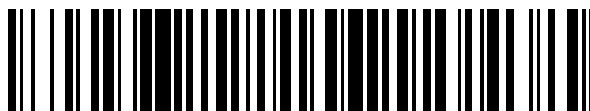


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 496**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2009 PCT/US2009/064127**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.05.2010 WO10056804**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2009 E 09826710 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2358392**

54 Título: **Formulación de anticuerpo**

30 Prioridad:

07.10.2009 US 249365 P

12.11.2008 US 113796 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2019

73 Titular/es:

MEDIMMUNE, LLC (100.0%)

One Medimmune Way

Gaithersburg, MD 20878 , US

72 Inventor/es:

SATHISH, HASIGE;

SHAH, AMBARISH;

CARLESSO, GIANLUCA y

DELANEY, TRACY

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 719 496 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulación de anticuerpo

1. Introducción

La presente divulgación se refiere a formulaciones líquidas de anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un polipéptido ICOS humano, exhiben una mayor actividad in vivo de ADCC y experimentan una autoasociación reversible en solución, cuyas formulaciones exhiben estabilidad, niveles bajos a indetectables de fragmentación de anticuerpos, niveles bajos a indetectables de agregación, y muy poca o ninguna pérdida de las actividades biológicas de los anticuerpos, incluso durante largos períodos de almacenamiento. La presente divulgación también se refiere a métodos para prevenir, tratar, controlar o mejorar los síntomas asociados con una enfermedad o trastorno mediado por ICOS (por ejemplo, pero no limitado a, lupus eritematoso sistémico, miositis, esclerosis múltiple, esclerodermia, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus dependiente de insulina, soriasis, tiroiditis autoinmunitaria, artritis reumatoide y glomerulonefritis, rechazo de trasplantes, enfermedad de injerto contra anfitrión) que utilizan formulaciones líquidas de alta concentración de anticuerpos o fragmentos de las mismas que se unen específicamente a un polipéptido ICOS humano y exhiben una mayor actividad in vivo de ADCC.

2. Antecedentes

ICOS es una proteína de membrana de tipo 1 que comprende un dominio similar a (Ig)V extracelular. ICOS sirve como el receptor para la molécula coestimuladora B7h. La expresión de ICOS es baja en las células T humanas no tratadas, pero se regula en aumento en cuestión de horas después de la activación con TCR. La expresión de ICOS persiste sobre las subpoblaciones de células T activadas, tales como las células CD4⁺ Th1, Th2 y Th17.

Dado que la expresión de ICOS se concentra en las poblaciones de células T auxiliares activadas, el uso terapéutico de un anticuerpo anti-ICOS con una función efectora mejorada mantiene la promesa de mejorar la eficacia del tratamiento y la prevención de enfermedades y trastornos mediados por células T, tales como, pero no limitados a, infección crónica, enfermedad o trastorno autoinmunitario, enfermedad o trastorno inflamatorio, enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD), rechazo de trasplantes y trastorno proliferativo de células T que utilizan anticuerpos terapéuticos anti-ICOS con función efectora mejorada.

El documento EP1158004 A2 describe anticuerpos humanos que se unen a AILIM (molécula inmunomoduladora de linfocitos inducible por activación), AILIM también se conoce como ICOS (coestimulador inducible); sin embargo, se divulga un anticuerpo anti-hICOS, JMab136, no hay divulgación de una versión afucosilada del anticuerpo JMab136 o formulaciones del mismo.

Actualmente, muchos anticuerpos se proporcionan como formulaciones liofilizadas. Las formulaciones liofilizadas de anticuerpos tienen una serie de limitaciones, que incluyen un proceso prolongado de liofilización y el alto coste de fabricación. Adicionalmente, una formulación liofilizada debe ser reconstituida de manera aséptica y precisa por los profesionales de la salud antes de administrarla a los pacientes. Por lo tanto, subsiste la necesidad de formulaciones líquidas de anticuerpos, en particular, anticuerpos anti-ICOS humanos, a una concentración comparable o superior a aquella de las formulaciones liofilizadas reconstituidas, de modo que no haya necesidad de reconstituir la formulación antes de la administración. Esto permite a los profesionales de la salud una administración de anticuerpos mucho más rápida y fácil a un paciente.

Las preparaciones de anticuerpos líquidos anteriores tienen una vida útil corta y pueden perder la actividad biológica de los anticuerpos que resultan de la inestabilidad química y física durante el almacenamiento. La inestabilidad química puede ser provocada por desamidación, racemización, hidrólisis, oxidación, eliminación beta o intercambio de disulfuro, y la inestabilidad física puede ser provocada por la desnaturalización, agregación, precipitación o adsorción de anticuerpos. Entre ellos, se sabe que la agregación, desamidación y oxidación son las causas más comunes de la degradación del anticuerpo (Wang et al., 1988, J. of Parenteral Science & Technology 42(Suppl):S4-S26; Cleland et al., 1993, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10(4):307-377). Por lo tanto, subsiste la necesidad de una formulación líquida estable de anticuerpos, en particular, anticuerpos ICOS antihumanos líquidos estables.

3. Resumen

La invención proporciona una formulación acuosa estable que comprende un anticuerpo que une específicamente ICOS humano, en la que dicha formulación comprende 10 mg/ml del anticuerpo, 80 mM de NaCl, 10 mM de histidina, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80 y en la que el pH de la formulación es 6; y en la que

a) el anticuerpo comprende una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar,

b) el anticuerpo se somete a autoasociación reversible en solución, en el que la autoasociación reversible no induce formulación de agregado, y

c) por lo menos 10 por ciento en moles del anticuerpo existe como un trímero en PBS a 10 mg/ml de concentración de anticuerpo a 37°C; y

- 5 en la que el anticuerpo comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6 y una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1.

En una realización preferida dicha formulación es isotónica.

Preferiblemente dicha formulación es una formulación farmacéuticamente aceptable.

- 10 Más preferiblemente dicha formulación es una formulación inyectable y opcionalmente en la que la formulación es adecuada para inyección intravenosa, subcutánea, o intramuscular.

La invención proporciona adicionalmente una forma de dosificación farmacéutica adecuada para administración parenteral a un humano que comprende una formulación de anticuerpo de la invención en un recipiente adecuado.

La invención aún proporciona adicionalmente una jeringa precargada que contiene la formulación de la invención.

3.1. Definiciones

- 15 Todas las formulaciones de anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno de interés (por ejemplo, ICOS) se denominan aquí colectivamente como “formulaciones de la divulgación”, “formulaciones líquidas de la divulgación”, “formulaciones líquidas estables de alta concentración de la divulgación”, “formulaciones líquidas de anticuerpos de la divulgación”, o “formulaciones de anticuerpos de la divulgación”.

- 20 Como se utiliza en el presente documento, los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” (inmunoglobulinas) abarcan anticuerpos monoclonales (que incluyen los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos de dominio, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos de anticuerpos que exhiben la actividad biológica deseada, Fvs ligado a disulfuro (sdFv), y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos de la divulgación), intracuerpos y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina, fragmentos biológicamente activos de las moléculas divulgadas y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.
- 30

- Los anticuerpos nativos suelen ser glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Las cadenas ligeras se clasifican como cadenas lambda o cadenas kappa con base en la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera. El dominio variable de la cadena ligera kappa también se puede denotar aquí como VK. El término “región variable” también se puede utilizar para describir el dominio variable de una cadena pesada o cadena ligera. Se considera que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y pesada. Dichos anticuerpos se pueden derivar de cualquier mamífero, que incluyen, pero no se limitan a, humanos, monos, cerdos, caballos, conejos, perros, gatos, ratones, etc.
- 45

- El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos y son responsables de la especificidad de unión de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones de marco (FW). Los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada una cuatro regiones FW, que adoptan en gran parte una configuración de hoja β , conectadas por tres CDR, que forman bucles que se conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura de la hoja β . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en las proximidades de las regiones FW y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los
- 50
- 55

anticuerpos (véase, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes en general no están involucrados directamente en la unión a antígeno, pero pueden influir en la afinidad de unión a antígeno y pueden exhibir varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en ADCC, CDC, fagocitosis dependiente de anticuerpo y/o apoptosis.

El término “región hipervariable” cuando se utiliza en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que están asociados con su unión a antígeno. Las regiones hipervariables abarcan los residuos de aminoácidos de las “regiones determinantes de complementariedad” o “CDR” (por ejemplo, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y residuos 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable” (por ejemplo, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en la variable de la cadena ligera dominio y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)). Los residuos “marco” o “FW” son aquellos residuos de dominio variable que flanquean las CDR. Los residuos de FW están presentes en anticuerpos de dominio quimérico, humanizado, humano, diacuerpos, vacueros, anticuerpos lineales y anticuerpos biespecíficos.

Como se utiliza en el presente documento, “región Fc” incluye los polipéptidos que comprenden la región constante de un anticuerpo que excluye el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante. Por lo tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, y los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y la bisagra de terminal N flexible a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cy2 y Cy3) y la bisagra entre Cgamma1 (Cy1) y Cgamma2 (Cy2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se define generalmente para comprender los residuos C226 o P230 a su terminal carboxilo, en el que la numeración es de acuerdo con el índice de EU como en Kabat et al 1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA). El “índice de EU según lo establecido en Kabat” se refiere a la numeración de los residuos del anticuerpo EU IgG1 humano tal como se describe en Kabat et al. supra. Fc se puede referir a esta región aislada o a esta región en el contexto de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc. Una proteína variante de Fc puede ser un anticuerpo, fusión de Fc o cualquier proteína o dominio de proteína que comprenda una región Fc. Particularmente se prefieren las proteínas que comprenden regiones Fc variantes, que son variantes de origen no natural de una región Fc. La secuencia de aminoácidos de una región Fc de origen no natural (también denominada en este documento como una “región Fc variante”) comprende una sustitución, inserción y/o supresión de por lo menos un residuo de aminoácido en comparación con la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre. Cualquier nuevo residuo de aminoácido que aparezca en la secuencia de una región Fc variante como resultado de una inserción o sustitución puede denominarse un residuo de aminoácido de origen no natural. Nota: Se han observado polimorfismos en varias posiciones Fc, que incluyen, pero no se limitan a, Kabat 270, 272, 312, 315, 356 y 358, y por lo tanto pueden existir ligeras diferencias entre la secuencia presentada y las secuencias en la técnica anterior.

El término “anticuerpo monoclonal”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un solo sitio antigénico. Adicionalmente, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se pueden sintetizar por células de hibridoma que no están contaminadas por otras células productoras de inmunoglobulina. Aquellos expertos en la técnica conocen métodos de producción alternativos, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal puede ser producido por células transfectadas de forma estable o transitoria con los genes de las cadenas pesada y ligera que codifican el anticuerpo monoclonal.

El modificador “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como un requisito de ingeniería del anticuerpo por ningún método en particular. El término “monoclonal” se utiliza en el presente documento para referirse a un anticuerpo que se deriva de una población clonal de células, incluidas cualquier clon eucariótico, procariota o fago, y no el método por el cual se diseñó el anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizarán de acuerdo con la presente divulgación se pueden producir mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), o se pueden preparar mediante cualquier método de ADN recombinante (véase, por ejemplo, *Patente de Estados Unidos No. 4,816,567*), que incluye el aislamiento de bibliotecas de anticuerpos de fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222-581-597 (1991), por ejemplo. Estos métodos se pueden utilizar para producir anticuerpos monoclonales de mamíferos, quiméricos, humanizados, humanos, anticuerpos de dominio, diacuerpos, vacueros, anticuerpos lineales y anticuerpos biespecíficos.

Un “anticuerpo humano” puede ser un anticuerpo derivado de un humano o un anticuerpo obtenido de un organismo transgénico que ha sido “diseñado por ingeniería” para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a la

exposición antigénica y se puede producir por cualquier método conocido en la técnica. En ciertas técnicas, los elementos de los loci de las cadenas pesada y ligera del humano se introducen en cepas del organismo derivadas de estirpes de células madre embrionarias que contienen interrupciones específicas de los loci de la cadena pesada y de la cadena ligera endógenas. El organismo transgénico puede sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, y el organismo se puede utilizar para producir hibridomas secretores de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humano también puede ser un anticuerpo en el que las cadenas pesada y ligera están codificadas por una secuencia de nucleótidos derivada de una o más fuentes de ADN humano. Un anticuerpo completamente humano también puede construirse por métodos de transfección genética o cromosómica, así como por la tecnología de visualización de fagos, o células T que expresan ICOS activadas in vitro, todas las cuales son conocidas en la técnica.

“Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” y “ADCC” se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas (por ejemplo, linfocitos citotóxicos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula objetivo y posteriormente provocarán la lisis de la célula objetivo. En una realización, dichas células son células humanas. Si bien no se desea limitarse a ningún mecanismo de acción en particular, estas células citotóxicas que median la ADCC en general expresan los receptores Fc (FcR). Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII, FcγRIII y/o FcγRIV. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula, se puede realizar un ensayo de ADCC in vitro, tal como el que se describe en la patente de Estados Unidos No. 5,500,362 o 5,821,337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citotóxicos naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de las moléculas de interés se puede evaluar in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes et al., *Proc. Natl Acad Sci. (USA)*, 95: 652-656 (1998).

“Citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refiere a la capacidad de una molécula para iniciar la activación del complemento y lisar un objetivo en presencia de complemento. La ruta de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) en complejo con un antígeno relacionado. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, cómo se describe en Gazzano-Santaro et al., *J. Immunol. Methods*, 202: 163 (1996).

La “fagocitosis dependiente de anticuerpos” u “opsonización” como se utiliza en el presente documento se refiere a la reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconocen el anticuerpo unido en una célula objetivo y, posteriormente, provocan la fagocitosis de la célula objetivo.

Las “células efectoras” son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Las células expresan por lo menos FcγRI, FcγRII, FcγRIII y/o FcγRIV y llevan a cabo la función de efector de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citotóxicos naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos.

Los términos “receptor de Fc” o “FcR” se utilizan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En una realización, el FcR es un FcR humano de secuencia nativa. Más aún, en ciertas realizaciones, el FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcγRIV, que incluyen variantes alélicas y formas empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición a base de tirosina inmunoreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico, (véase, Daëron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15: 203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4: 25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126: 330-41 (1995). Otros FcR, que incluyen aquellos que se identificarán en el futuro, se abarcan por el término “FcR” en este documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., *Immunol.*, 117: 587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.*, 24: 249 (1994)).

La “afinidad” de un anticuerpo para un epítipo que se utilizará en el(los) tratamiento(s) descrito(s) en este documento es un término bien entendido en la técnica y significa la extensión o fuerza de la unión del anticuerpo al epítipo. La afinidad se puede medir y/o expresar de varias formas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, la constante de disociación en equilibrio (KD o Kd), la constante de disociación en equilibrio aparente (KD’ o Kd’) y la IC50 (cantidad necesaria para efectuar una inhibición del 50% en un ensayo de competición). Se entiende que, para los propósitos de esta divulgación, una afinidad es una afinidad promedio para una población dada de anticuerpos que se unen a un epítipo. Los valores de KD’ reportados en este documento en términos de mg de IgG por mL o mg/mL indican mg de Ig por mL de suero, aunque se puede utilizar plasma. Cuando la afinidad de anticuerpos se utiliza como base para la administración de los métodos de tratamiento descritos en este documento, o la selección de los métodos de tratamiento descritos en este documento, la afinidad de anticuerpos se puede

medir antes y/o durante el tratamiento, y los valores obtenidos se pueden utilizar por un médico para evaluar Si un paciente humano es un candidato apropiado para el tratamiento.

Como se utiliza en el presente documento, el término “avidez” es una medida de la fuerza de unión global (es decir, ambos brazos de anticuerpos) con la que un anticuerpo se une a un antígeno. La avidez del anticuerpo se puede determinar al medir la disociación del enlace antígeno-anticuerpo en el exceso de antígeno utilizando cualquier medio conocido en la técnica, tal como, pero sin limitarse a, por la modificación del anticuerpo fluorescente indirecto según lo descrito por Gray et al., *J Virol. Meth.*, 44: 11-24 (1993).

Un “epítipo” es un término bien entendido en la técnica y significa una fracción química que muestra unión específica a un anticuerpo. Un “antígeno” es una fracción o molécula que contiene un epítipo y, como tal, también se une específicamente al anticuerpo.

El término “vida media del anticuerpo”, como se utiliza en el presente documento, significa una propiedad farmacocinética de un anticuerpo que es una medida del tiempo de supervivencia medio de las moléculas de anticuerpo después de su administración. La vida media del anticuerpo se puede expresar como el tiempo requerido para eliminar el 50 por ciento de una cantidad conocida de inmunoglobulina del cuerpo del paciente o un compartimento específico del mismo, por ejemplo, medido en suero o plasma, es decir, en vida media en circulación, o en otros tejidos. La vida media puede variar de una inmunoglobulina o clase de inmunoglobulina a otra. En general, un aumento en la vida media del anticuerpo da como resultado un aumento en el tiempo de residencia medio (MRT) en circulación para el anticuerpo administrado.

El término “isotipo” se refiere a la clasificación de la región constante de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Los dominios constantes de los anticuerpos no están involucrados en la unión al antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada, un anticuerpo humano dado o inmunoglobulina se puede asignar a una de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Varias de estas clases se pueden dividir en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1 (gamma 1), IgG2 (gamma 2), IgG3 (gamma 3) e IgG4 (gamma 4), e IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. De las diversas clases de inmunoglobulinas humanas, solo se sabe que las IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM humanas activan el complemento. Se sabe que las IgG1 e IgG3 humanas median la ADCC en los humanos. Las regiones constantes de la cadena ligera humana se pueden clasificar en dos clases principales, kappa y lambda.

Como se utiliza en el presente documento, el término “inmunogenicidad” significa que un compuesto es capaz de provocar una respuesta inmunitaria (estimular la producción de anticuerpos específicos y/o la proliferación de células T específicas).

Como se utiliza en el presente documento, el término “antigenicidad” significa que un compuesto es reconocido por un anticuerpo o se puede unir a un anticuerpo e inducir una respuesta inmunitaria.

El término “excipiente”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una sustancia inerte que se utiliza comúnmente como un diluyente, vehículo, conservante, aglutinante o agente estabilizante para medicamentos que confieren una propiedad física beneficiosa a una formulación, tal como el aumento de la estabilidad de la proteína, el aumento de la solubilidad de la proteína, y disminución de la viscosidad. Los ejemplos de excipientes incluyen, pero no se limitan a, proteínas (por ejemplo, pero no limitadas a, albúmina sérica), aminoácidos (por ejemplo, pero no limitados a, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, glicina), surfactantes (por ejemplo, pero no limitado a, SDS, Tween 20, Tween 80, polisorbato y surfactantes no iónicos), sacáridos (por ejemplo, pero no limitado a, glucosa, sacarosa, maltosa y trehalosa), polioles (por ejemplo, pero no limitado) a, manitol y sorbitol), ácidos grasos y fosfolípidos (por ejemplo, pero no limitados a, sulfonatos y caprilato de alquilo). Para información adicional sobre los excipientes, consulte Remington's Pharmaceutical Sciences (por Joseph P. Remington, 18ª edición, Mack Publishing Co., Easton, PA).

La frase “farmacéuticamente aceptable” como se utiliza en este documento significa aprobada por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o enumerada en la Farmacopea de los Estados Unidos, la Farmacopea Europea u otra farmacopea en general reconocida para su uso en animales, y más particularmente en humanos.

Los términos “estabilidad” y “estable” como se utilizan en el presente documento en el contexto de una formulación líquida que comprende un anticuerpo (que incluye su fragmento de anticuerpo) que se une específicamente a un antígeno de interés (por ejemplo, ICOS) se refieren a la resistencia del anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) en la formulación para agregación, degradación o fragmentación en determinadas bajo condiciones de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento. Las formulaciones “estables” de la divulgación conservan la actividad biológica en condiciones de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento dadas. La estabilidad de dicho anticuerpo (que incluye el fragmento de anticuerpo del mismo) se puede evaluar por grados de agregación, degradación o fragmentación, según lo medido por HPSEC, cromatografía de fase inversa, dispersión de luz estática (SLS), dispersión de luz dinámica (DLS), espectroscopia de infrarrojo por

transformada de Fourier (FTR), dicroísmo circular (CD), técnicas de despliegue de urea, fluorescencia intrínseca de triptófano, calorimetría diferencial de barrido y/o técnicas de unión a SNA, en comparación con una formulación de referencia. Por ejemplo, una formulación de referencia puede ser un estándar de referencia congelado a -70°C que consiste en 10 mg/ml de un anticuerpo (que incluye su fragmento de anticuerpo) (por ejemplo, pero no limitado a, un anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadena ligera de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tienen cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor en la cadena de azúcar) en 10 mM de histidina, pH 6.0-6.5 que contiene 80 mM de NaCl, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80, cuya formulación de referencia proporciona regularmente un solo pico de monómero (por ejemplo, ≥97% de área) por HPSEC. La estabilidad general de una formulación que comprende un anticuerpo (que incluye el fragmento de anticuerpo del mismo) se puede evaluar mediante diversos ensayos inmunológicos que incluyen, por ejemplo, ELISA y radioinmunoensayo utilizando moléculas de antígeno aisladas.

La frase “niveles bajos a indetectables de agregación”, como se utiliza en este documento, se refiere a muestras que no contienen más de aproximadamente el 5%, no más de aproximadamente el 4%, no más de aproximadamente el 3%, no más de aproximadamente el 2%, no más de aproximadamente el 1% y no más de aproximadamente un 0.5% de agregación en peso de proteína según lo medido por cromatografía de exclusión de tamaño de alto rendimiento (HPSEC) o técnicas de dispersión de luz estática (SLS).

El término “niveles bajos a indetectables de fragmentación”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a muestras que contienen igual o más de aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 98% o aproximadamente el 99% de la proteína total. Por ejemplo, en un solo pico determinado por HPSEC o cromatografía de fase inversa, o en dos picos (por ejemplo, cadenas pesadas y ligeras) (o tantos picos como subunidades) por electroforesis de gel capilar reducido (rCGE), que representa el anticuerpo no degradado o un fragmento no degradado del mismo, y que no contiene otros picos individuales que tengan más de aproximadamente el 5%, más de aproximadamente el 4%, más de aproximadamente el 3%, más de aproximadamente el 2%, más de aproximadamente el 1%, o más de aproximadamente el 0.5% de la proteína total en cada uno. El término “electroforesis en gel capilar reducido”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a la electroforesis en gel capilar bajo condiciones reductoras suficientes para reducir los enlaces disulfuro en un anticuerpo.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “trastorno” y “enfermedad” se utilizan indistintamente para referirse a una afección en un sujeto en el cual el sujeto difiere de un sujeto sano y no afectado. En particular, el término “enfermedad autoinmunitaria” se utiliza de manera intercambiable con el término “trastorno autoinmunitario” para referirse a una afección en un sujeto caracterizado por una lesión celular, tisular y/u orgánica provocada por una reacción inmunológica del sujeto a sus propias células, tejidos y/u órganos. El término “enfermedad inflamatoria” se utiliza de manera intercambiable con el término “trastorno inflamatorio” para referirse a una afección en un sujeto caracterizado por una inflamación, por ejemplo, pero no limitado a, inflamación crónica. Los trastornos autoinmunitarios pueden o no estar asociados con inflamación. Más aún, la inflamación puede o no ser provocada por un trastorno autoinmunitario. Ciertas afecciones se pueden caracterizar como más de un trastorno. Por ejemplo, ciertas afecciones se pueden caracterizar como trastornos autoinmunitarios e inflamatorios.

Los términos “terapias” y “terapia” se pueden referir a cualquier protocolo(s), método(s) y/o agente(s) que se pueden utilizar en la prevención, tratamiento y/o manejo de una enfermedad o trastorno.

Por los términos “tratar”, “que trata” o “tratamiento de” (o términos gramaticalmente equivalentes) se entiende que la gravedad de la afección del sujeto se reduce o por lo menos se mejora o alivia por lo menos parcialmente y/o que se logra cierto alivio, mitigación o disminución en por lo menos un síntoma clínico y/o hay una inhibición o retraso en la progresión de la afección y/o prevención o retraso en el inicio de una enfermedad o dolencia. Por lo tanto, los términos “tratar”, “que trata” o “tratamiento de” (o términos gramaticalmente equivalentes) se refieren a los regímenes de tratamiento tanto profiláctico como terapéutico.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “manejar”, “que maneja” y “manejo” se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto deriva de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico), que no resulta en una cura de la enfermedad. En ciertas realizaciones, a un sujeto se le administran una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) para “manejar” una enfermedad a fin de prevenir la progresión o empeoramiento de la enfermedad.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “prevenir”, “que previene” y “prevención” se refieren a la inhibición del desarrollo o aparición de una enfermedad o trastorno, o la prevención de la recurrencia, aparición o desarrollo de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno en un sujeto que resulta de la administración de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico), o la administración de una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos).

Como se utiliza en el presente documento, los términos “agente profiláctico” y “agentes profilácticos” se refieren a cualquier agente(s) que se puede utilizar en la prevención de la aparición, recurrencia o desarrollo de una enfermedad o trastorno. En ciertas realizaciones, el término “agente profiláctico” se refiere a un anticuerpo que se

une específicamente a ICOS humano. En ciertas otras realizaciones, el término “agente profiláctico” se refiere a un agente distinto de un anticuerpo que se une específicamente a ICOS humano. En ciertas realizaciones, un agente profiláctico es un agente que se sabe que es útil o que se está utilizando o se está utilizando actualmente para prevenir o impedir el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad o trastorno.

Como se utiliza en el presente documento, el término “agente inmunomodulador” y variaciones del mismo, que incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunomoduladores, inmunomoduladores o fármacos inmunomoduladores, se refieren a un agente que modula el sistema inmunitario del anfitrión. En una realización específica, un agente inmunomodulador es un agente que cambia un aspecto de la respuesta inmunitaria de un sujeto. En ciertas realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente que inhibe o reduce el sistema inmunitario de un sujeto (es decir, un agente inmunosupresor). En ciertas otras realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente que activa o aumenta el sistema inmunitario de un sujeto (es decir, un agente inmunoestimulador). De acuerdo con la divulgación, un agente inmunomodulador utilizado en las terapias de combinación de la divulgación no incluye un anticuerpo de la divulgación. Los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos (por ejemplo, pero no limitados a, nucleótidos de ADN y ARN que incluyen, pero no se limitan a, secuencias de nucleótidos antisentido, triples hélices, ARNi, y secuencias de nucleótidos que codifican proteínas biológicamente activas, polipéptidos o péptidos), anticuerpos, moléculas inorgánicas sintéticas o naturales, agentes miméticos y moléculas orgánicas sintéticas o naturales.

Como se utiliza en este documento, una “cantidad suficiente” o “una cantidad suficiente para” lograr un resultado particular se refiere a una cantidad de un anticuerpo o composición de la divulgación que es efectiva para producir un efecto deseado, que es opcionalmente un efecto terapéutico (es decir, por administración de una cantidad terapéuticamente efectiva). Por ejemplo, una “cantidad suficiente” o “una cantidad suficiente para” puede ser una cantidad que sea efectiva para agotar las células T que expresan ICOS.

Una cantidad “terapéuticamente efectiva” como se utiliza en este documento es una cantidad que proporciona alguna mejora o beneficio para el sujeto. Dicho de otra manera, una cantidad “terapéuticamente efectiva” es una cantidad que favorece cierto alivio, mitigación y/o disminución de por lo menos un síntoma clínico. Los síntomas clínicos asociados con los trastornos que se pueden tratar mediante los métodos de la divulgación son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Adicionalmente, aquellos expertos en la técnica apreciarán que los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, siempre que se proporcione algún beneficio al sujeto.

Una “dosificación terapéuticamente efectiva” de un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación resulta en una disminución de la gravedad de por lo menos un síntoma de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y la duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad, o una prevención de deterioro o discapacidad debido a la aflicción de la enfermedad. Por ejemplo, en el caso del lupus eritematoso sistémico (SLE), una dosis terapéuticamente efectiva previene un mayor deterioro de por lo menos un síntoma físico asociado con el SLE, tal como, por ejemplo, el dolor o la fatiga. Una dosis terapéuticamente eficaz también previene o retrasa la aparición del SLE, como puede desearse cuando se presentan signos tempranos o preliminares de la enfermedad. Asimismo, incluye retrasar la progresión crónica asociada con el SLE, las pruebas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico del SLE incluyen química, hematología, serología y radiología. De acuerdo con lo anterior, cualquier ensayo clínico o bioquímico que monitoriza cualquiera de los anteriores se puede utilizar para determinar si un tratamiento particular es una dosis terapéuticamente efectiva para tratar el SLE. Un experto en la técnica sería capaz de determinar dichas cantidades con base en factores tales como el tamaño del sujeto, gravedad de los síntomas del sujeto y composición o ruta de administración particular seleccionada.

Como se utiliza en este documento, el término “sujeto” incluye cualquier animal humano o no humano. El término “animal no humano” incluye a todos los vertebrados, por ejemplo, pero no limitados a, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “no sensible” y resistente” describen a los pacientes tratados con una terapia actualmente disponible (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) para una enfermedad o trastorno. Es probable que estos pacientes sufran una enfermedad grave y persistentemente activa y requieran terapia adicional para mejorar los síntomas asociados con el trastorno.

Las concentraciones, cantidades, recuentos de células, porcentajes y otros valores numéricos se pueden presentar en este documento en un formato de rango. También se debe entender que dicho formato de rango se utiliza simplemente por conveniencia y brevedad y se debe interpretar de manera flexible para incluir no solo los valores numéricos explícitamente citados como los límites del rango, sino también para incluir todos los valores numéricos individuales o subrangos abarcados dentro de ese rango como si cada valor numérico y sub-rango se citara explícitamente.

4. Breve descripción de los dibujos

Con el propósito de ilustrar realizaciones representativas de la divulgación, los dibujos se proporcionan en el presente documento.

Figura 1. Perfil DSC del anticuerpo anti-ICOS 136 en histidina 25 mM (pH 6.0).

Figura 2 Efecto del pH sobre la estabilidad térmica del anticuerpo anti-ICOS 136. Se muestran los perfiles de intensidad de fluorescencia del triptófano (medidos a 330 nm) en función de la temperatura. Las mediciones del perfil de intensidad de fluorescencia de triptófano se realizaron a diversos pH.

Figura 3 Dependencia del pH de la estabilidad coloidal de las formulaciones anti-ICOS. Se muestra la absorción a 350 nm de formulaciones con diversos pH en función de la temperatura.

Figura 4 Esquemas del uso de la medición de la estabilidad coloidal para el cribado de excipientes.

Figura 5 Cribado de un solo excipiente: efecto del polisorbato, trehalosa, sacarosa y lisina sobre la estabilidad coloidal de formulaciones 136.

Figura 6 Cribado de un solo excipiente: efecto del aumento de la concentración de NaCl sobre la estabilidad coloidal de formulaciones 136.

Figura 7. Cribado de un solo excipiente: Efecto del aumento de la concentración de NaCl o arginina sobre la estabilidad coloidal de formulaciones 136.

Figura 8. Cribado de excipiente: Efecto de la combinación de trehalosa y arginina sobre la estabilidad coloidal de formulaciones 136.

Figura 9. Estabilidad de formulaciones de anticuerpo anti-ICOS 136. La estabilidad de las formulaciones de anticuerpo se comprobó por SEC. El gráfico muestra el porcentaje (%) de contenido de monómero de la formulación, según se determina por SEC, después de almacenamiento a 40°C.

Figura 10. Estabilidad de formulaciones de anticuerpo anti-ICOS 136. La estabilidad de las formulaciones de anticuerpo que comprende 90 mg/ml de 136, 10 mM de histidina (pH 6.0), 4% de trehalosa y cualquiera de 80 mM de NaCl (A) o arginina HCl 100 mM (B) se comprobó por SEC. Las formulaciones se almacenaron a 40°C durante 21 días antes de realizar análisis SEC. Se muestran perfiles de elución de proteína SEC.

Figura 11. Efecto de polisorbato 80 sobre la estabilidad de formulaciones de anticuerpo anti-ICOS 136. La estabilidad de formulaciones 136 (105 mg/ml de 136, 10 mM de histidina (pH 6.0), 80 mM de NaCl) que comprende polisorbato 80 al 0%, 0.02% o 0.05% se comprobó luego de almacenamiento a 40°C. El gráfico muestra el porcentaje (%) de contenido de monómero de la formulación, según lo determinado por SEC, en diversos puntos de tiempo.

Figura 12. Efecto de polisorbato 80 sobre la estabilidad de formulaciones de anticuerpo anti-ICOS 136. La estabilidad de formulaciones 136 (105 mg/ml de 136, 10 mM de histidina (pH 6.0), 80 mM de NaCl) que comprende 0%, 0.02% o 0.05% de polisorbato 80 se comprobó luego de almacenamiento a 40°C. El gráfico muestra el porcentaje (%) del contenido del fragmento de la formulación, según se determina por SEC, en varios puntos de tiempo.

Figura 13. Efecto de polisorbato 80 sobre la estabilidad de formulaciones de anticuerpo anti-ICOS 136. La estabilidad de formulaciones 136 (105 mg/ml de 136, 10 mM de histidina (pH 6.0), 80 mM de NaCl) que comprende polisorbato 80 al 0%, 0.02% o 0.05% se comprobó luego de almacenamiento a 40°C. El gráfico muestra el porcentaje (%) de contenido de dímero de la formulación, según se determina por SEC, en varios puntos de tiempo.

Figura 14. Estabilidad de una formulación de anticuerpo anti-ICOS 136 almacenada a 2-8, 25 o 40°C. La estabilidad de la 136 formulación que comprende 105 mg/ml de 136, 10 mM de histidina (pH 6.0), 80 mM de NaCl y 0.02% de polisorbato 80 se comprobó luego de almacenamiento a 2-8, 25 o 40°C. El gráfico muestra el porcentaje (%) de contenido de monómero de la formulación, según se determina por SEC, en varios puntos de tiempo.

Figura 15. A) Afinidad de unión a BIAcore del MAb anti-ICOS fucosilado y afucosilado al FcγRIV de ratón. B) Caracterización del inmuno-fenotipo en el estado en equilibrio de la expresión de ICOS en células de memoria nultratadas esplénicas y auxiliares T (central y efector). C) El MAb anti-ICOS libre de fucosa (IgG2a-aFuc) media un agotamiento más efectivo de células T que llevan ICOS. El análisis farmacodinámico de las células T que llevan ICOS de memoria efectora esplénica y central auxiliar esplénicas luego de una sola inyección intraperitoneal de los MAb anti-ICOS indicados en ratones Balb/c nultratados (250 µg/animal).

Figura 16. El MAb Anti-ICOS (IgG2a-aFuc) reduce la puntuación clínica de esclerodermia de injerto contra anfitrión. Se muestra la puntuación media de la enfermedad clínica después del tratamiento cada dos semanas (hora de inicio: día 8) con IgG2a-aFuc ICOS anti-ratón o MAb de control de isotipo (n=10). Las mediciones de las puntuaciones cutáneas de referencia se obtuvieron el día 6 del estudio. (* P <0.05, ** p <0.005)

Figura 17. El MAb Anti-ICOS media en la eliminación efectiva de TFH que lleva ICOS e inhibe la expansión de las células B del centro germinal. Análisis inmunofenotípico del bazo, ganglios linfáticos y sangre periférica Th memoria (A) y Th memoria ICOS + células (B, C) (cerradas como se indica en la Figura 1C) aisladas de ratones de control Balb/c y de ratones deficientes en rag2 tratados con cualquiera anti-ICOS o MAb de control de isotipo. D) La terapia anti-ICOS previene la expansión de las células TFH. Si bien el MAb anti-ICOS no altera el número total de células B

esplénicas totales (CD19+) (E), inhibe significativamente la expansión mediada por TFH de las células B del centro germinal (F). El agotamiento de las células T que llevan ICOS no perturba los compartimientos de células T CD4+ (G) y CD8+ (H).

5 Figura 18. Histología de RAG2-/- de bazo y riñón de un animal tratado con MAb de control de isotipo (A, E,) y un animal tratado con MAb anti-ICOS (C). Un aumento mayor (×200) del bazo demuestra la falta de formación del centro germinal en animales tratados con anti-ICOS (D) en comparación con el isotipo (B). Ampliación original, ×100; recuadro ×1000.

10 Figura 19. El tratamiento con MAb anti-ICOS inhibe significativamente la patología de la piel GvHD-SSc. Se muestra la histología de la piel de la espalda de ratones Balb/c (A, B) o RAG2-/- injertados con esplenocitos a las 4 semanas desde el grupo MAb de control de isotipo (C, D) y el grupo tratado con MAb anti-ICOS (E, F). Las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina y eosina (fila superior) o con la tinción de Trichrome de Masson (fila inferior). Ampliaciones originales, ×200.

Figura 20. El tratamiento con MAb ICOS afecta los genes asociados a TFH y auxiliar T y la huella del gen autoinmunitario en la piel.

15 Figura 21. Efecto de la concentración sobre el diámetro hidrodinámico del anticuerpo anti-ICOS 136. En la figura, el triángulo cerrado representa los datos obtenidos con el anticuerpo anti-ICOS 136 y el círculo cerrado representa los datos obtenidos con un anticuerpo monoclonal que no interactúa (mAbB).

Figura 22. Efecto de la concentración de cloruro de sodio en el anticuerpo anti-ICOS 136 RSA a 23°C (círculo cerrado) y 37°C (triángulo cerrado).

20 Figura 23. Efecto del pH sobre RSA de anticuerpos 136 anti-ICOS. También se muestran los datos obtenidos con un anticuerpo de control que no interactúa (mAbB).

Figura 24. Efecto de la temperatura sobre RSA de anticuerpos 136 anti-ICOS. El mAbB es un anticuerpo de control que no interactúa.

Figura 25 Efecto de la temperatura sobre las cinéticas de disociación del anticuerpo anti-ICOS 136.

25 5. Descripción detallada

La caracterización de las propiedades físico-químicas del anticuerpo anti-ICOS 136 llevó al sorprendente descubrimiento de que el anticuerpo sufre una autoasociación reversible en solución. La autoasociación reversible observada del anticuerpo 136 es única en que no lleva a formación agregada. Debido a la autoasociación, una fracción significativa del anticuerpo 136 existe como un trímero en solución. El trabajo experimental adicional demostró que el equilibrio entre la forma del monómero y el trímero de 136 en solución está influenciado por la concentración de anticuerpos, temperatura, fuerza iónica y pH. Por ejemplo, por lo menos 10 por ciento en moles del anticuerpo 136 existe como un trímero en PBS a 10 mg/ml de concentración de anticuerpo a 37°C. Se describen en este documento formulaciones líquidas estables que comprende un anticuerpo que une específicamente ICOS humano y se somete a autoasociación reversible en solución.

35 La presente divulgación se refiere a formulaciones líquidas estables de anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a ICOS, se someten a autoasociación reversible en solución y tienen una función efectora mejorada (por ejemplo, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad mediada por células dependientes del complemento (CDC), y/o fagocitosis dependiente de anticuerpos. En ciertas realizaciones, una formulación líquida estable de un anticuerpo anti-ICOS humano o un fragmento del mismo es adecuada para la administración parenteral a un sujeto humano. En una realización específica, una formulación líquida estable de la divulgación es adecuada para administración subcutánea a un sujeto humano.

40 La presente divulgación se refiere a formulaciones acuosas estables que comprenden un anticuerpo o fragmento del mismo que une específicamente ICOS humano, tiene funciones efectoras mejoradas y se somete a autoasociación reversible en solución. La presente divulgación proporciona una formulación de un anticuerpo anti-ICOS descrita en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 12/116,512. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo ICOS anti-humano que comprende una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar. En otra realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo ICOS anti-humano que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6 y una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1. En una realización adicional, una formulación descrita en este documento comprende un anticuerpo ICOS anti-humano que se somete a autoasociación reversible en solución, en la que por lo menos 10 por ciento en moles del anticuerpo existe como un trímero en PBS a 10 mg/ml de concentración de anticuerpo a 37°C, y en el que la autoasociación reversible no induce formación agregada. En una realización, se proporciona una formulación de la divulgación en una jeringa precargada.

La presente divulgación proporciona métodos para estabilizar un anticuerpo ICOS anti-humano o fragmento del mismo.

La presente divulgación se refiere adicionalmente a procesos para elaborar una formulación acuosa estable que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo que une específicamente ICOS humano.

- 5 La presente divulgación también abarca métodos para evitar, manejar, tratar o mejorar una enfermedad o trastorno inflamatorio, una enfermedad o trastorno autoinmunitario, una enfermedad proliferativa, una enfermedad proliferativa de células T, una infección, una enfermedad o trastorno asociado o caracterizado por expresión aberrante y/o actividad de ICOS, una enfermedad o trastorno asociado con o caracterizado por expresión aberrante y/o actividad del receptor de ICOS, o uno o más síntomas de los mismos, dichos métodos comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de una formulación de anticuerpo anti-ICOS humano. La presente divulgación también se refiere a métodos para tratar o evitar enfermedades y trastornos mediados por células T, tales como, pero no limitados a, infección crónica, enfermedad o trastorno autoinmunitario, enfermedad o trastorno inflamatorio, enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD), rechazo de trasplantes y trastorno proliferativo de células T que utilizan formulaciones que comprenden anticuerpos anti-ICOS con función efectora mejorada.

5.1. Formulaciones de anticuerpo

- En realizaciones específicas, la presente divulgación abarca formulaciones líquidas estables de anticuerpos que se unen específicamente a ICOS humano, se someten a autoasociación reversible en solución y tienen una función efectora mejorada (por ejemplo, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad mediada por células dependientes del complemento (CDC), y/o fagocitosis dependiente de anticuerpos), en la que las formulaciones exhiben niveles bajos a indetectables de agregación de anticuerpos y/o fragmentación con muy poca o ninguna pérdida de las actividades biológicas durante la fabricación, preparación, transporte, y largos periodos de almacenamiento. La presente divulgación también abarca formulaciones líquidas estables de anticuerpos que se unen específicamente a ICOS humano, se someten a autoasociación reversible en solución, tienen una función efectora mejorada y tienen aumento vidas medias in vivo, dichas formulaciones que exhiben niveles bajos a indetectables de agregación de anticuerpos y/o fragmentación, y muy poca o ninguna pérdida de las actividades biológicas de los anticuerpos durante fabricación, preparación, transporte, y largos periodos de almacenamiento. En realizaciones específicas, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo ICOS anti-humano que tiene aumento de actividad de ADCC in vivo, dicha formulación que exhibe niveles bajos a indetectables de agregación de anticuerpos y/o fragmentación, y muy poca a ninguna de actividades biológicas de los anticuerpos durante fabricación, preparación, transporte, y largos periodos de almacenamiento.

En una realización, una formulación líquida de la divulgación es una formulación acuosa. En una realización específica, una formulación líquida de la divulgación es una formulación acuosa en la que el portador acuoso es agua destilada.

- 35 En una realización, una formulación de la divulgación es estéril.

En una realización, una formulación de la divulgación es homogénea.

