGPSVFP LAPCSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSGV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDPHKPS NTKVDKTVER KSCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNGKLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPEMLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCVMHEA LHNHYTQKSL 320 SLSPGK 326
130	G2-NSFL	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSGV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YTCNVDPHKPS NTKVDKTVER KSCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNGKLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPEMLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCVMHEA LHNHYTQKSL 320 SLSPGK 326
131	IgG2- TIDNTRRP	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSGV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YICNVNPKPS NTKVDRVEP KSCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNGKLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPEMLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCVMHEA LHNHYTQKSL 320 SLSPGK 326
132	G2-NSFLRP	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSGV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YTCNVDPHKPS NTKVDKTVEP KSCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNGKLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPEMLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCVMHEA LHNHYTQKSL 320 SLSPGK 326
133	G1-G1-G2-G1-	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40

	AY	WNSGALTSVG HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSFLT VVHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 280 LSDSGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT 320 QKSLSLSPGK 330
134	G1-G1-G2-G1-KH	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPPVAGP 120 SVFLFPPKPK DTLMISRTP VTCVVVDVSH EDPEVQFNWY 160 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TFRVVSFLT VHQDWLNGKE 200 YKCKVSNKGL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM 240 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPV 280 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNNHYTQ 320 KSLSLSPGK 329
135	G2-G2 3-G1-G2-KH	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KSCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG 160 VEVHNAKTK REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPMLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCVMHEA LHNHYTQKSL 320 SLSPCK 326
136	G2 5-G2 3-G1-G2-KH	ASTKGPSVFP LAPSSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KSCVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG 160 VEVHNAKTK REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPMLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCVMHEA LHNHYTQKSL 320 SLSPGK 326
137	G2-G2 3-G1-G2-AY	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KSCVECPPCP APELLGGPSV 120 FLFPPKPKDT LMISRTPPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD 160 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 200 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK 240 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS 280 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS 320 LSLSPG 326
138	G2 5-G2 3-G1-G2-AY	ASTKGPSVFP LAPSSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSVG HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KSCVECPPCP APELLGGPSV 120 FLFPPKPKDT LMISRTPPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD 160 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 200 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK 240

		NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS 280 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNNHYTQKS 320 LSLSPGK 327
139	G1-G2.3-G1-G1-KH	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCVECPCPC APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQGPENNY KTTPEVLDS 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL 320 SLSPGK 326
140	G2-G1-G2-G2-AY	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVNDHKPS NTKVDKTVER KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVSVLTV VVHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM 280 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT 320 QKSLSLSPGK 330
141	G2.5-G1-G2-G2-AY	ASTKGPSVFP LAPSSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVNDHKPS NTKVDKTVER KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVSVLTV VVHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM 280 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT 320 QKSLSLSPGK 330
142	G1-G2-G1-G1-AY	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCVECPCPC APPELLGGPSV 120 FLFPPKPKDT LMISRTPPEVT CVVDVSHED PEVKFNWYVD 160 GVEVHNAKTK FREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 200 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYTL LPPSREEMTK 240 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPEVLDS 280 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNNHYTQKS 320 LSLSPGK 327
143	G2-G1-G2-G2-KH	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVNDHKPS NTKVDKTVER KSCDKTHTCP PCPAPPVAGP 120 SVFLFPPKPK DTLMISRTP EVTCVVVDVSH EDPEVQFNWY 160 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TFRVSVLTV VHQDWLNGKE 200 YKCKVSNKGL PAPIEKTISK KTKGQPREPQ VYTLPPSREEM 240 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPML 280 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNNHYTQ 320 KSLSLSPG 328
144	G2.5-G1-G2-G2-KH	ASTKGPSVFP LAPSSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80

		YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KSCDKTHTCP PCPAPPVAGP 120 SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVQFNWY 160 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TFRVSVLTV VHQDWLNGKE 200 YKCKVSNKGL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM 240 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPML 280 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ 320 KSLSLSPGK 329
145	IgG1- deltaHinge	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKRVKPCPPCPAPEL LGGPSVFLFP 120 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV 160 HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS 200 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS 240 LTCLVKGFYP SDIAVEWESN QQPENNYKTT PPVLDSDGSF 280 FLYKSLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL 320 PGK 323
146	IgG2- deltaHinge	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KCPPCPAPPV AGPSVFLFP 120 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH 160 NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN 200 KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 240 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTT PMLDSDGSFF 280 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP 320 GK 322
147	IgG2.5- deltaHinge	ASTKGPSVFP LAPSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KCPPCPAPPV AGPSVFLFP 120 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH 160 NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN 200 KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 240 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTT PMLDSDGSFF 280 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP 320 GK 322
148	IgG1-deltaG237	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKRVKPCPPCPAPEL LGGPSVFLFP 120 SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY 160 VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVSVLTV LHQDWLNGKE 200 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM 240 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL 280 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ 320 KSLSLSPG 328
149	IgG2-plusG237	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KSCVECPPC APPVAGGPSV 120 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD 160 GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK 200 CKVSNKGLPA PIEKTIKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK 240 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQFENN YKTTTPMLDS 280

		DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS 320 LSLSPGK 327
150	IgG2.4	ASTKGFPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDPKPS NTKVDKTVR KCSVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNGKLPAP IEKTIKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQPFENNY KTTTPMLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL 320 SLSPGK 326
151	IgG2.3/4	ASTKGFPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDPKPS NTKVDKTVR KSSVECPPCP APPVAGPSVF 120 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG 160 VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNGKLPAP IEKTIKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQPFENNY KTTTPMLDSD 280 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL 320 SLSPGK 326
152	C220S шарнира IgG2	ERKCSVECPP CPAPPVAG 18
153	C220S гибридного шарнира IgG2/IgG1	ERKCSVECPP CPAPELLGG 19
154	Шарнирная часть IgG2 дикого типа	ERKCCVECPP CPAP 14
155	C219S шарнирной части IgG2	ERKSCVECPP CPAP 14
156	C220S шарнирной части IgG2	ERKCSVECPP CPAP 14
157	C219X шарнирной части IgG2	ERKXVECPP CPAP 14
158	C220X шарнирной части IgG2	ERKXVECPP CPAP 14
159	IgG2 CH1+ шарнир IgG2 (дикого типа)	ASTKGFPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSKV HTPPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT 80 YTCNVDPKPS NTKVDKTVR KCCVECPPCP APPVAG 116
160	IgG2 с C219X	ERKXVECPP CPAPPVAG 18
161	IgG2 с C220X	ERKXVECPP CPAPPVAG 18
162	Гибрид IgG2/IgG1 с C219X	ERKXVECPP CPAPELLGG 19

163	Гибрид IgG2/IgG1 с C220X	ERKXCVECPP CPAPELLGG 19
164	Гибрид IgG2/IgG1 deltaG	ERKCCVECPP CPAPELLG 18
165	Гибрид IgG2/IgG1 с C219S deltaG	ERKSCVECPP CPAPELLG 18
166	Гибрид IgG2/IgG1 с C220S deltaG	ERKCSVECPP CPAPELLG 18
167	Гибрид IgG2/IgG1 с C219X deltaG	ERKXCVECPP CPAPELLG 18
168	Гибрид IgG2/IgG1 с C220X deltaG	ERKXCVECPP CPAPELLG 18
169	Шарнирная часть IgG2	PVAG 4
170	Шарнирная часть IgG1	SCDKTHT 7
171	Шарнирная часть 1 IgG1	ELLG 4
172	Шарнирная часть 2 IgG1	ELLGG 5
173	Внеклеточный домен зрелого белка huCOS (21 – 134 из NP 036224.1)	EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLLKGGQ 40 LLCDLTKTKG SGNFVSKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD 80 HSHANYEFCN LSIFFDPPPFK VTLTGGYLHI YESQ 114
174	Нуклеотидная последовательность переменного домена тяжелой цепи 3E8	ATG GAG TTT GGG CTG ACC TGG GTT TTC CTC GTT GCT 36 CTT TTA AGA GGT GTC CAG TGT CAG GTG CAG CTG GTG 72 GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG ATG TCC 108 CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC 144 AGT ACC TAT GGC ATG CAG TGG GTC CGC CAG GCT CCA 180 GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG ACA GTT ATA TGG CAT 216 GAT GGA AGT CAT AAA GAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG 252 GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC 288 ACG ATG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG 324 GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CGG CAA 360 ACT GGG GAG GGC TAC TTT GAC TTC TGG GGC CAG GGA 396 ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA 417
175	Нуклеотидная последовательность переменного домена легкой цепи 3E8	ATG AGG GTC CTC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTG 36 CTC TGT TTC CCA GGT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG 72 ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA 108 GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CCG GCG AGT CAG GGT 144 ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA 180 GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC 216 AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC 252 AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC 288 AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC 324 CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG 360 GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA 381