En una realización, una formulación de la divulgación es isotónica.

- La presente divulgación proporciona formulaciones líquidas de alta concentración estables que comprenden un anticuerpo anti-ICOS que tienen una función efectora mejorada. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS descrito en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 12/116,512.

- En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo o un fragmento del mismo comprende un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y un dominio VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo ICOS anti-humano que comprende una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

- 50 La divulgación abarca formulaciones líquidas estables que comprenden un anticuerpo único de interés (que incluye anticuerpo o fragmento del mismo), por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido ICOS. La divulgación también abarca formulaciones líquidas estables que comprenden dos o más anticuerpos de interés (que incluyen fragmentos de anticuerpo de los mismos), por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido(s) ICOS.

- 55 En una realización, una formulación de la divulgación comprende por lo menos aproximadamente 1 mg/ml, por lo menos aproximadamente 5 mg/ml, por lo menos aproximadamente 10 mg/ml, por lo menos aproximadamente 20

mg/ml, por lo menos aproximadamente 30 mg/ml, por lo menos aproximadamente 40 mg/ml, por lo menos aproximadamente 50 mg/ml, por lo menos aproximadamente 60 mg/ml, por lo menos aproximadamente 70 mg/ml, por lo menos aproximadamente 80 mg/ml, por lo menos aproximadamente 90 mg/ml, por lo menos aproximadamente 100 mg/ml, por lo menos aproximadamente 110 mg/ml, por lo menos aproximadamente 120

5 mg/ml, por lo menos aproximadamente 130 mg/ml, por lo menos aproximadamente 140 mg/ml, por lo menos aproximadamente 150 mg/ml, por lo menos aproximadamente 160 mg/ml, por lo menos aproximadamente 170 mg/ml, por lo menos aproximadamente 180 mg/ml, por lo menos aproximadamente 190 mg/ml, por lo menos aproximadamente 200 mg/ml, por lo menos aproximadamente 250 mg/ml, o por lo menos aproximadamente 300

10 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos aproximadamente 5 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos aproximadamente 10 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos aproximadamente 15 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos aproximadamente

15 100 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos aproximadamente 125 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos aproximadamente 130 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos aproximadamente 150 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos aproximadamente

20 90 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En otra realización, una formulación de la divulgación comprende entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml, entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml, entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 25 mg/ml, entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml, entre aproximadamente 25 mg/ml y aproximadamente

25 200 mg/ml, entre aproximadamente 50 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml, entre aproximadamente 75 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml, entre aproximadamente 100 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml, entre aproximadamente 125 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml, entre aproximadamente 150 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml, entre aproximadamente 25 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml, entre aproximadamente 50 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml, entre aproximadamente 75 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml, entre aproximadamente 100 mg/ml y aproximadamente 125 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml, entre aproximadamente 100 mg/ml y aproximadamente 125 mg/ml, entre aproximadamente 125 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml y aproximadamente 125 mg/ml, entre aproximadamente 25 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, entre aproximadamente 50 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, entre

30 aproximadamente 75 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, entre aproximadamente 25 mg/ml y aproximadamente 75 mg/ml, entre aproximadamente 50 mg/ml y aproximadamente 75 mg/ml, o entre aproximadamente 25 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende entre aproximadamente 90 mg/ml y aproximadamente 110 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende entre aproximadamente 100 mg/ml y aproximadamente 210 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización adicional, una formulación descrita en este documento comprende aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml,

45 aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 110 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 130 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 170 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, o aproximadamente 300

50 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 5 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 10 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 15 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 100 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 125 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 130 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 150 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 200 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

65

- En una realización, una formulación de la divulgación comprende por lo menos 1 mg/ml, por lo menos 5 mg/ml, por lo menos 10 mg/ml, por lo menos 20 mg/ml, por lo menos 30 mg/ml, por lo menos 40 mg/ml, por lo menos 50 mg/ml, por lo menos 60 mg/ml, por lo menos 70 mg/ml, por lo menos 80 mg/ml, por lo menos 90 mg/ml, por lo menos 100 mg/ml, por lo menos 110 mg/ml, por lo menos 120 mg/ml, por lo menos 130 mg/ml, por lo menos 140 mg/ml, por lo menos 150 mg/ml, por lo menos 160 mg/ml, por lo menos 170 mg/ml, por lo menos 180 mg/ml, por lo menos 190 mg/ml, por lo menos 200 mg/ml, por lo menos 250 mg/ml, o por lo menos 300 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos 5 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos 10 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos 15 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos 100 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos 125 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos 150 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos 175 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos 200 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En otra realización, una formulación de la divulgación comprende entre 1 mg/ml y 20 mg/ml, entre 5 mg/ml y 20 mg/ml, entre 1 mg/ml y 25 mg/ml, entre 1 mg/ml y 200 mg/ml, entre 25 mg/ml y 200 mg/ml, entre 50 mg/ml y 200 mg/ml, entre 75 mg/ml y 200 mg/ml, entre 100 mg/ml y 200 mg/ml, entre 125 mg/ml y 200 mg/ml, entre 150 mg/ml y 200 mg/ml, entre 25 mg/ml y 150 mg/ml, entre 50 mg/ml y 150 mg/ml, entre 75 mg/ml y 150 mg/ml, entre 100 mg/ml y 150 mg/ml, entre 125 mg/ml y 150 mg/ml, entre 25 mg/ml y 100 mg/ml, entre 50 mg/ml y 100 mg/ml, entre 75 mg/ml y 100 mg/ml, entre 25 mg/ml y 75 mg/ml, entre 50 mg/ml y 75 mg/ml, o entre 25 mg/ml y 50 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende entre 5 mg/ml y 20 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende entre 90 mg/ml y 110 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende entre 100 mg/ml y 210 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización adicional, una formulación descrita en este documento comprende 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 110 mg/ml, 120 mg/ml, 130 mg/ml, 140 mg/ml, 150 mg/ml, 160 mg/ml, 170 mg/ml, 180 mg/ml, 190 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml, o 300 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende 10 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende 100 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende 125 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende 150 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende 175 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende 200 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.
- Opcionalmente, las formulaciones de la divulgación pueden comprender adicionalmente excipientes y/o aditivos comunes tales como agentes de tamponamiento, sacáridos, sales y surfactantes. Adicional o alternativamente, las formulaciones de la divulgación pueden comprender además excipientes y/o aditivos comunes, tales como, pero no limitados a, solubilizantes, diluyentes, aglutinantes, estabilizantes, sales, solventes lipófilos, aminoácidos, quelantes, conservantes o similares.
- En ciertas realizaciones, el agente de tamponamiento se selecciona del grupo que consiste en histidina, citrato, fosfato, glicina y acetato. En otras realizaciones, el excipiente de sacárido se selecciona del grupo que consiste en trehalosa, sacarosa, manitol, maltosa y rafinosa. En aún otras realizaciones, el surfactante se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 80 y Pluronic F68. En otras realizaciones más, la sal se selecciona del grupo que consiste en NaCl, KCl, MgCl₂ y CaCl₂.
- Opcionalmente, las formulaciones de la divulgación pueden comprender adicionalmente otros componentes auxiliares comunes, tales como, pero no limitados a, excipientes adecuados, polioles, solubilizantes, diluyentes, aglutinantes, estabilizantes, disolventes lipófilos, quelantes, conservantes o similares.
- Las formulaciones de la divulgación incluyen un agente de tamponamiento o ajuste de pH para proporcionar un control de pH mejorado. En una realización, una formulación de la divulgación tiene un pH de entre aproximadamente 3.0 y aproximadamente 9.0, entre aproximadamente 4.0 y aproximadamente 8.0, entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 8.0, entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0, entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 6.5, entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 8.0, entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 7.0, o entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 6.5. En una

realización adicional, una formulación de la divulgación tiene un pH de aproximadamente 3.0, aproximadamente 3.5, aproximadamente 4.0, aproximadamente 4.5, aproximadamente 5.0, aproximadamente 5.1, aproximadamente 5.2, aproximadamente 5.3, aproximadamente 5.4, aproximadamente 5.5, aproximadamente 5.6, aproximadamente 5.7, aproximadamente 5.8, aproximadamente 5.9, aproximadamente 6.0, aproximadamente 6.1, aproximadamente 6.2, aproximadamente 6.3, aproximadamente 6.4, aproximadamente 6.5, aproximadamente 6.6, aproximadamente 6.7, aproximadamente 6.8, aproximadamente 6.9, aproximadamente 7.0, aproximadamente 7.5, aproximadamente 8.0, aproximadamente 8.5, o aproximadamente 9.0. En una realización específica, una formulación de la divulgación tiene un pH de aproximadamente 6.0.

Las formulaciones de la divulgación incluyen un agente de tamponamiento o que ajusta el pH para proporcionar control de pH mejorado. En una realización, una formulación de la divulgación tiene un pH de entre 3.0 y 9.0, entre 4.0 y 8.0, entre 5.0 y 8.0, entre 5.0 y 7.0, entre 5.0 y 6.5, entre 5.5 y 8.0, entre 5.5 y 7.0, o entre 5.5 y 6.5. En una realización adicional, una formulación de la divulgación tiene un pH de 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, o 9.0. En una realización específica, una formulación de la divulgación tiene un pH de 6.0.

El pH de la formulación en general, no debe ser igual al punto isoeléctrico del anticuerpo particular (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) para ser utilizado en la formulación (por ejemplo, pero no se limita a, el punto isoeléctrico del anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar) y puede variar de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 8.0, o puede variar de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 6.5.

Normalmente, el agente de tamponamiento es una sal preparada a partir de un ácido o base orgánico o inorgánico. Los agentes de tamponamiento representativos incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos orgánicos, como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico: Tris, clorhidrato de trometamina o tampones de fosfato. Adicionalmente, los componentes de aminoácidos también pueden funcionar en una capacidad de tamponamiento. Los componentes de aminoácidos representativos que se pueden utilizar en las formulaciones de la divulgación como agentes de tamponamiento incluyen, pero no se limitan a, glicina e histidina. En ciertas realizaciones, el agente de tamponamiento se selecciona del grupo que consiste en histidina, citrato, fosfato, glicina y acetato. En una realización específica, el agente de tamponamiento es histidina. En otra realización específica, el agente de tamponamiento es citrato. La pureza del agente de tamponamiento debe ser por lo menos del 98%, o por lo menos el 99%, o por lo menos el 99.5%. Como se utiliza en este documento, el término "pureza" en el contexto de la histidina se refiere a la pureza química de la histidina como se entiende en la técnica, por ejemplo, cómo se describe en The Merck Index, 13ª edición, O'Neil et al. ed. (Merck & Co., 2001).

Los agentes de tamponamiento se utilizan normalmente en concentraciones entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 200 mM o cualquier rango o valor en ellos, dependiendo de la fuerza iónica deseada y la capacidad de tamponamiento requerida. Las concentraciones habituales de los agentes de tamponamiento convencionales empleados en las formulaciones parenterales se pueden encontrar en: Pharmaceutical Dosage Form: Parenteral Medications, Volumen 1, 2nd Edition, Capítulo 5, p. 194, De Luca and Boylan, "Formulation of Small Volume Parenterals", Tabla 5: Aditivos comúnmente utilizados en Productos Parenterales. En una realización, el agente de tamponamiento está a una concentración de aproximadamente 1 mM, o de aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 10 mM, o de aproximadamente 15 mM, o de aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 25 mM, o de aproximadamente 30 mM, o de aproximadamente 35 mM, o de aproximadamente 40 mM, o de aproximadamente 45 mM, o de aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 60 mM, o de aproximadamente 70 mM, o de aproximadamente 80 mM, o de aproximadamente 90 mM, o de aproximadamente 100 mM. En una realización, el agente de tamponamiento está a una concentración de 1 mM, o de 5 mM, o de 10 mM, o de 15 mM, o de 20 mM, o de 25 mM, o de 30 mM, o de 35 mM, o de 40 mM, o de 45 mM, o de 50 mM, o de 60 mM, o de 70 mM, o de 80 mM, o de 90 mM, o de 100 mM. En una realización específica, el agente de tamponamiento está a una concentración de entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización específica, el agente de tamponamiento está a una concentración de entre 5 mM y 20 mM.

Los agentes de tamponamiento se utilizan normalmente en concentraciones entre 1 mM y 200 mM o en cualquier rango o valor de los mismos, dependiendo de la fuerza iónica deseada y la capacidad de tamponamiento requerida. Las concentraciones habituales de los agentes de tamponamiento convencionales empleados en las formulaciones parenterales se pueden encontrar en: Pharmaceutical Dosage Form: Parenteral Medications, Volume 1, 2nd Edition, Capítulo 5, p. 194, De Luca and Boylan, "Formulation of Small Volume Parenterals", Tabla 5: Aditivos comúnmente utilizados en Productos Parenterales. En una realización, el agente de tamponamiento está a una concentración de 1 mM, o de 5 mM, o de 10 mM, o de 15 mM, o de 20 mM, o de 25 mM, o de 30 mM, o de 35 mM, o de 40 mM, o de 45 mM, o de 50 mM, o de 60 mM, o de 70 mM, o de 80 mM, o de 90 mM, o de 100 mM. En una realización, el agente de tamponamiento está a una concentración de 1 mM, o de 5 mM, o de 10 mM, o de 15 mM, o de 20 mM, o de 25 mM, o de 30 mM, o de 35 mM, o de 40 mM, o de 45 mM, o de 50 mM, o de 60 mM, o de 70 mM, o de 80 mM, o de 90 mM, o de 100 mM. En una realización específica, el agente de tamponamiento está a una concentración de

entre 5 mM y 50 mM. En otra realización específica, el agente de tamponamiento está a una concentración de entre 5 mM y 20 mM.

En ciertas realizaciones, una formulación de la divulgación comprende un agente de tamponamiento. En una realización, dicho agente de tamponamiento se selecciona del grupo que consiste de histidina, citrato, fosfato, glicina, y acetato. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende histidina como un agente de tamponamiento.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende por lo menos aproximadamente 1 mM, por lo menos aproximadamente 5 mM, por lo menos aproximadamente 10 mM, por lo menos aproximadamente 20 mM, por lo menos aproximadamente 30 mM, por lo menos aproximadamente 40 mM, por lo menos aproximadamente 50 mM, por lo menos aproximadamente 75 mM, por lo menos aproximadamente 100 mM, por lo menos aproximadamente 150 mM, o por lo menos aproximadamente 200 mM de histidina. En otra realización, una formulación de la divulgación comprende entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 200 mM, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 150 mM, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 75 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 200 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 150 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 75 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 40 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 30 mM, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 200 mM, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 150 mM, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 75 mM, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 50 mM, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 40 mM, o entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 30 mM de histidina. En una realización adicional de la divulgación comprende aproximadamente 1 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 150 mM, o aproximadamente 200 mM de histidina. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 10 mM de histidina.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende por lo menos 1 mM, por lo menos 5 mM, por lo menos 10 mM, por lo menos 20 mM, por lo menos 30 mM, por lo menos 40 mM, por lo menos 50 mM, por lo menos 75 mM, por lo menos 100 mM, por lo menos 150 mM, o por lo menos 200 mM de histidina. En otra realización, una formulación de la divulgación comprende entre 1 mM y 200 mM, entre 1 mM y 150 mM, entre 1 mM y 100 mM, entre 1 mM y 75 mM, entre 10 mM y 200 mM, entre 10 mM y 150 mM, entre 10 mM y 100 mM, entre 10 mM y 75 mM, entre 10 mM y 50 mM, entre 10 mM y 40 mM, entre 10 mM y 30 mM, entre 20 mM y 75 mM, entre 20 mM y 50 mM, entre 20 mM y 40 mM, o entre 20 mM y 30 mM de histidina. En una realización adicional de la divulgación comprende 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 150 mM, o 200 mM de histidina. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende 10 mM de histidina.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de la divulgación comprenden un excipiente de carbohidrato. Los excipientes de carbohidrato pueden actuar, por ejemplo, como agentes potenciadores de viscosidad, estabilizantes, agentes de carga, agentes solubilizantes, y/o similares. Los excipientes de carbohidrato en general están presentes entre aproximadamente 1% y aproximadamente 99% en peso o volumen. En una realización, el excipiente de carbohidrato está presente entre aproximadamente 0.1% y aproximadamente 20%. En otra realización, el excipiente de carbohidrato está presente entre aproximadamente 0.1% y aproximadamente 15%. En una realización específica, el excipiente de carbohidrato está presente entre aproximadamente 0.1% y aproximadamente 5%, o entre aproximadamente 1% y aproximadamente 20%, o entre aproximadamente 5% y aproximadamente 15%, o entre aproximadamente 8% y aproximadamente 10%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 15%, o entre aproximadamente 15% y aproximadamente 20%. En otra realización específica, el excipiente de carbohidrato está presente entre 0.1% y 20%, o entre 5% y 15%, o entre 8% y 10%, o entre 10% y 15%, o entre 15% y 20%. En aún otra realización específica, el excipiente de carbohidrato está presente entre aproximadamente 0.1% y aproximadamente 5%. En aún otra realización específica, el excipiente de carbohidrato está presente entre aproximadamente 5% y aproximadamente 10%. En todavía otra realización específica, el excipiente de carbohidrato está presente entre aproximadamente 15% y aproximadamente 20%. En aún otras realizaciones específicas, el excipiente de carbohidrato está presente en 1%, o en 1.5%, o en 2%, o en 2.5%, o a 3%, o en 4%, o en 5%, o a 10%, o en 15%, o en 20%.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de la divulgación comprenden un excipiente de carbohidrato. Los excipientes de carbohidrato pueden actuar, por ejemplo, como agentes potenciadores de viscosidad, estabilizantes, agentes de carga, agentes solubilizantes, y/o similares. Los excipientes de carbohidrato en general están presentes entre 1% y 99% en peso o volumen. En una realización, el excipiente de carbohidrato está presente entre 0.1% y 20%. En otra realización, el excipiente de carbohidrato está presente entre 0.1% y 15%. En una realización específica, el excipiente de carbohidrato está presente entre 0.1% y 5%, o entre 1% y 20%, o entre 5% y 15%, o entre 8% y 10%, o entre 10% y 15%, o entre 15% y 20%. En otra realización específica, el excipiente de carbohidrato está presente entre 0.1% y 20%, o entre 5% y 15%, o entre 8% y 10%, o entre 10% y 15%, o entre 15% y 20%. En aún otra realización específica, el excipiente de carbohidrato está presente entre 0.1% y 5%. En aún otra

realización específica, el excipiente de carbohidrato está presente entre 5% y 10%. En todavía otra realización específica, el excipiente de carbohidrato está presente entre 15% y 20%. En aún otras realizaciones específicas, el excipiente de carbohidrato está presente en 1%, o en 1.5%, o en 2%, o en 2.5%, o en 3%, o en 4%, o en 5%, o a 10%, o en 15%, o en 20%.

- 5 Los excipientes de carbohidrato adecuados para uso en las formulaciones de la divulgación incluyen, por ejemplo, monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-mannosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones, y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y similares. En una realización, los excipientes de carbohidrato para uso en la presente divulgación se
- 10 seleccionan del grupo que consiste de, sacarosa, trehalosa, lactosa, manitol, y rafinosa. En una realización específica, el excipiente de carbohidrato es trehalosa. En otra realización específica, el excipiente de carbohidrato es manitol. En todavía otra realización específica, el excipiente de carbohidrato es sacarosa. En aún otra realización específica, el excipiente de carbohidrato es rafinosa. La pureza del excipiente de carbohidrato debe ser por lo menos 98%, o por lo menos 99%, o por lo menos 99.5%.
- 15 En una realización, una formulación de la divulgación comprende por lo menos aproximadamente 1%, por lo menos aproximadamente 2%, por lo menos aproximadamente 4%, por lo menos aproximadamente 8%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, o por lo menos aproximadamente 40% de trehalosa. En otra realización, una formulación de la divulgación comprende entre aproximadamente 1% y aproximadamente 40%, entre aproximadamente 1% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 1% y aproximadamente 20%,
- 20 entre aproximadamente 2% y aproximadamente 40%, entre aproximadamente 2% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 2% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 4% y aproximadamente 40%, entre aproximadamente 4% y aproximadamente 30%, o entre aproximadamente 4% y aproximadamente 20% de trehalosa. En una realización adicional, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 4%, aproximadamente 8%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, o aproximadamente 40% de trehalosa. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 4% de trehalosa.
- 25 En una realización, una formulación de la divulgación comprende por lo menos 1%, por lo menos 2%, por lo menos 4%, por lo menos 8%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, o por lo menos 40% de trehalosa. En otra realización, una formulación de la divulgación comprende entre 1% y 40%, entre 1% y 30%, entre 1% y 20%, entre 2% y 40%, entre 2% y 30%, entre 2% y 20%, entre 4% y 40%, entre 4% y 30%, o entre 4% y 20% de trehalosa. En una realización adicional, una formulación de la divulgación comprende 1%, 2%, 4%, 8%, 20%, 30%, o 40% de trehalosa. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende 4% de trehalosa.
- 30 En una realización, una formulación de la divulgación comprende un excipiente. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende por lo menos un excipiente seleccionado del grupo que consiste de: azúcar, sal, surfactante, aminoácido, poliol, agente quelante, emulsionante y conservante. En una realización, una formulación de la divulgación comprende una sal. En una realización, una formulación de la divulgación comprende una sal seleccionada del grupo que consiste de: NaCl, KCl, CaCl₂, y MgCl₂. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende NaCl.
- 35 En una realización, una formulación de la divulgación comprende por lo menos aproximadamente 10 mM, por lo menos aproximadamente 25 mM, por lo menos aproximadamente 50 mM, por lo menos aproximadamente 75 mM, por lo menos aproximadamente 80 mM, por lo menos aproximadamente 100 mM, por lo menos aproximadamente 125 mM, por lo menos aproximadamente 150 mM, por lo menos aproximadamente 175 mM, por lo menos aproximadamente 200 mM, o por lo menos aproximadamente 300 mM de cloruro de sodio. En una realización adicional, una formulación descrita en este documento comprende entre aproximadamente 10 mM y
- 40 aproximadamente 300 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 200 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 175 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 150 mM, entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 300 mM, entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 200 mM, entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 175 mM, entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 150 mM, entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 300 mM, entre aproximadamente 50 mM y
- 45 aproximadamente 200 mM, entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 175 mM, entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 150 mM, entre aproximadamente 75 mM y aproximadamente 300 mM, entre aproximadamente 75 mM y aproximadamente 200 mM, entre aproximadamente 75 mM y aproximadamente 175 mM, entre aproximadamente 75 mM y aproximadamente 150 mM, entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 300 mM, entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 200 mM, entre aproximadamente 100 mM y
- 50 aproximadamente 175 mM, o entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 150 mM de cloruro de sodio. En una realización adicional, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 10 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 125 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 175 mM, aproximadamente 200 mM, o aproximadamente 300 mM de cloruro de sodio. En una realización específica, una formulación de la divulgación
- 55 comprende 80 mM de cloruro de sodio.
- 60

En una realización, una formulación de la divulgación comprende por lo menos 10 mM, por lo menos 25 mM, por lo menos 50 mM, por lo menos 75 mM, por lo menos 80 mM, por lo menos 100 mM, por lo menos 125 mM, por lo menos 150 mM, por lo menos 175 mM, por lo menos 200 mM, o por lo menos 300 mM de cloruro de sodio. En una realización adicional, una formulación descrita en este documento comprende entre 10 mM y 300 mM, entre 10 mM y 200 mM, entre 10 mM y 175 mM, entre 10 mM y 150 mM, entre 25 mM y 300 mM, entre 25 mM y 200 mM, entre 25 mM y 175 mM, entre 25 mM y 150 mM, entre 50 mM y 300 mM, entre 50 mM y 200 mM, entre 50 mM y 175 mM, entre 50 mM y 150 mM, entre 75 mM y 300 mM, entre 75 mM y 200 mM, entre 75 mM y 175 mM, entre 75 mM y 150 mM, entre 100 mM y 300 mM, entre 100 mM y 200 mM, entre 100 mM y 175 mM, o entre 100 mM y 150 mM de cloruro de sodio. En una realización adicional, una formulación de la divulgación comprende 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 80 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM, 175 mM, 200 mM, o 300 mM de cloruro de sodio. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende 80 mM de cloruro de sodio.

Las formulaciones de la divulgación pueden comprender adicionalmente un surfactante. El término "surfactante" como se utiliza en el presente documento se refiere a sustancias orgánicas que tienen estructuras anfipáticas, a saber, están compuestas de grupos de tendencias de solubilidad opuestas, normalmente una cadena de hidrocarburo soluble en aceite y un grupo iónico soluble en agua. Los surfactantes se pueden clasificar, dependiendo de la carga de la fracción surfactante, en surfactantes aniónicos, catiónicos y no iónicos. Los surfactantes se utilizan a menudo como agentes humectantes, emulsionantes, solubilizantes y dispersantes para diversas composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos. Los surfactantes farmacéuticamente aceptables como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20 u 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Tritón; octilglicósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaina; lauril, miristil, linoleil o estearil-sarcosina; linoleil, miristil o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropil); miristamidopropil, palmidopropil o isoestramidilpropil-dimetilamina; metil cocoil o disil metil oleil taurato de sodio y la serie MONAQUA™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), polietilenglicol, polipropilglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, Pluronic, PF68, etc.), se pueden agregar opcionalmente a las formulaciones de la divulgación para reducir la agregación. Los surfactantes son particularmente útiles si se utiliza una bomba o un recipiente de plástico para administrar la formulación. La presencia de un surfactante farmacéuticamente aceptable mitiga la propensión a que se agregue la proteína. En una realización específica, las formulaciones de la divulgación comprenden un polisorbato que está a una concentración que varía desde entre aproximadamente 0.001% a aproximadamente 1%, o aproximadamente 0.001% a aproximadamente 0.1%, o aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.1%. En otras realizaciones específicas, las formulaciones de la divulgación comprenden un polisorbato que está a una concentración de 0.001%, o 0.002%, o 0.003%, o 0.004%, o 0.005%, o 0.006%, o 0.007%, o 0.008%, o 0.009%, o 0.01%, o 0.015%, o 0.02%. En otra realización específica, el polisorbato es polisorbato-80. En una realización específica, las formulaciones de la divulgación comprenden un polisorbato que está a una concentración que varía desde entre 0.001% y 1%, o 0.001% y 0.1%, o 0.01% y 0.1%. En otras realizaciones específicas, las formulaciones de la divulgación comprenden un polisorbato que está a una concentración de 0.001%, o 0.002%, o 0.003%, o 0.004%, o 0.005%, o 0.006%, o 0.007%, o 0.008%, o 0.009%, o 0.01%, o 0.015%, o 0.02%. En otra realización específica, el polisorbato es polisorbato-80.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un surfactante. En una realización, una formulación de la divulgación comprende Polisorbato 20, Polisorbato 40, Polisorbato 60, o Polisorbato 80. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende Polisorbato 80.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende por lo menos aproximadamente 0.001%, por lo menos aproximadamente 0.002%, por lo menos aproximadamente 0.005%, por lo menos aproximadamente 0.01%, por lo menos aproximadamente 0.02%, por lo menos aproximadamente 0.05%, por lo menos aproximadamente 0.1%, por lo menos aproximadamente 0.2%, o por lo menos aproximadamente 0.5% de Polisorbato 80. En otra realización, una formulación de la divulgación comprende entre aproximadamente 0.001% y aproximadamente 0.5%, entre aproximadamente 0.001% y aproximadamente 0.2%, entre aproximadamente 0.001% y aproximadamente 0.1%, entre aproximadamente 0.001% y aproximadamente 0.05%, entre aproximadamente 0.002% y aproximadamente 0.5%, entre aproximadamente 0.002% y aproximadamente 0.2%, entre aproximadamente 0.002% y aproximadamente 0.1%, entre aproximadamente 0.002% y aproximadamente 0.05%, entre aproximadamente 0.005% y aproximadamente 0.5%, entre aproximadamente 0.005% y aproximadamente 0.2%, entre aproximadamente 0.005% y aproximadamente 0.1%, entre aproximadamente 0.005% y aproximadamente 0.05%, entre aproximadamente 0.01% y aproximadamente 0.5%, entre aproximadamente 0.01% y aproximadamente 0.2%, entre aproximadamente 0.01% y aproximadamente 0.1%, o entre aproximadamente 0.01% y aproximadamente 0.05% de Polisorbato 80. En una realización adicional, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 0.001%, aproximadamente 0.002%, aproximadamente 0.005%, aproximadamente 0.01%, aproximadamente 0.02%, aproximadamente 0.05%, aproximadamente 0.1%, aproximadamente 0.2%, y aproximadamente 0.5% de Polisorbato 80. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 0.02% de polisorbato 80. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 0.04% de Polisorbato 80. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 0.05% de Polisorbato 80.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende por lo menos 0.001%, por lo menos 0.002%, por lo menos 0.005%, por lo menos 0.01%, por lo menos 0.02%, por lo menos 0.05%, por lo menos 0.1%, por lo menos

- 0.2%, o por lo menos 0.5% de Polisorbato 80. En otra realización, una formulación de la divulgación comprende entre 0.001% y 0.5%, entre 0.001% y 0.2%, entre 0.001% y 0.1%, entre 0.001% y 0.05%, entre 0.002% y 0.5%, entre 0.002% y 0.2%, entre 0.002% y 0.1%, entre 0.002% y 0.05%, entre 0.005% y 0.5%, entre 0.005% y 0.2%, entre 0.005% y 0.1%, entre 0.005% y 0.05%, entre 0.01% y 0.5%, entre 0.01% y 0.2%, entre 0.01% y 0.1%, o entre 0.01% y 0.05% de Polisorbato 80. En una realización adicional, una formulación de la divulgación comprende 0.001%, 0.002%, 0.005%, 0.01%, 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, y 0.5% de Polisorbato 80. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende 0.02% de polisorbato 80. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende 0.04% de Polisorbato 80. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende 0.05% de Polisorbato 80.
- Opcionalmente, las formulaciones de la divulgación pueden comprender adicionalmente otros excipientes y/o aditivos comunes que incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, aglutinantes, estabilizantes, solventes lipófilos, conservantes, adyuvantes o similares. Se pueden utilizar excipientes y/o aditivos farmacéuticamente aceptables en las formulaciones de la divulgación. Los excipientes/aditivos comúnmente utilizados, tales como los quelantes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, pero no limitados a, EDTA, DTPA o EGTA) pueden agregarse opcionalmente a las formulaciones de la divulgación para reducir la agregación. Estos aditivos son particularmente útiles si se utiliza una bomba o recipiente de plástico para administrar la formulación.
- Conservantes, tales como fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, nitrito fenilmercúrico, fenoxietanol, formaldehído, clorobutanol, cloruro de magnesio (por ejemplo, pero no limitado a, hexahidrato), alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de bentalquonio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos pueden agregarse opcionalmente a las formulaciones de la divulgación a cualquier concentración adecuada, tal como entre aproximadamente 0.001% y aproximadamente 5%, o cualquier rango o valor en el mismo. La concentración de conservante utilizada en las formulaciones de la divulgación es una concentración suficiente para producir un efecto antimicrobiano. Dichas concentraciones dependen del conservante seleccionado y las determina fácilmente el experto en la materia.
- Otros excipientes/aditivos contemplados, que se pueden utilizar en las formulaciones de la divulgación incluyen, por ejemplo, agentes aromatizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antióxidantes, agentes antiestáticos, lípidos tales como fosfolípidos o ácidos grasos, esteroides tales como colesterol, excipientes de proteínas tales como albúmina sérica (albúmina sérica humana (HSA), albúmina humana recombinante (rHA)), gelatina, caseína, contraiones formadores de sales como el sodio y similares. Estos y otros excipientes farmacéuticos conocidos y/o aditivos adecuados para utilizar en las formulaciones de la divulgación son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se indica en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 21 edición, Lippincott Williams. & Wilkins, (2005), y en "Physician's Desk Reference", 60ª edición, Medical Economics, Montvale, NJ (2005). Se puede seleccionar portadores farmacéuticamente aceptables de manera rutinaria que sean adecuados para el modo de administración, solubilidad y/o estabilidad de la proteína variante de Fc como es bien conocido en la técnica o como se describe en este documento.
- Los expertos en la técnica entenderán que las formulaciones de la divulgación pueden ser isotónicas con la sangre humana, es decir, las formulaciones de la divulgación tienen esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Dichas formulaciones isotónicas en general tendrán una presión osmótica de aproximadamente 250 mOSm a aproximadamente 350 mOSm. La isotonicidad se puede medir, por ejemplo, utilizando un osmómetro de presión de vapor o de congelación de hielo. La tonicidad de una formulación se ajusta mediante el uso de modificadores de tonicidad. Los "modificadores de tonicidad" son aquellas sustancias inertes farmacéuticamente aceptables que se pueden agregar a la formulación para proporcionar una isotonicidad de la formulación. Los modificadores de tonicidad adecuados para esta divulgación incluyen, pero no se limitan a, sacáridos, sales y aminoácidos.
- En ciertas realizaciones, las formulaciones de la presente divulgación tienen una presión osmótica desde aproximadamente 100 mOSm a aproximadamente 1200 mOSm, o desde aproximadamente 200 mOSm a aproximadamente 1000 mOSm, o desde aproximadamente 200 mOSm a aproximadamente 800 mOSm, o desde aproximadamente 200 mOSm a aproximadamente 600 mOSm, o desde aproximadamente 250 mOSm a aproximadamente 500 mOSm, o desde aproximadamente 250 mOSm a aproximadamente 400 mOSm, o desde aproximadamente 250 mOSm a aproximadamente 350 mOSm.
- En ciertas realizaciones, las formulaciones de la presente divulgación tienen una presión osmótica desde 100 mOSm a 1200 mOSm, o desde 200 mOSm a 1000 mOSm, o desde 200 mOSm a 800 mOSm, o desde 200 mOSm a 600 mOSm, o desde 250 mOSm a 500 mOSm, o desde 250 mOSm a 400 mOSm, o desde 250 mOSm a 350 mOSm.
- La concentración de cualquiera o cualquier combinación de varios componentes de las formulaciones de la divulgación se ajusta para lograr la tonicidad deseada de la formulación final. Por ejemplo, la relación del excipiente de carbohidrato con respecto al anticuerpo se puede ajustar de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 6,685,940). En ciertas realizaciones, la relación molar del excipiente de carbohidrato a anticuerpo puede ser desde aproximadamente 100 moles a aproximadamente 1000 moles de excipiente de carbohidrato a aproximadamente 1 mol de anticuerpo, o desde aproximadamente 200 moles a aproximadamente 6000 moles de excipiente de carbohidrato a aproximadamente 1 mol de anticuerpo, o desde aproximadamente 100 moles a aproximadamente 510 moles de excipiente de carbohidrato a aproximadamente 1

mol de anticuerpo, o desde aproximadamente 100 moles a aproximadamente 600 moles de excipiente de carbohidrato a aproximadamente 1 mol de anticuerpo.

La concentración de cualquiera o cualquier combinación de varios componentes de las formulaciones de la divulgación se ajusta para lograr la tonicidad deseada de la formulación final. Por ejemplo, la relación del excipiente de carbohidrato con respecto al anticuerpo se puede ajustar de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 6,685,940). En ciertas realizaciones, la relación molar del excipiente de carbohidrato a anticuerpo puede ser desde 100 moles a 1000 moles de excipiente de carbohidrato a 1 mol de anticuerpo, o desde 200 moles a 6000 moles de excipiente de carbohidrato a 1 mol de anticuerpo, o desde 100 moles a 510 moles de excipiente de carbohidrato a 1 mol de anticuerpo, o desde 100 moles a 600 moles de excipiente de carbohidrato a 1 mol de anticuerpo.

La isotonicidad deseada de la formulación final también se puede lograr al ajustar la concentración de sal de las formulaciones. Las sales que son farmacéuticamente aceptables y adecuadas para esta descripción como modificadores de tonicidad incluyen, pero no se limitan a, cloruro de sodio, succinato de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio y cloruro de calcio. En realizaciones específicas, las formulaciones de las descripciones comprenden NaCl, MgCl₂ y/o CaCl₂. En una realización, la concentración de NaCl está entre aproximadamente 75 mM y aproximadamente 150 mM. En otra realización, la concentración de MgCl₂ está entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM. Los aminoácidos que son farmacéuticamente aceptables y adecuados para esta descripción como modificadores de tonicidad incluyen, pero no se limitan a, prolina, alanina, L-arginina, asparagina, ácido L-aspartico, glicina, serina, lisina e histidina.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende histidina, cloruro de sodio, trehalosa, y Polisorbato 80. En una realización, una formulación de la divulgación comprende cloruro de sodio, trehalosa, y Polisorbato 80. En una realización, una formulación de la divulgación comprende histidina, trehalosa, y Polisorbato 80. En una realización, una formulación de la divulgación comprende histidina, cloruro de sodio, y Polisorbato 80. En una realización, una formulación de la divulgación comprende histidina, cloruro de sodio, y trehalosa. En una realización, una formulación de la divulgación comprende histidina y cloruro de sodio. En una realización, una formulación de la divulgación comprende histidina y trehalosa. En una realización, una formulación de la divulgación comprende histidina y Polisorbato 80. En una realización, una formulación de la divulgación comprende cloruro de sodio y trehalosa. En una realización, una formulación de la divulgación comprende cloruro de sodio y Polisorbato 80. En una realización, una formulación de la divulgación comprende trehalosa, y Polisorbato 80.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende histidina, cloruro de sodio, trehalosa y Polisorbato 80. En una realización, una formulación de la divulgación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de histidina, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 300 mM de cloruro de sodio, entre aproximadamente 0.3% y aproximadamente 10% de trehalosa, y entre aproximadamente 0.005% y aproximadamente 0.1% de Polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0. En otra realización, una formulación de la divulgación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM de histidina, entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 200 mM de cloruro de sodio, entre aproximadamente 1% y aproximadamente 8% de trehalosa, y entre aproximadamente 0.01% y aproximadamente 0.05% de Polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 6.5. En una realización adicional, una formulación de la divulgación comprende aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 80 mM de cloruro de sodio, aproximadamente 4% de trehalosa y aproximadamente 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende histidina, cloruro de sodio, trehalosa y Polisorbato 80. En una realización, una formulación de la divulgación comprende entre 5 mM y 100 mM de histidina, entre 10 mM y 300 mM de cloruro de sodio, entre 1% y 10% de trehalosa, y entre 0.005% y 0.1% de Polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de entre 5.0 y 7.0. En otra realización, una formulación de la divulgación comprende entre 5 mM y 50 mM de histidina, entre 50 mM y 200 mM de cloruro de sodio, entre 1% y 6% de trehalosa, y entre 0.01% y 0.05% de Polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de entre 5.5 y 6.5. En una realización adicional, una formulación de la divulgación comprende 10 mM de histidina, 80 mM de cloruro de sodio, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de 6.0.

En una realización, una formulación de la divulgación consiste de entre aproximadamente 20 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 80 mM de cloruro de sodio, aproximadamente 4% de trehalosa y aproximadamente 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0. En otra realización, una formulación de la divulgación consiste de aproximadamente 50 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 80 mM de cloruro de sodio, aproximadamente 4% de trehalosa y aproximadamente 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0. En una realización adicional, una formulación de la divulgación consiste de aproximadamente 100 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 80 mM de cloruro de sodio, aproximadamente 4% de trehalosa y aproximadamente 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0. En una realización adicional, una formulación de la divulgación consiste de aproximadamente 110 mg/ml de anticuerpo

anti-ICOS, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 80 mM de cloruro de sodio, aproximadamente 4% de trehalosa y aproximadamente 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0. En una realización adicional, una formulación de la divulgación consiste de aproximadamente 120 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 80 mM de cloruro de sodio, aproximadamente 4% de trehalosa y aproximadamente 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0. En una realización adicional, una formulación de la divulgación consiste de aproximadamente 130 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 80 mM de cloruro de sodio, aproximadamente 4% de trehalosa y aproximadamente 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación consiste de entre 20 mg/ml y 150 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, 10 mM de histidina, 80 mM de cloruro de sodio, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de 6.0. En otra realización, una formulación de la divulgación consiste de 50 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, 10 mM de histidina, 80 mM de cloruro de sodio, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de 6.0. En una realización adicional, una formulación de la divulgación consiste de 100 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, 10 mM de histidina, 80 mM de cloruro de sodio, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de 6.0. En una realización adicional, una formulación de la divulgación consiste de 110 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, 10 mM de histidina, 80 mM de cloruro de sodio, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de 6.0. En una realización adicional, una formulación de la divulgación consiste de 120 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, 10 mM de histidina, 80 mM de cloruro de sodio, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de 6.0. En una realización adicional, una formulación de la divulgación consiste de 130 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, 10 mM de histidina, 80 mM de cloruro de sodio, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de 6.0. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación consiste de entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 80 mM de cloruro de sodio, aproximadamente 4% de trehalosa y aproximadamente 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0. En otra realización, una formulación de la divulgación consiste de aproximadamente 5 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 80 mM de cloruro de sodio, aproximadamente 4% de trehalosa y aproximadamente 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0. En una realización adicional, una formulación de la divulgación consiste de aproximadamente 10 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 80 mM de cloruro de sodio, aproximadamente 4% de trehalosa y aproximadamente 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0. En una realización adicional, una formulación de la divulgación consiste de aproximadamente 15 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 80 mM de cloruro de sodio, aproximadamente 4% de trehalosa y aproximadamente 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcar ligadas a N-glicósido complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación consiste de entre 5 mg/ml y 20 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, 10 mM de histidina, 80 mM de cloruro de sodio, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de 6.0. En otra realización, una formulación de la divulgación consiste de 5 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, 10 mM de histidina, 80 mM de cloruro de sodio, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de 6.0. En una realización adicional, una formulación de la divulgación consiste de 10 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, 10 mM de histidina, 80 mM de cloruro de sodio, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de 6.0. En una realización adicional, una formulación de la divulgación consiste de 20 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS, 10 mM de histidina, 80 mM de cloruro de sodio, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80, en el que dicha formulación tiene un pH de 6.0. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, las formulaciones de la divulgación son formulaciones libres de pirógenos que están sustancialmente libres de endotoxinas y/o sustancias pirogénicas relacionadas. Las endotoxinas incluyen toxinas que están confinadas dentro de un microorganismo y se liberan solo cuando los microorganismos se descomponen

o mueren. Las sustancias pirógenas también incluyen sustancias termoestables, que inducen fiebre (glucoproteínas), procedentes de la membrana externa de las bacterias y otros microorganismos. Ambas sustancias pueden causar fiebre, hipotensión y choque si se administran un humanoos. Debido a los posibles efectos nocivos, incluso las cantidades bajas de endotoxinas deben eliminarse de las soluciones de medicamentos farmacéuticos administradas por vía intravenosa. La Administración de Alimentos y Fármacos ("FDA") ha establecido un límite superior de 5 unidades de endotoxinas (UE) por dosis por kilogramo de peso corporal en un solo período de una hora para aplicaciones de fármacos por vía intravenosa (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)). Cuando las proteínas terapéuticas se administran en cantidades de varios cientos o mil miligramos por kilogramo de peso corporal, como puede ser el caso de los anticuerpos, incluso deben eliminarse cantidades traza de endotoxinas dañinas y peligrosas. En ciertas realizaciones específicas, los niveles de endotoxinas y pirógenos en la composición son menores que 10 EU/mg, o menores que 5 EU/mg, o menores que 1 EU/mg, o menores que 0.1 EU/mg, o menores que 0.01 EU/mg, o menos de 0.001 EU/mg.