176	Нуклеотидная последовательность варибельного домена тяжелой цепи 17C4	ATG GAC ATA CTT TGT TCC ACG CTC CTG CTA CTG ACT 36 GTC CCG TCC TGG GTC TTA TCC CAG GTC ACC TTG AGG 72 GAG TCT GGT CCT GCG CTG GTG AAA CCC ACA CAG ACC 108 CTC ACA CTG ACC TGC ACC TTC TCT GGG TTC TCA CTC 144 AGC ACT AGT GGA ATG TGT GTG AGC TGG ATC CGT CAG 180 CCC CCA GGG AAG GCC CTG GAG TGG CTT GCA CTC ATT 216 GAT TGG GAT GAT GAT AAA TTC TAC AGC ACA TCT CTG 252 AAG ACC AGG CTC ACC ATC TCC AAG GAC ACC TCC AAA 288 AAC CAG GTG GTC CTT ACA ATG ACC AAC ATG GAC CCT 324 GTG GAC ACA GCC ACG TAT TAC TGT GCA CGG ATG TCA 360 ACA CCT ACC TAC TAC GGT TTG GAC GTC TGG GGC CAA 396 GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA 420
177	Нуклеотидная последовательность варибельного домена легкой цепи 17C4	ATG AGG GTC CTC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTG 36 CTC TGT TTC CCA GGT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG 72 ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA 108 GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT 144 ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA 180 GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC 216 AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC 252 AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC 288 AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC 324 CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA 360 GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA 381
178	Нуклеотидная последовательность варибельного домена тяжелой цепи 1D7	ATG GAC ACA CTT TGC TCC ACG CTC CTG CTG CTG ACC 36 ATC CCT TCA TGG CTC TTG TCC CAG ATC ACC TTG AAG 72 GAG TCT GGT CCT ACG CTG GTG AAA CCC ACA CAG ACC 108 CTC ACG CTG ACC TGC ACC TTC TCT GGG TTC TCA CTC 144 GGC TCT AAT GGA CTG GGT GTG GGC TGG ATC CGT CAG 180 CCC CCA GGA AAG GCC CTG GAG TGG CTT GCA CTC ATT 216 TAT TGG GAT GAT GAT AAG CGC TAC AGT CCA TCT CTG 252 AAG AGC AGG CTC ACC ATC ACC AAG GAC TCC TCC AAA 288 AAC CAG GTG GTC CTT ACA ATG ACC AAC ATG GAC CCT 324 GTG GAC ACA GCC ACG TAT TAC TGT GCA CAC AGG AAC 360 AGT GGC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ATC CTG GTC 396 ACC GTC TCC TCA 408
179	Нуклеотидная последовательность варибельного домена легкой цепи-а 1D7	ATG AGG GTC CTC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTG 36 CTC TGT TTC CCA GGT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG 72 ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA 108 GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT 144 TTT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA 180 GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC 216 AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC 252 AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC 288 AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC 324 CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT TAC ACT TTT GGC CAG 360 GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA 381
180	Нуклеотидная последовательность варибельного	ATG AGG GTC CTC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTG 36 CTC TGT TTC CCA GGT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG 72 ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA 108 GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT 144

	домна легкой цепи-в 1D7	ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA 180 GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC 216 AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC 252 AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC 288 AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC 324 CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA 360 GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA 381
181	Нуклеотидная последовательность переменного домена тяжелой цепи 9D5	ATG GAC ACA CTT TGC TCC ACG CTC CTG CTG CTG ACC 36 ATC CCT TCA TGG GTC TTG TCC CAG ATC ACC TTG AAG 72 GAG TCT GGT CCT ACG CTG GTG AAA CCC ACA CAG ACC 108 CTC ACG CTG ACC TGC ACC TTC TCT GGG TTC TCA CTC 144 GGC ACT AGT GGA CTG GGT GTG GGC TGG ATC CGT CAG 180 CCC CCA GGA AAG GCC CTG GAG TGG CTT GCA TTC ATT 216 TAT TGG GAT GAT GAT AAG CGC TAC AGC CCA TCT CTG 252 AAG AGC AGG CTC ACC ATC ACC AAG GAC ACC TCC AAA 288 AAC CAG GTG GTC CTT ACA ATG ACC AAC ATG GAC CCT 324 GTG GAC ACA GCC ACA TAT TAC TGT GCA CAC AGA CGG 360 GGC TTT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC 396 ACC GTC TCC TCA 408
182	Нуклеотидная последовательность переменного домена легкой цепи 9D5	ATG AGG GTC CTC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTG 36 CTC TGT TTC CCA GGT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG 72 ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA 108 GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT 144 ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA 180 GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC 216 AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC 252 AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC 288 AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC 324 CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA 360 GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA 381
183	Нуклеотидная последовательность ICOS.33 каппа	GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT 36 GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CAG 72 GCC AGT CAG GAC ATT AGC AAT TAT TTA AGC TGG TAT 108 CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC 144 TAC TAT ACA AAT CTA TTG GCA GAA GGG GTC CCA TCA 180 AGG TTC AGT GGA AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTT ACT 216 TTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT ATT GCA 252 ACA TAT TAC TGT CAA CAG TAT TAT AAC TAT CGG ACG 288 TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA CGT ACG 324 GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT 360 GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG 396 TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA 432 GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT 468 AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG 504 GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG 540 AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC 576 TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC 612 ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG 642
184	Нуклеотидная последовательность ICOS.33-	GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA 36 AAG CCT GGG GGG TCC CTT AGA CTC TCC TGT GCA GCC 72 TCT GGA TTC ACT TTC AGT GAC TAT TTC ATG CAC TGG 108

	g1f-S267E	GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT 144 GGC GTC ATA GAC ACT AAA AGT TTT AAT TAT GCA ACC 180 TAT TAC TCT GAT TTG GTG AAA GGC AGA TTC ACC ATC 216 TCA AGA GAT GAT TCA AAA AAC ACG CTG TAT CTG CAA 252 ATG AAC AGC CTG AAA ACC GAG GAC ACA GCC GTG TAT 288 TAC TGT ACC GCA ACC ATC GCT GTC CCA TAT TAC TTC 324 GAT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC 360 TCA GCT AGC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG 396 GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG 432 GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA 468 CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC 504 AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC 540 TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG 576 CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC 612 AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC 648 AAG AGA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC 684 ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG 720 GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG 756 GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA 792 TGC GTG GTG GTG GAC GTG GAG CAC GAA GAC CCT GAG 828 GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG 864 CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC 900 AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC 936 CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG 972 TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC 1008 GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA 1044 GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAG 1080 GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG 1116 GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG 1152 TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG 1188 ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC 1224 TTC CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG 1260 TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG 1296 CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC 1332 CTC TCC CTG TCC CCG GGT TGA 1353
185	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи IgG-2644	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCEASGFIFK YYAMSWVRQA 40 PGKGLEWVSG ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKHTLY 80 LQMNSLRAED TAVYYCAKDG DFDWIHYYG MDVWGQTTV 120 TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP 160 VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSL SVVTVPSSSL 200 GTQTYICNVN HKPSNTRKVDK RVEPKSCDKT HTCPCPFAPE 240 LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV 280 KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW 320 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP 360 SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT 400 TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH 440 NHYTQKSLSL SPG 453
186	Аминокислотная последовательность вариабельной области	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCEASGFIFK YYAMSWVRQA 40 PGKGLEWVSG ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKHTLY 80 LQMNSLRAED TAVYYCAKDG DFDWIHYYG MDVWGQTTV 120 TVSS 124