Cuando se utilizan para administración in vivo, las formulaciones de la divulgación deben ser estériles. Las formulaciones de la divulgación se pueden esterilizar mediante diversos métodos de esterilización, que incluyen filtración estéril, radiación, etc. En una realización, la formulación de anticuerpo se esteriliza por filtración con un filtro de 0.22 micrones preesterilizado. Las composiciones estériles para inyección pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional como se describe en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 21 ed., Lippincot Williams & Wilkins, (2005). Las formulaciones que comprenden anticuerpos, tales como aquellas divulgadas en el presente documento, normalmente se almacenarán en forma liofilizada o en solución. Se contempla que las composiciones estériles que comprenden anticuerpos se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o frasco que tiene un adaptador que permite la recuperación de la formulación, como un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica. En una realización, una composición de la divulgación se proporciona como una jeringa precargada.

5.2. Estabilidad de Formulaciones

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo o fragmento del mismo que es susceptible a agregación, fragmentación y/o desamidación.

En una realización, una formulación de la divulgación estabiliza un anticuerpo anti-ICOS. En una realización, una formulación de la divulgación evita la agregación de un anticuerpo anti-ICOS o fragmento del mismo. En otra realización, una formulación de la divulgación evita la fragmentación de un anticuerpo anti-ICOS o fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

Las presentes divulgaciones proporcionan formulaciones líquidas estables que comprenden anticuerpos anti-ICOS de la divulgación. La estabilidad de dicho anticuerpo se puede evaluar por grados de agregación, degradación o fragmentación, según lo medido por HPSEC, cromatografía de fase inversa, dispersión de luz estática (SLS), dispersión dinámica de luz (DLS), espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR), dicroísmo circular (CD), técnicas de despliegue de urea, fluorescencia intrínseca de triptófano, calorimetría diferencial de barrido y/o técnicas de unión a ANS, en comparación con una formulación de referencia que comprende un anticuerpo de referencia. Por ejemplo, una formulación de referencia puede ser un estándar de referencia congelado a -70°C que consiste en 10 mg/ml de un anticuerpo de referencia (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) (por ejemplo, pero no limitado a, el anticuerpo anti-ICOS 136 que comprende una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósido complejas en las que la fucosa no está unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor en la cadena de azúcar en 10 mM de histidina (pH 6.0) que contiene 80 mM de NaCl, 4% de trehalosa y 0.02% polisorbato 80, cuya formulación de referencia proporciona regularmente un solo pico de monómero (por ejemplo, ≥95% de área) por HPSEC. En ciertas realizaciones, una formulación de referencia es idéntica a la formulación cuya estabilidad se prueba; La formulación de referencia se puede almacenar congelada a -70°C durante las pruebas de estabilidad para conservar la formulación de referencia en su condición original. Por ejemplo, el estándar de referencia para evaluar cualquier pérdida de actividad de unión al antígeno ICOS en una formulación almacenada a 40°C puede ser la formulación idéntica almacenada a -70°C durante 30 días. La estabilidad general de una formulación que comprende un anticuerpo (que incluye el fragmento de anticuerpo del mismo) también se puede evaluar mediante diversos ensayos inmunológicos que incluyen, por ejemplo, ELISA y radioinmunoensayo utilizando moléculas de antígeno aisladas. Adicionalmente, la estabilidad de una formulación que comprende un anticuerpo también se puede evaluar utilizando diversos ensayos diseñados para medir una característica funcional del anticuerpo, por ejemplo, ensayos diseñados para medir la afinidad de unión a antígeno, actividad de ADCC in vitro, actividad de agotamiento in vivo, actividad de CDC in vitro.

En una realización, una formulación de la divulgación es estable luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante por lo menos aproximadamente 1 semana, por lo menos aproximadamente 2 semanas, por lo menos aproximadamente 3 semanas, o por lo menos aproximadamente 4 semanas. En una realización, una formulación de la divulgación es estable luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante por lo menos aproximadamente 1 mes, por lo menos aproximadamente 2 meses, por lo menos aproximadamente 3 meses, por lo

menos aproximadamente 4 meses, por lo menos aproximadamente 5 meses, o por lo menos aproximadamente 6 meses. En una realización específica, una formulación de la divulgación es estable luego de almacenamiento en una jeringa precargada.

En una realización, una formulación de la divulgación es estable luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante por lo menos aproximadamente 1 mes, por lo menos aproximadamente 2 meses, por lo menos aproximadamente 3 meses, por lo menos aproximadamente 4 meses, por lo menos aproximadamente 5 meses, por lo menos aproximadamente 6 meses, por lo menos aproximadamente 7 meses, por lo menos aproximadamente 8 meses, por lo menos aproximadamente 9 meses, por lo menos aproximadamente 10 meses, por lo menos aproximadamente 11 meses, o por lo menos aproximadamente 12 meses. En una realización, una formulación de la divulgación es estable luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante por lo menos aproximadamente 1 año, por lo menos aproximadamente 2 años, por lo menos aproximadamente 3 años, por lo menos aproximadamente 4 años, por lo menos aproximadamente 5 años, por lo menos aproximadamente 6 años, por lo menos aproximadamente 7 años, por lo menos aproximadamente 8 años, por lo menos aproximadamente 9 años, por lo menos aproximadamente 10 años, por lo menos aproximadamente 11 años, o por lo menos aproximadamente 12 años. En una realización específica, una formulación de la divulgación es estable luego de almacenamiento en una jeringa precargada.

En una realización, una formulación de la divulgación es estable luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, o aproximadamente 4 semanas. En una realización, una formulación de la divulgación es estable luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, o aproximadamente 6 meses. En una realización específica, una formulación de la divulgación es estable luego de almacenamiento en una jeringa precargada.

En una realización, una formulación de la divulgación es estable luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, o aproximadamente 12 meses. En una realización, una formulación de la divulgación es estable luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 9 años, aproximadamente 10 años, aproximadamente 11 años, o aproximadamente 12 años. En una realización específica, una formulación de la divulgación es estable luego de almacenamiento en una jeringa precargada.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que tiene una actividad de unión a ICOS que es por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de la actividad de unión a ICOS de un anticuerpo de referencia, en el que dicha formulación se almacenó a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, o aproximadamente 4 semanas. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que tiene una actividad de unión a ICOS que es por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de la actividad de unión a ICOS de un anticuerpo de referencia, en el que dicha formulación se almacenó a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, o aproximadamente 6 meses. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que tiene una actividad de unión a ICOS que es por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de la actividad de unión a ICOS de un anticuerpo de referencia, en el que dicha formulación se almacenó a aproximadamente 25°C durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, o aproximadamente 4 semanas. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que tiene una actividad de unión a ICOS que es por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de la actividad de unión a ICOS de un anticuerpo de referencia, en el que dicha formulación se almacenó a aproximadamente 25°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, o aproximadamente 6 meses. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que tiene una actividad de unión a ICOS que es por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de la actividad de unión a ICOS de un anticuerpo de referencia, en el que dicha formulación se almacenó a aproximadamente 5°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, o aproximadamente 12 meses. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que tiene una actividad de unión a ICOS que es por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de la actividad de unión a ICOS de un anticuerpo de referencia, en el que dicha formulación se almacenó a aproximadamente 5°C durante aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 9 años, aproximadamente 10 años, aproximadamente 11 años, o aproximadamente 12 años. En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que el anticuerpo pierde no más de aproximadamente 50%, no más de aproximadamente 40%, no más de aproximadamente 30%, no más de aproximadamente 20%, no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 5%, o no más de aproximadamente 1% de su actividad de unión a ICOS durante almacenamiento de la formulación a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, o aproximadamente 4 semanas. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que el anticuerpo pierde no más de aproximadamente 50%, no más de aproximadamente 40%, no más de aproximadamente 30%, no más de aproximadamente 20%, no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 5%, o no más de aproximadamente 1% de su actividad de unión a ICOS durante almacenamiento de la formulación a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, o aproximadamente 6 meses. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que el anticuerpo pierde no más de aproximadamente 50%, no más de aproximadamente 40%, no más de aproximadamente 30%, no más de aproximadamente 20%, no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 5%, o no más de aproximadamente 1% de su actividad de unión a ICOS durante almacenamiento de la formulación a aproximadamente 25°C durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, o aproximadamente 4 semanas. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que el anticuerpo pierde no más de aproximadamente 50%, no más de aproximadamente 40%, no más de aproximadamente 30%, no más de aproximadamente 20%, no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 5%, o no más de aproximadamente 1% de su actividad de unión a ICOS durante almacenamiento de la formulación a aproximadamente 25°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, o aproximadamente 6 meses. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que el anticuerpo pierde no más de aproximadamente 50%, no más de aproximadamente 40%, no más de aproximadamente 30%, no más de aproximadamente 20%, no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 5%, o no más de aproximadamente 1% de su actividad de unión a ICOS durante almacenamiento de la formulación a aproximadamente 5°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, o aproximadamente 12 meses. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que el anticuerpo pierde no más de aproximadamente 50%, no más de aproximadamente 40%, no más de aproximadamente 30%, no más de aproximadamente 20%, no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 5%, o no más de aproximadamente 1% de su actividad de unión a ICOS durante almacenamiento de la formulación a aproximadamente 5°C durante aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 9 años, aproximadamente 10 años, aproximadamente 11 años, o aproximadamente 12 años. En una realización específica, una formulación de la

divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que dicho anticuerpo retiene por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de capacidad de unión a un ICOS humano en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a aproximadamente 40°C durante por lo menos aproximadamente 1 semana, por lo menos aproximadamente 2 semanas, por lo menos aproximadamente 3 semanas, o por lo menos aproximadamente 4 semanas. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que dicho anticuerpo retiene por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de capacidad de unión a un ICOS humano en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a aproximadamente 40°C durante por lo menos aproximadamente 1 mes, por lo menos aproximadamente 2 meses, por lo menos aproximadamente 3 meses, por lo menos aproximadamente 4 meses, por lo menos aproximadamente 5 meses, o por lo menos aproximadamente 6 meses. En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que dicho anticuerpo retiene por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de capacidad de unión a un ICOS humano en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a aproximadamente 5°C durante por lo menos aproximadamente 1 mes, por lo menos aproximadamente 2 meses, por lo menos aproximadamente 3 meses, por lo menos aproximadamente 4 meses, por lo menos aproximadamente 5 meses, por lo menos aproximadamente 6 meses, por lo menos aproximadamente 7 meses, por lo menos aproximadamente 8 meses, por lo menos aproximadamente 9 meses, por lo menos aproximadamente 10 meses, por lo menos aproximadamente 11 meses, o por lo menos aproximadamente 12 meses. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que dicho anticuerpo retiene por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de capacidad de unión a un ICOS humano en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a aproximadamente 5°C durante por lo menos aproximadamente 1 año, por lo menos aproximadamente 2 años, por lo menos aproximadamente 3 años, por lo menos aproximadamente 4 años, por lo menos aproximadamente 5 años, por lo menos aproximadamente 6 años, por lo menos aproximadamente 7 años, por lo menos aproximadamente 8 años, por lo menos aproximadamente 9 años, por lo menos aproximadamente 10 años, por lo menos aproximadamente 11 años, o por lo menos aproximadamente 12 años. En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende anticuerpo anti-ICOS, en el que dicho anticuerpo retiene por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de capacidad de unión a un ICOS humano en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, o aproximadamente 4 semanas. En una realización, una formulación de la divulgación comprende anticuerpo anti-ICOS, en el que dicho anticuerpo retiene por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de capacidad de unión a un ICOS humano en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, o aproximadamente 6 meses. En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende anticuerpo anti-ICOS, en el que dicho anticuerpo retiene por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de capacidad de unión a un ICOS humano en comparación con un anticuerpo de

referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a aproximadamente 5°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, o aproximadamente 12 meses. En una realización, una formulación de la divulgación comprende anticuerpo anti-ICOS, en el que dicho anticuerpo retiene por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de capacidad de unión a un ICOS humano en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a aproximadamente 5°C durante aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 9 años, aproximadamente 10 años, aproximadamente 11 años, o aproximadamente 12 años. En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo forma un agregado según se determina por HPSEC luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante por lo menos aproximadamente 1 semana, por lo menos aproximadamente 2 semanas, por lo menos aproximadamente 3 semanas, o por lo menos aproximadamente 4 semanas. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en la que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo forma un agregado según se determina por HPSEC luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante por lo menos aproximadamente 1 mes, por lo menos aproximadamente 2 meses, por lo menos aproximadamente 3 meses, por lo menos aproximadamente 4 meses, por lo menos aproximadamente 5 meses, o por lo menos aproximadamente 6 meses. En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo forma un agregado según se determina por HPSEC luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante por lo menos aproximadamente 1 mes, por lo menos aproximadamente 2 meses, por lo menos aproximadamente 3 meses, por lo menos aproximadamente 4 meses, por lo menos aproximadamente 5 meses, por lo menos aproximadamente 6 meses, por lo menos aproximadamente 7 meses, por lo menos aproximadamente 8 meses, por lo menos aproximadamente 9 meses, por lo menos aproximadamente 10 meses, por lo menos aproximadamente 11 meses, o por lo menos aproximadamente 12 meses. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo forma un agregado según se determina por HPSEC luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante por lo menos aproximadamente 1 año, por lo menos aproximadamente 2 años, por lo menos aproximadamente 3 años, por lo menos aproximadamente 4 años, por lo menos aproximadamente 5 años, por lo menos aproximadamente 6 años, por lo menos aproximadamente 7 años, por lo menos aproximadamente 8 años, por lo menos aproximadamente 9 años, por lo menos aproximadamente 10 años, por lo menos aproximadamente 11 años, o por lo menos aproximadamente 12 años. En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo forma un agregado según se determina por HPSEC luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, o aproximadamente 4 semanas. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo forma un agregado según se determina por HPSEC luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, o aproximadamente 6 meses. En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares

ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

- En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo forma un agregado según se determina por HPSEC luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, o aproximadamente 12 meses.
- En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo forma un agregado según se determina por HPSEC luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 9 años, aproximadamente 10 años, aproximadamente 11 años, o aproximadamente 12 años.
- En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcar ligadas a N-glicósido complejas en las que la mucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.
- En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo se fragmenta según se determina por RP-HPLC luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante por lo menos aproximadamente 1 semana, por lo menos aproximadamente 2 semanas, por lo menos aproximadamente 3 semanas, o por lo menos aproximadamente 4 semanas.
- En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo se fragmenta según se determina por RP-HPLC luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante por lo menos aproximadamente 1 mes, por lo menos aproximadamente 2 meses, por lo menos aproximadamente 3 meses, por lo menos aproximadamente 4 meses, por lo menos aproximadamente 5 meses, o por lo menos aproximadamente 6 meses.
- En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.
- En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo se fragmenta según se determina por RP-HPLC luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante por lo menos aproximadamente 1 mes, por lo menos aproximadamente 2 meses, por lo menos aproximadamente 3 meses, por lo menos aproximadamente 4 meses, por lo menos aproximadamente 5 meses, por lo menos aproximadamente 6 meses, por lo menos aproximadamente 7 meses, por lo menos aproximadamente 8 meses, por lo menos aproximadamente 9 meses, por lo menos aproximadamente 10 meses, por lo menos aproximadamente 11 meses, o por lo menos aproximadamente 12 meses.
- En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo se fragmenta según se determina por RP-HPLC luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante por lo menos aproximadamente 1 año, por lo menos aproximadamente 2 años, por lo menos aproximadamente 3 años, por lo menos aproximadamente 4 años, por lo menos aproximadamente 5 años, por lo menos aproximadamente 6 años, por lo menos aproximadamente 7 años, por lo menos aproximadamente 8 años, por lo menos aproximadamente 9 años, por lo menos aproximadamente 10 años, por lo menos aproximadamente 11 años, o por lo menos aproximadamente 12 años.
- En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.
- En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo se fragmenta según se determina por RP-HPLC luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, o aproximadamente 4 semanas.
- En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo se fragmenta según se determina por RP-HPLC luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, o aproximadamente 6 meses.
- En una realización específica, una formulación de

la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcar ligadas a N-glicósido complejas en la que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo se fragmenta según se determina por RP-HPLC luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, o aproximadamente 12 meses. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS, en el que menos de 1%, menos de 2%, menos de 3%, menos de 4%, menos de 5%, menos de 7% o menos de 10% de dicho anticuerpo se fragmenta según se determina por RP-HPLC luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 9 años, aproximadamente 10 años, aproximadamente 11 años, o aproximadamente 12 años. En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación es transparente e incolora según se determina por inspección visual luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante por lo menos aproximadamente 1 semana, por lo menos aproximadamente 2 semanas, por lo menos aproximadamente 3 semanas, o por lo menos aproximadamente 4 semanas. En una realización, una formulación de la divulgación es transparente e incolora según se determina por inspección visual luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante por lo menos aproximadamente 1 mes, por lo menos aproximadamente 2 meses, por lo menos aproximadamente 3 meses, por lo menos aproximadamente 4 meses, por lo menos aproximadamente 5 meses, o por lo menos aproximadamente 6 meses. En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación es transparente e incolora según se determina por inspección visual luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante por lo menos aproximadamente 1 mes, por lo menos aproximadamente 2 meses, por lo menos aproximadamente 3 meses, por lo menos aproximadamente 4 meses, por lo menos aproximadamente 5 meses, por lo menos aproximadamente 6 meses, por lo menos aproximadamente 7 meses, por lo menos aproximadamente 8 meses, por lo menos aproximadamente 9 meses, por lo menos aproximadamente 10 meses, por lo menos aproximadamente 11 meses, o por lo menos aproximadamente 12 meses. En una realización, una formulación de la divulgación es transparente e incolora según se determina por inspección visual luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante por lo menos aproximadamente 1 año, por lo menos aproximadamente 2 años, por lo menos aproximadamente 3 años, por lo menos aproximadamente 4 años, por lo menos aproximadamente 5 años, por lo menos aproximadamente 6 años, por lo menos aproximadamente 7 años, por lo menos aproximadamente 8 años, por lo menos aproximadamente 9 años, por lo menos aproximadamente 10 años, por lo menos aproximadamente 11 años, o por lo menos aproximadamente 12 años. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación es transparente e incolora según se determina por inspección visual luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, o aproximadamente 4 semanas. En una realización, una formulación de la divulgación es transparente e incolora según se determina por inspección visual luego de almacenamiento a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, o aproximadamente 6 meses. En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación es transparente e incolora según se determina por inspección visual luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, o aproximadamente 12 meses. En una realización, una formulación de la divulgación es transparente e incolora según se determina por inspección visual luego de almacenamiento a aproximadamente 5°C durante aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 9 años, aproximadamente 10 años, aproximadamente 11 años, o aproximadamente 12 años. En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de la divulgación mantienen perfiles de agregación mejorados luego de almacenamiento, por ejemplo, durante periodos extendidos (por ejemplo, pero no se limita a 1 semana, 1 mes, 6 meses, 1 año, 2 años, 3 años o 5 años) a temperatura ambiente o 4°C o durante periodos (tales como, pero no se limita a 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, o 6 meses) a temperaturas elevadas tales como 38°C-42°C. En ciertas realizaciones, las formulaciones mantienen perfiles de agregación mejorados luego de almacenamiento mientras se exponen a luz o almacenado en la oscuridad en una variedad de condiciones de humedad, que incluyen, pero no se limitan a una humedad relativa de hasta 10%, o hasta 20%, o hasta 30%, o hasta 40%, o hasta 50%, o hasta 60%, o hasta 70%, o hasta 80%, o hasta 90%, o hasta 100%. Se entenderá en la técnica que el término condiciones "ambiente" en general se refiere a temperaturas de aproximadamente 20°C a una humedad relativa de entre 10% y 60% con exposición a luz. Del mismo modo, temperaturas entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C a una humedad relativa de menos de aproximadamente 10% se denominan colectivamente como temperaturas "4°C" o "5°C", entre aproximadamente 23°C y aproximadamente 27°C a una humedad relativa de aproximadamente 60% se denominan colectivamente como "25°C" y temperaturas entre aproximadamente 38°C y aproximadamente 42°C a una humedad relativa de aproximadamente 75% se denominan colectivamente como "40°C". En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada.

En ciertas realizaciones, después de almacenamiento a 4°C durante por lo menos un mes, las formulaciones de la divulgación comprenden (o consisten de la fracción agregada) un perfil de partículas de menos de aproximadamente 3.4 E +5 partículas/ml de diámetro 2-4 µm, menos de aproximadamente 4.0 E +4 partículas/ml de diámetro 4-10 µm, menos de aproximadamente 4.2 E +3 partículas/ml de diámetro 10-20 µm, menos de aproximadamente 5.0 E +2 partículas/ml de diámetro 20-30 µm, menos de aproximadamente 7.5 E +1 partículas/ml de diámetro 30-40 µm, y menos de aproximadamente 9.4 partículas/ml de diámetro 40-60 µm según se determina por un multidimensionador de partículas. En ciertas realizaciones, las formulaciones de la divulgación no contienen partículas detectables mayores de 40 µm, o mayores de 30 µm. En una realización específica, una formulación de la divulgación se almacena en una jeringa precargada.

Numerosos métodos útiles para determinar el grado de agregación, y/o tipos y/o tamaños de agregados presentes en una formulación de proteína (por ejemplo, formulación de anticuerpo de la divulgación) se conocen en la técnica, que incluyen pero no se limita a, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de exclusión por tamaño de alto desempeño (HPSEC), dispersión de luz estática (SLS), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), dicroísmo circular (CD), técnicas de despliegue de proteínas inducidas por urea, fluorescencia intrínseca del triptófano, calorimetría diferencial de barrido, y técnicas de unión a proteínas del ácido 1-anilino-8-naftalensulfónico (ANS). Por ejemplo, la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se puede realizar para separar moléculas con base en su tamaño, al pasar las moléculas sobre una columna empacada con la resina apropiada, las moléculas más grandes (por ejemplo, agregados) se eluirán antes que las moléculas más pequeñas (por ejemplo, monómeros). Las moléculas en general se detectan mediante absorbancia UV a 280 nm y se pueden recolectar para una caracterización adicional. Las columnas de cromatografía líquida de alta presión se utilizan a menudo para el análisis SEC (HP-SEC). Los métodos específicos de la SEC se detallan en la sección titulada "Ejemplos" infra. Alternativamente, se puede utilizar la ultracentrifugación analítica (AUC). AUC es una técnica ortogonal que determina los coeficientes de sedimentación (informados en Svedberg, S) de macromoléculas en una muestra líquida. Al igual que la SEC, el AUC es capaz de separar y detectar fragmentos/agregados de anticuerpos de monómeros y además puede proporcionar información sobre la masa molecular. La agregación de proteínas en las formulaciones también se puede caracterizar por análisis de contador de partículas utilizando un contador de rejillas o por mediciones de turbidez utilizando un turbidímetro. La turbidez es una medida de la cantidad por la cual las partículas en una solución dispersan la luz y, por lo tanto, se pueden utilizar como un indicador general de la agregación de proteínas. Adicionalmente, se puede utilizar una electroforesis en gel de poliácridamida no reductora (PAGE) o una electroforesis en gel capilar (CGE) para caracterizar el estado de agregación y/o fragmentación de los anticuerpos o un fragmento de los mismos en una formulación de la divulgación.

En una realización, una formulación de la divulgación es para administración parenteral. En una realización, una formulación de la divulgación es una formulación inyectable. En una realización, una formulación de la divulgación es

para administración intravenosa, subcutánea, o intramuscular. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS en la que dicha formulación es para inyección subcutánea. En una realización específica, una formulación de la divulgación se proporciona en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una

5 secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación es para administración intravenosa en la que dicha formulación comprende entre aproximadamente 20 mg/ml y aproximadamente 40 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un

10 fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación es para administración subcutánea en la que dicha formulación comprende entre aproximadamente 70 mg/ml y aproximadamente 250 mg/ml de un anticuerpo anti-ICOS o un

15 fragmento del mismo. En una realización específica, una formulación de la divulgación se proporciona en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no

20 se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación es para administración en aerosol.

La presente divulgación también proporciona una forma de dosificación farmacéutica adecuada para administración parenteral a un humano que comprende una formulación de anticuerpo anti-ICOS en un recipiente adecuado. En una realización, una dosificación unitaria farmacéutica de la divulgación comprende una formulación de anticuerpo

25 anti-ICOS suministrada por vía intravenosa, por vía subcutánea, o por vía intramuscular. En otra realización, una dosificación unitaria farmacéutica de la divulgación comprende formulación de anticuerpo anti-ICOS suministrada en aerosol. En una realización específica, una dosificación unitaria farmacéutica de la divulgación comprende una formulación de anticuerpo anti-ICOS suministrada por vía subcutánea. En otra realización, una dosificación unitaria farmacéutica de la divulgación comprende una formulación de anticuerpo anti-ICOS suministrada en aerosol. En una

30 realización adicional, una dosificación unitaria farmacéutica de la divulgación comprende una formulación de anticuerpo anti-ICOS suministrada por vía intranasal. En una realización, a recipiente adecuado es una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no

35 se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, una formulación de la divulgación se proporciona en un recipiente sellado. En una realización específica, una formulación de la divulgación se proporciona en una jeringa precargada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende el anticuerpo anti-ICOS que comprende una secuencia de

40 cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un kit que comprende una formulación de anticuerpo anti-ICOS de la divulgación.

La presente divulgación también se refiere un métodos para tratar y evitar enfermedades y trastornos mediados por

45 células T, tales como, pero no limitados a, infección crónica, enfermedad o trastorno autoinmunitario, enfermedad o trastorno inflamatorio, enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD), rechazo de trasplante y trastorno proliferativo de células T en un humano, que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo una formulación que comprende un anticuerpo anti-ICOS con una función efectora mejorada (por ejemplo, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad mediada por células dependientes del complemento (CDC) y/o

50 fagocitosis dependiente de anticuerpos en una cantidad suficiente para agotar las células que expresan ICOS circulantes. En un aspecto particular, la presente divulgación también se refiere a métodos para tratar y evitar enfermedades y trastornos mediados por células T, tales como, pero no limitados a, infección crónica, enfermedad o trastorno autoinmunitario, enfermedad o trastorno inflamatorio, enfermedad de injerto contra anfitrión. (GVHD), rechazo de trasplantes y trastorno proliferativo de células T en un humano que comprende la administración de un

55 régimen terapéuticamente efectivo de un anticuerpo anti-ICOS con una función efectora mejorada, que es del isotipo humano IgG1 o IgG3.

La presente divulgación también proporciona métodos para evitar, controlar, tratar o mejorar una enfermedad o trastorno inflamatorio, una enfermedad o trastorno autoinmunitario, una enfermedad proliferativa, una infección, una enfermedad o trastorno asociado con o caracterizado por la expresión y/o actividades aberrantes de la ICOS, una

enfermedad o trastorno asociado con o caracterizado por una expresión y/o actividad aberrantes del receptor ICOS, o uno o más de síntomas de los mismos.

En una realización, un método de la divulgación comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de una formulación de anticuerpo anti-ICOS. En una realización, un método de la divulgación es para la prevención, tratamiento, manejo o mejora de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus dependiente de insulina, soriasis, tiroiditis autoinmunitaria, artritis reumatoide, glomerulonefritis, lupus eritematoso sistémico, miopatías inflamatorias idiopáticas (IIM), dermatomiositis (DM), polimiositis (PM) y miositis por cuerpos de inclusión (IBM). En una realización específica, un método de la divulgación es para la prevención, tratamiento, manejo o mejora del lupus eritematoso sistémico. En una realización específica, un método de la divulgación es para la prevención, tratamiento, manejo o mejora de la psoriasis. En una realización específica, un método de la divulgación es para la prevención, tratamiento, manejo o mejora de la diabetes autoinmunitaria. En otra realización, un método de la divulgación es para la prevención, tratamiento, manejo o mejora del rechazo de trasplante o enfermedad de injerto contra anfitrión. En una realización adicional, un método de la divulgación es para la prevención, tratamiento, manejo o mejora de las miopatías inflamatorias idiopáticas (IIM), dermatomiositis (DM), polimiositis (PM) y miositis con cuerpos de inclusión (IBM).

En una realización, un método de la divulgación para la prevención, tratamiento, manejo o mejora de una enfermedad o trastorno comprende adicionalmente administrar a dicho sujeto una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de un agente profiláctico o terapéutico distinto de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que específicamente se une a ICOS.

En una realización, un método de la divulgación para la prevención, tratamiento, manejo o mejora de una enfermedad o trastorno comprende adicionalmente administrar a dicho sujeto una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico o terapéutico distinto de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a ICOS, en el que dicho agente profiláctico o terapéutico es un agente antiinflamatorio, agente inmunomodulador, agente antiangiogénico o agente contra el cáncer.

5.3. Anticuerpos útiles en las formulaciones de la divulgación

La presente divulgación proporciona formulaciones de anticuerpos que se unen específicamente al ICOS humano y tienen una función efectora mejorada. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS con una función efectora mejorada, tal como, pero no limitada a, ADCC mejorada, CDC mejorada y fagocitosis dependiente de anticuerpo potenciada. En una realización específica, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo ICOS antihumano con actividad ADCC mejorada. Estos anticuerpos se pueden utilizar con propósitos terapéuticos, que incluyen propósitos profilácticos, por ejemplo, en situaciones en las que la producción o expresión de ICOS está asociada con síntomas patológicos. Dichos anticuerpos también se pueden utilizar para el diagnóstico de diversas enfermedades o para el estudio de la evolución de tales enfermedades.

Los anticuerpos útiles en la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos multiespecíficos (que incluyen anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, Fvs de cadena única (scFv) (que incluyen bi-scFvs específicos), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs ligados a disulfuro (sdFv) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos de la presente divulgación incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la divulgación pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Los anticuerpos útiles en la presente divulgación pueden ser de cualquier origen animal, que incluyen aves y mamíferos (por ejemplo, pero no limitados a, humano, murino, burro, oveja, conejo, cabra, conejillo de indias, camello, caballo o pollo). En realizaciones específicas, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados.

Los anticuerpos útiles en la presente divulgación pueden ser mono-específicos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos se pueden unir específicamente a diferentes epítopos de un polipéptido o se pueden unir específicamente tanto a un polipéptido como a un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véase, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Nos. WO 93/17715, WO 92/08802, WO 91/00360 y WO 92/05793; Tuttl, et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Patentes de Estados Unidos Nos. 4,474,893, 4,714,681, 4,925,648, 5,573,920, y 5,601,819; y Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553.

Los anticuerpos útiles en la presente divulgación pueden ser anticuerpos de cadena única. El diseño y construcción de un anticuerpo de cadena única se describe en Marasco et al, 1993, Proc Natl Acad Sci 90:7889-7893.

La presente divulgación proporciona formulaciones de anticuerpos que se unen específicamente a ICOS humano y tienen una función efectora mejorada. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada, tal como, pero no se limita a, ADCC mejorada, CDC mejorada, y fagocitosis dependiente de anticuerpos mejorada.

5 La presente divulgación proporciona adicionalmente formulaciones de anticuerpos anti-ICOS que agotan de forma eficiente las células que expresan ICOS en un sistema modelo de xenoinjerto de ratón. En una realización, la administración de una o más dosis terapéuticas de una formulación de anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede lograr por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 99%, o por lo menos aproximadamente 100% de agotamiento de células que expresan ICOS en un sistema modelo de xenoinjerto de ratón.

15 La presente divulgación proporciona adicionalmente formulaciones de anticuerpos anti-ICOS que agotan de forma eficiente células que expresan ICOS en un sistema de modelo de ratón transgénico. En una realización, administración de una o más dosis terapéuticas de una formulación de anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede lograr por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 99%, o por lo menos aproximadamente 100% de agotamiento de células que expresan ICOS en un sistema de modelo de ratón transgénico.

25 La presente divulgación también proporciona formulaciones de anticuerpos anti-ICOS que agotan de forma eficiente células que expresan ICOS en un primate (primate no humano o humano). En una realización, administración de una o más dosis terapéuticas de una formulación de anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede lograr por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 99%, o por lo menos aproximadamente 100% de agotamiento de células que expresan ICOS en un primate (primate no humano o humano).

30 La presente divulgación también proporciona formulaciones de anticuerpos anti-ICOS que agotan de forma eficiente células T que expresan ICOS en un primate (primate no humano o humano). En una realización, administración de una o más dosis terapéuticas de una formulación de anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede lograr por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 99%, o por lo menos aproximadamente 100% de agotamiento de células T que expresan ICOS en un primate (primate no humano o humano).

40 La presente divulgación también proporciona formulaciones de anticuerpos anti-ICOS que agotan de forma eficiente células auxiliares T que expresan ICOS en un primate (primate no humano o humano). En una realización, administración de una o más dosis terapéuticas de una formulación de anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede lograr por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 99%, o por lo menos aproximadamente 100% de agotamiento de células auxiliares T que expresan ICOS en un primate (primate no humano o humano).

45 La presente divulgación también proporciona formulaciones de anticuerpos anti-ICOS que agotan de forma eficiente células Th1 que expresan ICOS en un primate (primate no humano o humano). En una realización, administración de una o más dosis terapéuticas de una formulación de anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede lograr por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 99%, o por lo menos aproximadamente 100% de agotamiento de células Th1 que expresan ICOS en un primate (primate no humano o humano).

55 La presente divulgación también proporciona formulaciones de anticuerpos anti-ICOS que agotan de forma eficiente células Th2 que expresan ICOS en un primate (primate no humano o humano). En una realización, administración de una o más dosis terapéuticas de una formulación de anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede lograr por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 99%, o por lo menos aproximadamente 100% de agotamiento de células Th2 que expresan ICOS en un primate (primate no humano o humano).

60

La presente divulgación también proporciona formulaciones de anticuerpos anti-ICOS que agotan de forma eficiente células Th17 que expresan ICOS en un primate (primate no humano o humano). En una realización, administración de una o más dosis terapéuticas de una formulación de anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede lograr por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 99%, o por lo menos aproximadamente 100% de agotamiento de células Th17 que expresan ICOS en un primate (primate no humano o humano).

La presente divulgación también proporciona formulaciones de anticuerpos anti-ICOS que agotan de forma eficiente células T auxiliares de memoria que expresan ICOS en un primate (primate no humano o humano). En una realización, administración de una o más dosis terapéuticas de una formulación de anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede lograr por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 99%, o por lo menos aproximadamente 100% de agotamiento de células T auxiliares de memoria que expresan ICOS en un primate (primate no humano o humano).

El agotamiento de un tipo de célula particular puede llevar un agotamiento de un producto secretado de dicho tipo de célula. Por ejemplo, el agotamiento de células Th17 que utilizan un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación puede llevar un agotamiento de IL-17. La presente divulgación también proporciona formulaciones de anticuerpos anti-ICOS que agotan de forma eficiente IL-17 en un primate (primate no humano o humano). En una realización, administración de una o más dosis terapéuticas de una formulación de anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede lograr por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 99%, o por lo menos aproximadamente 100% de agotamiento de IL-17 en un primate (primate no humano o humano).

La presente divulgación también proporciona formulaciones de anticuerpos anti-ICOS que agotan de forma eficiente IL-2 en un primate (primate no humano o humano). En una realización, administración de una o más dosis terapéuticas de una formulación de anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede lograr por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 99%, o por lo menos aproximadamente 100% de agotamiento de IL-2 en un primate (primate no humano o humano).

La presente divulgación proporciona formulaciones de anticuerpos anti-ICOS que luego de administración evitan de forma eficiente la formación de centro germinal en un órgano linfático secundario de un primate (primate no humano o humano). En una realización, el órgano linfático secundario es un ganglio linfático. En otra realización, el órgano linfático secundario es el bazo. En una realización adicional, el órgano linfático secundario es la amígdala. En una realización, el órgano linfático secundario es un ganglio linfático mesentérico.

La presente divulgación también proporciona formulaciones de anticuerpos anti-ICOS que luego de administración interrumpen de forma eficiente la arquitectura del centro germinal en un órgano linfático secundario de un primate (primate no humano o humano). En una realización, el órgano linfático secundario es un ganglio linfático. En otra realización, el órgano linfático secundario es el bazo. En una realización adicional, el órgano linfático secundario es la amígdala. En una realización, el órgano linfático secundario es un ganglio linfático mesentérico.

La presente divulgación también proporciona formulaciones de anticuerpos anti-ICOS que luego de administración agotan de forma eficiente las células B de centro germinal de un órgano linfático secundario en un primate (primate no humano o humano). En una realización, el órgano linfático secundario es un ganglio linfático. En otra realización, el órgano linfático secundario es el bazo. En una realización adicional, el órgano linfático secundario es la amígdala. En una realización, el órgano linfático secundario es un ganglio linfático mesentérico.

La presente divulgación también proporciona formulaciones de anticuerpos anti-ICOS que luego de administración agotan de forma eficiente células B cambiadas de clase circulante en un primate (primate no humano o humano). En una realización, la administración de una o más dosis terapéuticas de una formulación de anticuerpo anti-ICOS de la divulgación agota las células B cambiadas de clase circulante en un primate (primate no humano o humano) durante por lo menos 1 día, por lo menos 2 días por lo menos 5 días, por lo menos 1 semana, por lo menos 2 semanas, por lo menos 3 semanas, por lo menos 1 mes, por lo menos 2 meses, por lo menos 3 meses, por lo menos 4 meses, por lo menos 5 meses, por lo menos 6 meses, por lo menos 9 meses. El agotamiento de células B cambiadas de clase circulante se considera que "persiste sustancialmente" durante el periodo de tiempo luego de la administración de una o más dosis de anticuerpo anti-ICOS cuando la cantidad de células B cambiadas de clase circulante es por lo

menos 10% menor en la muestra tratada con anticuerpo que la cantidad de células B cambiadas de clase circulante en la muestra de control no tratada.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que media citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad mediada por células dependientes del complemento (CDC), y/o fagocitosis dependiente de anticuerpos. En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o fagocitosis dependiente de anticuerpos. En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación tiene citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mejorada (ADCC).

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que comprende una región Fc variante que media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mejorada (ADCC). En una realización adicional, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que comprende por lo menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de: residuo 239, 330, y 332, en el que las posiciones de residuo de aminoácido se determinan de acuerdo con la convención EU. En una realización específica, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que comprende por lo menos sobre la sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de: S239D, A330L, y I332E; en la que las posiciones de residuo de aminoácido se determinan de acuerdo con la convención EU. En una realización adicional, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de: D en la posición 239, L en la posición 330, y E en la posición 332; en el que las posiciones de residuo de aminoácido se determinan de acuerdo con la convención EU.

En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que tiene una región Fc diseñada por ingeniería que comprende por lo menos una glucoforma diseñada por ingeniería, en la que dicha región Fc diseñada por ingeniería media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mejorada (ADCC). En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería que carece de glucosilación. En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas ligadas a Asn297 en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción.

En ciertas realizaciones, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que tiene una región Fc variante que tiene una mayor afinidad para una proteína de unión a Fc tal como, pero no se limita a, receptor Fc, C1q que una región Fc tipo silvestre. En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que tiene mayor afinidad para la proteína del receptor FcγRIIIA que una región Fc tipo silvestre.

En ciertas realizaciones, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que tiene una región Fc diseñada por ingeniería que comprende por lo menos una glucoforma diseñada por ingeniería, en la que dicha región Fc diseñada por ingeniería tiene una mayor afinidad para una proteína de unión a Fc tal como, pero no se limita a, receptor Fc, C1q que una región Fc tipo silvestre. En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería que comprende por lo menos una glucoforma diseñada por ingeniería, en la que dicha región Fc diseñada por ingeniería tiene mayor afinidad para la proteína del receptor FcγRIIIA que una región Fc tipo silvestre.

En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante. En otra realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que tiene una afinidad alterada para una proteína de ligando Fc. En una realización adicional, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que tiene una afinidad alterada para un ligando Fc seleccionado del grupo que consiste de: FcγRIA, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA, FcγRIIIB, FcγRIV, y C1q. En una realización específica, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que tiene una afinidad alterada para la proteína FcγRIIIA. En una realización adicional, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que tiene una afinidad alterada para la proteína C1q. En una realización específica, una proteína de ligando Fc puede ser una proteína de ligando Fc de ratón, humana o de primate (por ejemplo, cynomolgus).

En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que tiene una afinidad incrementada para una proteína de ligando Fc. En una realización adicional, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que tiene una afinidad incrementada para un ligando Fc seleccionado del grupo que consiste de: FcγRIA, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA, FcγRIIIB, FcγRIV, y C1q. En una realización específica, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que tiene una afinidad incrementada para la proteína FcγRIIIA. En una realización adicional, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que tiene una afinidad incrementada para la proteína C1q. En una realización específica, una proteína de ligando Fc puede ser una proteína de ligando Fc de ratón, humana o de primate (por ejemplo, cynomolgus).

En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante en la que dicha región Fc variante comprende por lo menos una sustitución, inserción o supresión de aminoácido. En otra realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que comprende por lo menos una sustitución, inserción o supresión de aminoácido en la que dicho por lo menos un residuo de sustitución,

inserción o supresión de aminoácido resulta en una afinidad incrementada para un ligando Fc seleccionado del grupo que consiste de: FcγRIA, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA, FcγRIIIB, FcγRIV, y C1q. En una realización específica, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que comprende por lo menos una sustitución, inserción o supresión de aminoácido en la que dicho por lo menos un residuo de sustitución, inserción o supresión de aminoácido resulta en una afinidad incrementada para la proteína FcγRIIIA. En una realización adicional, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que comprende por lo menos una sustitución, inserción o supresión de aminoácido en la que dicho por lo menos un residuo de sustitución, inserción o supresión de aminoácido resulta en una afinidad incrementada para la proteína C1q. En una realización específica, una proteína de ligando Fc puede ser una proteína de ligando Fc de ratón, humana o de primate (por ejemplo, cynomolgus).

En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que comprende por lo menos una sustitución, inserción o supresión de aminoácido en la que dicho por lo menos un residuo de aminoácido se selecciona del grupo que consiste de: residuo 239, 330, y 332, en el que los residuos de aminoácidos se enumeran siguiendo el índice de EU. En otra realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que comprende por lo menos una sustitución, inserción o supresión de aminoácido en la que dicho por lo menos un residuo de aminoácido sustituido, insertado o suprimido se selecciona del grupo que consiste de: residuo 239, 330, y 332, en el que los residuos de aminoácidos se enumeran siguiendo el índice de EU. En una realización adicional, un anticuerpo anti-ICOS descrito en este documento comprende una región Fc variante que comprende por lo menos una sustitución de aminoácido en la que dicho por lo menos un residuo de aminoácido sustituido se selecciona del grupo que consiste de: residuo 239, 330, y 332, en el que los residuos de aminoácidos se enumeran siguiendo el índice de EU. En otra realización, un anticuerpo anti-ICOS descrito en este documento comprende una región Fc variante que comprende por lo menos una sustitución de aminoácido en la que dicho por lo menos una sustitución de aminoácido se selecciona del grupo que consiste de: S239D, A330L, A330Y, y I332E, en los que los residuos de aminoácidos se enumeran siguiendo el índice de EU. En una realización específica, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que comprende las sustituciones de aminoácido S239D, A330L, y I332E, en las que residuos de aminoácidos se enumeran siguiendo el índice de EU.

En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que comprende por lo menos uno de los residuos de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste de: D en el residuo 239, E en el residuo 239, L en el residuo 330, Y en el residuo 330, E en el residuo 332, y D en el residuo 332, en la que los residuos de aminoácidos se enumeran siguiendo el índice de EU. En una realización específica, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc variante que comprende D en el residuo 239, L en el residuo 330, y E en el residuo 332, en el que residuos de aminoácidos se enumeran siguiendo el índice de EU.

En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería en la que la región Fc diseñada por ingeniería comprende una modificación postraduccional que es diferente de aquella del anticuerpo anti-ICOS parental. En una realización específica, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería en la que dicha región Fc diseñada por ingeniería comprende cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería que tiene una afinidad alterada para una proteína de ligando Fc. En una realización adicional, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería que tiene una afinidad alterada para un ligando Fc seleccionado del grupo que consiste de: FcγRIA, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA, FcγRIIIB, FcγRIV, y C1q. En una realización específica, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería que tiene una afinidad alterada para la proteína FcγRIIIA. En una realización adicional, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería que tiene una afinidad alterada para la proteína C1q.

En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería que tiene una afinidad incrementada para una proteína de ligando Fc. En una realización adicional, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería que tiene una afinidad incrementada para un ligando Fc seleccionado del grupo que consiste de: FcγRIA, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA, FcγRIIIB, FcγRIV, y C1q. En una realización específica, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería que tiene una afinidad incrementada para la proteína FcγRIIIA. En una realización adicional, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería que tiene una afinidad incrementada para la proteína C1q.

En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería en la que dicha región Fc diseñada por ingeniería comprende un nivel reducido de fucosa en comparación con un anticuerpo nativo. En otra realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería que comprende un nivel reducido de fucosa, en el que dicha reducción en el nivel de fucosa resulta en una afinidad incrementada para un ligando Fc seleccionado del grupo que consiste de: FcγRIA, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA, FcγRIIIB, FcγRIV, y C1q. En una realización específica, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería que comprende un nivel reducido de fucosa, en el que dicha reducción en el nivel de fucosa resulta en una afinidad incrementada para la proteína FcγRIIIA. En una realización

adicional, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc diseñada por ingeniería que comprende un nivel reducido de fucosa, en el que dicha reducción en el nivel de fucosa resulta en una afinidad incrementada para la proteína C1q.

Los anticuerpos anti-ICOS descritos en este documento comprenden regiones Fc que tienen una alta afinidad de unión para la proteína FcγRIIIA humana. En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc que tiene una constante de afinidad o K_a (k_{on}/k_{off}) de por lo menos 10^3 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^4 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^5 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^6 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^7 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^8 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^9 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{10} M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{11} M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{12} M^{-1} , o por lo menos $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$. En otra realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc que tiene una constante de disociación o K_d (k_{off}/k_{on}) de menos de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, menos de 10^{-3} M , menos de $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, menos de 10^{-4} M , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, menos de 10^{-5} M , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, menos de 10^{-6} M , menos de $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, menos de 10^{-7} M , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, menos de 10^{-8} M , menos de $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, menos de 10^{-9} M , menos de $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, menos de 10^{-10} M , menos de $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, menos de 10^{-11} M , menos de $5 \times 10^{-12} \text{ M}$, o menos de 10^{-12} M .

Un anticuerpo utilizado de acuerdo con un método descrito en este documento puede comprender una región Fc que se une a FcγRIIIA humano con una constante de disociación (K_d) de menos de 3000 nM, menos de 2500 nM, menos de 2000 nM, menos de 1500 nM, menos de 1000 nM, menos de 750 nM, menos de 500 nM, menos de 250 nM, menos de 200 nM, menos de 150 nM, menos de 100 nM, menos de 75 nM, menos de 50 nM, menos de 25 nM, menos de 10 nM, menos de 5 nM, menos de 1 nM según lo evaluado utilizando un método descrito en este documento o conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA) (Biacore International AB, Uppsala, Suecia). En una realización específica, un anticuerpo utilizado de acuerdo con un método descrito en este documento puede comprender una región Fc que se une a FcγRIIIA humano con una constante de disociación (K_d) de entre 1 a 3000 nM, 1 a 3000 nM, 1 a 2000 nM, 1 a 1500 nM, 1 a 1000 nM, 1 a 750 nM, 1 a 500 nM, 1 a 250 nM, 1 a 100 nM, 1 a 50 nM, 1 a 25 nM, 1 a 10 nM según lo evaluado utilizando un método descrito en este documento o conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA). En otra realización, un anticuerpo anti-ICOS utilizado de acuerdo con un método descrito en este documento puede comprender una región Fc que se une a FcγRIIIA humano con una constante de disociación (K_d) de 500 nM, 250 nM, 100 nM, 75 nM, 50 nM, 25 nM, 10 nM o 1 nM según lo evaluado utilizando un método descrito en este documento o conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA).

Los anticuerpos anti-ICOS descritos en este documento comprenden regiones Fc que tienen una alta afinidad de unión para la proteína FcγRIIIA de primate no humano (por ejemplo, cynomolgus). En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc que tiene una constante de afinidad o K_a (k_{on}/k_{off}) de por lo menos 10^3 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^4 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^5 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^6 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^7 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^8 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^9 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{10} M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{11} M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{12} M^{-1} , o por lo menos $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$. En otra realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc que tiene una constante de disociación o K_d (k_{off}/k_{on}) de menos de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, menos de 10^{-3} M , menos de $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, menos de 10^{-4} M , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, menos de 10^{-5} M , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, menos de 10^{-6} M , menos de $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, menos de 10^{-7} M , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, menos de 10^{-8} M , menos de $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, menos de 10^{-9} M , menos de $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, menos de 10^{-10} M , menos de $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, menos de 10^{-11} M , menos de $5 \times 10^{-12} \text{ M}$, o menos de 10^{-12} M .

Un anticuerpo utilizado de acuerdo con un método descrito en este documento puede comprender una región Fc que se une a FcγRIIIA de primate no humano (por ejemplo, cynomolgus) con una constante de disociación (K_d) de menos de 3000 nM, menos de 2500 nM, menos de 2000 nM, menos de 1500 nM, menos de 1000 nM, menos de 750 nM, menos de 500 nM, menos de 250 nM, menos de 200 nM, menos de 150 nM, menos de 100 nM, menos de 75 nM, menos de 50 nM, menos de 25 nM, menos de 10 nM, menos de 5 nM, menos de 1 nM según lo evaluado utilizando un método descrito en este documento o conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA) (Biacore International AB, Uppsala, Suecia). En una realización específica, un anticuerpo utilizado de acuerdo con un método descrito en este documento puede comprender una región Fc que se une a FcγRIIIA de primate no humano (por ejemplo, cynomolgus) con una constante de disociación (K_d) de entre 1 a 3000 nM, 1 a 3000 nM, 1 a 2000 nM, 1 a 1500 nM, 1 a 1000 nM, 1 a 750 nM, 1 a 500 nM, 1 a 250 nM, 1 a 100 nM, 1 a 50 nM, 1 a 25 nM, 1 a 10 nM según lo evaluado utilizando un método descrito en este documento o conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA). En otra realización, un anticuerpo anti-ICOS utilizado de acuerdo con un método descrito en este documento puede comprender una región Fc que se une a FcγRIIIA de primate no humano (por ejemplo, cynomolgus) con una constante de disociación (K_d) de 500 nM, 250 nM, 100 nM, 75 nM, 50 nM, 25 nM, 10 nM o 1 nM según lo evaluado utilizando un método descrito en este documento o conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA).

Los anticuerpos anti-ICOS descritos en este documento comprenden regiones Fc que tienen una alta afinidad de unión para la proteína de FcγRIIIA de ratón. En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc que tiene una constante de afinidad o K_a (k_{on}/k_{off}) de por lo menos 10^3 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^4 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^5 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, por lo

menos 10^6 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^7 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^8 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^9 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{10} M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{11} M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{12} M^{-1} , o por lo menos $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$. En otra realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende una región Fc que tiene una constante de disociación o K_d ($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$) de menos de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, menos de 10^{-3} M , menos de $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, menos de 10^{-4} M , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, menos de 10^{-5} M , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, menos de 10^{-6} M , menos de $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, menos de 10^{-7} M , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, menos de 10^{-8} M , menos de $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, menos de 10^{-9} M , menos de $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, menos de 10^{-10} M , menos de $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, menos de 10^{-11} M , menos de $5 \times 10^{-12} \text{ M}$, o menos de 10^{-12} M .

Un anticuerpo utilizado de acuerdo con un método descrito en este documento puede comprender una región Fc que se une a Fc γ RIIIA de ratón con una constante de disociación (K_d) de menos de 3000 nM, menos de 2500 nM, menos de 2000 nM, menos de 1500 nM, menos de 1000 nM, menos de 750 nM, menos de 500 nM, menos de 250 nM, menos de 200 nM, menos de 150 nM, menos de 100 nM, menos de 75 nM, menos de 50 nM, menos de 25 nM, menos de 10 nM, menos de 5 nM, menos de 1 nM según lo evaluado utilizando un método descrito en este documento o conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA) (Biacore International AB, Uppsala, Suecia). En una realización específica, un anticuerpo utilizado de acuerdo con un método descrito en este documento puede comprender una región Fc que se une a Fc γ RIIIA de ratón con una constante de disociación (K_d) de entre 1 a 3000 nM, 1 a 3000 nM, 1 a 2000 nM, 1 a 1500 nM, 1 a 1000 nM, 1 a 750 nM, 1 a 500 nM, 1 a 250 nM, 1 a 100 nM, 1 a 50 nM, 1 a 25 nM, 1 a 10 nM según lo evaluado utilizando un método descrito en este documento o conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA). En otra realización, un anticuerpo anti-ICOS utilizado de acuerdo con un método descrito en este documento puede comprender una región Fc que se une a Fc γ RIIIA de ratón con una constante de disociación (K_d) de 500 nM, 250 nM, 100 nM, 75 nM, 50 nM, 25 nM, 10 nM o 1 nM según lo evaluado utilizando un método descrito en este documento o conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA).

La presente divulgación proporciona formulaciones de anticuerpos que se unen específicamente a ICOS humano y tienen una función efectora mejorada. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada, tal como, pero no se limita a, ADCC mejorada, CDC mejorada, y fagocitosis dependiente de anticuerpos mejorada. En una realización, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS divulgado en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 12/116,512, presentada el 7 de mayo de 2008. En una realización, los anticuerpos anti-ICOS de la divulgación comprenden una, dos, tres, cuatro, cinco, o los seis de las CDRs de JMAb-136 (véase, Patente de Estados Unidos 6,803,039).

Las secuencias de aminoácidos para CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de cadena pesada de JMAb-136 definida de acuerdo con Kabat se identifican como la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos para CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera de JMAb-136 definida de acuerdo con Kabat se identifican como la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 5, respectivamente.

La numeración de Kabat se basa en el trabajo seminal de Kabat et al. (1991) Secuencias de proteínas de interés inmunológico, publicación No. 91-3242, publicadas en un volumen de tres volúmenes establecidos por los Institutos Nacionales de la Salud, Servicio Nacional de Información Técnica (en adelante, "Kabat"). Kabat proporciona múltiples alineaciones de secuencias de cadenas de inmunoglobulina de numerosas especies de anticuerpos isotípicos. Las secuencias alineadas están numeradas de acuerdo con un sistema de numeración único, el sistema de numeración de Kabat. Las secuencias de Kabat se han actualizado desde la publicación de 1991 y están disponibles como una base de datos electrónica de secuencias (la última versión descargable 1997). Cualquier secuencia de inmunoglobulina se puede enumerar de acuerdo con Kabat al realizar una alineación con la secuencia de referencia de Kabat. De acuerdo con lo anterior, el sistema de numeración Kabat proporciona un sistema uniforme para enumerar las cadenas de inmunoglobulina. A menos que se indique lo contrario, todas las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina descritas en este documento están numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. De manera similar, todas las posiciones de aminoácidos individuales mencionadas en este documento están numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede comprender una región variable de cadena pesada, VH, que comprende por lo menos una CDR que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede comprender un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-ICOS descrito en este documento puede comprender una región variable de cadena ligera, VK, que comprende por lo menos una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 5. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede comprender un dominio VK que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación comprende un dominio VK que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y comprende adicionalmente un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

La presente divulgación abarca anticuerpos que se unen a ICOS humano, que comprenden derivados del dominio VH, CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, dominio VK, CDR1 VK, CDR2 VK, o CDR3 VK descritos en este documento que se pueden unir a ICOS humano. Las técnicas estándar conocidas por aquellos expertos en la técnica se pueden utilizar para introducir mutaciones (por ejemplo, adiciones, supresiones, y/o sustituciones) en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, que incluye, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR que se utilizan de forma rutinaria para generar sustituciones de aminoácido. En una realización, los derivados de CDR de VH y/o VK pueden incluir menos de 25 sustituciones de aminoácido, menos de 20 sustituciones de aminoácido, menos de 15 sustituciones de aminoácido, menos de 10 sustituciones de aminoácido, menos de 5 sustituciones de aminoácido, menos de 4 sustituciones de aminoácido, menos de 3 sustituciones de aminoácido, menos de 2 sustituciones de aminoácido, o 1 sustitución de aminoácido en relación con las CDR VH y/o VK originales del anticuerpo anti-ICOS JMab-136. En otra realización, los derivados de CDR VH y/o VK pueden tener sustituciones de aminoácidos conservadoras (por ejemplo, supra) hechas en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos (es decir, residuos de aminoácidos que no son críticos para que el anticuerpo se una específicamente a ICOS humano). Las mutaciones también se pueden introducir aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de las secuencias de codificación de CDR de VH y/o VK, como por ejemplo mediante mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes se pueden cribar para determinar la actividad biológica para identificar los mutantes que retienen la actividad. Después de la mutagénesis, el anticuerpo codificado se puede expresar y se puede determinar la actividad del anticuerpo.

La presente divulgación abarca adicionalmente anticuerpos que se unen a ICOS humano, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que comprenden una o más CDR en las que dichas CDR comprenden una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una o más CDR del anticuerpo anti-ICOS JMab-136. El porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos se pueden determinar por cualquier método conocido por un experto en la técnica, que incluye, pero no se limita a, búsquedas de proteína BLAST.

La presente divulgación abarca adicionalmente anticuerpos que se unen a ICOS humano, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio VH y/o VK en el que dichos dominios VH y/o VK comprenden una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH y VK del anticuerpo anti-ICOS JMab-136. El porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos se puede determinar por cualquier método conocido por un experto en la técnica, que incluye, pero no se limita a, búsquedas de proteína BLAST.

En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación se puede unir a ICOS humano con una afinidad comparable a aquella del anticuerpo anti-ICOS JMab-136.

En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación se une específicamente al epítipo de muestra de ICOS como el anticuerpo anti-ICOS JMab-136.

En una realización, un anticuerpo anti-ICOS compete específicamente con el anticuerpo anti-ICOS JMab-136 para unión a ICOS. El ensayo de competición se puede realizar utilizando cualquier ensayo de unión conocido en la técnica, por ejemplo, pero no se limita a ensayo ELISA, radioinmunoanálisis y citometría de flujo.

La divulgación proporciona adicionalmente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada. La divulgación también abarca polinucleótidos que se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas o de menor rigurosidad, como se define en este documento, para lo polinucleótidos que codifican un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada.

Otra realización de la divulgación es un vector que comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada.

La presente divulgación se refiere adicionalmente a una célula aislada que comprende un vector en el que dicho vector comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada.

Los anticuerpos anti-ICOS de la divulgación incluyen aquellos de los isotipos humano IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4.

La presente divulgación se refiere a anticuerpos anti-ICOS con función efectora mejorada, así como también a composiciones que comprenden aquellos anticuerpos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede mediar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC). En otras realizaciones, la presente divulgación se dirige hacia composiciones que comprenden un anticuerpo anti-ICOS del

isotipo humano IgG1 y/o IgG3, así como también a un anticuerpo anti-ICOS del isotipo humano IgG2 y/o IgG4, que puede mediar ADCC, CDC, y/o fagocitosis dependiente de anticuerpos humanos.

Los anticuerpos anti-ICOS descritos en este documento pueden tener una alta afinidad de unión para el antígeno de ICOS humano. Por ejemplo, un anticuerpo descrito en este documento puede tener una constante de tasa de asociación o tasa k_{on} (anticuerpo (Ab) + antígeno (Ag) $\xrightarrow{k_{on}}$ Ab-Ag) de por lo menos $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, por lo menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, por lo menos $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, por lo menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, por lo menos $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, por lo menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, o por lo menos $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

En otra realización, un anticuerpo anti-ICOS pueden tener una tasa k_{off} ((Ab-Ag) $\xrightarrow{k_{off}}$ anticuerpo (Ab) + antígeno (Ag)) de menos de $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-1} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-2} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-3} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, o menos de 10^{-4} s^{-1} . En una otra realización, un anticuerpo de la divulgación tiene una k_{off} de menos de $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-5} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-6} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-7} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-8} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-9} s^{-1} , o menos de 10^{-10} s^{-1} .

En otra realización, un anticuerpo anti-ICOS puede tener una constante de afinidad o K_a (k_{on}/k_{off}) de por lo menos 10^2 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^3 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^4 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^5 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^6 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^7 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^8 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^9 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{10} M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{11} M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{12} M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{13} M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{14} M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{15} M^{-1} , o por lo menos $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$. En aún otra realización, un anticuerpo anti-ICOS puede tener una constante de disociación o K_d (k_{off}/k_{on}) de menos de $5 \times 10^{-2} \text{ M}$, menos de 10^{-2} M , menos de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, menos de 10^{-3} M , menos de $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, menos de 10^{-4} M , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, menos de 10^{-5} M , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, menos de 10^{-6} M , menos de $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, menos de 10^{-7} M , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, menos de 10^{-8} M , menos de $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, menos de 10^{-9} M , menos de $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, menos de 10^{-10} M , menos de $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, menos de 10^{-11} M , menos de $5 \times 10^{-12} \text{ M}$, menos de 10^{-12} M , menos de $5 \times 10^{-13} \text{ M}$, menos de 10^{-13} M , menos de $5 \times 10^{-14} \text{ M}$, menos de 10^{-14} M , menos de $5 \times 10^{-15} \text{ M}$, o menos de 10^{-15} M .

Un anticuerpo utilizado de acuerdo con un método descrito en este documento se puede unir inmuno-específicamente a ICOS y puede tener una constante de disociación (K_d) de menos de 3000 pM, menos de 2500 pM, menos de 2000 pM, menos de 1500 pM, menos de 1000 pM, menos de 750 pM, menos de 500 pM, menos de 250 pM, menos de 200 pM, menos de 150 pM, menos de 100 pM, menos de 75 pM según lo evaluado utilizando un método descrito en este documento o conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA) (Biacore International AB, Uppsala, Suecia). En una realización específica, un anticuerpo utilizado de acuerdo con un método descrito en este documento se puede unir inmuno-específicamente a un antígeno de ICOS humano y puede tener una constante de disociación (K_d) de entre 25 a 3400 pM, 25 a 3000 pM, 25 a 2500 pM, 25 a 2000 pM, 25 a 1500 pM, 25 a 1000 pM, 25 a 750 pM, 25 a 500 pM, 25 a 250 pM, 25 a 100 pM, 25 a 75 pM, 25 a 50 pM según lo evaluado utilizando un método descrito en este documento o conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA). En otra realización, un anticuerpo anti-ICOS utilizado de acuerdo con un método descrito en este documento se puede unir inmuno-específicamente a ICOS y puede tener una constante de disociación (K_d) de 500 pM, 100 pM, 75 pM o 50 pM según lo evaluado utilizando un método descrito en este documento o conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA).

Los anticuerpos que se unen específicamente a ICOS incluyen derivados que se modifican, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de modo que la unión covalente no elimina la unión a ICOS humano. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueadores conocidos, división proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, entre otras, división química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Las formulaciones de anticuerpos de la presente divulgación que se unen específicamente a ICOS humano pueden ser mono-específicas, bio-específicas, tri-específicas o de mayor multi-especificidad. Los anticuerpos multi-específicos pueden ser específicos para diferentes epítopos de ICOS humano o pueden ser específicos tanto para ICOS humano como para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido.

5.4. Anticuerpos anti-ICOS monoclonales

Un anticuerpo monoclonal anti-ICOS exhibe especificidad de unión al antígeno ICOS humano y puede mediar ADCC humana, CDC y/o fagocitosis dependiente de anticuerpos. Dicho anticuerpo se puede generar utilizando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinante y de fago, o una combinación de los mismos. Los anticuerpos son altamente específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. Un anticuerpo anti-ICOS diseñado puede ser producido por cualquier medio conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, las técnicas descritas a continuación y las mejoras a aquellas técnicas. La producción de

alto rendimiento a gran escala normalmente implica cultivar una célula anfitrion que produce el anticuerpo anti-ICOS diseñado y recuperar el anticuerpo anti-ICOS del cultivo de la célula anfitrion.

5.4.1. Técnica de hibridoma

Los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando técnicas de hibridoma, que incluyen aquellas conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling et al., *En Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). Por ejemplo, en el método de hibridoma, un ratón u otro animal anfitrion apropiado, tal como un hámster o un mono macaco, se inmuniza para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para inmunización. Los linfocitos también se pueden inmunizar in vitro. Luego, los linfocitos se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células del mieloma parental carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas en general incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias impiden el crecimiento de la deficiencia de células HGPRT.

Las realizaciones específicas emplean células de mieloma que se fusionan de manera eficiente, apoyan la producción estable de anticuerpos de alto nivel por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio como el medio HAT. Entre estas estirpes celulares de mieloma se encuentran estirpes de mieloma murino, tales como aquellas derivadas de tumores de ratones MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Centro de Distribución Celular del Instituto Salk, San Diego, California, USA, y las celdas SP-2 o X63-Ag8.653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA. Las estirpes celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se analiza para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno ICOS humano. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se puede determinar mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Después se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden ser subclonados mediante procedimientos de dilución limitante y cultivados mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI 1640. Adicionalmente, las células de hibridoma pueden crecer in vivo como tumores de ascitis en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

5.4.2. Técnicas de ADN recombinante

El ADN que codifica un anticuerpo anti-ICOS descrito en este documento se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anti-ICOS). Las células de hibridoma sirven como fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que luego se transfectan en células anfitrionas, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra forma proteína de inmunoglobulina para obtener la síntesis de anticuerpos anti-ICOS en las células anfitrionas recombinantes.

En los métodos de presentación de fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se muestran sobre la superficie de las partículas de fagos que llevan las secuencias de polinucleótidos que las codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L se amplifican a partir de bibliotecas de ADNc de animales (por ejemplo, bibliotecas de ADNc humano o murino de tejidos afectados). El ADN que codifica los dominios V_H y V_L se recombinan junto con un ligador scFv por PCR y se clonan en un vector fagémido. El vector se electroporó en *E. coli* y la *E. coli* se infectó con fagos auxiliares. El fago utilizado en estos métodos es normalmente un fago filamentoso que incluye fd y M13, y los dominios V_H y V_L en general se fusionan de forma recombinante con el gen del fago III o el gen VIII. Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno particular pueden seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, utilizando antígeno etiquetado o antígeno unido o capturado en una superficie sólida o perla. Ejemplos de métodos de presentación de fagos que se pueden utilizar

para hacer los anticuerpos de la presente divulgación incluyen los descritos en Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods, 182:41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods, 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol., 24:952-958; Persic et al., 1997, Gene, 187:9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology, 57:191-280; Solicitud Internacional No. PCT/GB91/O1 134; Publicaciones Internacionales Nos. WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401, y WO97/13844; y Patentes de Estados Unidos Nos. 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727, 5,733,743, y 5,969,108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección del fago, las regiones de codificación de anticuerpos del fago pueden aislarse y utilizarse para generar anticuerpos completos, que incluyen los anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y expresarse en cualquier anfitrión deseado, que incluyen células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describe a continuación. Las técnicas para producir de forma recombinante los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también se pueden emplear utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como aquellos divulgados en la publicación PCT No. WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, BioTechniques, 12(6): 864-869; Sawai et al., 1995, AJRI, 34: 26-34; y Better et al., 1988, Science, 240: 1041-1043.

Los anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., Nature, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. La combinación de cadenas se puede utilizar en la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) (Marks et al., BioTechnology, 10: 779-783 (1992)), así como en la infección combinatoria y la recombinación in vivo como una estrategia para construir muy grandes bibliotecas de fagos (Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos anti-ICOS.

Para generar anticuerpos completos, se pueden utilizar cebadores de PCR que incluyen secuencias de nucleótidos VH o VL, un sitio de restricción y una secuencia de flanqueo para proteger el sitio de restricción para amplificar las secuencias VH o VL en clones de scFv. Utilizando técnicas de clonación conocidas por aquellos expertos en la técnica, los dominios VH amplificados por PCR se pueden clonar en vectores que expresan una región constante de cadena pesada, por ejemplo, en la región constante gamma 4 humana, y los dominios VL amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante de la cadena ligera, por ejemplo, regiones constantes kappa o lambda humanas. Los vectores para expresar los dominios VH o VL pueden comprender un promotor EF-1 α , una señal de secreción, un sitio de clonación para el dominio variable, dominios constantes y una etiqueta de selección tal como neomicina. Los dominios VH y VL también pueden clonarse en un vector que expresa las regiones constantes necesarias. Los vectores de conversión de cadena pesada y los vectores de conversión de cadena ligera se cotransfectan luego en estirpes celulares para generar estirpes celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, utilizando técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, al sustituir los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera de la secuencia de codificación en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos No. 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl Acad Sci. USA, 81: 6851 (1984)), o al unir covalentemente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina, toda o parte de la secuencia de codificación para un poli péptido no inmunoglobulina.

5.5. Anticuerpos quiméricos

Los anticuerpos anti-ICOS en este documento incluyen específicamente anticuerpos quiméricos (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica o homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que otra porción de la cadena es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl Acad Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, como babuino, rhesus o mono cynomolgus) y secuencias de región constante humana (Patente de Estados Unidos No. 5,693,780).

5.6. Anticuerpos mutados/alterados

Los anticuerpos anti-ICOS de composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden ser anticuerpos mutantes. Como se utiliza en el presente documento, "anticuerpo mutante" o "anticuerpo alterado" se refiere a una variante de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-ICOS en el que se han modificado uno o más de los residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-ICOS. Las modificaciones a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-ICOS incluyen modificaciones a la secuencia que pueden mejorar la afinidad o aidez del anticuerpo por su antígeno, y/o modificaciones a la porción Fc del anticuerpo que puede mejorar la función efectora.

Por lo tanto, la presente divulgación se refiere a los anticuerpos anti-ICOS con función efectora mejorada divulgados en este documento así como también derivados alterados/mutantes de los mismos que incluyen, pero no se limitan a unos que exhiben características de unión a ICOS humano alteradas; por ejemplo constantes de asociación alteradas K_{ON} , constantes de disociación K_{OFF} , y/o constante de equilibrio o afinidad de unión, K_D . En ciertas realizaciones la K_D de un anticuerpo anti-ICOS descrito en este documento, o un derivado alterado/mutante del mismo, para ICOS humano puede ser no más de aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, o 10^{-9} M. Los métodos y reactivos adecuados para la determinación de dichas características de unión de un anticuerpo de la presente divulgación, o un derivado alterado/mutante del mismo, se conocen en la técnica y/o están disponibles comercialmente (véase ante y, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 6,849,425, Patente de los Estados Unidos No. 6,632,926, Patente de los Estados Unidos No. 6,294,391, y Patente de los Estados Unidos No. 6,143,574). Más aún, el equipo y software diseñados para dichos análisis cinéticos están disponibles comercialmente (por ejemplo, Biacore® A100, y Biacore® 2000 instruments; Biacore International AB, Uppsala, Suecia).

Se pueden realizar las modificaciones a cualesquier anticuerpos anti-ICOS conocidos o anticuerpos anti-ICOS identificados como se describe en este documento. Dichos anticuerpos alterados necesariamente tienen menos de 100% de identidad de secuencia o similitud con un anticuerpo anti-ICOS conocido. Por vía de ejemplo, un anticuerpo alterado puede tener una secuencia de aminoácidos que está dentro del rango de desde aproximadamente 25% a aproximadamente 95% idéntico o similar a la secuencia de aminoácidos del dominio variable de ya sea la cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo anti-ICOS como se describe en este documento. Un anticuerpo alterado puede tener una secuencia de aminoácidos que tienen por lo menos 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de ya sea la cadena pesada o la cadena ligera de un anticuerpo anti-ICOS como se describe en este documento. En otra realización, un anticuerpo alterado puede tener una secuencia de aminoácidos que tienen por lo menos 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de las CDR1, CDR2, o CDR3 de cadena pesada de un anticuerpo anti-ICOS como se describe en este documento. En una realización, un anticuerpo alterado puede mantener la capacidad de unión a ICOS humano. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-ICOS como se describe en este documento puede comprender una VH que es por lo menos o aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

En otra realización, un anticuerpo alterado puede tener una secuencia de aminoácidos que tienen por lo menos 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de las CDR1, CDR2, o CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo anti-ICOS como se describe en este documento. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación puede comprender a VL que es por lo menos o aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más idéntica a una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

La identidad o similitud con respecto a una secuencia se define en este documento como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo residuo) o similar (es decir, un residuo de aminoácido del mismo grupo basado en las propiedades comunes de la cadena lateral, véase adelante) con residuos de anticuerpos anti-ICOS, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. Ninguno del terminal N, terminal C, extensiones, supresiones o inserciones internas en la secuencia del anticuerpo fuera del dominio variable se debe interpretar como que afecta la identidad o similitud de la secuencia.

“% de identidad”, como se conoce en la técnica, es una medida de la relación entre dos polinucleótidos o dos polipéptidos, según se determina al comparar sus secuencias. En general, las dos secuencias a comparar están alineadas para dar una correlación máxima entre las secuencias. Se examina la alineación de las dos secuencias y se determina el número de posiciones que dan una correspondencia exacta de aminoácidos o nucleótidos entre las dos secuencias, dividida por la longitud total de la alineación y multiplicada por 100 para obtener un % de identidad. Este % de identidad se puede determinar en toda la longitud de las secuencias que se van a comparar, lo que es particularmente adecuado para secuencias de la misma o muy similar longitud y que son altamente homólogas, o de longitudes más cortas definidas, que es más adecuada para secuencias de longitud desigual o que tienen un nivel inferior de homología.

Por ejemplo, las secuencias se pueden alinear con el software clustalw bajo Unix, que genera un archivo con una extensión “.aln”, este archivo se puede importar al programa Bioedit (Hall, TA 1999, BioEdit: un programa Editor y de análisis de alineación de secuencia biológica fácil de utilizar para Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Simp. Ser 41: 95-98) que abre el .archivo aln. En la ventana Bioedit, uno puede elegir secuencias individuales (dos a la vez) y alinearlas. Este método permite la comparación de la secuencia completa.

Los métodos para comparar la identidad de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, por ejemplo, los programas están disponibles en el paquete de análisis de secuencia de Wisconsin, versión 9.1 (Devereux J. et al., Nucleic Acids Res., 12: 387-395, 1984, disponible de Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, EE.UU.). La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando

un algoritmo matemático. Por ejemplo, los programas BESTFIT y GAP se pueden utilizar para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad entre dos secuencias de polipéptidos. BESTFIT utiliza el algoritmo de "homología local" de Smith and Waterman (Advances in Applied Mathematics, 2: 482-489, 1981) y encuentra la mejor región de similitud entre dos secuencias. BESTFIT es más adecuado para comparar dos polinucleótidos o dos secuencias de polipéptidos que son diferentes en longitud, el programa supone que la secuencia más corta representa una porción de la más larga. En comparación, GAP alinea dos secuencias que encuentran una "máxima similitud" según el algoritmo de Neddleman y Wunsch (J. Mol. Biol., 48: 443-354, 1970). GAP es más adecuado para comparar secuencias que tienen aproximadamente la misma longitud y se espera una alineación en toda la longitud. Preferiblemente, los parámetros "Peso de Espacio" y "Peso de Longitud" utilizados en cada programa son 50 y 3 para polinucleótidos y 12 y 4 para polipéptidos, respectivamente. Preferiblemente, el % de identidades y similitudes se determinan cuando las dos secuencias que se comparan están alineadas de manera óptima.

Otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias también se conocen en la técnica, por ejemplo, la familia de programas BLAST (Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl Acad Sci. USA, 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl Acad Sci. USA, 90: 5873-5877, disponible en el Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCB), Bethesda, Md., EE UU. y accesible a través de la página de inicio del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov). Estos programas son ejemplos no limitantes de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 215: 403-410. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico que codifica todo o una porción si es un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la divulgación. Para obtener alineaciones con espacios para propósitos de comparación, Gapped BLAST se puede utilizar como se describe en Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402. PSI-Blast también se puede utilizar para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Otro ejemplo no limitante de un programa para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias conocidas en la técnica es FASTA (Pearson W. R. and Lipman D. J., Proc. Natl Acad Sci. USA, 85: 2444-2448, 1988, disponible como parte del Paquete de Análisis de Secuencias de Wisconsin). Preferiblemente, la matriz de sustitución de aminoácidos BLOSUM62 (Henikoff S. and Henikoff J. G., Proc. Natl Acad Sci. USA, 89: 10915-10919, 1992) se utiliza en comparaciones de secuencias de polipéptidos que incluyen cuando las secuencias de nucleótidos se traducen primero en secuencias de aminoácidos antes de la comparación.

Otro ejemplo no limitante de un programa conocido en la técnica para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias de aminoácidos es SeqWeb Software (una interfaz basada en web para el paquete GCG Wisconsin: programa Gap) que se utiliza con el algoritmo predeterminado y ajustes de parámetros del programa: blosum62, peso de espacio 8, peso de longitud 2.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar utilizando técnicas similares a aquellas descritas anteriormente, permitiendo o no espacios. Al calcular el porcentaje de identidad, normalmente se cuentan las coincidencias exactas.

Preferiblemente, el programa BESTFIT se utiliza para determinar el % de identidad de un polinucleótido o una secuencia de polipéptidos de consulta con respecto a un polinucleótido o una secuencia de polipéptidos de la presente divulgación, la consulta y la secuencia de referencia se alinean de manera óptima y los parámetros del programa se establecen en el valor predeterminado.

Para generar un anticuerpo alterado, se introducen una o más alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más de las regiones hipervariables del anticuerpo dependiente de la especie. También se pueden introducir una o más alteraciones (por ejemplo, sustituciones) de los residuos de la región marco en un anticuerpo anti-ICOS en el que estos dan como resultado una mejora en la afinidad de unión del anticuerpo mutante por el antígeno de la segunda especie de mamífero. Ejemplos de residuos de la región marco, para modificar incluyen aquellos que se unen de forma no covalente al antígeno directamente (Amit et al., Science, 233: 747-753 (1986)); interactúan con/o efectúan la conformación de una CDR (Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987)); y/o participan en la interfaz V_L-V_H (EP 239 400B1). En ciertas realizaciones, la modificación de uno o más de dichos residuos de la región marco da como resultado un aumento de la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno de la segunda especie de mamífero. Por ejemplo, de aproximadamente uno a aproximadamente cinco residuos del marco pueden alterarse en esta realización de la divulgación. A veces, esto puede ser suficiente para producir un anticuerpo mutante adecuado para su uso en ensayos preclínicos, incluso cuando ninguno de los residuos de la región hipervariable se haya alterado. Normalmente, sin embargo, un anticuerpo alterado comprenderá alteraciones adicionales de la región hipervariable.

Los residuos de la región hipervariable que se alteran pueden cambiarse aleatoriamente, especialmente cuando la afinidad de unión inicial de un anticuerpo anti-ICOS para el antígeno de la segunda especie de mamífero es tal que tal anticuerpo alterado producido aleatoriamente se puede cribar fácilmente.

Un procedimiento útil para generar dicho anticuerpo alterado se denomina "mutagénesis de escaneo de alanina" (Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)). Aquí, uno o más de los residuos de la región hipervariable se reemplazan por uno o más residuos de alanina o polialanina para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno de la segunda especie de mamífero. Aquellos residuos de la región hipervariable que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones luego se refinan mediante la introducción de mutaciones adicionales u otras en o para los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación en sí no necesita estar predeterminada. Los mutantes de Ala producidos de esta manera se criban por su actividad biológica como se describe en el presente documento.

Otro procedimiento para generar dicho anticuerpo alterado implica la maduración por afinidad utilizando la presentación de fagos (Hawkins et al., J. Mol. Biol., 254: 889-896 (1992) y Lowman et al., Biochemistry, 30(45): 10832-10837 (1991)). Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los mutantes de anticuerpos generados de esta manera se muestran de forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empacado dentro de cada partícula. Los mutantes mostrados en fagos se criban luego para determinar su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en este documento.

Las mutaciones en las secuencias de anticuerpos pueden incluir sustituciones, supresiones, que incluyen supresiones internas, adiciones, que incluyen adiciones que producen proteínas de fusión, o sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos dentro y/o adyacentes a la secuencia de aminoácidos, pero que resultan en un cambio "silencioso", en que el cambio produce un anticuerpo anti-ICOS funcionalmente equivalente. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se pueden hacer sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos involucrados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Adicionalmente, la glicina y la prolina son residuos que pueden influir en la orientación de la cadena. Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Adicionalmente, si se desea, pueden introducirse aminoácidos no clásicos o análogos de aminoácidos químicos como una sustitución o adición en la secuencia del anticuerpo. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero no se limitan a, los isómeros D de los aminoácidos comunes. ácido α -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-amino butírico, γ -Abu, ϵ -Ahx, ácido 6-amino hexanoico, Aib, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como β -metil-aminoácidos, α -metil aminoácidos, $N\alpha$ -metil aminoácidos, y análogos de aminoácidos en general.

En otra realización, los sitios seleccionados para la modificación son madurados por afinidad utilizando la presentación de fagos (véase anteriormente).

Cualquier técnica para la mutagénesis conocida en la técnica se puede utilizar para modificar nucleótidos individuales en una secuencia de ADN, con el propósito de hacer sustituciones de aminoácidos en la secuencia del anticuerpo, o para crear/eliminar sitios de restricción para facilitar manipulaciones adicionales. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis química, mutagénesis dirigida in vitro (Kunkel, Proc. Natl Acad Sci. USA, 82: 488 (1985); Hutchinson, C. et al., J. Biol. Chem., 253: 6551 (1978)), mutagénesis dirigida a oligonucleótidos (Smith, Ann. Rev. Genet., 19: 423-463 (1985); Hill et al., Methods Enzymol., 155: 558-568 (1987)), extensión de superposición basada en PCR (Ho et al., Gene, 77: 51-59 (1989)), mutagénesis de megacebador basada en PCR (Sarkar et al. al., Biotechniques, 8: 404-407 (1990)), etc. Las modificaciones se pueden confirmar por secuenciación de ADN didesoxi de doble cadena.

En ciertas realizaciones de la divulgación, un anticuerpo anti-ICOS se puede modificar para producir proteínas de fusión; es decir, el anticuerpo, o un fragmento del mismo, fusionado a una proteína, polipéptido o péptido heterólogo. En ciertas realizaciones, la proteína fusionada con la porción de un anticuerpo anti-ICOS es un componente enzimático de la terapia de profármacos con enzimas dirigida por anticuerpos (ADEPT). Los ejemplos de otras proteínas o polipéptidos que pueden diseñarse como una proteína de fusión con un anticuerpo anti-ICOS incluyen, pero no se limitan a toxinas tales como ricina, abrina, ribonucleasa, DNasa I, enterotoxina-A estafilocócica, proteína antiviral de hierba carmín, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de Pseudomonas y endotoxina de Pseudomonas. Véase, por ejemplo, Pastan et al., Cell, 47: 641 (1986), y Goldenberg et al., Cancer Journal for Clinicians, 44:43 (1994). Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de los mismos que se pueden utilizar incluyen la cadena de la difteria, los fragmentos activos de no unión a la toxina de la difteria, la cadena de la exotoxina A (de Pseudomonas aeruginosa), la cadena de la ricina A, la cadena de la abrina A, la cadena de modeccin A, la cadena alfa-sarcina, proteínas Aleurites fordii, proteínas diantinas, proteínas Phytolaca americana (PAPI, PAPII y PAP-S),

inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado en octubre 28, 1993.

Se pueden generar proteínas de fusión adicionales a través de las técnicas de transposición de genes, transposición de motivos, transposición de exones y/o transposición de codones (colectivamente denominada "transposición de ADN"). La transposición de ADN se puede emplear para alterar las actividades del anticuerpo anti-ICOS o fragmentos del mismo (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo con mayores afinidades y menores tasas de disociación). Véase, en general, Patentes de Estados Unidos Nos. 5,605,793; 5,811,238; 5,830,721; 5,834,252; y 5,837,458, y Patten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol., 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson et al., 1999, J. Mol. Biol., 287:265-76; y Lorenzo ad Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-313. El anticuerpo puede ser además una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión como se describe en la publicación de Estados Unidos 20030118592, la publicación de Estados Unidos 200330133939 y la publicación PCT WO 02/056910, todas otorgadas a Ledbetter et al.

5.7. Anticuerpos de dominio

Los anticuerpos anti-ICOS de composiciones y métodos de la divulgación pueden ser anticuerpos de dominio, por ejemplo, anticuerpos que contienen las unidades de unión funcionales pequeñas de los anticuerpos, correspondientes a las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) o ligera (V_L) de los anticuerpos humanos. Ejemplos de anticuerpos de dominio incluyen, pero no se limitan a, aquellos disponibles de Domantis Limited (Cambridge, Reino Unido) y Domantis Inc. (Cambridge, Mass., EE.UU.) que son específicos para objetivos terapéuticos (véase, por ejemplo, los documentos WO04/058821; WO04/003019; Patentes de Estados Unidos Nos. 6,291,158; 6,582,915; 6,696,245; y 6,593,081). Se pueden utilizar bibliotecas de anticuerpos de dominio disponibles comercialmente para identificar anticuerpos de dominio anti-ICOS. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-ICOS comprenden una unidad de unión funcional ICOS y una unidad de unión funcional del receptor gamma Fc.