	тяжелой цепи IgG-2644	
187	Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG-2644	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSGV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVRGIFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV 280 LSDSGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT 320 QKSLSLSPG 329
188	Аминокислотная последовательность легкой цепи IgG-2644	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP 40 GKAPKLLIYD ASSLESGVPS RFGSGSGTD FTLTISLQP 80 EDFATYYCQQ FNSYPHTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ 160 ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKKH VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
189	Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи IgG-2644	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP 40 GKAPKLLIYD ASSLESGVPS RFGSGSGTD FTLTISLQP 80 EDFATYYCQQ FNSYPHTFGG GTKVEIK 107
190	Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи IgG-2644	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ 40 WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYLSLS TLTLSKADYE 80 KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC 107
191	IgG-2644 CDRH1 Amino Acid Sequence	YYAMS 5
192	Аминокислотная последовательность IgG-2644 CDRH2	GISGSGGSTY YADSVKG 17
193	Аминокислотная последовательность IgG-2644 CDRH3	DGDFDWIHYY YGMDV 15
194	Аминокислотная последовательность IgG-2644 CDRL1	RASQGISSAL A 11
195	Аминокислотная последовательность IgG-2644	DASSLES 7

	CDRL2	
196	IgG-2644 CDRL3 Амино- кислотная последователь- ность	QQFNSYPHT 9
197	Нуклеотидная последователь- ность тяжелой цепи IgG-2644	GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA 36 CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GAA GCC 72 TCT GGA TTC ATC TTT AAA TAC TAT GCC ATG AGC TGG 108 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC 144 TCA GGT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC 180 GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA 216 GAC AAT TCC AAG CAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC 252 AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTT TAT TAC TGT 288 GCG AAA GAT GGG GAT TTT GAC TGG ATC CAC TAT TAC 324 TAT GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC 360 ACC GTC TCC TCA GCG TCG ACC AAG GGC CCA TCC GTC 396 TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG 432 GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC 468 TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC 504 GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC 540 CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG 576 GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC 612 TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC 648 AAG GTG GAC AAG AGA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC 684 AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA 720 CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA 756 AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT 792 GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA 828 GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC 864 GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG 900 GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC 936 CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG 972 GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA 1008 GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG 1044 CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA 1080 TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG 1116 ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC 1152 GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC 1188 AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC 1224 GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG GAC 1260 AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC 1296 TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG 1332 CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCC CCG GGT 1359
198	Нуклеотидная последователь- ность варибельного домена тяжелой цепи IgG-2644	GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA 36 CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GAA GCC 72 TCT GGA TTC ATC TTT AAA TAC TAT GCC ATG AGC TGG 108 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC 144 TCA GGT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC 180 GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA 216 GAC AAT TCC AAG CAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC 252 AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTT TAT TAC TGT 288 GCG AAA GAT GGG GAT TTT GAC TGG ATC CAC TAT TAC 324 TAT GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC 360

		ACC GTC TCC TCA 372
199	Нуклеотидная последовательность константной области тяжелой цепи IgG-2644	GCG TCG ACC AAG GGC CCA TCC GTC TTC CCC CTG GCA 36 CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC 72 CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG 108 GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC 144 GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA 180 GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC 216 TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC 252 GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG 288 AGA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA 324 TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA 360 CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC 396 ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC 432 GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC 468 AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT 504 AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC 540 AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG 576 CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC 612 AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG 648 AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA 684 CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAG GAG 720 ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC 756 AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG 792 GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC 828 ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC 864 CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG 900 CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT 936 GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC 972 TCC CTG TCC CCG GGT 987
200	Нуклеотидная последовательность легкой цепи IgG-2644	GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT 36 GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG 72 GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT 108 CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC 144 TAT GAT GCC TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA 180 AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT 216 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA 252 ACT TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCT CAC 288 ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGT 324 ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA 360 TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT 396 GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC 432 AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG 468 GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC 504 AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG 540 CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC 576 GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC 612 GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT 642
201	Нуклеотидная последовательность переменного домена легкой	GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT 36 GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG 72 GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT 108 CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC 144 TAT GAT GCC TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA 180

	цепи IgG-2644	AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT 216 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA 252 ACT TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCT CAC 288 ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA 321
202	Нуклеотидная последовательность константного домена легкой цепи IgG-2644	CGT ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG 36 CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT 72 GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG 108 GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA 144 TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC 180 AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG 216 ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC 252 TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG 288 CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT 321
203	Аминокислотная последовательность эпитопа ICOS.4	SIFDPPPFKV TL 12
204	Константный домен тяжелой цепи hIgG1fc С-концевым лизином	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSGV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDRKVEP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVSD HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 240 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV 280 LDSDCSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKLSLSLSPGK 330
205	Изоформа 2 (Q9Y6W8-2)	MKSGLWYFFL FCLRIVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI 40 LCKYPDIVQQ FKMQLLKGQ ILCDLTKTKG SGNTVSIKSL 80 KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD HSHANYFCN LSIFDPPPFK 120 VTLTGGLYHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF VVVCILGCIL 160 ICWLTKKM 168
206	Человеческий IgG1 (P01857-1)	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS 40 WNSGALTSGV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 80 YICNVNHKPS NTKVDRKVEP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG 120 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVSD HEDPEVKFNW 160 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 240 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV 280 LDSDCSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT 320 QKLSLSLSPGK 330
207	VK1O18	DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP 40 GKAPKLLIYD ASNLETGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP 80 EDIATYYCQQ YDNL 95
208	JK3	FTFGPGTKVD IK 12
209	VH3-15	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS NAWMSWVRQA 40 PGKGLEWVGR IKSKTGGTT DYAAPVKGRF TISRDDSKNT 80 LYLQMNSLKT EDTAVYYCTT 100