En una realización, un anticuerpo de dominio anti-ICOS puede comprender cualquiera de, o cualquier combinación de las CDR de las cadenas pesadas o ligeras del anticuerpo monoclonal JMab-136.

En otra realización, un anticuerpo de dominio anti-ICOS puede comprender V_H CDR3 de JMab-136 junto con cualquier combinación de las CDR comprendidas por las regiones variables de cadenas pesadas o ligeras del anticuerpo monoclonal JMab-136. Un anticuerpo de dominio anti-ICOS también puede comprender V_K CDR3 de JMab-136 junto con cualquier combinación de las CDR comprendidas por las regiones variables de cadenas pesadas o ligeras del anticuerpo monoclonal JMab-136.

En otra realización más, un anticuerpo de dominio anti-ICOS puede comprender V_H CDR3 de JMab-136. Un anticuerpo anti-ICOS también puede comprender V_K CDR3 de JMab-136.

5.8. Diacuerpos

En ciertas realizaciones de la divulgación, los anticuerpos anti-ICOS son "diacuerpos". El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Al utilizar un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más detalladamente, por ejemplo, en el documento EP 404,097: WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl Acad Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

5.9. Vacicuerpos

En ciertas realizaciones de la divulgación, los anticuerpos anti-ICOS son vacicuerpos. Los vacicuerpos son polipéptidos díméricos. Cada monómero de un vacianticuerpo constituye un scFv con especificidad para una molécula de superficie en APC conectada a través de una región bisagra y un dominio $Cy3$ a un segundo scFv. En otras realizaciones de la divulgación, los vacicuerpos que contienen como uno de los scFv un fragmento de anticuerpo anti-ICOS se pueden utilizar para yuxtaponer aquellas células que expresan ICOS para destruir y una célula efectora que media la ADCC. Por ejemplo, véase, Bogen et al., Publicación de solicitud de patente estadounidense nº 20040253238.

5.10. Anticuerpos Lineales

En ciertas realizaciones de la divulgación, los anticuerpos anti-ICOS son anticuerpos lineales. Los anticuerpos lineales comprenden un par de segmentos Fd en tándem ($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos. Véase, Zapata et al., Protein Eng., 8(10): 1057-1062 (1995).

5.11. Anticuerpo parental

En ciertas realizaciones de la divulgación, un anticuerpo anti-ICOS es un anticuerpo parental. Un "anticuerpo parental" es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos que puede carecer, o puede ser deficiente en, uno o más residuos de aminoácidos en o adyacentes a una o más regiones hipervariables del mismo en comparación con un anticuerpo mutante/alterado como se divulga en este documento. Por lo tanto, el anticuerpo parental puede tener una región hipervariable más corta que la región hipervariable correspondiente de un mutante de anticuerpo como se divulga en este documento. El polipéptido parental puede comprender una secuencia de anticuerpos nativa (es decir, una variante que se presenta de forma natural que incluye una variante alélica que se presenta de forma natural) o una secuencia de anticuerpos con modificaciones de secuencias de aminoácidos preexistentes (tal como otras inserciones, supresiones y/o sustituciones) de una secuencia de origen natural. El anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

5.12. Fragmentos de anticuerpos

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, en general la unión a antígeno o región variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos: anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena simple; y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24: 107-117 (1992) y Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente por células anfitrionas recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpos discutidas anteriormente. Los fragmentos Fab'-SH también pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *BioTechnology*, 10: 163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células anfitrionas recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de una sola cadena (scFv). Véase, por ejemplo, el documento WO 93/16185. En ciertas realizaciones, el anticuerpo no es un fragmento Fab.

5.13. Anticuerpos Biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para por lo menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes de la etiqueta de superficie de células T que expresa ICOS. Otros anticuerpos de este tipo se pueden unir a una primera etiqueta de células T que expresan ICOS y además se unen a una segunda etiqueta de superficie de células T que expresa ICOS. Un brazo de unión a la etiqueta de células T que expresa anti-ICOS también se puede combinar con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores Fc para IgG (FcγR), para enfocar los mecanismos de defensa celular a la célula T que expresa ICOS. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en las células T que expresan ICOS. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a la etiqueta de células T que expresa ICOS y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide de vinca, cadena de ricina, metolaexato o isótopo radioactivo hapteno). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, F(ab')₂: anticuerpos biespecíficos).

Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983); Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991); Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986); Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992); Hollinger et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993); Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994); Patentes de Estados Unidos Nos. 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,81; 95,731,168; 4,676,980; y 4,676,980, documentos WO 94/04690; WO 91/00360; WO 92/200373; WO 93/17715; WO 92/08802; y EP 03089.)

En una realización, cuando un anticuerpo anti-ICOS de composiciones y métodos de la divulgación es biespecífico, el anticuerpo anti-ICOS puede ser humano o humanizado y puede tener especificidad por ICOS humano y un epítipo en una célula T o puede ser capaz de unirse a una célula efectora humana tal como, por ejemplo, un monocito/macrófago y/o un linfocito citotóxico natural para efectuar la muerte celular.

5.14. Regiones Fc variantes

La presente divulgación proporciona una formulación de proteínas que comprenden una región Fc variante. Es decir, una región Fc de origen no natural, por ejemplo, una región Fc que comprende uno o más residuos de aminoácidos no naturales. Las regiones Fc variantes de la presente divulgación también abarcan regiones Fc que comprenden supresiones, adiciones y/o modificaciones de aminoácidos.

Se entenderá que la región Fc como se utiliza en este documento incluye los polipéptidos que comprenden la región constante de un anticuerpo que excluye el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante. Por lo tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, y los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y la bisagra de terminal N flexible a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cγ2 y

Cgamma3 (Cy2 y Cy3) y la bisagra entre Cgamma1 (Cy1) y Cgamma2 (Cy2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se define en general para comprender los residuos C226 o P230 a su término carboxilo, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de EU como en Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA). El "índice de EU según lo establecido en Kabat" se refiere a la numeración de los residuos del anticuerpo IgG1 EU humano tal como se describe en Kabat et al. supra. Fc se refiere a esta región en aislamiento, o esta región en el contexto de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc. Una proteína variante de Fc puede ser un anticuerpo, fusión de Fc o cualquier proteína o dominio de proteínas que comprenda una región Fc que incluye, pero no se limita a, proteínas que comprenden regiones Fc variantes, que son variantes de origen no natural de un Fc. Nota: Se han observado polimorfismos en varias posiciones Fc, que incluyen, pero no se limitan a, Kabat 270, 272, 312, 315, 356 y 358, y por lo tanto pueden existir ligeras diferencias entre la secuencia presentada y las secuencias en la técnica anterior.

La presente divulgación abarca proteínas variantes de Fc que tienen propiedades de unión alteradas para un ligando de Fc (por ejemplo, un receptor de Fc, C1q) con respecto a una molécula comparable (por ejemplo, una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos, excepto que tiene una región de Fc de tipo silvestre). Los ejemplos de propiedades de unión incluyen, pero no se limitan a, especificidad de unión, constante de disociación de equilibrio (K_D), tasas de disociación y asociación (k_{off} y k_{on} respectivamente), afinidad de unión y/o avidez. En general, se entiende que una molécula de unión (por ejemplo, una proteína variante de Fc, como un anticuerpo) con una K_D baja puede ser preferible a una molécula de unión con una K_D alta. Sin embargo, en algunos casos, el valor de k_{on} o k_{off} puede ser más relevante que el valor de K_D . Un experto en la técnica puede determinar qué parámetro cinético es el más importante para una aplicación de anticuerpo dada.

Las afinidades y propiedades de unión de un dominio Fc para su ligando pueden determinarse mediante una variedad de métodos de ensayo in vitro (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar las interacciones Fc-FcγR, es decir, la unión específica de una región Fc a un FcγR que incluye, entre otros, los métodos de equilibrio (por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)), o cinética (por ejemplo, análisis BIACORE®) otros métodos, como ensayos de unión indirecta, inhibición competitiva ensayos, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), electroforesis en gel y cromatografía (por ejemplo, filtración en gel). Estos otros métodos pueden utilizar una etiqueta en uno o más de los componentes que se están examinando y/o emplear una variedad de métodos de detección que incluyen, pero no se limitan a, etiquetas cromogénicas, fluorescentes, luminiscentes o isotópicas. Se puede encontrar una descripción detallada de las afinidades y cinéticas de unión en Paul, W. E., ed., *Fundamental Immunology*, 4ta ed., Lippincott-Raven, Filadelfia (1999), que se centra en las interacciones anti-inmunógeno del cuerpo.

En una realización, la proteína variante de Fc tiene una unión mejorada a uno o más ligandos de Fc en relación con una molécula comparable. En otra realización, la proteína variante Fc tiene una afinidad por un ligando Fc que es por lo menos 2 veces, o por lo menos 3 veces, o por lo menos 5 veces, o por lo menos 7 veces, o por lo menos 10 veces, o por lo menos 20 veces, o por lo menos 30 veces, o por lo menos 40 veces, o por lo menos 50 veces, o por lo menos 60 veces, o por lo menos 70 veces, o por lo menos 80 veces, o por lo menos 90 veces, o por lo menos 100 veces, o por lo menos 200 veces mayor que la de una molécula comparable. En una realización específica, la proteína variante de Fc tiene una unión mejorada a un receptor de Fc. En otra realización específica, la proteína variante de Fc tiene una unión mejorada con el receptor de Fc FcγRIIIA. En aún otra realización específica, la proteína variante de Fc tiene una unión mejorada al receptor FcRn de Fc. En otra realización específica, la proteína variante de Fc tiene una unión mejorada a C1q con respecto a una molécula comparable.

La vida media en suero de las proteínas que comprenden regiones Fc se puede aumentar al aumentar la afinidad de unión de la región Fc por FcRn. En una realización, la proteína variante de Fc tiene una vida media en suero mejorada en relación con una molécula comparable.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada se une a los receptores Fc (FcRs) presentes sobre ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citotóxicos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula objetivo portadora de antígeno y posteriormente destruyen a la célula objetivo con citotoxinas. Los anticuerpos IgG específicos de alta afinidad dirigidos a la superficie de las células objetivo "dañan" las células citotóxicas y son absolutamente necesarias para dicha destrucción. La lisis de la célula objetivo es extracelular, requiere contacto directo de célula a célula y no implica complemento. Se contempla que, además de los anticuerpos, otras proteínas que comprenden regiones Fc, específicamente proteínas de fusión Fc, que tienen la capacidad de unirse específicamente a una célula objetivo portadora de antígeno, serán capaces de efectuar la citotoxicidad mediada por células. Por simplicidad, la citotoxicidad mediada por células que resulta de la actividad de una proteína de fusión Fc también se denomina en este documento actividad ADCC.

La capacidad de cualquier proteína variante de Fc particular para mediar la lisis de la célula objetivo por ADCC se puede evaluar. Para evaluar la actividad de la ADCC, se agrega una proteína variante de Fc de interés a las células objetivo en combinación con las células efectoras inmunitarias, que se pueden activar por los complejos de anticuerpos antigénicos que dan como resultado la citólisis de la célula objetivo. La citólisis en general se detecta

mediante la liberación de una etiqueta (por ejemplo, sustratos radiactivos, tintes fluorescentes o proteínas intracelulares naturales) de las células lisadas. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citotóxicos naturales (NK). Ejemplos específicos de ensayos de ADCC in vitro se describen en Wisecarver et al., 1985 79: 277-282; Bruggemann et al., 1987, J Exp Med 166: 1351-1361; Wilkinson et al., 2001, J Immunol Methods 258: 183-191; Patel et al., 1995 J Immunol Methods 184: 29-38. La actividad de ADCC de la proteína variante de Fc de interés también se puede evaluar in vivo, por ejemplo, en un modelo animal como aquel divulgado en Clynes et al., 1998, Proc. Natl Acad Sci. USA 95: 652-656.

En una realización, una proteína variante de Fc tiene una actividad de ADCC mejorada con respecto a una molécula comparable. En una realización específica, una proteína variante de Fc tiene una actividad ADCC que es por lo menos 2 veces, o por lo menos 3 veces, o por lo menos 5 veces o por lo menos 10 veces o por lo menos 50 veces o por lo menos 100 veces mayor que aquella de molécula comparable. En otra realización específica, una proteína variante de Fc tiene una unión mejorada con el receptor Fc γ RIIA y tiene una actividad de ADCC mejorada en relación con una molécula comparable. En otras realizaciones, la proteína variante de Fc tiene una actividad de ADCC mejorada y una vida media en suero mejorada en relación con una molécula comparable.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" y "CDC" se refieren a la lisis de una célula objetivo en presencia del complemento. La ruta de activación del complemento se inicia con la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula, un anticuerpo, por ejemplo, complejo con un antígeno relacionado. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., 1996, J. Immunol. Methods, 202: 163. En una realización, una proteína variante de Fc tiene una actividad CDC mejorada con respecto a una molécula comparable. En una realización específica, una proteína variante de Fc tiene una actividad de CDC que es por lo menos 2 veces, o por lo menos 3 veces, o por lo menos 5 veces o por lo menos 10 veces o por lo menos 50 veces o por lo menos 100 veces mayor que aquella de la molécula comparable. En otras realizaciones, la proteína variante de Fc tiene una actividad CDC mejorada y una vida media en suero mejorada en relación con una molécula comparable.

En una realización, la presente divulgación proporciona composiciones, en las que la región Fc comprende un residuo de aminoácido de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 313, 316, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 440 y 443 según se enumera por el índice de EU como se establece en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender un residuo de aminoácido de origen no natural en posiciones adicionales y/o alternativas conocidas por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; Publicaciones de Patente PCT WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 y WO 06/020114).

En una realización específica, la presente divulgación proporciona una composición de proteína variante Fc, en la que la región Fc comprende por lo menos un residuo de aminoácido de origen no natural seleccionado del grupo que consiste de 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241 L, 241Y, 241E, 241 R, 243W, 243L 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 251F, 252Y, 254T, 255L, 256E, 256M, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 296G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 305I, 313F, 316D, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H, 421K, 440Y y 434W según se enumera por el índice de EU como se establece en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender residuos de aminoácidos de origen no natural alternativos o adicionales conocidos por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; Publicaciones de Patente PCT WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752 y WO 05/040217).

En otra realización, la presente divulgación proporciona una composición de proteína variante Fc, en la que la región Fc comprende por lo menos un aminoácido de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 239, 330 y 332, según se enumera por el índice de EU como se establece en Kabat. En una realización específica, la presente divulgación proporciona una formulación de proteína de variante Fc, en la que la región Fc comprende por lo menos un aminoácido de origen no natural seleccionado del grupo que consiste de 239D, 330L y 332E, según se enumera por el índice de EU como se establece en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender aminoácidos adicionales de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 252, 254, y 256, según se enumera por el índice de EU como se establece en Kabat. En una realización específica, la presente divulgación proporciona una formulación de proteína de variante Fc, en la que la región Fc comprende por lo menos un aminoácido de origen no natural seleccionado del grupo que consiste de 239D, 330L y 332E, según se enumera por el índice de EU como se establece en Kabat y por lo menos un aminoácido de

origen no natural en una o más posiciones se seleccionan del grupo que consiste de 252Y, 254T y 256E, según se enumera por el índice de EU como se establece en Kabat.

En una realización, las variantes Fc de la presente divulgación se pueden combinar con otras variantes Fc conocidas tales como aquellas divulgadas en Ghetie et al., 1997, *Nat Biotech.* 15:637-40; Duncan et al, 1988, *Nature* 332:563-564; Lund et al., 1991, *J. Immunol* 147:2657-2662; Lund et al, 1992, *Mol Immunol* 29:53-59; Alegre et al, 1994, *Transplantation* 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, *Proc Natl. Acad Sci U S A* 92:11980-11984; Jefferis et al, 1995, *Immunol Lett.* 44:111-117; Lund et al., 1995, *Faseb J* 9:115-119; Jefferis et al, 1996, *Immunol Lett* 54:101-104; Lund et al, 1996, *J Immunol* 157:4963-4969; Armour et al., 1999, *Eur J Immunol* 29:2613-2624; Idusogie et al, 2000, *J Immunol* 164:4178-4184; Reddy et al, 2000, *J Immunol* 164:1925-1933; Xu et al., 2000, *Cell Immunol* 200:16-26; Idusogie et al, 2001, *J Immunol* 166:2571-2575; Shields et al., 2001, *J Biol Chem* 276:6591-6604; Jefferis et al, 2002, *Immunol Lett* 82:57-65; Presta et al., 2002, *Biochem Soc Trans* 30:487-490; Patentes de Estados Unidos Nos. 5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,528,624; 6,194,551; 6,737,056; 6,821,505; 6,277,375; Patente de los Estados Unidos Publication Nos. 2004/0002587 y publicaciones PCT WO 94/29351; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/060919; WO 04/029207; WO 04/099249; WO 04/063351. También se abarcan por la presente divulgación regiones Fc que comprenden supresiones, adiciones y/o modificaciones. Aún otras modificaciones/sustituciones/adiciones/ supresiones del dominio Fc serán evidentes para un experto en la técnica.

Los métodos para generar regiones Fc de origen no natural son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las sustituciones y/o supresiones de aminoácidos se pueden generar por métodos de mutagénesis, que incluyen, pero no se limitan a, mutagenesis dirigida al sitio (Kunkel, *Proc. Natl Acad Sci. USA* 82: 488-492 (1985)), mutagenesis PCR (Higuchi, en "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, pp. 177-183 (1990)), y mutagénesis en casete (Wells et al., *Gene* 34: 315-323 (1985)). Preferiblemente, la mutagénesis dirigida al sitio se realiza mediante el método de PCR de superposición y extensión (Higuchi, en "Tecnología de PCR: Principios y aplicaciones para la amplificación de ADN", Stockton Press, Nueva York, pp. 61-70 (1989)). La técnica de PCR de superposición-extensión (Higuchi, *ibid.*) También se puede utilizar para introducir cualquier mutación deseada en una secuencia objetivo (el ADN de partida). Por ejemplo, la primera ronda de PCR en el método de superposición y extensión implica amplificar la secuencia objetivo con un cebador externo (cebador 1) y un cebador de mutagénesis interna (cebador 3), y por separado con un segundo cebador externo (cebador 4) y un cebador interno (cebador 2), que produce dos segmentos de PCR (segmentos A y B). El cebador de mutagénesis interno (cebador 3) está diseñado para contener emparejamientos erróneos en la secuencia objetivo que especifica la mutación deseada. En la segunda ronda de PCR, los productos de la primera ronda de PCR (segmentos A y B) se amplifican por PCR utilizando los dos cebadores externos (cebadores 1 y 4). El segmento de PCR de longitud completa resultante (segmento C) se digiere con enzimas de restricción y el fragmento de restricción resultante se clona en un vector apropiado. Como primer paso de la mutagénesis, el ADN de partida (por ejemplo, que codifica una proteína de fusión Fc, un anticuerpo o simplemente una región Fc), se clona de forma operativa en un vector de mutagénesis. Los cebadores están diseñados para reflejar la sustitución de aminoácidos deseada. Otros métodos útiles para la generación de regiones Fc variantes son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nos. 5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,528,624; 6,194,551; 6,737,056; 6,821,505; 6,277,375; Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Nos. 2004/0002587 y Publicaciones PCT WO 94/29351; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/060919; WO 04/029207; WO 04/099249; WO 04/063351).

En algunas realizaciones, una proteína variante de Fc comprende una o más glucoformas modificadas por ingeniería genética, es decir, una composición de carbohidrato que está unida covalentemente a la molécula que comprende una región Fc. Las glucoformas diseñadas por ingeniería pueden ser útiles para una variedad de propósitos, que incluyen, pero no se limitan a, mejorar o reducir la función efectora. Las glucoformas diseñadas por ingeniería se pueden generar por cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de cepas de expresión modificadas por ingeniería genética, mediante coexpresión con una o más enzimas, por ejemplo DI N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT11), al expresar una molécula que comprende una región Fc en diversos organismos o estirpes celulares de diversos organismos, o al modificar los carbohidratos después de que se haya expresado la molécula que comprende la región Fc. Los métodos para generar glucoformas modificadas por ingeniería genética son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Umana et al, 1999, *Nat. Biotechnol* 17:176-180; Davies et al., 2001 *Biotechnol Bioeng* 74:288-294; Shields et al, 2002, *J Biol Chem* 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, *J Biol Chem* 278:3466-3473) Patentes de Estados Unidos No. 6,602,684; U.S. Ser. No. 10/277,370; U.S. Ser. No. 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; tecnología Potelligent™ (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); la tecnología de ingeniería de glucosilación GlycoMA™ (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Suiza). Véase, por ejemplo, documentos WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; Okazaki et al., 2004, *JMB*, 336: 1239-49.

5.15. Glucosilación de anticuerpos.

En aún otra realización, se modifica la glucosilación de anticuerpos utilizados de acuerdo con la divulgación. Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación puede alterarse, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por un antígeno objetivo. Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glucosilación dentro

de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de marco de región variable para eliminar así la glucosilación en ese sitio. Dicha aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dicho enfoque se describe con más detalle en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,714,350 y 6,350,861. También se

pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de un sitio de glucosilación presente en la región Fc (por ejemplo, Asparagina 297 de IgG). Adicionalmente, se pueden producir anticuerpos aglucosilados en células bacterianas que carecen de la maquinaria de glucosilación necesaria.

También se puede producir un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glucosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNAc bisectadas aumentadas. Se ha demostrado que tales patrones de glucosilación alterados aumentan la capacidad de anticuerpos de ADCC. Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula anfitriona con una maquinaria de glucosilación alterada. Las células con maquinaria de glucosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células anfitrionas en las que expresar anticuerpos recombinantes de la divulgación para producir así un anticuerpo con glucosilación alterada. Véase, por ejemplo, Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, as well as, Patente de los Estados Unidos No: US 6,946,292; Patente Europea No: EP 1,176,195; Publicaciones PCT WO 03/035835; WO 99/54342.

Los anticuerpos con patrón de glucosilación alterado también se pueden generar utilizando células anfitrionas eucariotas inferiores que comprenden una maquinaria de glucosilación modificada como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. US7029872, Publicación de Patente de Estados Unidos US20060148035A1.

5.16. Función efectora diseñada por ingeniería

Puede ser deseable modificar un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación con respecto a la función efectora, a propósito de mejorar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de enfermedades mediadas por células T, por ejemplo. Por ejemplo, los residuos de cisteína pueden introducirse en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o un aumento de la muerte celular mediada por el complemento y/o una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o una fagocitosis dependiente de anticuerpos. Véase, Caron et al., J. Exp. Med., 176: 119-1195 (1992) y Shopes, B., J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral aumentada también se pueden preparar utilizando entrecruzadores heterobifuncionales como se describe en Wolff et al., Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). También se puede diseñar un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y, por lo tanto, puede tener una lisis mejorada del complemento, fagocitosis dependiente de anticuerpos y/o capacidades ADCC. Véase, Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989).

Se conocen otros métodos de ingeniería de las regiones Fc de los anticuerpos para alterar las funciones efectoras en la técnica (por ejemplo, Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20040185045 y Publicación PCT No. WO 2004/016750, ambas otorgadas a Koenig et al., que describen la alteración de la región Fc para mejorar la afinidad de unión para FcγRIIB en comparación con la afinidad de unión para FcγRIIA, véase, también, las publicaciones de PCT No. WO 99/58572 otorgada a Armor et al., WO 99/51642 otorgada a Idusogie et al., y documento US No. 6,395,272 otorgada a Deo et al.). Los métodos para modificar la región Fc para disminuir la afinidad de unión a FcγRIIB también se conocen en la técnica (por ejemplo, Publicación de Patente de Estados Unidos No. 20010036459 y Publicación PCT No. WO 01/79299, ambas otorgadas a Ravetch et al.). Los anticuerpos modificados que tienen regiones Fc variantes con mayor afinidad de unión por FcγRIIA y/o FcγRIIB en comparación con una región Fc de tipo silvestre también se han descrito (por ejemplo, las publicaciones PCT Nos. WO 2004/063351, otorgada a Stavenhagen et al.).

Se pueden utilizar ensayos in vitro conocidos en la técnica para determinar si los anticuerpos anti-ICOS utilizados en composiciones y métodos de la divulgación son capaces de mediar en la ADCC, CDC y/o fagocitosis dependiente de anticuerpos, tales como aquellas descritas en este documento.

5.17. Fabricación/Producción de Anticuerpos Anti-ICOS

Una vez que se diseña un anticuerpo anti-ICOS deseado, el anticuerpo anti-ICOS se puede producir a escala comercial utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica para la fabricación de anticuerpos a gran escala. Por ejemplo, esto se puede lograr utilizando sistemas de expresión recombinantes tales como, pero no limitados a, aquellos descritos a continuación. Los anticuerpos (que incluyen los fragmentos de anticuerpos de los mismos) que se unen específicamente a un antígeno se pueden producir mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o mediante técnicas de expresión recombinante (véase la solicitud de Patente de Estados Unidos Ser. No. 12/116,512).

5.18. Sistemas de Expresión Recombinante

La expresión recombinante de un anticuerpo o variante del mismo, en general requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un

polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o una porción del mismo, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 6,331,415. Por lo tanto, los métodos para preparar una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene un anticuerpo que codifica una secuencia de nucleótidos se describen en este documento. Los métodos que son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica se pueden utilizar para construir vectores de expresión que contienen secuencias de codificación de anticuerpos y señales de control de transcripción y traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación genética in vivo. La divulgación, por lo tanto, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una porción del mismo, o una CDR de cadena pesada o ligera, operativamente ligado a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales Nos. WO 86/05807 y WO 89/01036; y la Patente de Estados Unidos No. 5,122,464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para la expresión de la cadena pesada completa, la cadena ligera completa o las cadenas pesada y ligera completas.

En otra realización, los anticuerpos anti-ICOS se pueden preparar utilizando recombinación homóloga dirigida para producir todos o porciones de los anticuerpos anti-ICOS (véase, Patente de Estados Unidos Nos. 6,063,630, 6,187,305 y 6,692,737). En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-ICOS se pueden preparar utilizando técnicas de recombinación aleatoria para producir todos o porciones de los anticuerpos anti-ICOS (véase, Patente de Estados Unidos Nos. 6,361,972, 6,524,818, 6,541,221 y 6,623,958). Los anticuerpos anti-ICOS también se pueden producir en células que expresan un anticuerpo de una secuencia genómica de la célula que comprende un locus de inmunoglobulina modificado utilizando recombinación homóloga específica del sitio mediada por Cre (véase, Patente de Estados Unidos No. 6,091,001). La estirpe de células anfitrionas puede derivarse de especies humanas o no humanas que incluyen, pero no se limitan a, ratón y hámster chino. Cuando se desea la producción de anticuerpos humanos o humanizados, la estirpe celular anfitrión debe ser una estirpe celular humana. Estos métodos se pueden utilizar ventajosamente para diseñar estirpes celulares estables que expresan permanentemente la molécula de anticuerpo.

Una vez que el vector de expresión se transfiere a una célula anfitriona mediante técnicas convencionales, las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo. Por lo tanto, la divulgación incluye células anfitrionas que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la divulgación o fragmentos del mismo, o una cadena pesada o ligera de la misma, o una porción del mismo, o un anticuerpo de cadena única de la divulgación, unido de manera operativa a un promotor heterólogo. En ciertas realizaciones para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores que codifican las cadenas pesadas y ligeras pueden expresarse conjuntamente en la célula anfitriona para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla a continuación.

Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión de anfitrión para expresar un anticuerpo anti-ICOS o porciones del mismo que se pueden utilizar en la ingeniería y generación de anticuerpos anti-ICOS (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5,807,715). Por ejemplo, células de mamíferos tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking et al., Gene, 45: 101 (1986) y Cockett et al., BioTechnology, 8: 2 (1990)). Adicionalmente, se puede elegir una cepa de células anfitrionas que modula la expresión de secuencias de anticuerpos insertadas, o modifica y procesa el producto genético del anticuerpo en la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y el procesamiento (por ejemplo, división) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células anfitrionas tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación post-traducciona de proteínas y productos genéticos. Se pueden elegir estirpes celulares apropiadas o sistemas anfitriones para asegurar la modificación y el procesamiento correctos del anticuerpo o la porción del mismo expresada. Para este fin, se pueden utilizar células anfitrionas eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado de la transcripción primaria, la glucosilación y la fosforilación del producto génico. Dichas células anfitrionas de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, células CHO, VERY, BHK, Hcla, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O y T47D, NS0 (una estirpe celular de mieloma murino que no produce endógenamente cualquier cadena de inmunoglobulina funcional), CRL7030 y HsS78Bst.

En una realización, las estirpes celulares humanas desarrolladas al immortalizar linfocitos humanos se pueden utilizar para producir recombinantemente anticuerpos anti-ICOS humanos monoclonales. En una realización, la estirpe celular humana PER.C6. (Crucell, Países Bajos) se puede utilizar para producir recombinantemente anticuerpos anti-ICOS humanos monoclonales.

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicho anticuerpo, para la generación de composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-ICOS, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, el sector de expresión de E. coli

- pUR278 (Ruther et al., EMBO, 12: 1791 (1983)), en el que la secuencia de codificación del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región de codificación lac Z para que se produzca una proteína de fusión; Vectores PIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem., 24: 5503-5509 (1989)); y similares, los vectores pGEX también se pueden utilizar para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por adsorción y unión a la matriz de afinidad glutatión-agarosa seguida de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para introducir sitios de división de proteasa de trombina y/o factor Xa en el polipéptido expresado de modo que el producto génico objetivo clonado se pueda liberar de la fracción GST.
- En un sistema de insectos, el virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) se utiliza como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia de codificación del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).
- En células anfitrionas de mamíferos, se pueden utilizar varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, la secuencia de codificación de interés del anticuerpo puede ligarse a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede luego insertarse en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en anfitriones infectados (por ejemplo, véase, Logan & Shenk, Proc. Natl Acad Sci. USA, 81: 355-359 (1984)). También pueden requerirse señales de iniciación específicas para la traducción eficiente de secuencias de codificación de anticuerpos insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. Adicionalmente, el codón de iniciación debe estar en general en marco con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de traducción exógenas y codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase, por ejemplo, Bittner et al., Methods in Enzymol., 153: 51-544 (1987)).
- La expresión estable se puede utilizar para la producción a largo plazo y alto rendimiento de proteínas recombinantes. Por ejemplo, se pueden generar estirpes celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo. Las células anfitrionas pueden transformarse con un vector diseñado apropiadamente que comprende elementos de control de la expresión (por ejemplo, promotor, potenciador, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un gen etiqueta seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, se puede permitir que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. La etiqueta seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células que integran de manera estable el plásmido en sus cromosomas crezcan y formen focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en estirpes celulares. Los plásmidos que codifican un anticuerpo anti-ICOS se pueden utilizar para introducir el gen/ADNc en cualquier estirpe celular adecuada para la producción en cultivo.
- Se pueden utilizar varios sistemas de selección, que incluyen, pero no se limitan a, la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., Cell, 11: 223 (1977)), hipoxantineguanina fosforribosiltransferasa (Szybalski, Proc. Natl Acad Sci. USA, 48: 202 (1992)), y los genes de la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., Cell, 22: 8-17 (1980)) se pueden emplear en las células tk⁻, hgprt⁻ o aprT⁻, respectivamente. Adicionalmente, la resistencia a los antimetabolitos se puede utilizar como la base para la selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., Natl. Acad Sci. USA, 77: 357 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl Acad Sci. USA, 78: 1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan and Berg. Proc. Natl Acad Sci. USA, 78: 2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Wu and Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-5% (1993); Mulligan, Science 260: 926-932 (1993); y Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); May, TIB TECH 11 (5): 155-215 (1993)); e hyg^r, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., Gene, 30: 147 (1984)). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante pueden aplicarse de forma rutinaria para seleccionar el clon recombinante deseado, y dichos métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y in Chapters 12 y 13, Dracopoli et al. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol., 150:1.
- Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse mediante la amplificación del vector (para una revisión, véase, Bebbington y Hentschel, el uso de vectores basados en la amplificación de genes para la expresión de genes clonados en células de mamíferos en la clonación de ADN, vol. 3. Academic Press, Nueva York (1987)). Cuando una etiqueta en el sistema vector que expresa anticuerpos es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula anfitriona aumentará el número de copias del gen etiqueta. Dado que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse et al., Mol. Célula. Biol., 3: 257 (1983)). Los niveles de expresión de anticuerpos pueden amplificarse

mediante el uso de métodos y herramientas recombinantes conocidos por aquellos expertos en la técnica de la producción de proteínas recombinantes, que incluyen las tecnologías que remodelan la cromatina circundante y aumentan la expresión del transgén en forma de un dominio transcripcional artificial activo.

La célula anfitriona puede cotransfectarse con dos vectores de expresión, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener etiquetas seleccionables idénticos o diferentes. También se puede utilizar un solo vector que codifica, y es capaz de expresar, polipéptidos de cadena pesada y ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera se debe colocar a 5' de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, *Nature* 322: 562-65 (1986); y Kohler, 1980, *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 77: 2197 (1980)). Las secuencias de codificación para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que se ha producido una molécula de anticuerpo por expresión recombinante, se puede purificar por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por los antígenos específicos Proteína A o Proteína G, y cromatografía en columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Adicionalmente, los anticuerpos de la presente divulgación o fragmentos de los mismos pueden fusionarse a secuencias de polipéptidos heterólogas descritas en este documento o, de otro modo, conocidas en la técnica para facilitar la purificación.

5.19. Purificación y aislamiento de anticuerpos

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primer paso, los residuos particulados, ya sean células anfitrionas o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *BioTechnology*, 10: 163-167 (1992) describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan en el espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3.5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos celulares se pueden eliminar por centrifugación. Cuando el anticuerpo mutante se secreta en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión en general se concentran primero utilizando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de la proteasa, tal como el PMSF, se puede incluir en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes inesperados.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrofoba, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, diálisis y/o cromatografía de afinidad, ya sea sola o en combinación con otras etapas de purificación. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo mutante. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., *J. Immunol. Methods*, 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humano (Guss et al., *EMBO J.*, 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es con mayor frecuencia agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como el vidrio de poro controlado o el poli (estirenodivinil) benceno, permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH_3 , la resina Bakerbond ABX (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía en SEPHAROSE sobre un anión o resina de intercambio catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SDS-PAGE y la precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se puede someter a cromatografía de interacción hidrofóbica a bajo pH utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2.5-4.5, y realizarse a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0.25 M).

5.20. Anticuerpos anti-ICOS terapéuticos

Un anticuerpo anti-ICOS utilizado en composiciones y métodos de la divulgación puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado que puede mediar en el linaje de células T ADCC, fagocitosis dependiente de anticuerpos y/o CDC, o puede seleccionarse de anticuerpos anti-ICOS conocidos que puede mediar ADCC de células del linaje T, fagocitosis dependiente de anticuerpos y/o CDC. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-ICOS pueden ser anticuerpos quiméricos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-ICOS puede ser un anticuerpo anti-ICOS monoclonal humano, humanizado o quimérico. Un anticuerpo anti-ICOS utilizado en composiciones y métodos de la divulgación puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado del isotipo humano IgG1 o IgG3 o cualquier alelo IgG1 o IgG3 encontrado en la población humana. En otras realizaciones, un anticuerpo anti-ICOS

utilizado en composiciones y métodos de la divulgación puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado del isotipo humano IgG2 o IgG4 o cualquier alelo IgG2 o IgG4 encontrado en la población humana.

Si bien dichos anticuerpos se pueden generar utilizando las técnicas descritas anteriormente, en otras realizaciones de la divulgación, el anticuerpo anti-ICOS JMab-136 humano (véase la Patente de Estados Unidos No. 6,803,039) se puede modificar para generar un anticuerpo anti-ICOS con función efectora como, por ejemplo, ADCC, fagocitosis dependiente de anticuerpos y/o CDC. Por ejemplo, los anticuerpos anti-ICOS conocidos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales anti-ICOS humanos divulgados en la Patente de Estados Unidos No. 6,803,039 y el clon ISA-3 (eBioscience, EE.UU.).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo es una variante con cambio de isotipo de un anticuerpo conocido (por ejemplo, para un isotipo humano IgG1 o IgG3) tales como aquellos descritos anteriormente.

Un anticuerpo anti-ICOS utilizado en composiciones y métodos de la divulgación puede ser anticuerpos desnudos, inmunocnjugados o proteínas de fusión. Los anticuerpos anti-ICOS descritos anteriormente para uso en composiciones y métodos de la divulgación pueden ser capaces de reducir o agotar las células T que expresan ICOS y la inmunoglobulina circulante en un humano tratado con las mismas. El agotamiento de las células T puede estar en las células T circulantes, o en tejidos particulares como, por ejemplo, la médula ósea, el bazo, los tejidos linfoides asociados al intestino y/o los ganglios linfáticos. Dicho agotamiento se puede lograr a través de diversos mecanismos, tales como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o la fagocitosis dependiente de anticuerpos, y/o mediante el bloqueo de la interacción de ICOS con su ligando deseado, y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por "agotamiento" de las células T se entiende una reducción en las células T que expresan ICOS circulantes y/o células T que expresan ICOS en tejido(s) en particular en por lo menos aproximadamente el 25%, 40%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más. En realizaciones particulares, prácticamente todas las células T que expresan ICOS detectables se agotan de la circulación y/o tejido(s) particular(es). Por "agotamiento" de la inmunoglobulina circulante (Ig) se entiende una reducción de por lo menos aproximadamente el 25%, 40%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más. En realizaciones particulares, prácticamente toda la Ig detectable se agota de la circulación.

5.21. Cribado de anticuerpos para la unión de ICOS humano

Los ensayos de unión se pueden utilizar para identificar anticuerpos que se unen al antígeno ICOS humano. Los ensayos de unión se pueden realizar como ensayos de unión directa o como ensayos de unión competitiva. La unión se puede detectar mediante ELISA estándar o ensayos estándar de citometría de flujo. En un ensayo de unión directa, un anticuerpo candidato se analiza para determinar la unión al antígeno ICOS humano. En ciertas realizaciones, los ensayos de cribado comprenden, en una segunda etapa, la determinación de la capacidad de un anticuerpo para inducir eventos de señalización en dirección descendente en células T que expresan ICOS humana. Los ensayos de unión competitiva, por otro lado, evalúan la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un anticuerpo anti-ICOS conocido u otro compuesto que se une al ICOS humano.

En un ensayo de unión directa, el antígeno ICOS humano se pone en contacto con un anticuerpo candidato bajo condiciones que permiten la unión del anticuerpo candidato al antígeno ICOS humano. La unión puede tener lugar en solución o sobre una superficie sólida. El anticuerpo candidato puede haberse etiquetado previamente para detección. Se puede utilizar cualquier compuesto detectable para marcar, tal como, por ejemplo, un isótopo luminiscente, fluorescente o radiactivo, o un grupo que contenga el mismo, o una etiqueta no isotópica, como una enzima o tinte. Después de un período de incubación suficiente para que se produzca la unión, la reacción se expone a condiciones y manipulaciones que eliminan el exceso o el anticuerpo no específicamente unido. Por lo general, se trata de lavar con un tampón adecuado. Finalmente, se detecta la presencia de un complejo ICOS-anticuerpo.

En un ensayo de unión competitiva, un anticuerpo candidato se evalúa por su capacidad para inhibir o desplazar la unión de un anticuerpo anti-ICOS conocido (u otro compuesto) al antígeno ICOS humano. Un aglutinante conocido etiquetado de ICOS puede mezclarse con el anticuerpo candidato y colocarse en condiciones en las que normalmente se produciría la interacción entre ellos, con y sin la adición del anticuerpo candidato. La cantidad de aglutinante conocido etiquetado de ICOS que se une a la ICOS humana se puede comparar con la cantidad unida en presencia o ausencia del anticuerpo candidato.

En una realización, el ensayo de unión se lleva a cabo con uno o más componentes inmovilizados sobre una superficie sólida para facilitar la formación y detección del complejo de antígeno de anticuerpo. En diversas realizaciones, el soporte sólido podría ser, pero no está limitado a, polifluoruro de vinilideno, policarbonato, poliestireno, polipropileno, polietileno, vidrio, nitrocelulosa, dextrano, nylon, poliácridamida y agarosa. La configuración de soporte puede incluir perlas, membranas, micropartículas, la superficie interior de un recipiente de reacción, como una placa de microtitulación, un tubo de ensayo u otro recipiente de reacción. La inmovilización de la ICOS humana, u otro componente, se puede lograr mediante uniones covalentes o no covalentes. En una realización, la unión puede ser indirecta, es decir, a través de un anticuerpo unido. En otra realización, el antígeno ICOS humano y los controles negativos se etiquetan con un epitopo, como la glutatión S-transferasa (GST), de

modo que la unión a la superficie sólida puede estar mediada por un anticuerpo disponible comercialmente tal como el anti-GST (Santa Cruz). Biotechnology).

Por ejemplo, dicho ensayo de unión por afinidad se puede realizar utilizando el antígeno ICOS humano que está inmovilizado en un soporte sólido. Normalmente, el componente no movilizado de la reacción de unión, en este caso el anticuerpo anti-ICOS candidato, se marca para permitir la detección. Hay una variedad de métodos de etiquetado disponibles y se pueden utilizar, tales como isótopos luminiscentes, cromóforos, fluorescentes o radiactivos que contienen los mismos y etiquetas no isotópicas, como enzimas o colorantes. En una realización, el anticuerpo anti-ICOS candidato está etiquetado con un fluoróforo tal como isotiocianato de fluoresceína (FITC, disponible de Sigma Chemicals, St. Louis). Dicho ensayo de unión por afinidad se puede realizar utilizando el antígeno ICOS humano inmovilizado sobre una superficie sólida. Los anticuerpos anti-ICOS luego se incuban con el antígeno y la unión específica de los anticuerpos se detecta mediante métodos conocidos en la técnica, que incluyen pero no se limitan a, los análisis BiaCore, los métodos ELISA, FMET y RIA.

Finalmente, la etiqueta que permanece sobre la superficie sólida puede detectarse mediante cualquier método de detección conocido en la técnica. Por ejemplo, si el anticuerpo anti-ICOS candidato está etiquetado con un fluoróforo, se puede utilizar un fluorímetro para detectar complejos.

El antígeno ICOS humano se puede agregar a los ensayos de unión en forma de células intactas que expresan el antígeno ICOS humano o membranas aisladas que contienen antígeno ICOS humano. Por lo tanto, la unión directa al antígeno ICOS humano se puede ensayar en células intactas en cultivo o en modelos animales en presencia y ausencia del anticuerpo anti-ICOS candidato. Un anticuerpo anti-ICOS candidato etiquetado se puede mezclar con células que expresan el antígeno ICOS humano, o con extractos crudos obtenidos de dichas células, y se puede agregar el anticuerpo anti-ICOS candidato. Se pueden utilizar membranas aisladas para identificar los anticuerpos anti-ICOS candidatos que interactúan con el ICOS humano. Por ejemplo, en un experimento típico que utiliza membranas aisladas, las células pueden ser modificadas genéticamente para expresar el antígeno ICOS humano. Las membranas pueden recogerse mediante técnicas estándar y utilizarse en un ensayo de unión in vitro. El anticuerpo anti-ICOS candidato etiquetado (por ejemplo, un anticuerpo etiquetado con fluorescencia) se une a las membranas y se ensaya su actividad específica; la unión específica se determina por comparación con los ensayos de unión realizados en presencia de un exceso de anticuerpo anti-ICOS no etiquetado (frío). El antígeno ICOS humano soluble también puede expresarse de forma recombinante y utilizarse en ensayos no basados en células para identificar anticuerpos que se unen al antígeno ICOS humano. Los polipéptidos ICOS humanos expresados de forma recombinante se pueden utilizar en los ensayos de cribado no basados en células. Los péptidos correspondientes a una o más de las porciones de unión del antígeno ICOS humano, o proteínas de fusión que contienen una o más de las porciones de unión del antígeno ICOS humano también se pueden utilizar en sistemas de ensayo no basados en células para identificar anticuerpos que se unen a porciones de humano Antígeno ICOS. En ensayos no basados en células, la ICOS humana expresada de forma recombinante se une a un sustrato sólido como un tubo de ensayo, un pozo de microtitulación o una columna, por medios bien conocidos por aquellos expertos en la técnica (véase, Ausubel et al., supra). Los anticuerpos de prueba luego se ensayan para determinar su capacidad para unirse al antígeno ICOS humano.

La reacción de unión también se puede llevar a cabo en solución. En este ensayo, se permite que el componente etiquetado interactúe con su(s) pareja(s) de unión en solución. Si las diferencias de tamaño entre el componente etiquetado y su(s) pareja(s) de unión permiten tal separación, la separación se puede lograr al pasar los productos de la reacción de unión a través de un ultrafiltro cuyos poros permiten el paso del componente etiquetado no unido pero no de su socio de unión o del componente etiquetado unido a su socio. La separación también se puede lograr utilizando cualquier reactivo capaz de capturar un socio de unión del componente etiquetado de la solución, como un anticuerpo contra el socio de unión y así sucesivamente.

En otra realización específica, el soporte sólido es una membrana que contiene antígeno ICOS humano unido a una placa de microtitulación. Los anticuerpos candidatos, por ejemplo, pueden unir células que expresan anticuerpos de biblioteca cultivados en condiciones que permiten la expresión de los miembros de la biblioteca en la placa de microtitulación. Se cosechan los miembros de la biblioteca que se unen al ICOS humano. Tales métodos se describen en general a modo de ejemplo en Parmley and Smith, 1988, Gene, 73: 305-318; Fowlkes et al., 1992, BioTechniques, 13: 422-427; Publicación PCT No. WO94/18318; y en las referencias citadas anteriormente. Los anticuerpos identificados como unión al antígeno ICOS humano pueden ser de cualquiera de los tipos o modificaciones de anticuerpos descritos anteriormente.

5.21.1. Cribado de anticuerpos para la función efectora de ADCC humana

Los anticuerpos de la clase de IgG humana, que tienen características funcionales como una vida media tan larga en el suero y la capacidad de mediar diversas funciones efectoras, se utilizan en ciertas realizaciones de la divulgación (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., Chapter 1 (1995)). El anticuerpo de clase IgG humana se clasifica adicionalmente en las siguientes 4 subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Hasta el momento, se han realizado numerosos estudios para ADCC y CDC como funciones efectoras del anticuerpo de clase IgG, y se ha informado que entre los anticuerpos de clase IgG humana, la subclase IgG1 tiene la actividad ADCC y CDC más alta en humanos. (Chemical Immunology, 65, 88 (1997)).

La expresión de la actividad ADCC y la actividad CDC de los anticuerpos de la subclase IgG1 humana en general involucra la unión de la región Fc del anticuerpo a un receptor para un anticuerpo (en lo sucesivo, "FcγR") que existe sobre la superficie de las células efectoras, como los linfocitos citotóxicos, linfocitos citotóxicos naturales o macrófagos activados. Se pueden unir varios componentes del complemento. Con respecto a la unión, se ha sugerido que varios residuos de aminoácidos en la región bisagra y el segundo dominio de la región C (en lo sucesivo, "dominio Cγ2") del anticuerpo son importantes (Eur. J. Immunol., 23, 1098 (1993), Immunology, 86, 319 (1995), Chemical Immunology, 65, 88 (1997)) y que una cadena de azúcar en el dominio Cγ2 (Chemical Immunology, 65, 88 (1997)) también es importante.

Los anticuerpos anti-ICOS pueden modificarse con respecto a la función efectora, por ejemplo, para mejorar la ADCC y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede lograr al introducir una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo. Los residuos de cisteína también se pueden introducir en la región Fc, lo que permite la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. De esta manera, se puede generar un anticuerpo homodimérico que puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o un aumento de la muerte celular mediada por el complemento y ADCC (Caron et al., J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). Los entrecruzadores heterobifuncionales también se pueden utilizar para generar anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral mejorada (Wolff et al., Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993)). Los anticuerpos también pueden diseñarse para tener dos o más regiones Fc que resulten en una mejor capacidad de lisis del complemento y ADCC (Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, (3) 219-230 (1989)).

Otros métodos de ingeniería de las regiones Fc de los anticuerpos para alterar las funciones efectoras se conocen en la técnica (por ejemplo, Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20040185045 y Publicación PCT No. WO 2004/016750, ambas otorgadas a Koenig et al., que describen la alteración de la región Fc para mejorar la afinidad de unión para FcγRIIB cuando se compara con la afinidad de unión para FcγRIIA; véase también las Publicaciones PCT Nos. WO 99/58572 otorgada a Armour et al., WO 99/51642 otorgada a Idusogie et al., y U.S. 6,395,272 otorgada a Deo et al.). Los métodos para modificar la región Fc para reducir la afinidad de unión a FcγRIIB también se conocen en la técnica (por ejemplo, Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20010036459 y Publicación PCT No. WO 01/79299, ambas otorgadas a Ravetch et al.). Los anticuerpos modificados que tienen regiones Fc variantes con afinidad de unión mejorada para FcγRIIA y/o FcγRIIB cuando se compara con una región Fc tipo silvestre también se han descrito (por ejemplo, Publicación PCT No. WO 2004/063351, otorgada a Stavenhagen et al.).

Por lo menos se han encontrado cuatro diferentes tipos de FcγR, que se denominan respectivamente FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), y FcγRIV. En humanos, FcγRII y FcγRIII se clasifican adicionalmente en FcγRIIa y FcγRIIb, y FcγRIIIa y FcγRIIIb, respectivamente. El FcγR es una proteína de membrana que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas, FcγRII, FcγRIII, y FcγRIV tienen una cadena α que tiene una región extracelular que contiene tres dominios similares a inmunoglobulinas, como componente constituyente, y la cadena α está involucrada en la actividad de unión de IgG. Adicionalmente, FcγRI y FcγRIII tienen una cadena γ o una cadena ζ como componente constituyente que tiene una función de transducción de señales en asociación con la cadena α (Annu. Rev. Immunol., 18, 709 (2000), Annu. Rev. Immunol., 19, 275 (2001)). FcγRIV ha sido descrito por Bruhns et al., Clin. Invest. Med., (Canadá) 27: 3D (2004).

Para evaluar la actividad de ADCC de un anticuerpo anti-ICOS de interés, se puede utilizar un ensayo de ADCC in vitro, tal como aquel descrito en las Patente de los Estados Unidos No. 5,500,362 o 5,821,337. El ensayo también se puede realizar utilizando un kit disponible comercialmente, por ejemplo, CytoTox 96® (Promega). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen, pero no se limitan a células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Linfocitos citotóxicos naturales (NK) y estirpes celulares NK. Las estirpes de células NK que expresan un receptor de Fc transgénico (por ejemplo, CD16) y polipéptido de señalización asociado (por ejemplo, FCεRI-γ) también pueden servir como células efectoras (véase, por ejemplo, WO 2006/023148 A2 otorgada a Campbell). Por ejemplo, se puede ensayar la capacidad de cualquier anticuerpo particular para mediar la lisis de la célula objetivo mediante la activación del complemento y/o ADCC. Las células de interés se cultivan y se marcan in vitro; el anticuerpo se agrega al cultivo celular en combinación con células inmunitarias que se pueden activar por los complejos de anticuerpos antigénicos; es decir, células efectoras involucradas en la respuesta de ADCC. El anticuerpo también puede ser probado para la activación del complemento. En cualquier caso, la citólisis de las células objetivo se detecta mediante la liberación de la etiqueta de las células lisadas. El grado de lisis de las células objetivo también se puede determinar detectando la liberación de proteínas citoplásmicas (por ejemplo, LDH) en el sobrenadante. De hecho, los anticuerpos se pueden cribar utilizando el propio suero del paciente como fuente de complemento y/o células inmunitarias. Los anticuerpos que son capaces de mediar la ADCC humana en la prueba in vitro se pueden utilizar terapéuticamente en ese paciente en particular. La actividad de ADCC de la molécula de interés también se puede evaluar in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como aquel descrito en Clynes et al., Proc. Natl Acad Sci. (USA) 95: 652-656 (1998). Más aún las técnicas para modular (es decir, aumentar o disminuir) el nivel de ADCC, y opcionalmente la actividad de los CDC, de un anticuerpo son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 6,194,551. Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser capaces o pueden haber sido modificados para tener la capacidad de inducir ADCC y/o CDC. Los ensayos para determinar la función de ADCC se pueden practicar utilizando células efectoras humanas para evaluar la función de ADCC humana. Dichos ensayos también pueden incluir aquellos destinados a cribar anticuerpos que

inducen, median, mejoran, bloquean la muerte celular por mecanismos necróticos o apoptóticos. Dichos métodos, que incluyen los ensayos que utilizan tintes viables, los métodos de detección y análisis de caspasas y los ensayos que miden las rupturas de ADN, se pueden utilizar para evaluar la actividad apoptótica de las células cultivadas in vitro con un anticuerpo anti-ICOS de interés.

- 5 Por ejemplo, los ensayos de etiquetado del extremo libre por dUTP (TUNEL) mediado por Anexina V o TdT se pueden llevar a cabo como se describe en Decker et al., Blood (USA 103: 2718-2725 (2004) para detectar la actividad apoptótica. El ensayo TUNEL implica cultivar la célula de interés con dUTP etiquetado con fluoresceína para su incorporación en rupturas de la cadena de ADN. Las células se procesan para su análisis por citometría de flujo. El ensayo Anexina V detecta la aparición de fosfatidilserina (PS) en el exterior de la membrana plasmática de células apoptóticas utilizando una Anexina V conjugada con fluoresceína que reconoce específicamente las moléculas de PS expuestas. Al mismo tiempo, se puede utilizar un tinte viable tal como el yoduro de propidio para excluir las células apoptóticas tardías. Las células se tiñen con la anexina V marcada y se analizan mediante citometría de flujo.

5.22. Inmunoconjugados y proteínas de fusión.

- 15 De acuerdo con ciertos aspectos de la divulgación, los agentes terapéuticos o toxinas se pueden conjugar con anticuerpos anti-ICOS para su uso en composiciones y métodos de la divulgación. En ciertas realizaciones, estos conjugados se pueden generar como proteínas de fusión. Ejemplos de agentes terapéuticos y toxinas incluyen, pero no se limitan a, miembros de la familia de moléculas enedina, tales como caliqueamicina y esperamicina. Las toxinas químicas también pueden tomarse del grupo que consiste en duocarmicina (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5,703,080 y la Patente de Estados Unidos No. 4,923,990), metotrexato, doxorubicina, melfalán, clorambucilo, ARA-C, vindesina, mitomicina C, cis-platino, etopósido, bleomicina y 5-fluorouracilo. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos también incluyen adriamicina, doxorubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina (Ara-C), ciclofosfamida, tiotepa, taxoter (docetaxel), busulfán, Busulfan, Citoxina, Taxol, Metotrexato, Cisplatino, Melfalan, Vinblastina, Bleomicina, Etopósido, Ifosfamida, Mitomicina C, Mitoxantrona, Vincristina, Vinorelbina, Carboplatino, Teniposido, Daunomicina, Carminomicina, Aminopterina, Dactinomicina, Mitomicinas, Esperamicinas (véase, Patente de los Estados Unidos No. 4,675,187), Melfalan, y otras mostazas de nitrógeno relacionadas.

- En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-ICOS se conjugan con un agente citostático, citotóxico o inmunosupresor en el que el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un enedino, una lexitropsina, una duocarmicina, un taxano, una puomicina, una dolastatina, un maitansinoide, y un alcaloide de vinca. En ciertas realizaciones más específicas, el agente citotóxico es paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecan, morfolino-doxorubicina, rizoxina, cianomorfolinino-doxorubicina, dolastatin-10, ecqunomicina, combretastatina, caliqueamicina, maitansina, DM-1, auristatina E, AEB, AEVB, AEFP, MMAE (véase, Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 10/983,340), o netropsina.

- En ciertas realizaciones, el agente citotóxico de un conjugado de agente anti-ICOS citotóxico de la divulgación es un agente anti-tubulina. En realizaciones específicas, el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un alcaloide de vinca, una podofilotoxina, un taxano, un derivado de baccatina, una criptofisina, un maitansinoide, una combretastatina y una dolastatina. En otras realizaciones, el agente citotóxico es vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, paclitaxel, docetaxel, epirilona A, epirilona B, nocodazol, coichicina, colcimid, estramustina, cernadotina, discodermolida, maitansina, DM-1, AEFP, auristatina E, AEB, AEVB, AEFP, MMAE o eleuterobina.

En realizaciones específicas, un anticuerpo anti-ICOS se conjuga con el agente citotóxico a través de un ligador, en el que el ligador es un ligador peptídico. En otras realizaciones, un anticuerpo anti-ICOS se conjuga con el agente citotóxico a través de un ligador, en el que el ligador es un ligador val-cit, un ligador phe-lys, un ligador de hidrazona, o un ligador disulfuro.

- 45 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-ICOS de un conjugado de agente anti-ICOS citotóxico se conjuga con el agente citotóxico a través de un ligador, en el que el ligador es hidrolizable a un pH de menos de 5,5. En una realización específica, el ligador es hidrolizable a un pH menor de 5.0.

- En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-ICOS de un conjugado de agente anti-ICOS citotóxico se conjuga con el agente citotóxico a través de un ligador, en el que el ligador es dividible por una proteasa. En una realización específica, la proteasa es una proteasa lisosomal. En otras realizaciones, la proteasa es, entre otros, una proteasa asociada a la membrana, una proteasa intracelular o una proteasa endosomal.

- Otras toxinas que se pueden utilizar en los inmunoconjugados de la divulgación incluyen lectinas venenosas, toxinas vegetales tales como ricina, abrina, modeccin, botulina y toxinas de la difteria. Por supuesto, las combinaciones de las diversas toxinas también podrían acoplarse a una molécula de anticuerpo acomodando de esta manera la citotoxicidad variable. Ilustrativos de las toxinas que se emplean adecuadamente en las terapias de combinación de la divulgación son ricina, abrina, ribonucleasa, ADNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antiviral de hierba carmín, gelonina, toxina diftérica, exotoxina Pseudomonas y endotoxina Pseudomonas. Véase, por ejemplo, Pastan et al., Cell, 47: 641 (1986), y Goldenberg et al., Cancer Journal for Clinicians, 44:43 (1994). Las toxinas

enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena de la difteria, los fragmentos activos no vinculantes de la toxina de la difteria, la cadena de la exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena de la ricina A, la cadena de la abrina A, la cadena de modeccin A, la cadena alfa-sarcina, Proteínas Aleurites fordii, proteínas diantinas, Proteínas Phytolaca americana (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de Sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restricocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado en octubre 28, 1993.

Las toxinas y los agentes quimioterapéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª ed. (Mack Publishing Co. 1995), y en Goodman And Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985). Aquellos expertos en la técnica conocen otras toxinas y/o agentes quimioterapéuticos adecuados.

La presente divulgación abarca adicionalmente anticuerpos (que incluyen fragmentos de anticuerpos o variantes de los mismos) que comprenden o se conjugan con un agente radiactivo adecuado para propósitos de diagnóstico. Ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, yodo (^{121}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{111}In , ^{112}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, $^{115\text{m}}\text{In}$), tecnecio (^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{135}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , y ^{97}Ru

Adicionalmente, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación (que incluye un scFv u otra molécula que comprende, o que consiste alternativamente en fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos), se puede acoplar o conjugarse con un ión metálico radiactivo utilizado con propósitos terapéuticos. Ejemplos de iones radiactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, emisores alfa tales como ^{213}Bi , u otros radioisótopos tales como ^{103}Pd , ^{135}Xe , ^{131}I , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{35}S , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , ^{90}Y , ^{117}In , ^{186}Re , ^{188}Re y ^{166}Ho . En realizaciones específicas, un anticuerpo o fragmento del mismo se une a los quelantes macrocíclicos que quelan iones radiometálicos, que incluyen pero no se limitan a, ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{166}Ho , y ^{153}Sm , a polipéptidos. En realizaciones específicas, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA). En otras realizaciones específicas, el DOTA se une a un anticuerpo de la divulgación o fragmento del mismo a través de una molécula ligadora. Los ejemplos de moléculas ligadoras útiles para conjugar DOTA con un polipéptido se conocen comúnmente en la técnica; véase, por ejemplo, DeNardo et al., Clin Cancer Res 4(10): 2483-90, 1998; Peterson et al., Bioconjug Chem 10(4): 553-7, 1999; y Zimmerman et al., Nucl Med Biol 26(8): 943-50, 1999.

Un anticuerpo anti-ICOS de la presente divulgación también se puede utilizar en ADEPT al conjugar el anticuerpo con una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, véase, documento WO81/01145) a un fármaco activo contra el cáncer. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la Patente de Estados Unidos No. 4,975,278. El componente enzimático del inmunocóncugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal manera que lo convierta en su forma más activa y citotóxica.

Las enzimas que son útiles en el método de esta divulgación incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como serratina proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y cathepsinas (tales como las cathepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácido; enzimas que dividen los carbohidratos, tales como la β -galactosidasa y la neuraminidasa, útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convocar fármacos derivados con α -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivados en sus aminos nitrógenos con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", también se pueden utilizar para convertir los profármacos en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)), conjugados de anticuerpo-abzima se puede preparar como se describe en el presente documento para el suministro de la abzima según se desee a porciones de un humano afectado por una enfermedad maligna de células T que expresa ICOS.

Los anticuerpos de esta descripción se pueden unir covalentemente a las enzimas mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tales como el uso de los reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales discutidos anteriormente. Las proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo anti-ICOS unido a por lo menos una porción funcionalmente activa de una enzima también pueden construirse utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger et al., Nature, 312: 604-608 (1984)).

Las modificaciones covalentes de un anticuerpo anti-ICOS se incluyen dentro del alcance de esta divulgación. Se pueden realizar por síntesis química o por división enzimática o química del anticuerpo, si corresponde. Otros tipos de modificaciones covalentes de un anticuerpo anti-ICOS se introducen en la molécula haciendo reaccionar residuos

de aminoácidos objetivos del anticuerpo con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos de terminal N o C.

Los residuos de cisteinilo se hacen reaccionar más comúnmente con α -haloacetatos (y las aminas correspondientes), tales como el ácido cloroacético o la cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. De forma similar, también se pueden utilizar reactivos de yodo. Los residuos de cisteinilo también se derivatizan por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidozilo)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metilo 2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los residuos de histidilo se derivan por reacción con dimetilpirocarbonato a pH 5.5-7.0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo también es útil; la reacción se puede realizar en cacodilato de sodio 0.1 M a pH 6.0.

Los residuos de terminal lisilo y amino se hacen reaccionar con anhídridos succínicos u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivación con estos agentes tiene el efecto de revertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para la derivación de residuos que contienen α -amino y/o residuos que contienen ϵ -amino incluyen imidoésteres tales como metil picolinimidato, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanediona y reacción catalizada por transaminasas con glixilato.

Los residuos de arginilo se modifican por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilgloxal, 2,3-butanediona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivación de los residuos de arginilo en general requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido a la alta pKa del grupo funcional guanidina. Adicionalmente, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos ϵ -amino de la lisina, así como con el grupo arginina epsilon-amino.

Se puede realizar la modificación específica de los residuos de tirosilo, con particular interés en la introducción de etiquetas espectrales en los residuos de tirosilo por reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Más comúnmente, se utilizan N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente. Los residuos de tirosilo se yodan utilizando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas marcadas para su uso en radioinmunoensayo.

Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimidas ($\text{R-N}=\text{C}=\text{N-R}'$), en las que R y R' son grupos alquilo diferentes, como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinilo)-4-etil carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Adicionalmente, los residuos de aspartilo y glutamilo se convierten en residuos de asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones de amonio.

Los residuos de glutaminilo y asparaginilo se desaminan frecuentemente a los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente. Estos residuos son desamidados en condiciones neutras o básicas. La forma desaminada de estos residuos se encuentra dentro del alcance de esta divulgación.

Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de los grupos hidroxilo de los residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilación de la amina de terminal N, y la amidación de cualquier grupo carboxilo de terminal C.

Otro tipo de modificación covalente implica el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción del anticuerpo en una célula anfitriona que tiene capacidad de glucosilación para la glucosilación ligada a N o O. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, los azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como aquellos de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como aquellos de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como aquellos de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987 y en Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, Pp. 259-306 (1981).

5.23. Combinaciones quimioterapéuticas

De acuerdo con la divulgación, el cáncer o uno o más de sus síntomas se pueden evitar, tratar, manejar o mejorar mediante la administración de una formulación de anticuerpo anti-ICOS en combinación con la administración de una o más terapias tales como, pero no limitadas a, quimioterapias., terapias de radiación, terapias hormonales y/o terapias biológicas/inmunoterapias.

En una realización específica, los métodos de la divulgación abarcan la administración de uno o más antagonistas de la angiogénesis, tales como, pero no limitados a: angiostatina (fragmento de plasminógeno); antitrombina III antiangiogénica; Angiozima; ABT-627; Bahía 12-9566; Benefin Bevacizumab; BMS-275291; inhibidor derivado del cartílago (CDI); CAI; Fragmento de complemento CD59; CEP-7055; Col 3; Combretastatina A-4; Endostatina (fragmento del colágeno XVIII); Fragmento de fibronectina; Gro-beta; Halofuginona; Heparinasas; Fragmento de hexasacárido de heparina; HMV833; Gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; Interferón alfa/beta/gamma; Proteína inducible por interferón (IP-10); Interleuquina-12; Kringle 5 (fragmento de plasminógeno); Marimastat;

Inhibidores de la metaloproteínasa (TIMPs); 2-metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; Inhibidor de la ribonucleasa placentaria; Inhibidor del activador de plasminógeno; Factor plaquetario-4 (PF4); Prinomastat; Fragmento de prolactina de 16 kD; Proteína relacionada con proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; Retinoides; Solimastat; Escualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; 5 Tetrahydrocortisol-S; tetratiomolibdato; talidomida; Trombospondina-1 (TSP-1); TNP-470; Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β); Vasculostatina; Vasostatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD 6474; inhibidores de la farnesil transferasa (FTI); y bifosfonatos (tales como, pero no limitados a, alendronato, clodronato, etidronato, ibandronato, pamidronato, risedronato, tiludronato y zoledronato).

En una realización específica, los métodos de la divulgación abarcan la administración de uno o más agentes inmunomoduladores, tales como, pero no limitados a, agentes quimioterapéuticos y agentes inmunomoduladores no quimioterapéuticos. Ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos incluyen metotrexato, ciclosporina A, leflunomida, cisplatino, ifosfamida, taxanos tales como taxol y paclitaxol, inhibidores de topoisomerasa I (por ejemplo, CPT-11, topotecan, 9-AC, y GG- 211), gemcitabina, vinorelbina, oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, vinorelbina, temodal, citocalasina B, gramicidin D, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y homólogos de puomicina, y citoxan. Ejemplos de agentes inmunomoduladores no quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos del receptor de célula anti- T (por ejemplo anticuerpos, anti-CD4 (por ejemplo, cMT412 (Boeringer), IDEC-CE9.1® (IDEC y SKB), mAb 4162W94, Ortoclon y OKTcdr4a (Janssen-Cilag)), anticuerpos anti-CD3 (por ejemplo, Nuvion (Product Design Labs), OKT3 (Johnson & Johnson), o Rituxan (IDEC)), anticuerpos anti-CD5 (por ejemplo, un inmunodonzugado ligado a ricina anti-CD5), anticuerpos anti-CD7 (por ejemplo, CHH-380 (Novartis)), anticuerpos anti-CD8, anticuerpos monoclonales de ligando anti-CD40 (por ejemplo, IDEC-131 (IDEC)), anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, CAMPATH 1H (Ilex)), anticuerpos anti-CD2 (por ejemplo, MEDI-507 (MedImmune, Inc., Publicaciones Internacionales Nos. WO 02/098370 y WO 02/069904), anticuerpos anti-CD11a (por ejemplo, Xanelim (Genentech)), y anticuerpos anti-B7 (por ejemplo, IDEC-114) (IDEC)); anticuerpos del receptor de anti-citoquina (por ejemplo, anticuerpos del receptor anti-IFN, anticuerpos del receptor anti-IL-2 (por ejemplo, Zenapax (Protein Design Labs)), anticuerpos del receptor anti-IL-4, anticuerpos del receptor anti-IL-6, anticuerpos del receptor anti-IL-10, y anticuerpos del receptor anti-IL-12), anticuerpos anti-citoquina (por ejemplo, anticuerpos anti-IFN, anticuerpos anti-TNF- α , anticuerpos anti-IL-1 β , anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-IL-8 (por ejemplo, ABX-IL-8 (Abgenix)), anticuerpos anti-IL-12 y anticuerpos anti-IL-23)); CTLA4-inmunoglobulina; LFA-3TIP (Biogen, Publicación Internacional No. WO 93/08656 y Patente de los Estados Unidos No. 6,162,432); receptores de citoquina solubles (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor TNF- α o un fragmento del mismo, el dominio extracelular de receptor un IL-1 β o un fragmento del mismo, y el dominio extracelular de un receptor IL-6 o un fragmento del mismo); citoquinas o fragmentos de las mismas (por ejemplo, interleuquina (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-23, TNF- α , TNF- β , interferón (IFN)- α , IFN- β , IFN- γ , y GM-CSF); y anticuerpos anti-citoquina (por ejemplo, anticuerpos anti-IL-2, anti- anticuerpos IL-4, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-IL-10, anticuerpos anti-IL-12, anticuerpos anti-IL-15, anticuerpos anti-TNF- α , y anticuerpos anti-IFN- γ), y anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a antígenos asociados a tumores (por ejemplo, Herceptin®). En ciertas realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunomodulador diferente de un agente quimioterapéutico. En otras realizaciones un agente inmunomodulador es un agente inmunomodulador diferente de una citoquina o hematópoyético tal como IL-1, IL-2, IL-4, IL-12, IL-15, TNF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , M-CSF, G-CSF, IL-3 o eritropoyetina. En todavía otras realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente diferente de un agente quimioterapéutico y una citoquina o factor hematopoyético.

En una realización específica, los métodos de la divulgación abarcan la administración de uno o más agentes antiinflamatorios, tales como, pero no limitados a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), fármacos antiinflamatorios esteroideos, agonistas beta, anticolinérgicos agentes, y metilxantinas. Ejemplos de NSAID incluyen, pero no se limitan a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenac (VOLTAREN™), etodolac (LODINE™), fenoprofen (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketoralac (TORADOL™), oxaprozin (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindac (CLINORIL™), tolmentin (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Dichos NSAID funcionan al inhibir una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Ejemplos de fármacos esteroideos anti-inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE™), prednisolona, triamcinolona, azulfidina, y eicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos, y leucotrienos.

En otra realización específica, los métodos de la divulgación abarcan la administración de uno o más agentes antivíricos (por ejemplo, amantadina, ribavirina, rimantadina, aciclovir, famciclovir, foscarnet, ganciclovir, trifluridina, vidarabina, didanosina, estavudina, zalcitabina, zidovudina, interferón), antibióticos (por ejemplo, dactinomina (anteriormente actinomina), bleomicina, mitramicina, y antamicina (AMC)), anti-eméticos (por ejemplo, alprazolam, dexametasona, domperidona, dronabinol, droperidol, granisetron, haloperidol, haloperidol, lorazepam, metilprednisolona, metoclopramida, nabilona, ondansetron, proclorperazina), agentes antifúngicos (por ejemplo, anfotericina, clotrimazol, econazol, fluconazol, flucitosina, griseofulvina, itraconazol, ketoconazol, miconazol y nistatina), agentes anti-parásitos (por ejemplo, dehidroemetina, furoato de diloxanida, emetina, mefloquina,

melarsoprol, metronidazol, nifurtimox, paromomicina, pentabidina, isetionato de pentamidina, primaquina, quinacrina, quinidina) o una combinación de los mismos.

Ejemplos específicos de agentes contra el cáncer que se pueden utilizar en diversas realizaciones de la divulgación, incluyen composiciones farmacéuticas y formas de dosificación y kits, incluyen pero no se limitan a: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleuquina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramizina; asparaginasa; asperlin; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesin; sulfato de bleomicina; brequinar sodio; bropirimina; busulfan; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carrubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elsamitricina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sodio de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxurridina; fosfato de fludarrabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sodio; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxiaurea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofofina; interleuquina II (que incluye interleuquina recombinante II, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-1 a; interferón gamma-1 b; ioplatino; clorhidrato de irinotecan; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol sodio; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalan; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sodio; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamina; ormaplatino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobroman; piposulfan; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfimer sodio; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sodio; esparfomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrin; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sodio; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; teniposida; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; vinglucinato sulfato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato; de vinzolidina vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorrubicina. Otros agentes contra el cáncer incluyen, pero no se limitan a: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleuquina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolida; inhibidor de angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfognética anti-dorsalizing -1; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrogénico; antineoplaston; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; modulares del gen de apoptosis; reguladores de apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetron; azatoxina; azatirosina; derivados de baccatin III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilstaurosoprina; derivados de beta lactama; beta-aletina; betaclamicina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breffato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofostin C; derivados de camptotecina; canarypox IL-2; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado del cartílago; carzelesina; inhibidores de quinasa caseína (ICOS); castanospermina; cecropin B; cetorelix; colrins; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidin 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; dehidrodidemina B; deslorelinea; dexametasona; dexifosfamida; dextrazoxano; dexverapamil; diaziquona; didemnin B; didox; dietilnorspermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; espiromustina difenilo; docetaxel; docosanol; dolasetrona; doxifluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafrina gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatona; hepsulfam; heregulin; bisacetamida hexametileno; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofofina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina; agonistas del interferón; interferones interleuquinas; iobenguano; yododoxorrubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetron; jasplakinolida; kahalalida F; lamelarin-N triacetato; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinan; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de leucemia; interferón alfa de leucocitos; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido de disacárido lipófilo; compuestos lipofílicos de platino; lissoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina;

losoxantrona; inhibidor de reductasa HMG-CoA (tal como pero no se limita a, Lovastatina, Pravastatina, Fluvastatina, Statina, Simvastatina, y Atorvastatina); loxoribina; lurtotecan; lutetio texafirina; lysofillina; péptidos líticos; maitansina; mannostatina A; marimastat; masoprocol; maspin; inhibidores de matrilisina; inhibidores de la metaloproteínasa de matriz; menogaril; merbarona; meterelin; methioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltfosina; mirimostim; ARN de doble cadena con emparejamiento erróneo; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos mitotóxica-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A+micobacterias de la pared celular sk; mopidamol; inhibidor de genes de resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en supresor de tumores múltiples 1; agente anticancerígeno mostaza; micaperóxido B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona N-acetildinalina; Benzamidas N-sustituídas; nafarelin; nagrestip; naloxone+pentazocina; napavin; naphterpin; nartogastim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridróico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; nitróxido antióxidante; nitulina; O6- bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetron; ondansetron; oracina; inductor de citoquina oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrhizoxin; ácido pamidróico; panaxitriol; panomifeno; parabactin; pazelliptina; pegaspargasa; peldesina; pentosan polisulfato de sodio; pentostatina; pentozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perílico; fenazinomicina; acetato de fenilo; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetino A; placetino B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfimer sodio; porfiromicina; prednisona; bis-acridona de propilo; prostaglandina J2; inhibidores de proteasoma; modulador inmune basado en proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de la proteína quinasa C, microalgal; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de la fosforilasa de nucleósidos de purina; purpurinas; pirazoloacridina; polioxietileno conjugado de hemoglobina piridoxilada; antagonistas del raf; raltitrexed; ramosetron; inhibidores de la proteína farnesil transferasa ras; inhibidores de la ras; inhibidor de ras-GAP; retelliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohitukina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcositol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor derivado de la senescencia 1; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de transducción de señales; proteína de unión a antígeno de cadena única; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermin; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentin; espongistatina 1; ecualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; wstipiamida; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramin; swainsonina; glucosaminoglicanos sintéticos; talimustina; tamoxifen metiodida; tauromustina; tazaroteno; tecogalan sodio; tegafur; tellurapirilio; inhibidores de telomerasa; temoporfin; temozolomida; teniposida; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; thaliblastina; thiocoralina; trombopoyetina; trombopoyetina mimética; timalfasina; timopoietin receptor agonist; timotrinan; hormona estimulante de la tiroides; estaño etil etiopurpurina; tirapazamina; bicloruro de titanoceno topsentin; toremifeno; factor totipotente de células madre; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosina quinasa; tirfostinas; Inhibidores de la UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vaporeotida; variolin B; sistema vectorial, terapia génica de eritrocitos; velaesol; veramina; verdinas; verteporfin; vinorelbina; vinxaltina; Vitaxin®; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimulador de zinostatina. Otros fármacos contra el cáncer son el 5-fluorouracilo y la leucovorina. Estos dos agentes pueden ser útiles cuando se utilizan en métodos que emplean talidomida y un inhibidor de topoisomerasa. En realizaciones específicas, un agente contra el cáncer no es un agente quimioterapéutico.

En realizaciones más particulares, la presente divulgación también comprende la administración de una formulación de anticuerpo anti-ICOS en combinación con la administración de una o más terapias tales como, pero no limitadas a, agentes contra el cáncer tales como aquellas descritas en la Tabla 1, para el tratamiento de los cánceres de mama, ovario, melanoma, próstata, colon y pulmón como se describió anteriormente. Cuando se utiliza en una terapia de combinación, las dosis y/o la frecuencia de administración enumeradas en la Tabla 1 pueden disminuir.

Tabla 1 Agentes contra el cáncer

Agente Terapéutico		Dosis/Administración /Formulación	
clorhidrato de doxorubicina (Adriamycin RDF® y Adriamycin PFS®)	Intravenosa	2 60-75 mg/m ² en el Día 1	Intervalos de 21 días de
clorhidrato de epirubicina (Ellence™)	Intravenosa	100-120 mg/m ² en el Día 1 de cada ciclo o divididos en partes iguales en los días 1 a 8 del ciclo	ciclos de 3 a 4 semanas
fluorouracilo	Intravenoso	Cómo se suministra: frascos de 5 mL y 10 mL (que	

		contienen 250 y 500 mg de fluorouracilo respectivamente)	
docetaxel (Taxotere®)	Intravenoso	60-100 mg/m ² durante 1 hora	Una vez cada 3 semanas
paclitaxel (Taxol®)	Intravenoso	175 mg/m ² durante 3 horas	Cada 3 semanas durante 4 ciclos (administrado secuencialmente a la quimioterapia combinada que contiene doxorrubicina)
citrato de tamoxifeno (Nolvadex®)	Oral (comprimido)	Dosificaciones de 20-40 mg mayores de 20 mg se deben administrar en dosis divididas (por la mañana y por la noche)	Diariamente
Leucovorina de calcio para inyección	inyección intravenosa o intramuscular	Cómo se suministra: frasco de 350 mg	Dosis no está clara en texto. PDR 3610
acetato de luprolida Lupron®)	inyección subcutánea única	1 mg (0.2 mL o marca de 20 unidades)	Una vez al día
flutamida (Eulexin®)	Oral (cápsula)	50 mg (las cápsulas contienen 125 mg de flutamida cada una)	3 veces al día a intervalos de 8 horas (dosis diaria total 750 mg)
nilutamida (Nilandron®)	Oral (comprimido)	300 mg o 150 mg (los comprimidos contienen 50 o 150 mg de nilutamida cada una)	300 mg una vez al día durante 30 días seguidos de 150 mg una vez al día
bicalutamida (Casodex ®)	Oral (comprimido)	50 mg (los comprimidos contienen 50 mg de bicalutamida cada una)	Una vez al día
Progesterona	Inyección	USP en aceite de sésamo 50 mg/mL	
ketoconazol (Nizoral®)	Crema	2% de crema aplicada una o dos veces al día según los síntomas	
prednisona	Oral (comprimido)	La dosificación inicial puede variar de 5 mg a 60 mg por día, dependiendo de la entidad de enfermedad específica que se esté tratando.	
estramustina fosfato de sodio (Emcyt®)	Oral (cápsula)	14 mg/kg de peso corporal (es decir, una cápsula de 140 mg por cada 10 kg o 22 lb de peso corporal)	Diariamente administrada en 3 o 4 dosis divididas de
etopósido o VP16	Intravenoso	5 mL de solución de 20 mg/mL (100 mg)	
dacarbazina (DTIC-Dome®)	Intravenosa	2-4.5 mg/kg	Una vez al día durante 10 días. Puede repetirse a intervalos de 4 semanas
polifeprosan 20 con implante de carmustina (BCNU)	colocada en la cavidad de	8 obleas, cada una con 7.7 mg de carmustina, para un total de 61.6 mg, si el	

(nitrosourea) (Gliadel®)	resección	tamaño y la forma de la resección la cavidad permite	
cisplatino	Inyección	[n/a en PDR 861] Cómo se suministra solución de 1 mg/mL en frascos de dosis múltiples de 50 mL y 100 mL.	
mitomicina	Inyección	suministrada en frascos de 5 mg y 20 mg (que contienen 5 mg y 20 mg de mitomicina)	
HCl de gemcitabina (Gemzar®)	Intravenoso	Para NSCLC-2 se han investigado los programas y no se ha determinado el programa óptimo, administración de 4 semanas por vía intravenosa a 1000 mg/m ² durante 30 minutos en programa de 3 semanas: Gemzar administrado por vía intravenosa a 1250 mg/m ² en 30 minutos	Programa de 4 semanas: días 1, 8 y 15 de cada ciclo de 28 días. Cisplatino por vía intravenosa a 100 mg/m ² el día 1 después de la infusión de Gemzar. Programa de 3 semanas Días 1 y 8 de cada ciclo de 21 días. Cisplatino a dosis de 100 mg/m ² administrados por vía intravenosa después de la administración de Gemzar en el día 1.
carboplatino (Paraplatin®)	Intravenoso	Tratamiento con agente único: 360 mg/m ² I.V. en el día 1 (infusión que dura 15 minutos o más) Otros cálculos de dosificación: Terapia de combinación con ciclofosfamida, recomendaciones de ajuste de dosis, dosificación de fórmula, etc.	Cada 4 semanas
ifosamida (Ifex®)	Intravenosa	1.2 g/m ² al día	5 días consecutivos Repetir cada 3 semanas o después de la recuperación de la toxicidad hematológica
clorhidrato de topotecan	Intravenoso	1.5 mg/m infusión intravenosa durante 30 minutos al día,	5 días consecutivos, a partir del día 1 del curso de 21 días
Bifosfonatos Pamidronato Alendronato Risedronato	Intravenoso u oral, tomar con 6-8 oz de agua.	60 mg o 90 mg de perfusión única durante 4 a 24 horas para corregir la hipercalcemia en pacientes con cáncer 5 mg/d al día durante 2 años y luego 10 mg/d durante 9 meses para evitar o controlar la reabsorción ósea. 5.0 mg para prevenir o controlar la reabsorción ósea.	
Lovastatina (Mevacor™)	Oral	10-80 mg/día en una o dos dosis divididas.	

La divulgación también abarca la administración de una formulación de anticuerpo anti-ICOS de la divulgación en combinación con radioterapia que comprende el uso de rayos X, rayos gamma y otras fuentes de radiación para

destruir las células cancerosas. En realizaciones particulares, el tratamiento de radiación se administra como radiación de haz externo o teleterapia en la que la radiación se dirige desde una fuente remota. En otras realizaciones, el tratamiento de radiación se administra como terapia interna o braquiterapia en la que se coloca una fuente radiactiva dentro del cuerpo cerca de células cancerosas o una masa tumoral.

- 5 Las terapias contra el cáncer y sus dosis, las rutas de administración y el uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en la bibliografía como Physician's Desk Reference (56ª edición, 2002).

5.24. Anticuerpos que tienen vidas medias aumentadas

- 10 La presente divulgación proporciona formulaciones de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno de interés (por ejemplo, ICOS) que tienen una vida media extendida in vivo. En particular, la presente divulgación proporciona formulaciones de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno de interés (por ejemplo, ICOS) que tiene una vida media en un mamífero (por ejemplo, pero no limitado a, un humano), de más de 3 días, más de 7 días, más de 10 días, más de 15 días, más de 25 días, más de 30 días, más de 35 días, más de 40 días, más de 45 días, más de 2 meses, más de 3 meses, más de 4 meses o más de 5 meses.

- 15 Para prolongar la circulación en suero de anticuerpos (por ejemplo, pero no limitados a, anticuerpos monoclonales y anticuerpos de cadena única) o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, pero no limitados a, fragmentos de Fab) in vivo, por ejemplo, moléculas de polímeros inertes tales como polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular se puede unir a los anticuerpos (que incluyen fragmentos de anticuerpos de los mismos) con o sin un ligador multifuncional, ya sea a través de la conjugación específica del sitio del PEG al terminal N o C de los anticuerpos o a través de grupos épsilon-amino. Presente en los residuos de lisina. Se utilizará una derivación polimérica lineal o ramificada que resulte en una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se puede monitorizar de cerca mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación adecuada de las moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG no reaccionado se puede separar de los conjugados de anticuerpo-PEG por cromatografía de exclusión de tamaño o por cromatografía de intercambio iónico. Los anticuerpos derivados de PEG (que incluyen fragmentos de anticuerpos de los mismos) se pueden ensayar para determinar la actividad de unión así como la eficacia in vivo utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante inmunoensayos descritos en el presente documento.

- 20 Los anticuerpos que tienen una vida media aumentada in vivo también se pueden generar introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o supresiones) en un dominio constante de IgG, o en fragmento de unión al mismo a FcRn (por ejemplo, fragmento de dominio Fc para bisagra o Fc). Véase, por ejemplo, la publicación internacional No. WO 98/23289; Publicación Internacional No. WO 97/34631; y la Patente de Estados Unidos No. 6,277,375.