210	ЖН4	YFDYWGQGTLL VTVSS 15
211	Тяжелая цепь mICOS 1-mG1	EVDLVETGGG LVQPGGSLKL SCVASGFTEFS RYWMFWIRQA 40 PGKGLEWVSS VSTDGRSTYY PDSVQGRFTI SRNDAENTVY 80 LQMNSLRSED TATYYCAKEG YYDGSYYAYY FDYWGQGVTV 120 TVSSAKTTPP SVYPLAPGSA AQTNSMVTLG CLVKGYFPEP 160 VVTWNSSGSL SSGVHTFPFV LQSDLYTLSS SVTVPSSTWP 200 SETVTCNVAH PASSTKVDKK IVPRDCGCKP CICTVPEVSS 240 VFIFFPKPKD VLTITLTPKV TCVVVDISKD DPEVQFSWFV 280 DDVEVHTAQT QPREEQFNST FRVSELPLIM HQDWLNGKEF 320 KCRVNSAAFP APIEKTISKI KGRPKAPQVY TIFPPKQMA 360 KDKVSLTCMI TDFFPEDITV EWQWNGQPAE NYKNTQFIMD 400 TDGSYFVYSK LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNNHTEK 440 SLSHSPGK 448
212	Легкая цепь mICOS 1-mG1	DVQMAQSPSS LAASPGESVS INCASKSIS KYLAWYQQKP 40 GKANKLLIYS GSTLQSGTFS RFGSGSGTD FTLTIRNLEP 80 EDFGLYCCQQ HNAYPPTFGT GTKLELKRAD AAPTVSIFPP 120 SSEQLTSGGA SVVCFLLNFY PKDINVKWKI DGSERQNGVL 160 NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT 200 STSPIVKSFN RNEC 214
213	Тяжелая цепь ICOS 4-mG1	EVQLVESGGG LVKPAAGSLTL SCVASGFTEFS DYFMHWVRQA 40 PGKGLEWVAV IDTKSFNYAT YYSDLVKGRF TVSRDSDSQM 80 VYLQMNLRK EDTATYYCTA TIAVPYFDY WGQGTMTVTS 120 SAKTTPPSVY PLAPGSAQT NSMVTLGCLV KGYFPEPVTV 160 TWNSSGSLSSG VHTFPFVAVLQS DLYTLSSSVT VPSSTWPFSE 200 VTCNVAHPAS STKVDDKIVP RDCGCKPCIC TVPEVSSVFI 240 FPPKPKDVLV ITLTPKVTCTV VVDISKDDPE VQFSWFVDDV 280 EVHTAQTQPR EEQFNSTFRS VSELPIMHQD WLNKGEFKCR 320 VNSAAFPAPI EKTISKTKGR PKAPQVYTIP PPKEQMAKDK 360 VSLTCMITDF FPEDITVEWQ WNGQPAENYK NTQPIMDTDG 400 SYFVYSKLVN QKSNWEAGNT FTCVSLHEGL HNHTEKSL 440 HSPGK 445
214	Легкая цепь ICOS 4-mG1	DIQMTQSPSS LPASLGDRVT INCQASQDIS NYLSWYQQKP 40 GKAPKLLIYY TNLLADGVPS RFGSGSGGRD YSFTISSLES 80 EDIGSYCCQQ YYNYRTFGPG TKLEIKRADA APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLLNFYF KDIVKWKID GSERQNGVLN 160 SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL TKDEYERHNS YTCEATHKTS 200 TSPIVKSFNR NEC 213
215	Тяжелая цепь ICOS 34-G1f	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTEFS DYFMHWVRQA 40 PGKGLEWVGV IDTKSFNYAT YYSDLVKGRF TISRDDSKNT 80 LYLQMNLSKT EDTAVYYCTA TIAVPYFDY WGQGTMTVTS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV 160 SWNSGALTSV VHTFPFVAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ 200 TYICNVNHPK SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCPAPELLG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMSIRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN 280 WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG 320 KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP 400 VLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSQS VMHEALHNNY 440 TQKSLSLSPG 450
216	Легкая цепь ICOS 34-G1f	DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCQASQDIS NYLSWYQQKP 40 GKAPKLLIYY TNLLADGVPS RFGSGSGTD FTFTISSLQP 80 EDIATYYCQQ YYNYRTFGPG TKVDIKRTVA APSVFIFFPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNFYF REAKVQWKVD NALQSGNSQE 160 SVTEQDSKDS TYLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL 200 SSPVTKSFNR GEC 213
217	Тяжелая цепь ICOS 35-G1f	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTEFS DYFMHWVRQA 40 PGKGLEWVGV IDTKSFNYAT YYSDLVKGRF TISRDDSKNT 80 LYLQMNLSKT EDTAVYYCTA TIAVPYFDY WGQGTMTVTS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV 160 SWNSGALTSV VHTFPFVAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ 200 TYICNVNHPK SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCPAPELLG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMSIRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN 280 WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG 320 KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP 400 VLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSQS VMHEALHNNY 440 TQKSLSLSPG 450
218	Легкая цепь ICOS 35-G1f	DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCQASQDIS NYLSWYQQKP 40 GKAPKLLIYY TNLLADGVPS RFGSGSGTD FTFTISSLQP 80 EDIATYYCQQ YYNYRTFGPG TKVDIKRTVA APSVFIFFPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNFYF REAKVQWKVD NALQSGNSQE 160 SVTEQDSKDS TYLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL 200 SSPVTKSFNR GEC 213
219	Агонист пути IL-2 NKTR-214	PTTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT 40 FKFYMPKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR 80 PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с молекулой индуцибельного костимулятора (ICOS) человека, при этом антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий области CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно, и переменный домен легкой цепи, содержащий области CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 12, 14 и 15 соответственно.

2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что антитело содержит переменные домены тяжелой и легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 5 и 6 соответственно.

3. Антитело по п.1 или 2, отличающееся тем, что антитело содержит тяжелую и легкую цепи, содержащие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно.

4. Антитело по п.1 или 2, отличающееся тем, что антитело представляет собой гуманизованное антитело.

5. Антитело по п.1 или 2, отличающееся тем, что антитело представляет собой антитело IgG1 или IgG2a.

6. Антитело по п.5, отличающееся тем, что антитело содержит одну аминокислотную замену в Fc-области по сравнению с аминокислотной последовательностью человеческого IgG1, как указано в SEQ ID NO: 206, причем аминокислотная замена в Fc-области представляет собой S267E.

7. Антитело по п.6, отличающееся тем, что замена повышает аффинность антитела к FcγRIIb и/или снижает антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксическую (ADCC) активность по сравнению с аминокислотной последовательностью человеческого IgG1, как указано в SEQ ID NO: 206.

8. Антитело по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что антитело блокирует связывание и/или взаимодействие лиганда ICOS (ICOS-L) с ICOS человека.

9. Антитело по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что антитело связывается с ICOS человека, яванского макака, мыши и крысы.

10. Антитело по любому из пп.1-9, отличающееся тем, что антитело обладает одним или несколькими следующими свойствами:

(a) связывается с человеческими Т-клетками со значением EC50 примерно 0,7 нМ и Т-клетками яванского макака со значением EC50 примерно 0,3 нМ;

(b) связывается с человеческими активированными CD4+ Т-клетками;

(c) не связывается с человеческим CD28 или человеческим CTLA-4;

(d) активирует по меньшей мере один первичный Т-лимфоцит, такой как CD4+ эффекторную Т-клетку (Teff), фолликулярную Т-хелперную клетку (Tfh) и регуляторную Т-клетку (Treg);

(e) индуцирует фосфорилирование протеинкиназы В (pAkt) в *in vitro* анализе сигнализации первичных Т-клеток со значением EC50 примерно 30 нМ;

(f) индуцирует выработку интерлейкина-10 (IL-10) в ответ на стафилококковый энтеротоксин В в анализе совместной культуры Tfh и наивных В-клеток;

(g) индуцирует большее увеличение пролиферации CD3-стимулированных Teff по сравнению с CD45RA+ Treg и CD45RO+ Treg в анализе *in vitro*;

(h) уменьшает супрессию Teff клетками Treg;

(i) не увеличивает выработку цитокинов в анализе цельной крови при 10 мкг/мл;

(j) увеличивает секрецию по меньшей мере одного из IL-10 и IFN-γ клетками Tfh *in vitro*;

(k) стимулирует ICOS-опосредованную передачу сигнала;

(l) обладает повышенной аффинностью к CD32B и/или CD32A и/или

(m) имеет пониженную аффинность к CD16.

11. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи или полноразмерную тяжелую цепь антитела по п.1, причем переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, и полноразмерная тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7.

12. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи или полноразмерную легкую цепь антитела по п.1, где переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6, и полноразмерная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8.

13. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая переменные области тяжелой и легкой цепей антитела по п.1, где переменные домены тяжелой и легкой цепей содержат аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 5 и 6 соответственно.

14. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полноразмерные тяжелую и легкую цепи антитела по п.1, где тяжелая и легкая цепи содержат аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно.

15. Способ получения антитела по п.1, включающий экспрессию одной или более нуклеиновой ки-

слоты, кодирующей аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей, указанные в SEQ ID NO: 5 и 6, соответственно, в клетке-хозяине, тем самым продуцируя антитело.

16. Способ по п.15, где одна или более нуклеиновых кислот кодируют аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи, указанные в SEQ ID NO: 7 и 8.

17. Композиция для лечения рака, содержащая антитело по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

18. Композиция по п.17, дополнительно содержащая дополнительный терапевтический агент, причем дополнительный терапевтический агент представляет собой противораковый терапевтический агент, иммуностимулирующий терапевтический агент, химиотерапевтический агент, радиотерапевтический агент, иммунотерапевтический агент и/или иммуногенный терапевтический агент.

19. Композиция по п.18, где дополнительный терапевтический агент представляет собой анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело и/или анти-CTLA-4 антитело.

20. Способ лечения рака у субъекта-человека, включающий введение субъекту-человеку эффективного количества антитела по любому из пп.1-10 или композиции по любому из пп.17-19.

21. Способ по п.20, отличающийся тем, что рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки/шейки матки, рак яичников, рак предстательной железы, рак яичка, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак почки, рак головы и шеи, рак легкого, рак желудка, герминогенный рак, рак кости, рак печени, рак щитовидной железы, рак кожи, новообразование центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, миелому, саркому или связанный с вирусом рак.

22. Способ по п.20 или 21, дополнительно включающий введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов субъекту-человеку.

23. Способ по п.22, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент представляет собой противораковый терапевтический агент, иммуностимулирующий терапевтический агент, химиотерапевтический агент, радиотерапевтический агент, иммунотерапевтический агент и/или иммуногенный терапевтический агент.

24. Способ по п.22, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент представляет собой анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело и/или анти-CTLA-4 антитело.

```
MKSGLWYFFFLFCLRIKVLVTGEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGQ 60
ILCDLTKTKGSGNTVSIKSLKFCBSQLSNNSVSVFFLYNLDSHANYFCNLSIFDPPPFK 120
VTLTGGYLLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSVHDPNGEY 180
MFMRAVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID NO:1) 199
```

Фиг. 1

```
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSV HTFFAVLQSS 177

GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 237
D D

PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 297
D E D EG

STYRVVSVLT VLNQDNLNGK EYKCKVSNKA LPAPLEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE 357
F R

MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LSDSGSFFLY SKLTVDKSRW 417

QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG 446
```

Фиг. 2

```

          FR      CDR1      FR2      CDR2
          * * *
VKI 018   DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC QASQDISNYLH WYQQKPGKAPKLLIY DASHLET
C398.4A VL DIQMTQSPSSLPASLQDRVTINC QASQDISNYLS WYQQKPGKAPKLLIY YTNLLAE
ICOS.33 IgG1f S267E VL DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC QASQDISNYLS WYQQKPGKAPKLLIY YTNLLAE
                                                                56

          FR3      CDR3      FR4
          * * * * *
VKI 018   GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSIQPEDIAITYC QQYDNLP
C398.4A VL GVPSRFSGSGSGRQYSFTISSLESDIGSYTC QQYNYRT FPGTKLEIK
JK3       PT FPGTKVDIK
ICOS.33 IgG1f S267E VL GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSIQPEDIAITYC QQYNYRT FPGTKVDIK
                                                                57

          FR1      CDR1      FR2
          * * *
VKI 018   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NAMMS WVRQAPGKLEWVG
C398.4A VH EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYPH WVRQAPGKLEWVG
ICOS.33 IgG1f S267E VH EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYPH WVRQAPGKLEWVG

          CDR2      FR3      94      CDR3
          * * * * *
VKI 018   RISKTDGGTIDYAAPYK RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCT
C398.4A VH VIDTSFNATYYSDLVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTA TIAPVYYFDY
ICOS.33 IgG1f S267E VH VIDTSFNATYYSDLVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTA TIAPVYYFDY

          FR4
          *
C398.4A VH WQQQTIVTVSS
JK4       YFDY WQQQTIVTVSS
ICOS.33 IgG1f S267E VH WQQQTIVTVSS
    
```

Фиг. 3

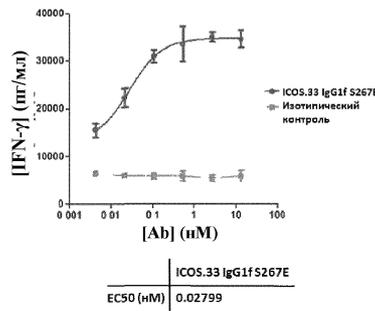
```

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYFMHWVRQAPGKLEWVG
                                     CDR1
VIDTKSFNATYYSDLVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYC
                                     CDR2
TATIAPVYYFDYWQQQTIVTVSS (SEQ ID NO:5)
                                     CDR3
    
```

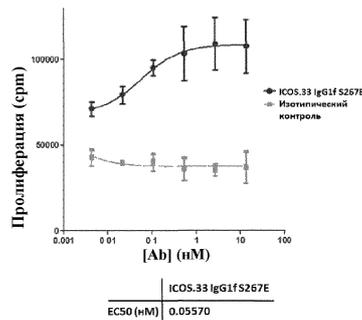
```

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC QASQDISNYLSWYQQKPGKAPKLLIY
                                     CDR1
YTNLLAEGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSIQPEDIAITYC QQYNYRTFG
                                     CDR2                                     CDR3
PGTKVDIK (SEQ ID NO:6)
    
```