- 25 Adicionalmente, los anticuerpos (que incluyen fragmentos de anticuerpos de los mismos) se pueden conjugar con albúmina para hacer que el anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) sea más estable in vivo o tenga una vida media más larga in vivo. Las técnicas son bien conocidas en el arte, véase, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Nos. WO 93/15199, WO 93/15200 y WO 01/77137; y la Patente Europea No. EP 413, 622.

5.25. Métodos de preparación de las formulaciones de anticuerpos

- 30 La presente divulgación proporciona métodos para preparar formulaciones líquidas de anticuerpos o derivados, análogos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un antígeno de interés (por ejemplo, polipéptido ICOS humano). Los métodos para preparar formulaciones líquidas de la presente divulgación pueden comprender: purificar el anticuerpo (que incluye el fragmento de anticuerpo del mismo) del medio condicionado (ya sea lotes individuales o lotes combinados de medio) y concentrar una fracción del anticuerpo purificado (que incluye el fragmento de anticuerpo del mismo) a una concentración final de aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, o aproximadamente 300 mg/ml. Medio acondicionado que contiene el anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo), por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a ICOS se puede someter a filtración por CUNO y el anticuerpo filtrado se somete a cromatografía de intercambio de cationes HS50. La fracción de la cromatografía de intercambio catiónico HS50 se somete luego a un tratamiento de pH bajo seguido de cromatografía Hypercel MEP. La fracción de la cromatografía Hypercel MEP está sujeta a nanofiltración. El anticuerpo purificado o un fragmento del mismo obtenido después de la nanofiltración se somete luego a diafiltración y ultrafiltración a intercambio de tampón y se concentra en el tampón de formulación utilizando la misma membrana.

Las formulaciones líquidas de la presente divulgación se pueden preparar como formas de dosificación unitarias al preparar en un frasco que contiene una parte alícuota de la formulación líquida para un uso único. Por ejemplo, una dosificación unitaria por frasco puede contener 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml, o 20

ml de diferentes concentraciones de un anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) que se une específicamente a ICOS que varía desde aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml. Si es necesario, estas preparaciones se pueden ajustar a la concentración deseada al agregarse un diluyente estéril a cada frasco. En una realización específica, las formulaciones líquidas de la presente divulgación se formulan en frascos de dosificación única como un líquido estéril que contiene 10 mM de amortiguador de histidina a pH 6.0, 80 mM de NaCl, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80. Cada 1.0 mL de solución contiene 100 mg del anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo). En una realización, el anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) de la divulgación se suministra a 100 mg/ml en frascos de 3 cc de ámbar borosilicato tipo I de USP (West Pharmaceutical Services - No. de pieza 6800-0675). El volumen de llenado objetivo es de 1.2 mL.

Las formulaciones líquidas de la presente divulgación se pueden preparar como formas de dosificación unitaria al preparar una jeringa precargada que contiene una alícuota de la formulación líquida para un solo uso. Por ejemplo, una dosificación unitaria por jeringa precargada puede contener 0.1 ml, 0.2 ml, 0.3 ml, 0.4 ml, 0.5 ml, 0.6 ml, 0.7 ml, 0.8 ml, 0.9 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml, o 20 ml de diferentes concentraciones de un anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) que se une específicamente a ICOS que varía desde aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml. En una realización específica, las formulaciones líquidas de la presente divulgación se formulan en jeringas precargadas de dosis única como un líquido estéril que contiene 10 mM de amortiguador de histidina a pH 6.0, 80 mM de NaCl, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80. Cada 1.0 mL de solución contiene 100 mg del anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo).

Las formulaciones líquidas de la presente divulgación se pueden esterilizar mediante diversos métodos de esterilización, que incluyen filtración estéril, radiación, etc. En una realización específica, la formulación de anticuerpo diafiltrado se esteriliza por filtración con un filtro de 0.2 micras preesterilizado. Las formulaciones líquidas esterilizadas de la presente divulgación se pueden administrar a un sujeto para evitar, tratar y/o manejar una enfermedad o trastorno asociado o caracterizado por una expresión aberrante y/o actividad de ICOS, una enfermedad o trastorno asociado o caracterizado por una expresión aberrante y/o actividad del receptor ICOS, una enfermedad o trastorno autoinmunitario, una enfermedad o trastorno inflamatorio, una enfermedad o trastorno proliferativo de células T, una enfermedad maligna, una enfermedad maligna de células T, un rechazo de trasplante, una enfermedad de injerto contra anfitrión, o uno o más síntomas de los mismos.

Aunque la divulgación está dirigida a formulaciones líquidas no liofilizadas, debe señalarse con el propósito de equivalentes que las formulaciones de la divulgación pueden liofilizarse si se desea. Por lo tanto, la divulgación abarca formas liofilizadas de las formulaciones de la divulgación.

5.26. Métodos de monitorización de la estabilidad y agregación de formulaciones de anticuerpos

Hay varios métodos disponibles para evaluar la estabilidad de las formulaciones de proteínas, incluidas las formulaciones de anticuerpos, basadas en las estructuras físicas y químicas de las proteínas, así como en sus actividades biológicas. Por ejemplo, para estudiar la desnaturalización de proteínas, métodos tales como la absorción de transferencia de carga, el análisis térmico, espectroscopia de fluorescencia, dicroísmo circular (CD), RMN, electroforesis capilar en gel reductor (rCGE) y cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC), filtración de flujo tangencial (TFF), dispersión de luz estática (SLS), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), técnicas de despliegue de proteínas inducidas por urea, fluorescencia intrínseca del triptófano, calorimetría de barrido diferencial y técnicas de unión a proteína del ácido 1-anilino-8-naftalenosulfónico (ANS) están disponibles. Véase, por ejemplo, Wang et al., 1988, J. of Parenteral Science & Technology 42 (Suppl): S4-S26.

El rCGE y el HPSEC son los métodos más comunes y simples para evaluar la formación de agregados de proteínas, la degradación de proteínas y la fragmentación de proteínas. De acuerdo con lo anterior, la estabilidad de las formulaciones líquidas de la presente divulgación se puede evaluar mediante estos métodos.

Por ejemplo, la estabilidad de las formulaciones líquidas de la presente divulgación se puede evaluar mediante HPSEC, en la que el área de porcentaje de los picos representa el anticuerpo no degradado o los fragmentos de anticuerpo no degradado. En particular, se inyectan aproximadamente 250 µg del anticuerpo (que incluye el fragmento de anticuerpo del mismo) (aproximadamente 25 µl de una formulación líquida que comprende 10 mg/ml de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo) en una columna TosoH Biosep TSK G3000SW_{XL} (7.8 mm x 30 cm) equipado con una columna protectora TSK SW x1 (6.0 mm CX 4.0 cm). El anticuerpo (que incluye el fragmento de anticuerpo del mismo) se eluye isocráticamente con fosfato de sodio 0.1 M que contiene sulfato de sodio 0.1 M y azida de sodio al 0.05%, a un índice de flujo de 0.8 a 1.0 ml/min. La proteína eluida se detecta utilizando la absorbancia UV a 280 nm. Los estándares de referencia se ejecutan en el ensayo como controles, y los resultados se informan como el porcentaje de área del pico de monómero del producto en comparación con todos los demás picos, excluyendo el pico de volumen incluido observado en aproximadamente 12 a 14 minutos. Los picos que se eluyen antes del pico del monómero se registran como porcentaje agregado.

Las formulaciones líquidas de la presente divulgación exhiben niveles de agregación de bajos a indetectables según lo medido por cualquiera de los métodos descritos anteriormente, es decir, no más del 5%, no más del 4%, no más del 3%, no más del 2%, no más del 1%, y no más del 0.5% de agregados en peso de proteínas, y niveles bajos a

indetectables de fragmentación, es decir, 80% o más, 85% o más, 90% o más, 95% o más, 98 % o más alto, o 99%, o más alto, o 99.5% o más del área del pico total los picos que representan anticuerpos intactos (que incluyen fragmentos de anticuerpos de los mismos). Cuando se utiliza SDS-PAGE para medir la fragmentación del anticuerpo, se puede medir la densidad o la radiactividad de cada banda teñida o marcada con radioisótopo y se puede obtener el % de densidad o el % de radiactividad de la banda que representa anticuerpos no degradados (que incluyen fragmentos de anticuerpos de los mismos).

La estabilidad de las formulaciones líquidas de la presente divulgación también se puede evaluar mediante cualquier ensayo que mide la actividad biológica del anticuerpo en la formulación. Las actividades biológicas de los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, actividad de unión a antígeno, bloqueo de la interacción ligando-receptor, etc. (ver más abajo). La actividad de unión a antígeno de los anticuerpos (que incluyen los fragmentos de anticuerpos de los mismos) se puede medir mediante cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica, que incluye, pero no se limita a ELISA, el radioinmunoensayo, transferencia Western, y similares. Véase también Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988). Se puede utilizar un ensayo basado en ELISA, por ejemplo, para comparar la capacidad de un anticuerpo (que incluyen fragmentos de anticuerpo del mismo) para unirse específicamente a un polipéptido ICOS con aquel de un anticuerpo de referencia estándar.

La pureza de las formulaciones de anticuerpos líquidos de la divulgación se puede medir mediante cualquier método bien conocido por un experto en la técnica tal como, por ejemplo, pero no limitado a, HPSEC. La esterilidad de las formulaciones de anticuerpos líquidos se puede evaluar mediante cualquier método bien conocido por los expertos en la técnica, como, por ejemplo: medio de digestión de caseína de soja estéril y medio de tioglucolato líquido se inoculan con una formulación de anticuerpo líquido de prueba al filtrar la formulación líquida de anticuerpos a través de un filtro estéril con una porosidad nominal de 0.45 µm. Cuando se utiliza el método Sterisure™ o Steritest™, cada dispositivo de filtro se llena asépticamente con aproximadamente 100 ml de medio de digestión de caseína de soja estéril o medio fluido de tioglucolato. Cuando se utiliza el método convencional, el filtro expuesto se transfiere asépticamente a 100 ml de medio de digestión de caseína de soja estéril o medio fluido de tioglucolato. Los medios se incuban a temperaturas apropiadas y se observan tres veces durante un período de 14 días en busca de evidencia de crecimiento bacteriano o fúngico.

5.27. Métodos de administración de las formulaciones de anticuerpos

La divulgación proporciona métodos de prevención, tratamiento y/o manejo de un trastorno, por ejemplo, una enfermedad o trastorno asociado o caracterizado por una expresión y/o actividad aberrante de ICOS, una enfermedad o trastorno asociado o caracterizado por una expresión aberrante y/o actividad del receptor ICOS, una enfermedad o trastorno autoinmunitario, una enfermedad o trastorno inflamatorio, una enfermedad o trastorno proliferativo de células T, una enfermedad maligna, una enfermedad maligna de células T, un rechazo de trasplante, una enfermedad de injerto contra anfitrión, o uno o más síntomas de los mismos mediante la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de formulaciones líquidas de la divulgación. Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden utilizar para administrar una formulación líquida de la presente divulgación o un agente profiláctico o terapéutico. Los métodos para administrar las formulaciones líquidas de anticuerpos de la presente divulgación o una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico) incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, administración intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración tópica y administración de la mucosa (por ejemplo, pero no limitado a, rutas intranasales y orales). En una realización específica, las formulaciones líquidas de la presente divulgación se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. En una realización, las formulaciones líquidas de la divulgación se administran por vía subcutánea. Las formulaciones se pueden administrar por cualquier ruta conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección de bolos, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

La divulgación también proporciona una formulación líquida de la presente divulgación que se empaca en un recipiente herméticamente sellado, tal como una ampolla o sachette que indica la cantidad de anticuerpo (que incluye el fragmento de anticuerpo del mismo). En una realización, una formulación líquida de la presente divulgación está en un recipiente herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración del anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo). En una realización, una formulación líquida de la presente descripción se suministra en un recipiente herméticamente sellado y comprende aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 110 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 130 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, o aproximadamente 300 mg/ml de un anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) que se une específicamente a ICOS humano, en una cantidad de aproximadamente 1 ml, aproximadamente 2 ml, aproximadamente 3 ml, aproximadamente 4 ml, aproximadamente 5 ml, 6 aproximadamente ml, aproximadamente 7 ml, aproximadamente 8 ml, aproximadamente 9 ml, aproximadamente 10 ml, aproximadamente 15 ml, o aproximadamente 20 ml. En una realización específica de la divulgación, una formulación líquida de la divulgación se suministra en un recipiente herméticamente sellado y comprende por lo menos

aproximadamente 15 mg/ml, por lo menos aproximadamente 20 mg/ml, por lo menos aproximadamente 25 mg/ml, por lo menos aproximadamente 50 mg/ml, por lo menos aproximadamente 100 mg/ml, por lo menos aproximadamente 110 mg/ml, por lo menos aproximadamente 120 mg/ml, por lo menos aproximadamente 130 mg/ml, por lo menos aproximadamente 150 mg/ml, por lo menos aproximadamente 175 mg/ml, por lo menos aproximadamente 200 mg/ml, por lo menos aproximadamente 250 mg/ml o por lo menos aproximadamente 300 mg/ml de un anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) que se une específicamente a ICOS humano (por ejemplo, pero no se limita a, o un fragmento de unión a antígeno del mismo) para inyecciones intravenosas, y por lo menos aproximadamente 15 mg/ml, por lo menos aproximadamente 20 mg/ml, por lo menos aproximadamente 50 mg/ml, por lo menos aproximadamente 80 mg/ml, por lo menos aproximadamente 100 mg/ml, por lo menos aproximadamente 110 mg/ml, por lo menos aproximadamente 120 mg/ml, por lo menos aproximadamente 130 mg/ml, por lo menos aproximadamente 150 mg/ml, por lo menos aproximadamente 175 mg/ml, por lo menos aproximadamente 200 mg/ml, por lo menos aproximadamente 250 mg/ml o por lo menos aproximadamente 300 mg/ml de un anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) que se une específicamente a ICOS humano (por ejemplo, pero no se limita a, o un fragmento del mismo) para administración subcutánea repetida.

La cantidad de una formulación líquida de la presente divulgación que será efectiva en la prevención, tratamiento y/o manejo de una enfermedad o trastorno asociado o caracterizado por una expresión y/o actividad aberrante de ICOS, una enfermedad o trastorno asociado o caracterizado. por expresión aberrante y/o actividad del receptor ICOS, una enfermedad o trastorno autoinmunitario, una enfermedad o trastorno inflamatorio, una enfermedad o trastorno proliferativo de células T, una enfermedad maligna, una enfermedad maligna de células T, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra anfitrión, o se pueden determinar uno o más síntomas de los mismos mediante técnicas clínicas estándar bien conocidas en el arte o descritas en el presente documento. La dosis precisa que se empleará en la formulación también dependerá de la ruta de administración y la gravedad del trastorno inflamatorio o trastorno autoinmunitario, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba de modelos animales o in vitro.

5.28. Formulaciones farmacéuticas

La divulgación también se refiere a formulaciones inmunoterapéuticas y métodos para el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por células T en sujetos humanos, tales como, pero no limitados a, infección crónica, enfermedad o trastorno autoinmunitario, enfermedad o trastorno inflamatorio, enfermedad del injerto contra anfitrión (GVHD), rechazo de trasplante y trastorno proliferativo de células T en sujetos humanos, utilizando anticuerpos terapéuticos que se unen al antígeno ICOS y median la ADCC humana.

La presente divulgación se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-ICOS potenciados por la función efectora del isotipo humano IgG1 o IgG3. La presente divulgación también se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-ICOS humanos o humanizados del isotipo humano IgG2 o IgG4 que median la ADCC humana. En ciertas realizaciones, la presente divulgación también se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-ICOS monoclonales con un efector potenciado.

Las formulaciones terapéuticas y los regímenes se describen para el tratamiento de sujetos humanos diagnosticados con enfermedades autoinmunitarias, tales como, pero no limitadas a, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, púrpura trombocitopénica (PTI) sistémica, diabetes, soriasis y reacciones de hipersensibilidad (por ejemplo, alergias, fiebre de heno, asma y reacciones de hipersensibilidad tipo I provocadas por edema agudo). La presente divulgación también se relaciona con formulaciones y regímenes para el tratamiento de sujetos humanos diagnosticados con enfermedades inflamatorias crónicas, tales como, pero no limitadas a, enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa), enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto y diabetes mellitus.

Las formulaciones terapéuticas y los regímenes se describen para tratar sujetos humanos diagnosticados con tumores malignos de células T que se derivan de las células T que expresan ICOS y sus precursores.

En realizaciones particulares, una formulación de la divulgación comprende un anticuerpo anti-ICOS que puede mediar la ADCC, la citotoxicidad celular dependiente del complemento o la fagocitosis dependiente de anticuerpos, las formulaciones y los métodos de la presente divulgación también tienen la ventaja de dirigirse a una población más estrecha de T Células que otras inmunoterapias dirigidas por células T. Por ejemplo, las formulaciones de la presente divulgación pueden ser eficaces para dirigirse específicamente a las células T activadas, por ejemplo, pero sin limitarse a, las células T activadas. De acuerdo con lo anterior, los métodos y formulaciones de la divulgación pueden ser eficaces para reducir o agotar las células T CD4+ activadas circulantes, así como las células T CD8+ activadas.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la divulgación proporciona formulaciones de anticuerpos anti-ICOS para el tratamiento y la prevención de la GVHD y el rechazo del injerto, que están asociados con menos complicaciones y/o complicaciones menos graves que los agentes terapéuticos y regímenes menos específicos. En una realización, las formulaciones y los métodos de la divulgación se utilizan con dosis más bajas de agentes terapéuticos

tradicionales de lo que serían posibles en ausencia de los métodos y formulaciones de la divulgación. En otra realización, las formulaciones y los métodos de la divulgación obvian la necesidad de una forma más severa de terapia, tal como la terapia de radiación, quimioterapia de dosis alta o esplenectomía.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de anticuerpos anti-ICOS se pueden administrar a un paciente receptor de trasplante antes o después del trasplante, solos o en combinación con otros agentes terapéuticos o regímenes para el tratamiento o la prevención de la GVHD y el rechazo del injerto. Por ejemplo, las formulaciones de anticuerpos anti-ICOS se pueden utilizar para agotar las células T activadas de un receptor de trasplante antes o después del trasplante de un injerto alogénico. Las formulaciones de anticuerpos anti-ICOS también se pueden utilizar para agotar las células T activadas del injerto ex vivo, antes del trasplante, o en el donante, o como profilaxis contra la GVHD y el rechazo del injerto.

5.29. Formulaciones farmacéuticas, administración y dosificación.

Las formulaciones farmacéuticas de la divulgación contienen como ingrediente activo anticuerpos anti-ICOS con función efectora mejorada. Las formulaciones contienen anticuerpo desnudo, inmunoconjugado o proteína de fusión en una cantidad efectiva para producir la respuesta deseada en una unidad de peso o volumen adecuada para la administración a un paciente humano, y son preferiblemente estériles. La respuesta se puede medir, por ejemplo, al determinar los efectos fisiológicos de la formulación del anticuerpo anti-ICOS, tal como, pero no limitados a, agotamiento de las células T, el agotamiento de IL-17, la regresión de una enfermedad maligna de las células T o la disminución de los síntomas de la enfermedad. Un experto en la técnica conocerá otros ensayos y se pueden emplear para medir el nivel de la respuesta (por ejemplo, pero no limitado a SLEDAI, BILAG, PRO). Los ensayos adicionales que se pueden utilizar para monitorizar la respuesta incluyen, pero no se limitan a, inmunohistoquímica de biopsia de tejido (por ejemplo, Biopsia de piel), expresión de ARNm de ICOS en una muestra de tejido (por ejemplo, Biopsia de piel, biopsia de amígdalas, sangre), citometría de flujo de células de sangre, análisis de micromatrices de muestra de tejido (por ejemplo, biopsia de piel, sangre), análisis proteómico de muestra de tejido (por ejemplo, biopsia de piel, sangre), análisis de matriz de anticuerpos, análisis de SNP.

5.29.1. Administración y dosificación

La administración de las formulaciones de la divulgación a un paciente humano puede ser por cualquier ruta, que incluye, pero no se limita a, administración intravenosa, intradérmica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, inhalación (por ejemplo, mediante un aerosol), bucal (por ejemplo, sublingual), tópica (es decir, tanto en la piel como en las superficies de mucosa, que incluyen las vías respiratorias), intratecal, intraarticular, intraplural, intracerebral, intraarterial, intraperitoneal, oral, intralinfática, intranasal, rectal o vaginal, por perfusión a través de un catéter regional o por inyección intralesional directa. En una realización, las formulaciones de la divulgación se administran mediante inyección intravenosa o infusión intravenosa durante un período definido (por ejemplo, de 0.5 a 2 horas). Las formulaciones de la divulgación pueden entregarse por medios peristálticos o en forma de depósito, aunque la ruta más adecuada en cualquier caso dependerá, como es bien sabido en la técnica, de factores tales como la especie, edad, género y estado general del sujeto, la naturaleza y gravedad de la afección que se va a tratar y/o sobre la naturaleza de la formulación particular (es decir, dosis, formulación) que se está administrando. En realizaciones particulares, la ruta de administración es por bolo o infusión continua durante un período de tiempo, una o dos veces por semana. En otras realizaciones particulares, la ruta de administración es por inyección subcutánea, opcionalmente una, dos veces, tres veces o cuatro veces al mes. En una realización, las formulaciones y/o los métodos de la divulgación se administran de forma ambulatoria.

En ciertas realizaciones, la dosis de una formulación que comprende anticuerpo anti-ICOS se mide en unidades de mg/kg de peso corporal del paciente. En otras realizaciones, la dosis de una formulación que comprende anticuerpo anti-ICOS se mide en unidades de mg/kg de peso corporal magro del paciente (es decir, peso corporal menos contenido de grasa corporal). En aún otras realizaciones, la dosis de una formulación que comprende anticuerpo anti-ICOS se mide en unidades de mg/m² del área de superficie corporal del paciente. En aún otras realizaciones, la dosis de una formulación que comprende anticuerpo anti-ICOS se mide en unidades de mg por dosis administrada a un paciente. Cualquier medida de dosis se puede utilizar junto con formulaciones y los métodos de la divulgación y las unidades de dosificación se pueden convertir por medio del estándar en la técnica.

Aquellos expertos en la técnica apreciarán que las dosis pueden seleccionarse en función de una serie de factores que incluyen la edad, el sexo, la especie y el estado del sujeto (por ejemplo, etapa de la enfermedad), el grado deseado de agotamiento celular, la enfermedad que se va a tratar y/o el anticuerpo particular o el fragmento de unión a antígeno que se utiliza y puede ser determinado por un experto en la técnica. Por ejemplo, las cantidades efectivas de formulaciones de la divulgación se pueden extrapolar de las curvas de dosis-respuesta derivadas de los sistemas de prueba in vitro o de los sistemas de prueba del modelo animal (por ejemplo, mono o rata de algodón). Los modelos y métodos para la evaluación de los efectos de los anticuerpos son conocidos en la técnica (Wooldridge et al., Blood, 89(8): 2994-2998 (1997)). En ciertas realizaciones, para ICOS particulares que expresan enfermedades malignas de células T, los regímenes terapéuticos estándar en la técnica para la terapia con anticuerpos se pueden utilizar con formulaciones y métodos de la divulgación.

Ejemplos de regímenes de dosificación que se pueden utilizar en los métodos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, diariamente, tres veces por semana (intermitente), semanal, quincenal, mensual, bimensual o trimestral (una vez cada tres meses). En ciertas realizaciones, los regímenes de dosificación incluyen, pero no se limitan a, una dosificación mensual o una dosificación cada 6-8 semanas.

- 5 Aquellos expertos en la técnica apreciarán que las dosis son en general mayores y/o la frecuencia de administración es mayor para el tratamiento inicial en comparación con los regímenes de mantenimiento.

En algunas realizaciones de la divulgación, los anticuerpos anti-ICOS se unen a las células T que expresan ICOS y pueden resultar en agotamiento eficiente (es decir, a baja dosificación) de células T que expresan ICOS (como se describe en este documento). En ciertas realizaciones, las dosificaciones del anticuerpo (opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable como parte de una formulación farmacéutica) son por lo menos aproximadamente 0.0005, 0.001, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.375, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 37.5, o 50 mg/m² y/o menos de aproximadamente 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 60, 50, 37.5, 20, 15, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.375, 0.1, 0.075 o 0.01 mg/m². En ciertas realizaciones, la dosificación está entre aproximadamente 0.0005 a aproximadamente 200 mg/m², entre aproximadamente 0.001 y 150 mg/m², entre aproximadamente 0.075 y 125 mg/m², entre aproximadamente 0.375 y 100 mg/m², entre aproximadamente 2.5 y 75 mg/m², entre aproximadamente 10 y 75 mg/m², y entre aproximadamente 20 y 50 mg/m². En realizaciones relacionadas, la dosificación de anticuerpo anti-ICOS utilizado es por lo menos aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, 15, 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, 19.5, 20, 20.5 mg/kg de peso corporal de un paciente. En ciertas realizaciones, la dosis de anticuerpo anti-ICOS desnudo utilizado es por lo menos aproximadamente 1 a 10, 5 a 15, 10 a 20, o 15 a 25 mg/kg de peso corporal de un paciente. En ciertas realizaciones, la dosis de anticuerpo anti-ICOS utilizado es por lo menos aproximadamente 1 a 20, 3 a 15, o 5 a 10 mg/kg de peso corporal de un paciente. En otras realizaciones, la dosis de anticuerpo anti-ICOS utilizado es por lo menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, o 10 mg/kg de peso corporal de un paciente. En ciertas realizaciones, una unidad de dosificación única del anticuerpo (opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable como parte de una formulación farmacéutica) puede ser por lo menos aproximadamente 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, o 250 microgramos/m². En otras realizaciones, la dosis es hasta 100 mg por unidad de dosificación única.

En algunas realizaciones de los métodos de esta divulgación, los anticuerpos y/o formulaciones de esta divulgación se pueden administrar en una dosis menor de aproximadamente 375 mg/m²; en una dosis menor de aproximadamente 37.5 mg/m²; en una dosis menor de aproximadamente 0.375 mg/m²; y/o en una dosis entre aproximadamente 0.075 mg/m² y aproximadamente 125 mg/m². En ciertas realizaciones de los métodos de la divulgación, los regímenes de dosificación comprenden dosis bajas, administradas a intervalos repetidos. Por ejemplo, en una realización, las formulaciones de la divulgación se pueden administrar en una dosis menor de aproximadamente 375 mg/m² a intervalos de aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 20, 21, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 125, 150, 175, o 200 días.

La dosis especificada puede resultar en el agotamiento de células T que expresan ICOS en el humano tratado utilizando las formulaciones y métodos de la divulgación durante un período de por lo menos aproximadamente T 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 o 180 días o mayor. En ciertas realizaciones de los métodos de la divulgación, las células T que expresan ICOS se agotan en por lo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% en comparación con niveles de células T que expresan ICOS en el paciente que se trata antes del uso de las formulaciones y métodos de la divulgación. En otras realizaciones de los métodos de la divulgación, las células T que expresan ICOS se agotan en por lo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% en comparación con niveles de células T que expresan ICOS estándares típicos para humanos. En realizaciones relacionadas, los niveles de células T que expresan ICOS estándares típicos para humanos se determinan utilizando pacientes comparables al paciente que se está tratando con respecto a la edad, sexo, peso y otros factores.

En ciertas realizaciones de la divulgación, una dosificación de aproximadamente 125 mg/m² o menos de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno resulta en agotamiento de células T que expresan ICOS durante un periodo de por lo menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 200 días. En otra realización representativa, una dosificación de aproximadamente 37.5 mg/m² o menos agota células T que expresan ICOS durante un periodo de por lo menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 200 días. En aún otras realizaciones, una dosificación de aproximadamente 0.375 mg/m² o menos resulta en el agotamiento de células T que expresan ICOS durante por lo menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 45 o 60 días. En otra realización, una dosificación de aproximadamente 0.075 mg/m² o menos resulta en el agotamiento de células T que expresan ICOS durante un periodo de por lo menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 200 días. En todavía otras realizaciones, una dosificación de aproximadamente 0.01 mg/m², 0.005 mg/m² o incluso 0.001 mg/m² o menos resulta en el agotamiento de células T que expresan ICOS durante por lo menos aproximadamente 3, 5, 7, 10, 14,

21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 200 días. De acuerdo con estas realizaciones, la dosificación se puede administrar por cualquier ruta adecuada, pero se administra opcionalmente por una ruta subcutánea.

Como otro aspecto, la divulgación proporciona el descubrimiento de que el agotamiento y/o tratamiento de células T que expresan ICOS de trastornos mediados por células T se puede lograr a dosificaciones menores de anticuerpo o fragmentos de anticuerpo que se emplean en los métodos actualmente disponibles. Por lo tanto, en otra realización, la divulgación proporciona un método para agotar células T que expresan ICOS y/o tratar un trastorno mediado por células T, que comprende administrar a un humano, una cantidad efectiva de un anticuerpo que se une específicamente a ICOS, en el que una dosificación de aproximadamente 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 60, 50, 37.5, 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.375, 0.25, 0.1, 0.075, 0.05, 0.001, 0.0005 mg/m² o menos resulta en un agotamiento de células T que expresan ICOS (células T que expresan ICOS circulantes y/o de tejido) de 25%, 35%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o más durante un periodo por lo menos aproximadamente 3, 5, 7, 10, 14, 21, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, o 200 días o mayor. En realizaciones representativas, una dosificación de aproximadamente 125 mg/m² o 75 mg/m² o menos resulta en por lo menos aproximadamente 50%, 75%, 85% o 90% de agotamiento de células T que expresan ICOS durante por lo menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 60, 75, 90, 120, 150 o 180 días. En otras realizaciones, una dosificación de aproximadamente 50, 37.5 o 10 mg/m resulta en por lo menos aproximadamente un 50%, 75%, 85% o 90% de agotamiento de células T que expresan ICOS durante por lo menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 60, 75, 90, 120 o 180 días. En aún otras realizaciones, una dosificación de aproximadamente 0.375 o 0.1 mg/m resulta en por lo menos aproximadamente un 50%, 75%, 85% o 90% de agotamiento de células T que expresan ICOS durante por lo menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 60, 75 o 90 días. En realizaciones adicionales, una dosificación de aproximadamente 0.075, 0.01, 0.001, o 0.0005 mg/m² resulta en por lo menos aproximadamente un 50%, 75%, 85% o 90% de agotamiento de células T que expresan ICOS durante por lo menos aproximadamente 7, 14, 21, 30 o 60 días.

En ciertas realizaciones de la divulgación, la dosis se puede escalar o reducir para mantener una dosis constante en la sangre o en un tejido, tal como, pero no se limita a, médula ósea. En realizaciones relacionadas, la dosis se escala o reduce en aproximadamente 2%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, y 95% con el fin de mantener un nivel deseado de un anticuerpo de formulaciones y métodos de la divulgación.

En ciertas realizaciones, la dosificación se puede ajustar y/o la tasa de infusión se puede reducir en función de la respuesta inmunogénica del paciente a las formulaciones y los métodos de la divulgación.

Para las formulaciones de los anticuerpos, proteínas, polipéptidos, péptidos y proteínas de fusión abarcadas por la divulgación, la dosis administrada a un paciente puede calcularse utilizando el peso del paciente en kilogramos (kg) multiplicado por la dosis que se administrará en mg/kg. El volumen requerido (en mL) que se administrará se determinará tomando la dosis de mg requerida dividida por la concentración de la formulación del anticuerpo. El volumen requerido final calculado se obtendrá al agrupar los contenidos de tantos frascos como sean necesarios en la jeringa para administrar la formulación de anticuerpos de la divulgación. El volumen requerido final calculado se obtendrá al agrupar el contenido de tantos frascos como sea necesario en la jeringa) para administrar el fármaco. Se puede inyectar un volumen máximo de 2.0 mL de la formulación del anticuerpo por sitio. La dosis (en mL) se puede calcular utilizando la siguiente fórmula: Dosis (mL) = [peso del voluntario] (kg) × [dosis] mg/kg ÷ 100 mg/mL de la formulación del anticuerpo. En general, los anticuerpos humanos tienen una vida media más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos extraños. Por lo tanto, a menudo es posible una menor dosificación de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente. Adicionalmente, la dosificación, volumen y frecuencia de administración de las formulaciones líquidas de la presente divulgación se pueden reducir al aumentar la concentración de un anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) en las formulaciones, al aumentar la afinidad y/o la avidéz del anticuerpo (que incluye el fragmento de anticuerpo del mismo), y/o aumentar la vida media del anticuerpo (que incluye el fragmento de anticuerpo del mismo).

En una realización específica, la dosis administrada a un paciente se calculará utilizando el peso del paciente en kilogramos (kg) multiplicado por la dosis que se administrará en mg/kg. El volumen requerido (en mL) que se proporciona luego se determina al tomar la dosis de mg requerida dividida por la concentración del anticuerpo (que incluye el fragmento del mismo) en las formulaciones (100 mg/mL). El volumen requerido final calculado se puede obtener al agrupar el contenido de tantos frascos como sea necesario en la jeringa para administrar el fármaco. Se puede inyectar un volumen máximo de 2.0 mL de anticuerpo (que incluye el fragmento de anticuerpo del mismo) en las formulaciones por sitio.

En una realización, 0.01 a 20 mg/kg/semana, 0.01 a 10 mg/kg/semana, 0.01 a 5 mg/semana, 0.01 a 2 mg/semana, 0.01 a 1 mg/semana, 0.01 a 0.5 mg/semana, 0.01 a 0.2 mg/semana, 0.01 a 0.1 mg/semana de un anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) que se une específicamente a ICOS humano (por ejemplo, pero no se limita a, o un fragmento del mismo) en una formulación líquida de la divulgación se administra a un sujeto con un trastorno inflamatorio, un trastorno autoinmunitario o una enfermedad maligna. En otra realización, 0.01 a 20 mg/kg/mes, 0.01 a 10 mg/kg/mes, 0.01 a 5 mg/mes, 0.01 a 2 mg/mes, 0.01 a 1 mg/mes, 0.01 a 0.5 mg/mes, 0.01 a 0.2 mg/mes, 0.01 a 0.1 mg/mes de un anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) que se une específicamente a ICOS humano (por ejemplo, pero no se limita a, o un fragmento del mismo) en una formulación

líquida de la divulgación se administra a un sujeto con un trastorno inflamatorio, un trastorno autoinmunitario o una enfermedad maligna. En una realización adicional, 0.01 a 20 mg/kg/2 meses, 0.01 a 10 mg/kg/2 meses, 0.01 a 5 mg/2 meses, 0.01 a 2 mg/2 meses, 0.01 a 1 mg/2 meses, 0.01 a 0.5 mg/2 meses, 0.01 a 0.2 mg/2 meses, 0.01 a 0.1 mg/2 meses de un anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) que se une específicamente a ICOS humano (por ejemplo, pero no se limita a, o un fragmento del mismo) en una formulación líquida de la divulgación se administra a un sujeto con un trastorno inflamatorio, un trastorno autoinmunitario o una enfermedad maligna. En otra realización, a un sujeto se administra una o más dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de una formulación líquida de la divulgación, en la que la cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva no es la misma para cada dosis.

En una realización, una formulación líquida de la divulgación se administra en un régimen de dosificación que mantiene la concentración en plasma del anticuerpo específico para ICOS humano a un nivel deseable (por ejemplo, desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 100 µg/ml), que agota continuamente las células que expresan ICOS. En una realización específica, la concentración en plasma del anticuerpo se mantiene a aproximadamente 0.001 µg/ml, aproximadamente 0.01 µg/ml, aproximadamente 0.1 µg/ml, aproximadamente 0.2 µg/ml, aproximadamente 0.5 µg/ml, aproximadamente 1 µg/ml, aproximadamente 2 µg/ml, aproximadamente 3 µg/ml, aproximadamente 4 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 6 µg/ml, aproximadamente 7 µg/ml, aproximadamente 8 µg/ml, aproximadamente 9 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 15 µg/ml, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 25 µg/ml, aproximadamente 30 µg/ml, aproximadamente 35 µg/ml, aproximadamente 40 µg/ml, aproximadamente 45 µg/ml o aproximadamente 50 µg/ml. La concentración en plasma que es deseable en un sujeto variará dependiendo de diversos factores, que incluyen, pero no se limitan a, la naturaleza de la enfermedad o trastorno, la severidad de la enfermedad o trastorno y la afección del sujeto. Dichos regímenes de dosificación son especialmente beneficiosos en la prevención, tratamiento y/o manejo de una enfermedad crónica o trastorno.

En otra realización, a un sujeto humano se administra una o más dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une específicamente a ICOS humano en una formulación líquida de la divulgación, en la que la dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva del anticuerpo en la formulación líquida de la divulgación administrada a dicho sujeto se aumenta en, por ejemplo, aproximadamente 0.01 µg/kg, aproximadamente 0.02 µg/kg, aproximadamente 0.04 µg/kg, aproximadamente 0.05 µg/kg, aproximadamente 0.06 µg/kg, aproximadamente 0.08 µg/kg, aproximadamente 0.1 µg/kg, aproximadamente 0.2 µg/kg, aproximadamente 0.25 µg/kg, aproximadamente 0.5 µg/kg, aproximadamente 0.75 µg/kg, aproximadamente 1 µg/kg, aproximadamente 1.5 µg/kg, aproximadamente 2 µg/kg, aproximadamente 4 µg/kg, aproximadamente 5 µg/kg, aproximadamente 10 µg/kg, aproximadamente 15 µg/kg, aproximadamente 20 µg/kg, aproximadamente 25 µg/kg, aproximadamente 30 µg/kg, aproximadamente 35 µg/kg, aproximadamente 40 µg/kg, aproximadamente 45 µg/kg, aproximadamente 50 µg/kg, aproximadamente 55 µg/kg, aproximadamente 60 µg/kg, aproximadamente 65 µg/kg, aproximadamente 70 µg/kg, aproximadamente 75 µg/kg, aproximadamente 80 µg/kg, aproximadamente 85 µg/kg, aproximadamente 90 µg/kg, aproximadamente 95 µg/kg, aproximadamente 100 µg/kg, o aproximadamente 125 µg/kg, como progreso de tratamiento.

En otra realización, un sujeto (por ejemplo, un humano) se administra una o más dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une específicamente a ICOS humano en una formulación líquida de la divulgación, en la que la dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva del anticuerpo en la formulación líquida de la divulgación administrada a dicho sujeto se reduce en, por ejemplo, aproximadamente 0.01 µg/kg, aproximadamente 0.02 µg/kg, aproximadamente 0.04 µg/kg, aproximadamente 0.05 µg/kg, aproximadamente 0.06 µg/kg, aproximadamente 0.08 µg/kg, aproximadamente 0.1 µg/kg, aproximadamente 0.2 µg/kg, aproximadamente 0.25 µg/kg, aproximadamente 0.5 µg/kg, aproximadamente 0.75 µg/kg, aproximadamente 1 µg/kg, aproximadamente 1.5 µg/kg, aproximadamente 2 µg/kg, aproximadamente 4 µg/kg, aproximadamente 5 µg/kg, aproximadamente 10 µg/kg, aproximadamente 15 µg/kg, aproximadamente 20 µg/kg, aproximadamente 25 µg/kg, aproximadamente 30 µg/kg, aproximadamente 35 µg/kg, aproximadamente 40 µg/kg, aproximadamente 45 µg/kg, aproximadamente 50 µg/kg, aproximadamente 55 µg/kg, aproximadamente 60 µg/kg, aproximadamente 65 µg/kg, aproximadamente 70 µg/kg, aproximadamente 75 µg/kg, aproximadamente 80 µg/kg, aproximadamente 85 µg/kg, aproximadamente 90 µg/kg, aproximadamente 95 µg/kg, aproximadamente 100 µg/kg, o aproximadamente 125 µg/kg, como progreso de tratamiento.

Las dosificaciones de agentes profilácticos o terapéuticos se describen en Physicians' Desk Reference (60th ed., 2006).

5.29.2. Pruebas de toxicidad

La tolerancia, toxicidad y/o eficacia de las formulaciones y/o regímenes de tratamiento de la presente divulgación se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población), la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población), y la IC50 (la dosis efectiva para lograr una inhibición del 50%). En una realización, la dosis es una dosis eficaz para lograr por lo menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de agotamiento de las células T que expresan ICOS circulantes. La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50/ED50. Se pueden preferir las

terapias que exhiben grandes índices terapéuticos. Si bien se pueden utilizar terapias que muestran efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de suministro que dirija dichos agentes a las células que expresan ICOS para minimizar el daño potencial a las células negativas de ICOS y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden utilizar para formular un rango de dosificaciones de las formulaciones y/o regímenes de tratamiento para uso en humanos. La dosificación de dichos agentes puede estar dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier terapia utilizada en los métodos de la divulgación, se puede estimar una dosis terapéuticamente efectiva mediante modelos animales apropiados. Dependiendo de la especie del modelo animal, la dosis se puede escalar para uso humano de acuerdo con las fórmulas aceptadas en la técnica, por ejemplo, según lo proporciona Freireich et al., Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, monkey, dog, and human, Cancer Chemotherapy Reports, NCI 1966 40:219-244. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares pueden ser útiles para predecir la toxicidad potencial. Los estudios en animales se pueden utilizar para formular una dosis específica para lograr un rango de concentración en plasma circulante que incluya la IC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición de los síntomas a la mitad del máximo) determinada en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles de fármacos en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, ELISA o mediante ensayos basados en células.

5.30. Usos terapéuticos

Las formulaciones que comprenden un anticuerpo anti-ICOS con una función efectora mejorada se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes, púrpura trombocitopénica inmunitaria (ITP) y soriasis; enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa). Enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto y diabetes mellitus. Las formulaciones anti-ICOS descritas en el presente documento también se pueden utilizar para aliviar el síndrome de choque tóxico, la enfermedad inflamatoria intestinal, la alosensibilización debida a transfusiones de sangre, las enfermedades mediadas por células B dependientes de células T y el tratamiento de la enfermedad de injerto contra anfitrión. Adicionalmente, las formulaciones y los métodos de la divulgación pueden ser útiles en indicaciones terapéuticas que requieren la inhibición o el aumento de la producción de anticuerpos.

Las formulaciones que comprenden un anticuerpo anti-ICOS con una función efectora mejorada también se pueden utilizar como agentes inmunosupresores para el trasplante de médula ósea y órganos y se pueden utilizar para prolongar la supervivencia del injerto. Dichas formulaciones pueden proporcionar ventajas significativas sobre el tratamiento existente. La terapia de trasplante de médula ósea y órganos debe competir con el rechazo mediado por las células T de las células o tejidos extraños por parte del anfitrión. Los regímenes terapéuticos actuales para inhibir el rechazo mediado por células T incluyen el tratamiento con los fármacos ciclosporina o FK506. Mientras que los fármacos son efectivos, los pacientes sufren efectos secundarios graves, como hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y neurotoxicidad. El objetivo de la terapéutica de la ciclosporina/FK506 es la calcineurina, una fosfatasa con expresión ubicua. Dado que la expresión de ICOS se restringe a las células T, el agotamiento de las células T que expresan ICOS puede carecer de los efectos secundarios graves observados con el uso de los presentes agentes inmunoterapéuticos.