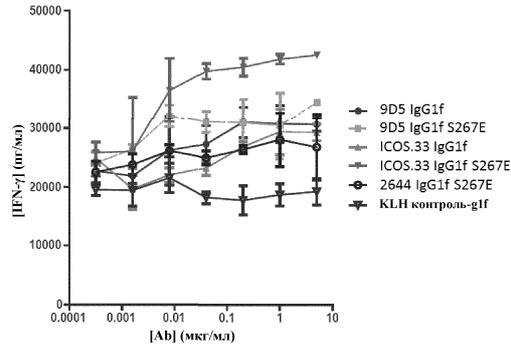
Фиг. 4



Фиг. 5A

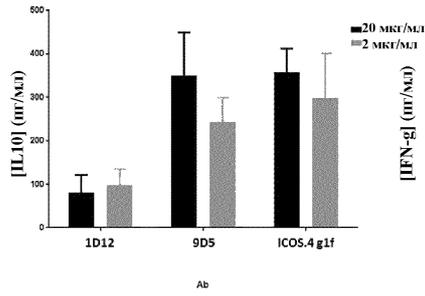


Фиг. 5B



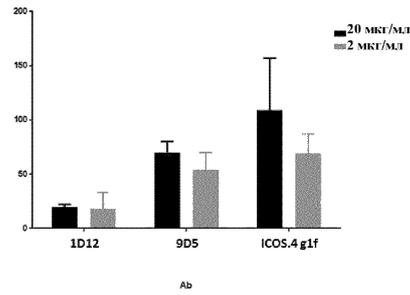
Фиг. 6

Анализ Tfh + наивных В-клеток



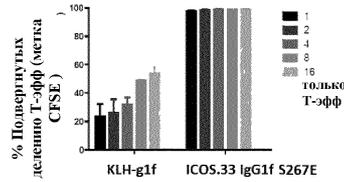
Фиг. 7А

Анализ Tfh + наивных В-клеток



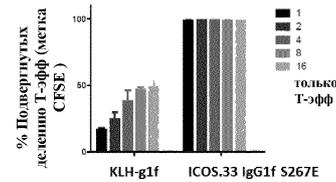
Фиг. 7В

Пролиферация Т-эфф при разных соотношениях Т-эфф:Т-рег(RA+), + CD28



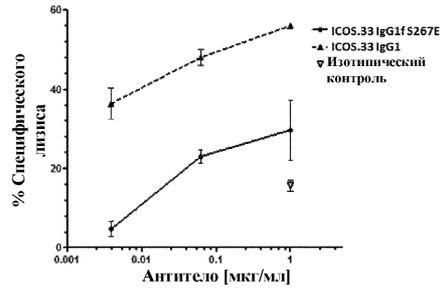
Фиг. 8А

Пролиферация Т-эфф при разных соотношениях Т-эфф:Т-рег(RO+), + CD28



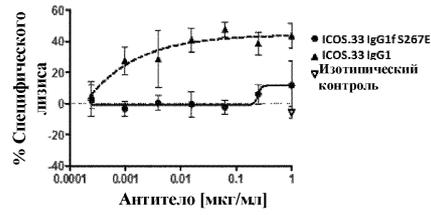
Фиг. 8В

Донор 12 (отношение E:T 10:1)
NK ADCC на CD4+ T-клетках

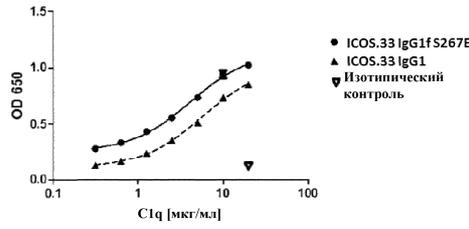


Фиг. 9А

Донор 9 (отношение E:T 10:1)
NK ADCC на CD4+ T-клетках

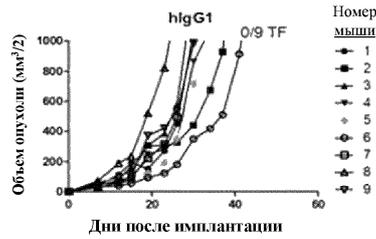


Фиг. 9В

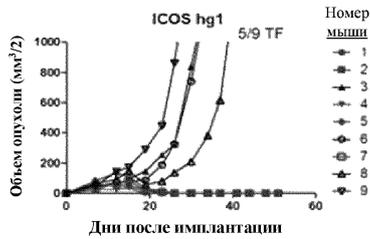


	ICOS.33 IgG1fS267E	ICOS.33 IgG1f
EC50 [µg/ml]	4.180	5.696

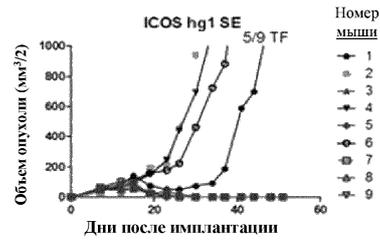
Фиг. 10



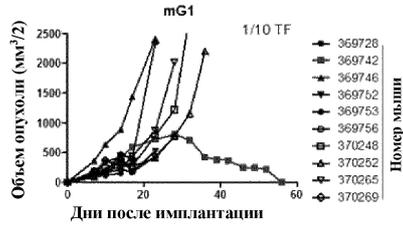
Фиг. 11А



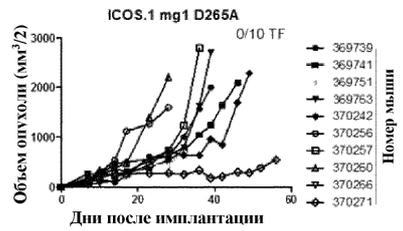
Фиг. 11В



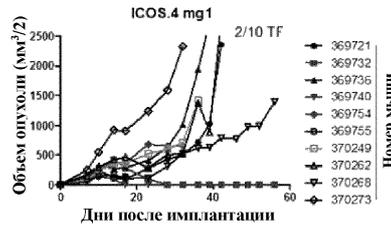
Фиг. 11С



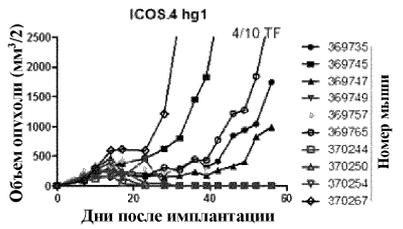
Фиг. 12А



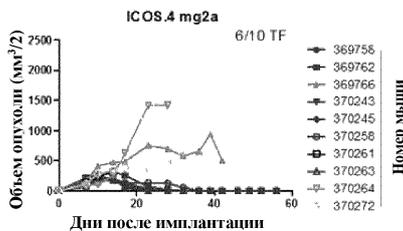
Фиг. 12В



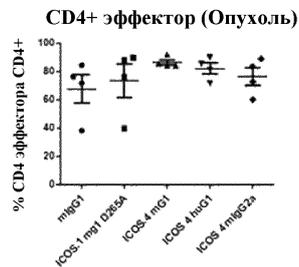
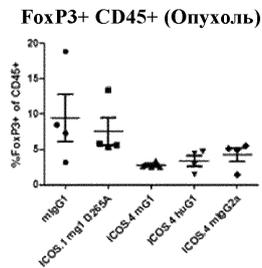
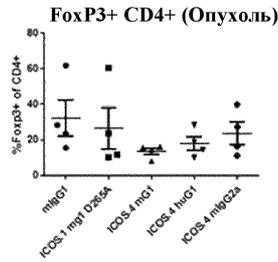
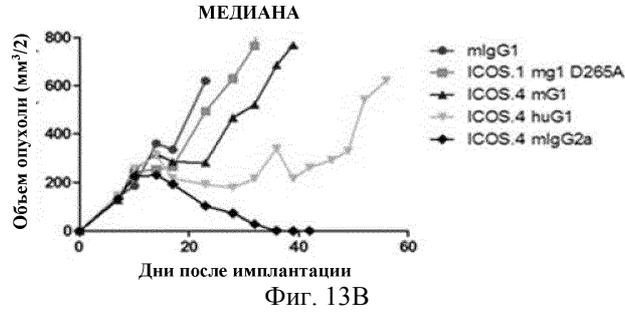
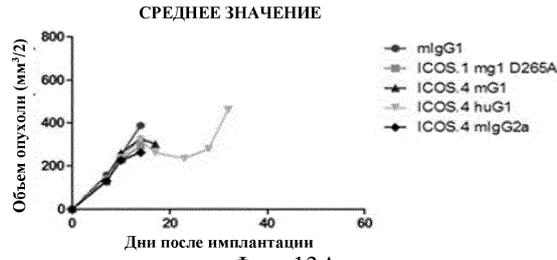
Фиг. 12С

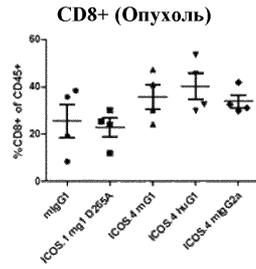


Фиг. 12D

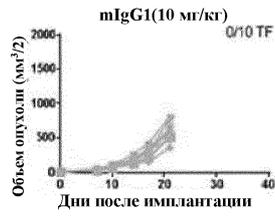


Фиг. 12Е

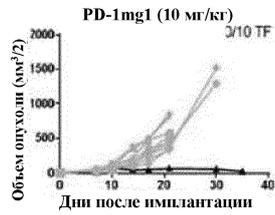




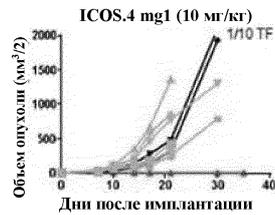
Фиг. 14D



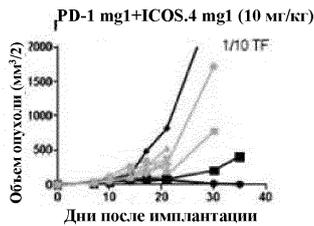
Фиг. 15A



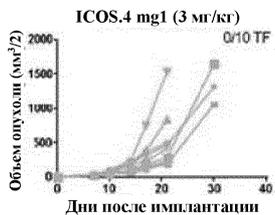
Фиг. 15B



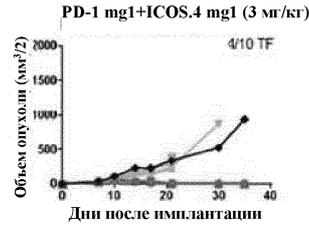
Фиг. 15C



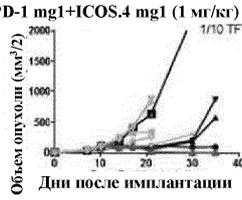
Фиг. 15D



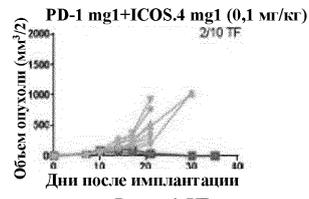
Фиг. 15G



Фиг. 15H



Фиг. 15E



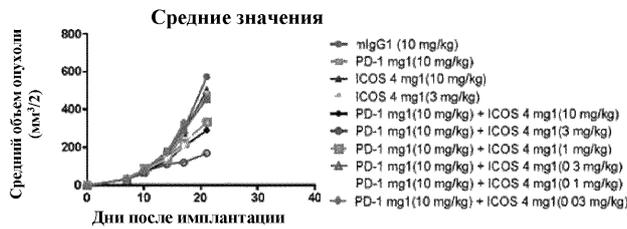
Фиг. 15F



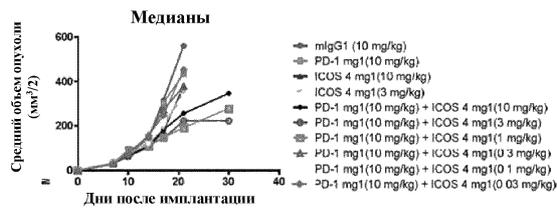
Фиг. 15I



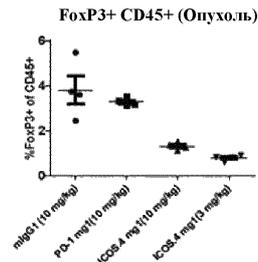
Фиг. 15J



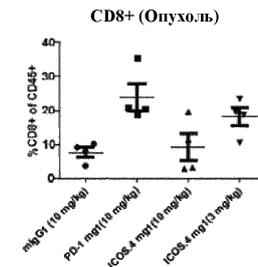
Фиг. 16A



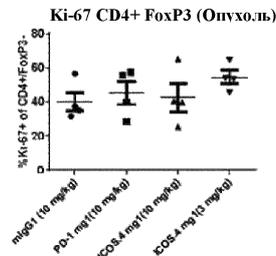
Фиг. 16B



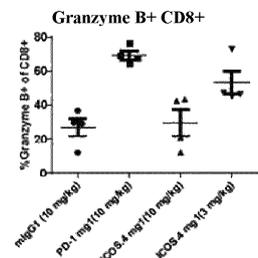
Фиг. 17А



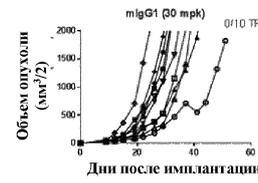
Фиг. 17В



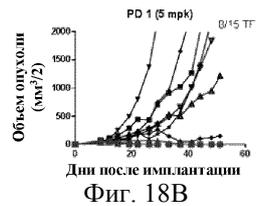
Фиг. 17С



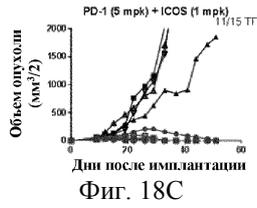
Фиг. 17D



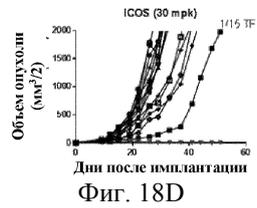
Фиг. 18А



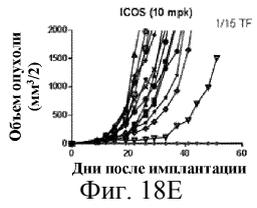
Фиг. 18В



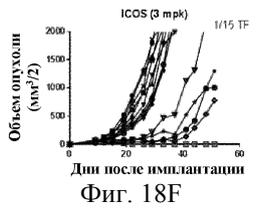
Фиг. 18С



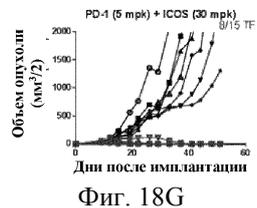
Фиг. 18D



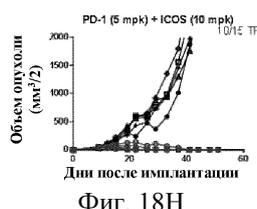
Фиг. 18E



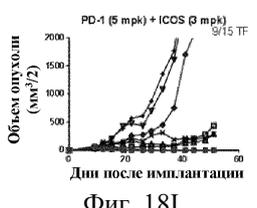
Фиг. 18F



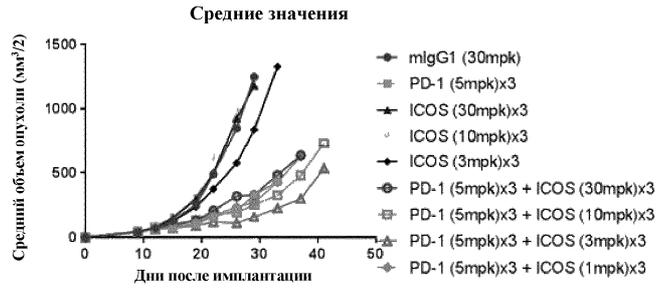
Фиг. 18G



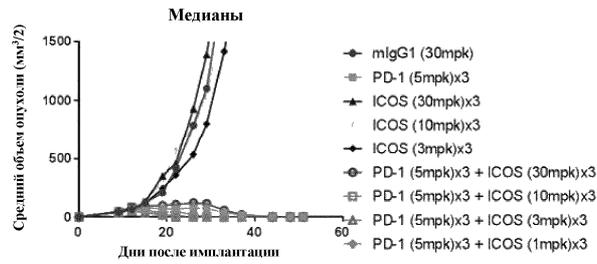
Фиг. 18H



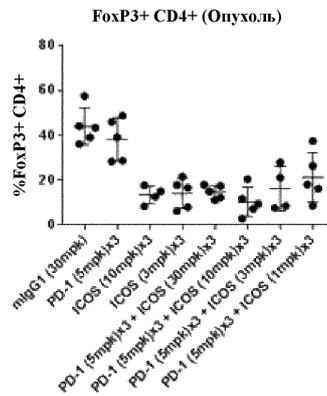
Фиг. 18I



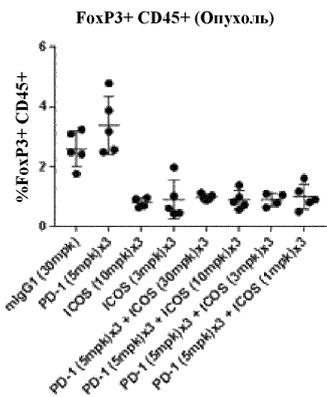
Фиг. 19А



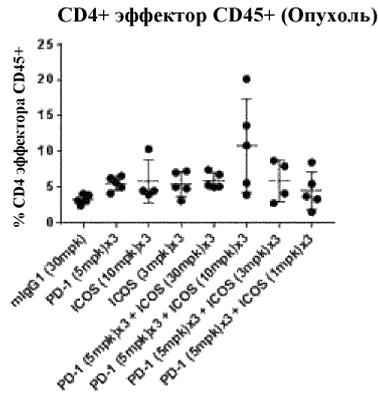
Фиг. 19В



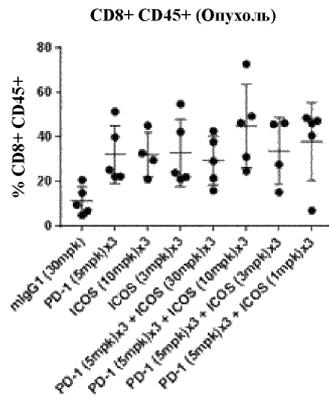
Фиг. 20А



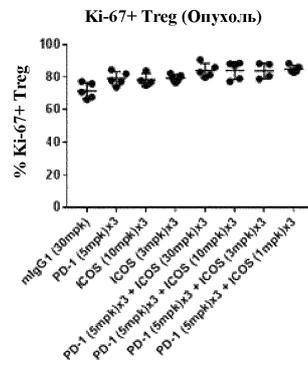
Фиг. 20В



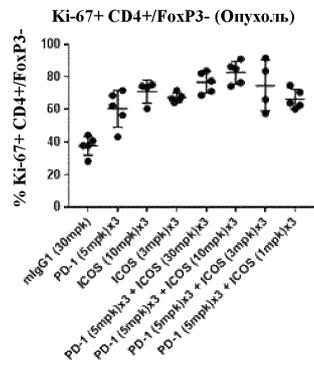
Фиг. 20С



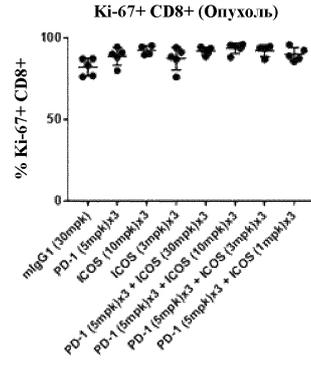
Фиг. 20D



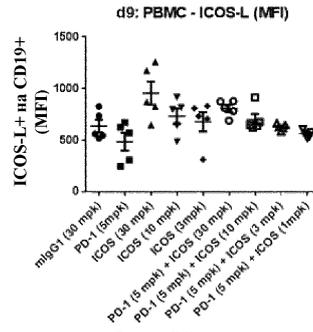
Фиг. 21А



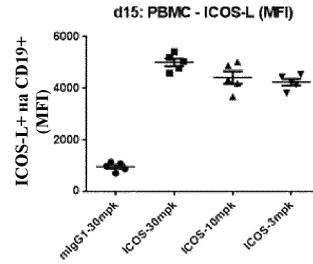
Фиг. 21В



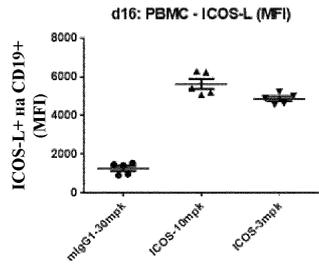
Фиг. 21С



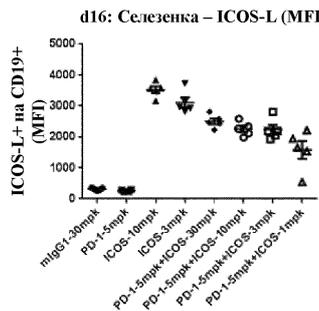
Фиг. 22А



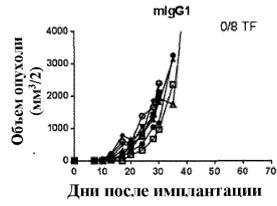
Фиг. 22В



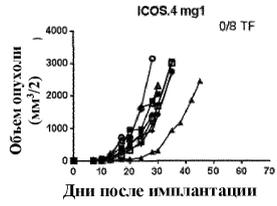
Фиг. 22С



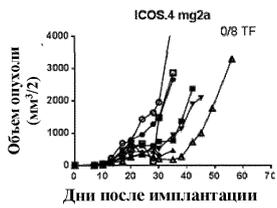
Фиг. 22D



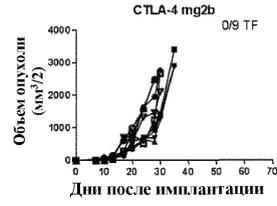
Фиг. 23А



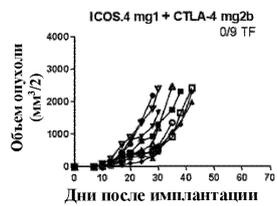
Фиг. 23В



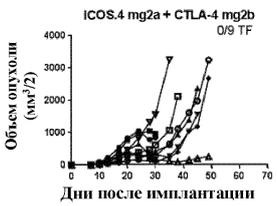
Фиг. 23С



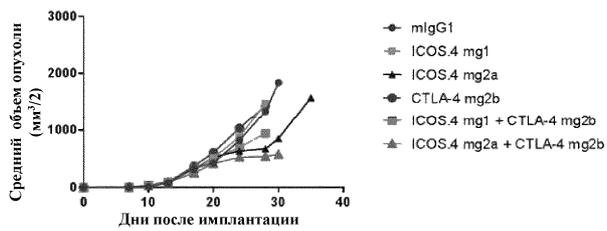
Фиг. 23D



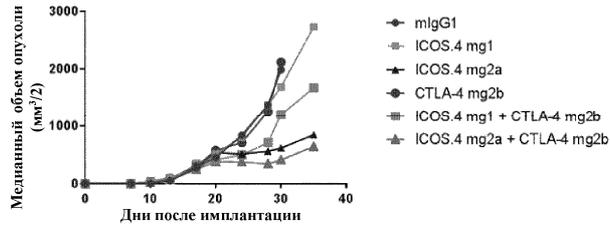
Фиг. 23Е



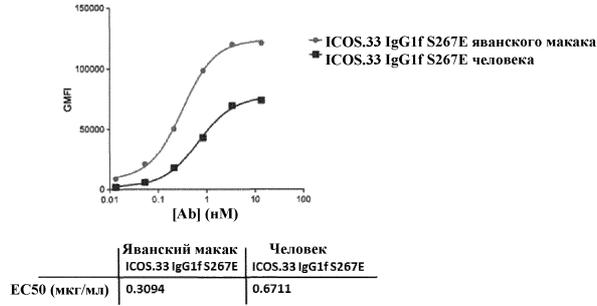
Фиг. 23F



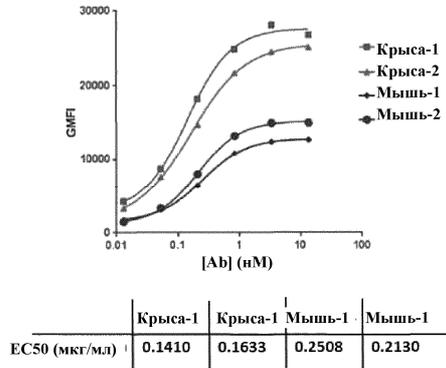
Фиг. 24А



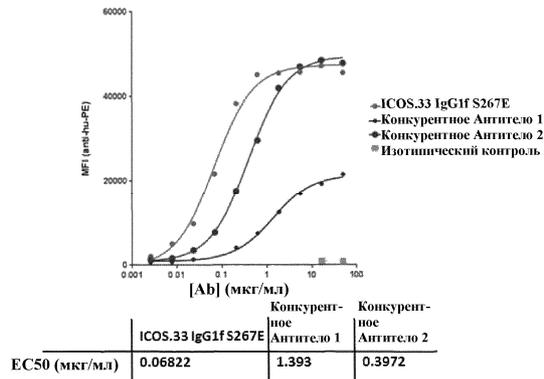
Фиг. 24В



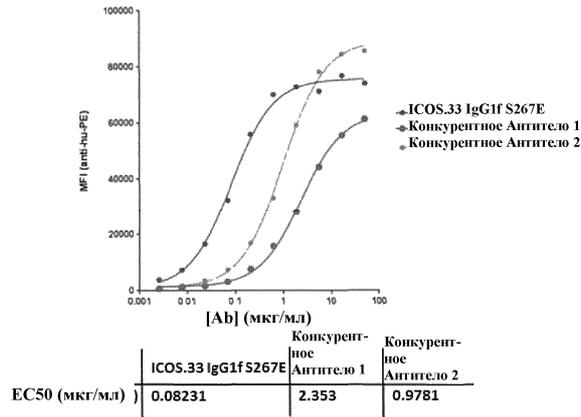
Фиг. 25А



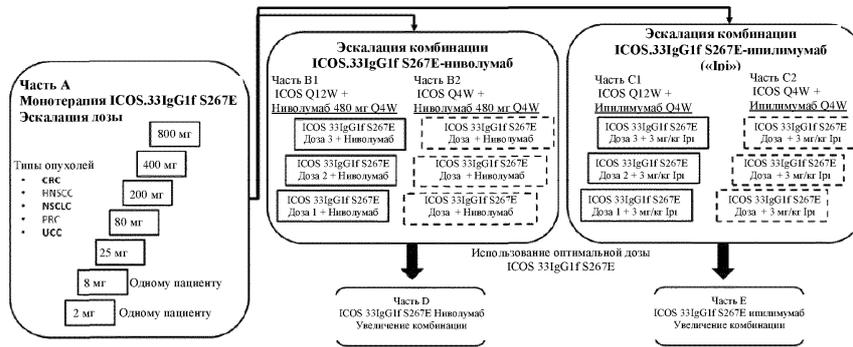
Фиг. 25В



Фиг. 26А

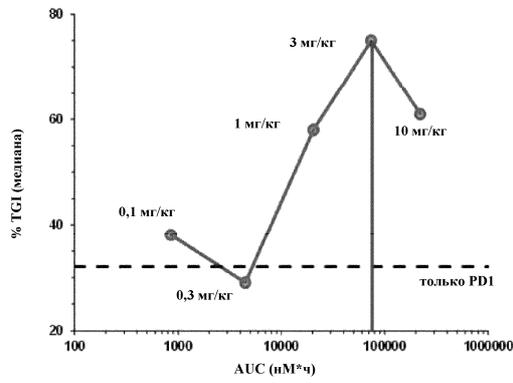


Фиг. 26В



Фиг. 27

α-ICOS антитело + α-PD1 антитело



Фиг. 28