La hipersensibilidad es una respuesta inmunitaria normalmente beneficiosa que es exagerada o inapropiada y conduce a reacciones inflamatorias y daño tisular. Las reacciones de hipersensibilidad que están mediadas por anticuerpos pueden ser particularmente susceptibles al antagonismo por el agotamiento de las células que expresan ICOS. Las alergias, la fiebre del heno, el asma y el edema agudo provocan reacciones de hipersensibilidad de tipo I, y estas reacciones pueden suprimirse por el agotamiento de las células que expresan ICOS.

Las enfermedades que provocan reacciones de hipersensibilidad mediadas por anticuerpos, incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis (artritis reumatoide, artritis reactiva, artritis psoriásica), nefropatías (glomerulonefritis, tubulopatías mesangiocapilares, de segmentación focal, necrotizantes, crescánticas, proliferativas), trastornos de piel (eritema nodoso pénfigo y penfigoide), endocrinopatías (diabetes mellitus dependiente de insulina por tiroiditis de Grave, Hashimoto), varias neumopatías (especialmente alveolitis extrínseca), diversas vasculopatías, enfermedad celiaca, con producción aberrante de IgA, muchas anemias y trombocitopenias, síndrome de Guillain-Barre, y miastenia gravis se pueden tratar utilizando formulaciones que comprenden un anticuerpo anti-ICOS con una función efectora mejorada.

Adicionalmente, los trastornos linfoproliferativos, tales como mieloma múltiple, la macroglobulinemia de Waldenstrom y las crioglobulinemias se pueden inhibir al administrar una formulación que comprende un anticuerpo anti-ICOS con una función efectora mejorada. Adicionalmente, la enfermedad de injerto contra anfitrión, un trastorno inmunológico "artificial", puede beneficiarse del agotamiento de las células que expresan ICOS.

La ruta de coestimulación dependiente de ICOS está involucrada en la regulación de la producción de IgE. La IgE es un isotipo de inmunoglobulina involucrado específicamente en la mediación de respuestas alérgicas tales como el asma, las alergias alimentarias, la fiebre del heno, la hipersensibilidad tipo 1 y la inflamación sinusal. Tras la exposición a un alérgeno, un proceso que implica la colaboración de células T y células B produce una producción de células B de IgE específica para el alérgeno. Las IgE específicas de alérgenos liberadas en la circulación por las células B se unen a los mastocitos y basófilos a través del receptor de IgE de alta afinidad (FcεRI). Los mastocitos y basófilos a los que se une la IgE se sensibilizan y la exposición posterior al alérgeno da como resultado el entrecruzamiento de los receptores de superficie y la liberación de histaminas.

La divulgación proporciona el uso de un anticuerpo anti-ICOS para regular la producción de IgE y para evitar o tratar trastornos mediados por IgE. A modo de ejemplo, dichos trastornos incluyen respuestas alérgicas tales como asma, alergias alimentarias, fiebre del heno, hipersensibilidad e inflamación sinusal. En una realización, un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación se utiliza para inhibir parcial o completamente la producción de IgE. Un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación se puede utilizar por separado, o en combinación, en un régimen de tratamiento para disminuir los niveles de IgE.

La divulgación también proporciona el uso de un anticuerpo anti-ICOS en combinación con un antagonista de IgE para inhibir parcial o completamente la producción de IgE y para evitar y/o tratar trastornos caracterizados por una producción excesiva o inapropiada de IgE. Como se utiliza en el presente documento, el término "antagonista de IgE" se refiere a un compuesto capaz de interrumpir o bloquear la interacción de IgE con su receptor de alta afinidad FcεRI sobre células, de tal manera que la respuesta al estímulo alérgico se atenúa o se elimina. Los antagonistas incluyen un anticuerpo anti-IgE y fragmentos del mismo, un receptor soluble de FcεRI y fragmentos del mismo, un anticuerpo anti-FcεRI y fragmentos del mismo, variantes de IgE y fragmentos de los mismos, péptidos de unión a IgE, péptidos de unión a receptor de FcεRI y moléculas pequeñas capaces de unirse a IgE o competir con IgE para unirse al receptor FcεRI. Un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación también se puede utilizar en combinación con antihistamínicos, desensibilización de alérgenos, reducción de la exposición al alérgeno y similares para el tratamiento de trastornos alérgicos.

La divulgación también proporciona la prevención y/o el tratamiento del asma que comprende administrar un anticuerpo anti-ICOS de la divulgación solo o junto con uno o más agentes para tratar el asma. Los ejemplos de dichos agentes incluyen broncodilatadores (agentes anticolinérgicos, agonistas del receptor adrenérgico beta-2, antagonistas de leucotrieno D-4, antagonistas de neuroquinina, abridores de canales de potasio, antagonistas de la sustancia P, antagonistas de tromboxano A-2 y xantinas), antiinflamatorios (inhibidores de 5-lipoxigenasa, inhibidores de la proteína activadora de 5 lipoxigenasa, inhibidores de la fosfodiesterasa IV, antagonistas del factor activador de plaquetas, NSAID respiratorios, esteroides e inhibidores de la tirosina quinasa), inhibidores de la citoquina (inhibidores de CD4, IL-4 e IL-5) y antagonistas de IgE como se estableció anteriormente.

Las formulaciones y los métodos de acuerdo con esta divulgación pueden controlar (suprimir o estimular) la proliferación de células que expresan ICOS o la producción de citoquinas (por ejemplo, IL-17) por células que expresan ICOS, lo que permite la supresión de diversas afecciones patológicas y el tratamiento o prevención de Diversos trastornos causados por diversos fenómenos fisiológicos relacionados con la transducción de señales mediada por ICOS.

Las formulaciones que comprenden un anticuerpo anti-ICOS de esta divulgación permiten la supresión, la prevención y/o el tratamiento de, por ejemplo, pero sin limitarse a, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmunitaria, dermatitis alérgica de tipo de contacto, dermatosis inflamatoria crónica (por ejemplo, liquen planus), lupus crematoso sistémico, diabetes mellitus insulino dependiente, soriasis, trastornos autoinmunitarios o alérgicos, enfermedad autoinmunitaria y alergia tardía causada por la inmunidad celular; Artropatía (por ejemplo, pero no limitado a, artritis reumatoide (RA) y osteoartritis (OA)), inflamación (por ejemplo, hepatitis), reacción de injerto contra anfitrión (reacción de GVH), enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD), rechazo inmunitario que acompaña el trasplante de un tejido (por ejemplo, piel, córnea, hueso) u órgano (por ejemplo, hígado, corazón, pulmón, riñón, páncreas), respuesta inmunitaria desencadenada por un antígeno o autoantígeno extraño (por ejemplo, producción de anticuerpos contra dicho antígeno, proliferación celular), producción de citocinas) y trastornos provocados por la inmunidad intestinal anormal (por ejemplo, trastornos inflamatorios intestinales, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, alergia alimentaria).

Adicionalmente, las formulaciones y los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar para la supresión/tratamiento del rechazo de trasplantes o GVHD en combinación con agentes inmunosupresores conocidos, tales como inhibidores de la transcripción de citoquinas (por ejemplo, ciclosporina A, tacrolimus), síntesis de nucleótidos (por ejemplo, azathiopurine, micofenolato mofetilo), la transducción de la señal del factor de crecimiento (por ejemplo, sirolimus, rapamicina) y el receptor de interleucina 2 de las células T (por ejemplo, daclizumab, basiliximab). En una realización particular, un agente inmunosupresor utilizado en combinación con formulaciones y métodos de la divulgación incluye uno o más de los siguientes: adriamicina, azatiopurina, busulfan, ciclofosfamida, ciclosporina A ("CyA"), citoxina, fludarabina, 5-fluorouracilo, metotrexato, micofenolato mofetilo (MOFETIL), antiinflamatorios no esteroides (NSAID), rapamicina y tacrolimus (FK 506).

Las formulaciones y los métodos de la presente divulgación se pueden aplicar en enfermedades inflamatorias, por ejemplo, inflamación que acompaña a varias artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, osteoartritis), neumonía, hepatitis (que incluye hepatitis viral), inflamación que acompaña enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedades intestinales, enteritis, nefritis (por ejemplo, nefritis glomerular, nefrofibrosis), gastritis, angitis, pancreatitis, peritonitis, bronquitis, miocarditis, cerebritis, inflamación en la lesión por perfusión postisquémica (lesión por perfusión isquémica miocárdica), inflamación atribuida al rechazo inmunitario después del trasplante de tejido y órgano, quemaduras, diversas inflamaciones de la piel (soriasis, dermatitis alérgica de tipo de contacto, liquen plano), inflamación en múltiples fallas de órganos, inflamación después de la operación de PTCA o PTCR, e inflamación que acompaña la arteriosclerosis y tiroiditis autoinmunitaria.

Las formulaciones de la divulgación que comprenden un anticuerpo anti-ICOS con una función efectora mejorada como un ingrediente activo se pueden utilizar para inhibir, tratar y/o evitar una variedad de enfermedades, por ejemplo, pero no limitadas a artritis reumatoide, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmunitaria, dermatitis alérgica de contacto, liquen plano, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus dependiente de insulina, psoriasis, enfermedades autoinmunitarias o enfermedades alérgicas, alergias retardadas mediadas por la inmunidad celular; artropatías (por ejemplo, artritis reumatoide (RA), osteoartritis (OA)), inflamación (por ejemplo, hepatitis), reacción de injerto contra anfitrión (reacción de GVH), enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD), inmunorechazo asociado con trasplante de tejidos (por ejemplo, piel, córnea y hueso u órganos (por ejemplo, hígado, corazón, pulmón, riñón, páncreas), enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y alergia alimentaria.

Las formulaciones de acuerdo con la presente divulgación hacen posible tratar o evitar algunas inflamaciones para las cuales se utilizan varios fármacos esteroides como fármacos antiinflamatorios, por ejemplo, inflamación asociada con varias artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, osteoartritis), neumonía, hepatitis (que incluyen hepatitis viral), inflamación asociada con enfermedades infecciosas, enfermedad inflamatoria intestinal, enteritis, nefritis, nefritis glomerular, inflamación asociada con fibrosis renal, gastritis, vasculitis, pancreatitis, peritonitis, bronquitis, miocarditis, encefalitis, inflamación asociada con lesión por isquemia-reperfusión, lesión por isquemia-reperfusión miocárdica, inflamación asociada al inmunorechazo después de un trasplante de tejidos u órganos, soriasis, dermatitis alérgica de contacto, liquen plano, inflamación asociada a fallas de múltiples órganos, inflamación después de la operación de ACTP o RCPC, inflamación asociada con aterosclerosis y tiroiditis autoinmunitaria.

5.31. Trasplante

De acuerdo con ciertos aspectos de la divulgación, el régimen de tratamiento y la dosis utilizada con las formulaciones y los métodos de la divulgación se eligen en función de una serie de factores que incluyen, por ejemplo, una manifestación clínica que pone a un paciente en riesgo de desarrollar un rechazo de trasplante o evidencia clínica de que se está desarrollando dicho rechazo.

La presente divulgación proporciona formulaciones, métodos y regímenes eficaces para reducir la incidencia, gravedad o duración de la GVHD, un episodio de rechazo o un trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante. En ciertas realizaciones, las formulaciones y los métodos de la divulgación son eficaces para atenuar la respuesta del anfitrión a la lesión por perfusión isquémica de un tejido sólido o injerto de órgano. En una realización, las formulaciones y los métodos de la divulgación son eficaces para prolongar la supervivencia de un injerto en un receptor de trasplante.

La presente divulgación abarca injertos que son autólogos, alogénicos o xenogénicos para el receptor. Los tipos de injertos abarcados por la divulgación incluyen injertos de tejidos y órganos, que incluyen, pero no se limitan a, injertos de médula ósea, injertos de células madre periféricas, injertos de piel, injertos venosos y arteriales, injertos de células de islotes pancreáticos y trasplantes de riñón, hígado, páncreas, tiroides y corazón. Los términos "injerto" y "trasplante" se utilizan indistintamente en este documento. En una realización, el injerto autólogo es un injerto de médula ósea, un injerto arterial, un injerto venoso o un injerto de piel. En una realización, el aloinjerto es un injerto de médula ósea, un injerto de córnea, un trasplante de riñón, un trasplante de células de los islotes pancreáticos o un trasplante combinado de un riñón y páncreas. En una realización, el injerto es un xenoinjerto, en el que los posibles donantes de animales incluyen, pero no se limitan a cerdos. Las formulaciones y los métodos de la presente divulgación también se pueden utilizar para suprimir una respuesta inmunitaria perjudicial para un injerto o implante no biológico, que incluye, pero no se limita a, una articulación artificial, un stent o un dispositivo de marcapasos.

Los anticuerpos anti-ICOS, las formulaciones y los métodos de la divulgación se pueden utilizar para tratar o evitar la GVHD, el rechazo o el trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante sin tener en cuenta las indicaciones particulares que originan inicialmente la necesidad del trasplante o el tipo particular de tejido trasplantado.

Las formulaciones terapéuticas y los regímenes de la presente divulgación se describen para tratar sujetos humanos diagnosticados con enfermedades o trastornos autoinmunitarios, que incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, SLE, PTI, trastornos relacionados con el pénfigo, diabetes y esclerodermia.

Los regímenes de tratamiento apropiados pueden ser determinados por un experto en la técnica para el paciente particular o la población de pacientes. En realizaciones particulares, el régimen de tratamiento es un régimen de acondicionamiento previo al trasplante, un régimen de mantenimiento posterior al trasplante o un régimen de

tratamiento posterior al trasplante para un rechazo agudo o crónico. En ciertas realizaciones, el régimen particular se varía para un paciente que se considera que tiene un riesgo alto o intermedio de desarrollar una respuesta de rechazo, en comparación con el régimen para un paciente que se considera que tiene un bajo riesgo de rechazo.

En ciertas realizaciones, el régimen particular se varía de acuerdo con la etapa de rechazo, indicándose una terapia más agresiva para los pacientes en etapas posteriores de rechazo. Las etapas del rechazo humoral se pueden clasificar de acuerdo con el conocimiento y la habilidad en la técnica. Por ejemplo, las etapas del rechazo humoral se pueden clasificar como una de las etapas I a IV de acuerdo con los siguientes criterios: Etapa I Respuesta latente, caracterizada por aloanticuerpos anti-donadores circulantes, especialmente anticuerpos anti-HLA; Etapa II Reacción silenciosa, caracterizada por aloanticuerpos anti-donadores circulantes, especialmente anticuerpos anti-HLA y deposición de C4d, pero sin cambios histológicos o disfunción del injerto; Etapa III Rechazo subclínico: caracterizado por aloanticuerpos anti-donadores circulantes, especialmente anticuerpos anti-HLA, deposición de C4d y patología del tejido, pero sin disfunción del injerto. Etapa IV Rechazo humoral: caracterizado por aloanticuerpos anti-donadores circulantes, especialmente anticuerpos anti-HLA. Deposición de C4d, patología de tejidos y disfunción del injerto.

Los anticuerpos anti-ICOS, las formulaciones y los métodos de la divulgación se pueden practicar para tratar o evitar los trastornos linfoproliferativos de GVHD, rechazo o postrasplante, solos o en combinación con otros agentes terapéuticos o regímenes de tratamiento. Otros regímenes terapéuticos para el tratamiento o la prevención de los trastornos linfoproliferativos GVHD, rechazo o postrasplante pueden comprender, por ejemplo, uno o más de terapia anti-linfocitos, terapia con esteroides, terapia de agotamiento de anticuerpos, terapia de inmunosupresión y plasmaféresis.

La terapia anti-linfocitos puede comprender la administración al receptor de trasplante de globulinas anti-timocitos, también conocida como timoglobulina. La terapia anti-linfocitos también puede comprender la administración de uno o más anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie de células T. Ejemplos de dichos anticuerpos incluyen, sin limitación, OKT3™ (muromonab-CD3), CAMPATH™ -1H (alemtuzumab), CAMPATH™-1G, CAMPATH™-1M, SIMULECT™ (basiliximab) y ZENAPAX™ (daclizumab). En una realización específica, la terapia anti-linfocitos comprende uno o más anticuerpos dirigidos contra las células B, que incluye, sin limitación, RITUXAN™ (rituximab).

La terapia con esteroides puede comprender la administración al receptor de trasplante de uno o más esteroides seleccionados del grupo que consiste en cortisol, prednisona, metil prednisolona, dexametasona e indometacina. Uno o más de los esteroides pueden ser corticosteroides, que incluyen sin limitación, cortisol, prednisona y metilprednisolona.

La terapia de agotamiento de anticuerpos puede incluir, por ejemplo, la administración al receptor de trasplante de inmunoglobulina intravenosa. La terapia de reducción de anticuerpos también puede comprender una terapia de inmunoadsorción aplicada al injerto ex vivo, antes del trasplante. La inmunoadsorción se puede lograr utilizando cualquier técnica adecuada, por ejemplo, afinidad a la proteína A, o técnicas de afinidad basadas en anticuerpos que utilizan anticuerpos dirigidos contra etiquetas de superficie de células T o B tales como anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD19, anticuerpos anti-CD20, y Anticuerpos anti-CD22.

La terapia de inmunosupresión puede comprender la administración de uno o más agentes inmunosupresores tales como inhibidores de la transcripción de citoquinas (por ejemplo, ciclosporina A, tacrolimus), síntesis de nucleótidos (por ejemplo, azatiopurina, micofenolato mofetilo), transducción de señales del factor de crecimiento (por ejemplo, sirolimus, rapamicina) y el receptor de interleuquina 2 de células T (por ejemplo, daclizumab, basiliximab). En una realización particular, un agente inmunosupresor utilizado en combinación con formulaciones y métodos de la divulgación incluye uno o más de los siguientes: adriamicina, azatiopurina, busulfan, ciclofosfamida, ciclosporina A ("CyA"), citoxina, fludarabina, 5-fluorouracilo, metotrexato, micofenolato mofetilo (MOFETIL), antiinflamatorios no esteroides (NSAID), rapamicina y tacrolimus (FK506). Los agentes inmunosupresores también pueden comprender inhibidores de complemento, por ejemplo, receptor de complemento soluble 1, anticuerpo anti-C5 o un inhibidor de molécula pequeña de C1s, por ejemplo, como se describe en Buerke et al. (J. Immunol., 167: 5375-80 (2001)).

En una realización, las formulaciones y los métodos de la divulgación se utilizan en combinación con uno o más regímenes terapéuticos para suprimir el rechazo, que incluyen, sin limitación, terapia con mofetilo de tacrolimus y micofenolato, inmunoadsorción, terapia con inmunoglobulina intravenosa y plasmaféresis.

5.32. Trastorno inflamatorio

Los anticuerpos anti-ICOS de la divulgación se pueden administrar a un sujeto en necesidad de los mismos para evitar, manejar, tratar o mejorar un trastorno inflamatorio (por ejemplo, asma) o uno o más síntomas de los mismos. Las formulaciones de la divulgación también se pueden administrar en combinación con una o más terapias, preferiblemente terapias útiles para la prevención, manejo, tratamiento o mejora de un trastorno inflamatorio (que incluye, pero no se limita a, los agentes profilácticos o terapéuticos enumerados en este documento) a un sujeto en necesidad del mismo para evitar, manejar, tratar o mejorar un trastorno inflamatorio o uno o más síntomas de los mismos. En una realización específica, la divulgación proporciona un método para evitar, manejar, tratar o mejorar

un trastorno inflamatorio o uno o más síntomas de los mismos, dicho método comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un anti-ICOS anticuerpos de la divulgación. En otra realización, la divulgación proporciona un método para evitar, manejar, tratar o mejorar un trastorno inflamatorio o uno o más síntomas de los mismos, dicho método comprende administrar a un

5 sujeto en necesidad del mismo una dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación y una dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de una o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de los anticuerpos (que incluyen fragmentos de anticuerpos de los mismos) que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido ICOS.

10 La divulgación proporciona métodos para manejar, tratar o mejorar uno o más síntomas de un trastorno inflamatorio en un sujeto resistente a terapias convencionales (por ejemplo, metotrexato y un antagonista de TNF-alfa (por ejemplo, REMICADE™ o ENBREL™)) para dicho trastorno inflamatorio, dichos métodos comprenden administrar a dicho sujeto una dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación. La descripción también proporciona métodos para manejar, tratar o

15 mejorar uno o más síntomas de un trastorno inflamatorio en un sujeto resistente a las terapias de agente único existentes para dicho trastorno inflamatorio, dichos métodos comprenden administrar a dicho sujeto una dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación y una dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de una o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) distinta de los anticuerpos (que incluyen fragmentos de anticuerpos de los mismos) que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido ICOS. La divulgación también proporciona métodos para controlar o tratar un trastorno inflamatorio mediante la administración de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación en combinación con cualquier otro tratamiento a pacientes que han demostrado ser resistentes a otros tratamientos, pero ya no están en estos tratamientos. La descripción también proporciona métodos alternativos para el tratamiento de un trastorno inflamatorio en el que otra terapia ha demostrado o puede resultar demasiado tóxica, es decir, resulta en efectos secundarios inaceptables o

20 insoportables para el sujeto que está siendo tratado. Por ejemplo, una formulación de la divulgación se puede administrar a un sujeto, en donde el sujeto es resistente a un antagonista de TNF o metotrexato. Adicionalmente, la divulgación proporciona métodos para evitar la recurrencia de un trastorno inflamatorio en pacientes que han sido tratados y no tienen actividad de la enfermedad al administrar un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación.

Los trastornos inflamatorios que se pueden tratar con los métodos abarcados en la divulgación incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía no diferenciada, artropatía no diferenciada, artritis, osteoartritis, espondiloartropatías (por ejemplo, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter (artritis reactiva), osteólisis inflamatoria, enfermedad de Wilson e inflamación crónica que resulta de infecciones virales crónicas o bacterias). Como se describe en este documento, algunos trastornos autoinmunitarios están asociados con una afección inflamatoria.

Las terapias antiinflamatorias y sus dosificación, rutas de administración y el uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en publicaciones tales como Physician's Desk Reference (61ª ed., 2007).

5.32.1. Terapias antiinflamatorias

La presente divulgación proporciona métodos para evitar, manejar, tratar o mejorar un trastorno inflamatorio o uno o más síntomas de los mismos, dichos métodos comprenden administrar a un sujeto en necesidad del mismo un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación y una o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los anticuerpos (que incluyen fragmentos de anticuerpos de los mismos) que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido ICOS. Cualquier agente o terapia que se sepa que sea útil, o que se haya utilizado o se esté utilizando actualmente para la prevención, manejo, tratamiento o mejora de un trastorno inflamatorio o uno o más síntomas de los mismos se puede utilizar en combinación con un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación de acuerdo con la divulgación descrita en el presente documento.

Cualquier agente antiinflamatorio, que incluye agentes útiles en terapias para trastornos inflamatorios, bien conocidos por un experto en la técnica, se puede utilizar en las formulaciones y métodos de la divulgación. Ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), fármacos antiinflamatorios esteroideos, anticolinérgicos (por ejemplo, sulfato de atropina, metilnitrato de atropina y bromuro de ipratropio (ATROVENT™)), beta2-agonistas (por ejemplo, abuterol (VENTOLIN™ y PROVENTIL™), bitolterol (TORNALATE™), levalbuterol (XOPONEX™), metaproterenol (ALUPENT™), pirbuterol (MAXAIR™), terbutalina (BRETHAIRE™ y BRETINA™), albuterol (PROVENTIL™, REPETABS™, y VOLMAX™), formoterol (FORADIL AEROLIZER™), y salmeterol (SEREVEN™ y SEREVENT DISKUS™)), y metilxantinas (por ejemplo, teofilina (UNIPHYL™, TEO-DUR™, SLO-BID™, y TEHO-42™)). Ejemplos de NSAID incluyen, pero no se limitan a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenac (VOLTAREN™), etodolac (LODINE™), fenoprofen (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketoralac (TORADOL™), oxaprozín (DAYPRO™), nabumetona (RELAFEN™), sulindac (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Dichos NSAID funcionan al inhibir una enzima

ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Ejemplos de fármacos esteroides antiinflamatorios incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), corticosteroides (por ejemplo, metilprednisolona (MEDROL™)), cortisona, hidrocortisona, prednisona (PREDNISONA™ y DELTASONE™), prednisolona (PRELONE™ y PEDIAPRED™), triamcinolona, azulfidina, y inhibidores de eicosanoides (por ejemplo, prostaglandinas, tromboxanos, y leucotrienos).

En una realización, una cantidad efectiva de una o más formulaciones de la divulgación se administra en combinación con un inhibidor de proteasa de mastocitos a un sujeto en riesgo de o con un trastorno inflamatorio. En otra realización, el inhibidor de proteasa de mastocitos es un inhibidor de la triptasa quinasa, tal como, pero no se limita a GW-45, GW-58, y genisteína. En una realización específica, el inhibidor de proteasa de mastocitos es un inhibidor de fosfatidilinositida-3' (PI3)-quinasa, tal como, pero no se limita a calfoestina C. En otra realización, el inhibidor de proteasa de mastocitos es un inhibidor de quinasa proteína tal como, pero no se limita a estaurosporina. En una realización, el inhibidor de proteasa de mastocitos se administra localmente al área afectada.

Ejemplos específicos de agentes inmunomoduladores que se pueden administrar en combinación con un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación a un sujeto con un trastorno inflamatorio incluyen pero no se limitan a, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, citoxan, Immuran, ciclosporina A, minociclina, azatioprina, antibióticos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, deoxispergualin, brequinar, malononitriloamidas (por ejemplo, leflunamida), anticuerpos del receptor anti-célula T (por ejemplo, anticuerpos anti-CD4 (por ejemplo, cM-T412 (Boeringer), IDEC-CE9.1.RTM. (IDEC y SKB), mAB 4162W94, Ortoclon y OKTcdr4a (Janssen-Cilag)), anticuerpos anti-CD3 (por ejemplo, Nuvion (Product Design Labs), OKT3 (Johnson & Johnson), o Rituxan (IDEC)), anticuerpos anti-CD5 (por ejemplo, un inmunoconjugado ligado a ricina anti-CD5), anticuerpos anti-CD7 (por ejemplo, CHH-380 (Novartis)), anticuerpos anti-CD8, anticuerpos monoclonales del ligando anti-CD40 (por ejemplo, IDEC-131 (IDEC)), anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, CAMPATH 1H (Ilex)), anticuerpos anti-CD2 (por ejemplo, MEDI-507 (MedImmune, Inc., Publicaciones Internacionales Nos. WO 02/098370 y WO 02/069904), anticuerpos anti-CD11a (por ejemplo, Xanelim (Genentech)), y anticuerpos anti-B7 (por ejemplo, IDEC-114) (IDEC)); anticuerpos del receptor anti-citoquina (por ejemplo, anticuerpos anti-IFN del receptor, anticuerpos del receptor anti-IL-2 (por ejemplo, Zenapax (Protein Design Labs)), anticuerpos del receptor anti-IL-4, anticuerpos del receptor anti-IL-6, anticuerpos del receptor anti-IL-10, y anticuerpos del receptor anti-IL-12), anticuerpos anti-citoquina (por ejemplo, anticuerpos anti-IFN, anticuerpos anti- TNF-alfa, anticuerpos anti-IL-1beta, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-IL-8 (por ejemplo, ABX-IL-8 (Abgenix)), y anticuerpos anti-IL-12)); CTLA4-inmunoglobulina; LFA-3TIP (Biogen, Publicación Internacional No. WO 93/08656 y Patentes de Estados Unidos No. 6,162,432); receptores de citoquina solubles (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor TNF-alfa o un fragmento del mismo, el dominio extracelular de un receptor IL-1beta o un fragmento del mismo, y el dominio extracelular de un receptor IL-6 o un fragmento del mismo); citoquinas o fragmentos de las mismas (por ejemplo, interleuquina (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, TNF-alfa, TNF-beta, interferón (IFN)-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, y GM-CSF); y anticuerpos anti-citoquina (por ejemplo, anticuerpos anti-IL-2, anticuerpos anti-IL-4, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-IL-9, anticuerpos anti-IL-10, anticuerpos anti-IL-12, anticuerpos anti-IL-15, anticuerpos anti-IL17, anticuerpos anti- TNF-alfa, y anticuerpos anti-IFN-gamma).

Cualesquier antagonistas de TNF-alfa bien conocidos por un experto en la técnica se pueden utilizar en las formulaciones y métodos de la divulgación. Ejemplos no limitantes de antagonistas TNF-alfa que se pueden administrar en combinación con un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación a un sujeto con un trastorno inflamatorio incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusión, anticuerpos (por ejemplo, humanos, humanizados, quiméricos, monoclonales, policlonales, Fvs, ScFvs, fragmentos de Fab, fragmentos de F(ab)₂, y fragmentos de unión a antígenos de los mismos) tales como anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a TNF-alfa, moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas antisentido o triples hélices), moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, y moléculas pequeñas que bloquean, reducen, inhiben o neutralizan la función, actividad y/o expresión de TNF-alfa. En diversas realizaciones, un antagonista de TNF-alfa reduce la función, actividad y/o expresión de TNF-alfa en por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o por lo menos 99% con relación a un control tal como solución salina regulada con fosfato (PBS). Ejemplos de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a TNF-alfa incluyen, pero no se limitan a, infliximab (REMICADE™; Centacor), D2E7 (Abbott Laboratories/Knoll Pharmaceuticals Co., Mt. Olive, N.J.), CDP571 que se conoce como HUMICADE™ y CDP-870 (ambos de Celltech/Pharmacia, Slough, U.K.), y TN3-19.12 (Williams et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2762-2766; Thorbecke et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7375-7379). La presente divulgación también abarca el uso de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a TNF-alfa divulgados en las siguientes Patentes de los Estados Unidos en las formulaciones y métodos de la divulgación: 5,136,021; 5,147,638; 5,223,395; 5,231,024; 5,334,380; 5,360,716; 5,426,181; 5,436,154; 5,610,279; 5,644,034; 5,656,272; 5,658,746; 5,698,195; 5,736,138; 5,741,488; 5,808,029; 5,919,452; 5,958,412; 5,959,087; 5,968,741; 5,994,510; 6,036,978; 6,114,517; y 6,171,787. Ejemplos de receptores TNF-alfa solubles incluyen, pero no se limitan a, sTNF-R1 (Amgen), etanercept (ENBREL™; Immunex) y su homólogo de rata RENBREL™, inhibidores solubles de TNF-alfa derivados de TNFrl, TNFrlI (Kohno et al., 1990,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8331-8335), y TNF-alfa Inh (Seckinger et al, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5188-5192).

Otros antagonistas de TNF-alfa abarcados por la divulgación incluyen, pero no se limitan a, IL-10, que se sabe que bloquea la producción de TNF-alfa a través de macrófagos activados con interferón gamma (Oswald et al. 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8676-8680), TNFR-IgG (Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539), el producto de murino TBP-1 (Serono/Yeda), la vacuna CytoTab (Protherics), molécula antisentido 104838 (ISIS), el péptido RDP-58 (SangStat), talidomida (Celgene), CDC-801 (Celgene), DPC-333 (Dupont), VX-745 (Vertex), AGIX-4207 (AtheroGenics), ITF-2357 (Italfarmaco), NPI-13021-31 (Nereus), SCIO-469 (Scios), objetivo TACE (Immunix/AHP), CLX-120500 (Calyx), Tiazolopirim (Dynavax), auranofina (Ridaura) (SmithKline Beecham Pharmaceuticals), quinacrina (diclorhidrato de mepacrina), tenidap (Enablex), Melanina (Large Scale Biological), y agentes anti-p38 MAPK por Uriach.

Ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios que se pueden administrar en combinación con un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación a un sujeto con un trastorno inflamatorio incluyen fármacos anti-inflamatorios no esteroides (NSAID), fármacos esteroides anti-inflamatorios, beta-agonistas, agentes anticolinérgicos, y metil xantinas. Ejemplos de NSAID incluyen, pero no se limitan a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenac (VOLTAREN™), etodolac (LODINE™), fenoprofen (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketoralac (TORADOL™), oxaprozin (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindac (CLINORIL™), tolmentin (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Dichos NSAID funcionan al inhibir un enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Ejemplos de fármacos esteroides anti-inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE™), prednisolona, triamcinolona, azulfidina, y eicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos, y leucotrienos.

En realizaciones específicas, a los pacientes con osteoartritis se les administra una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación en combinación con otros agentes o terapias útiles para la prevención, tratamiento, manejo o mejora de la osteoartritis, que incluyen, pero no se limitan a: analgésicos (ejemplos no limitantes son acetaminofén, en una dosis de hasta 4000 mg/día; fenacetina; y tramadol, en una dosis diaria en el rango de 200 a 300 mg); Los NSAID (ejemplos no limitantes incluyen, pero no se limitan a, aspirina, diflunisal, diclofenaco, etodolaco, fenamatos, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, cetoprofeno, salicilato, nebumetona, naproxin, oxaprazin, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, y tolmetina. Se prefieren los NSAID de dosis bajas, por ejemplo, ibuprofeno a 1200 mg/d, naproxeno a 500 mg/d. Se prefiere un agente gastroprotector, por ejemplo, misoprostol, famotidina u omeprazol, para utilizar simultáneamente con un NSAID (NSAID); salicilatos no acetilados que incluyen pero no se limitan a salsalato; Inhibidores específicos de la ciclooxigenasa (Cox)-2 (CSI), que incluyen pero no se limitan a, celecoxib y rofecoxib; inyección intra o periarticular de un preparado de glucocorticoides de depósito; inyección intraarticular de ácido hialurónico; crema de capsaicina; abundante irrigación de la rodilla con osteoartritis para eliminar la fibrina, fragmentos de cartilago y otros desechos; y cirugía de reemplazo articular. Las formulaciones y los métodos de la divulgación también se pueden utilizar en combinación con otras medidas no farmacológicas en la prevención, tratamiento, manejo y mejora de la osteoartritis, que incluyen, pero no se limitan a: reducción de la carga articular (ejemplos no limitantes son la corrección de la mala postura, el apoyo a la excesiva lordosis lumbar, evitar la carga excesiva de la articulación afectada, evitar estar de pie, arrodillarse y ponerse en cuclillas durante mucho tiempo); aplicación de calor a la articulación afectada; ejercicio aeróbico y otras terapias físicas.

En realizaciones específicas, a los pacientes con artritis reumatoide se les administra una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación en combinación con otros agentes o terapias útiles en la prevención, tratamiento, manejo y mejora de la artritis reumatoide, que incluye pero no se limita a: NSAID (ejemplos no limitantes incluyen, pero no se limitan a, aspirina, diflunisal, diclofenaco, etodolaco, fenamatos, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, metilsalicilato, nebumetona, naproxin, oxaprazin, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, y tolmetina); analgésicos (ejemplos no limitantes son acetaminofén, fenacetina y tramadol); Los CSI incluyen, pero no se limitan a, celecoxib y rofecoxib; glucocorticoides (preferiblemente glucocorticoides orales de dosis bajas, por ejemplo, <7.5 mg/día de prednisona, o pulsos mensuales con glucocorticoides de dosis altas, o glucocorticoides intraarticulares); fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD) que incluyen, pero no se limitan a, metotrexato (preferiblemente administrados en dosis bajas intermitentes, por ejemplo, 7.5-30 mg una vez a la semana), compuestos de oro (por ejemplo, sales de oro), D-penicilamina, los antimaláricos (por ejemplo, cloroquina) y sulfasalazina; Agentes neutralizantes de TNF-alfa que incluyen, pero no se limitan a, etanercept e infliximab; agentes inmunosupresores y citotóxicos (ejemplos incluyen, pero no se limitan a, azatioprina, leflunomida, ciclosporina y ciclofosfamida) y cirugía (ejemplos incluyen, pero no se limitan a, artroplastias, reemplazo total de articulaciones, cirugía reconstructiva de la mano, sinovectomía abierta o artroscópica y tenosinovectomía precoz de la muñeca.). Las formulaciones y los métodos de la divulgación también se pueden utilizar en combinación con otras medidas en la prevención, tratamiento, manejo y mejora de la artritis reumatoide, que incluyen, pero no se limitan a: reposo, férula para reducir el movimiento no deseado de la articulación inflamada, ejercicio, uso de una variedad de dispositivos ortopédicos y auxiliares, y otras terapias físicas. Las formulaciones y métodos de la divulgación también se pueden utilizar en combinación con algunos enfoques no tradicionales en la prevención, tratamiento, manejo y mejora de la artritis reumatoide que incluyen, pero no se limitan a, dietas (por ejemplo, Sustituyendo ácidos grasos

omega-3 como el ácido eicosapentaenoico encontrado en ciertos aceites de pescado para ácidos grasos esenciales omega-6 en la dieta, vacunas, hormonas y preparaciones tópicas.

En realizaciones específicas, a los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) se les administra una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación en combinación con otros agentes o terapias útiles en la prevención, tratamiento, manejo y mejora de COPD que incluye pero no se limita a: broncodilatadores que incluyen, pero no se limitan a, agonistas beta2-adrenérgicos de acción corta y larga (ejemplos de agonistas beta2 de acción corta incluyen, pero no se limitan a, albuterol, pirbuterol, terbutalina y metaproterenol; ejemplos de agonistas beta2 de acción larga incluyen, pero no se limitan a, albuterol de liberación sostenida oral y salmeterol inhalado, anticolinérgicos (ejemplos incluyen, pero no se limitan a, bromuro de ipratropio) y teofilina y sus derivados (el rango terapéutico para la teofilina es preferiblemente de 10 a 20 .mu.g/mL); glucocorticoides; alpha1AT exógeno (por ejemplo, alpha1AT derivado de plasma humano combinado administrado por vía intravenosa en una dosis semanal de 60 mg/kg); oxígeno; trasplante de pulmón; cirugía de reducción de volumen pulmonar; intubación endotraqueal, soporte de ventilación; vacuna anual contra la influenza y vacunación neumocócica con polisacárido 23 valente; ejercicio; y dejar de fumar.

En realizaciones específicas, a los pacientes con asma se les administra una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación en combinación con una cantidad efectiva de uno o más agentes útiles para la terapia del asma. Ejemplos no limitantes de dichos agentes incluyen estimulantes adrenérgicos (por ejemplo, catecolaminas (por ejemplo, epinefrina, isoproterenol e isoetarina), resorcinoles (por ejemplo, metaproterenol, terbutalina, y fenoterol), y saligeninas (por ejemplo, salbutamol), adrenocorticoides, glucocorticoides, corticosteroides (por ejemplo, beclomethadonsa, budesonida, flunisolida, fluticasona, triamcinolona, metilprednisolona, prednisolona, y prednisona), otros esteroides, beta2-agonistas (por ejemplo, albuterol, bitolterol, fenoterol, isoetharina, metaproterenol, pirbuterol, salbutamol, terbutalina, formoterol, salmeterol, y albutamol terbutalina), anticolinérgicos (por ejemplo, bromuro de ipratropio y bromuro de oxitropio), antagonistas de IL-4 (que incluyen anticuerpos), antagonistas de IL-5 (que incluyen anticuerpos), antagonistas de IL-9 (que incluyen anticuerpos), antagonistas de IL-13 (que incluyen anticuerpos), antagonistas de IL-17 (que incluyen anticuerpos), inhibidor de PDE4, inhibidor de NF-Kappa-beta, inhibidor de VLA-4, CpG, anti-CD23, antagonistas de la selectina (TBC 1269), inhibidores de proteasa de mastocitos (por ejemplo, inhibidores de triptasa quinasa (por ejemplo, GW-45, GW-58 y genisteína), inhibidores de la fosfatidilinositida-3' (PI3)-quinasa (por ejemplo, la calfoestina C) y otros inhibidores de quinasa (por ejemplo, estaurosporina) (véase Temkin et al., 2002 J Immunol 169 (5): 2662-2669; Vosseller et al., 1997 Mol. Biol. Cell 8 (5): 909-922; y Nagai et al., 1995 Biochem Biophys Res Commun 208 (2): 576-581), un antagonista del receptor C3 (que incluyen anticuerpos), agentes inmunosupresores (por ejemplo, metotrexato y sales de oro), moduladores de mastocitos (por ejemplo, cromolin sódico). (INTAL™) y nedocromil sódico (TILADE™) y agentes mucolíticos (por ejemplo, acetilcisteína). En una realización específica, el agente antiinflamatorio es un inhibidor de leucotrienos (por ejemplo, montelukast (SINGULAIR™), zafirlukast (ACCOLATE™), pranlukast (ONON™) o zileuton (ZYFLO™)).

En realizaciones específicas, a los pacientes con alergia se les administra una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación en combinación con una cantidad efectiva de uno o más agentes útiles para la terapia de alergia. Ejemplos no limitantes de dichos agentes incluyen fármacos antimedidores (por ejemplo, antihistamínicos), corticosteroides, descongestivos, fármacos simpaticomiméticos (por ejemplo, Fármacos alfa-adrenérgicos y beta-adrenérgicos), TNX901 (Leung et al., N Engl J Med 348 (11): 986-993 (2003)), antagonistas de IgE (por ejemplo, anticuerpos rhuMab-E25 omalizumab (véase Finn et al., 2003 J Allergy Clin Immuno 111(2):278-284; Corren et al., 2003 J Allergy Clin Immuno 111(1):87-90; Busse and Neaville, 2001 Curr Opin Allergy Clin Immuno 1(1):105-108; and Tang and Powell, 2001, Eur J Pediatr 160(12): HMK -12 y 6HD5 (véase Miyajima et al., 2002 Int Arch Allergy Immuno 128 (1): 24-32), y mAb Hu-901 (véase van Neerven et al., 2001 Int Arch Allergy Immuno 124 (1-3) : 400), teofilina y sus derivados, glucocorticoides e inmunoterapias (por ejemplo, Inyección repetida a largo plazo de alérgeno, desensibilización de corta duración e inmunoterapia con veneno).

5.33. Enfermedad autoinmunitaria

De acuerdo con ciertos aspectos de la divulgación, el régimen de tratamiento y la dosis utilizada con las formulaciones y los métodos de la divulgación se eligen con base en una serie de factores que incluyen, pero no se limitan a, la etapa de la enfermedad o trastorno autoinmunitario que se está tratando. Los regímenes de tratamiento apropiados pueden ser determinados por un experto en la técnica para etapas particulares de una enfermedad o trastorno autoinmunitario en un paciente o población de pacientes. Las curvas de respuesta a la dosis se pueden generar utilizando protocolos estándar en la técnica para determinar la cantidad efectiva de formulaciones de la divulgación para tratar pacientes que tienen diferentes estadios de una enfermedad o trastorno autoinmunitario. En general, los pacientes que tienen más actividad de una enfermedad o trastorno autoinmunitario requerirán dosis más altas y/o dosis más frecuentes que se pueden administrar durante períodos más prolongados en comparación con los pacientes que tienen menos actividad de una enfermedad o trastorno autoinmunitario.

Los anticuerpos, formulaciones y métodos anti-ICOS se pueden practicar para tratar una enfermedad o trastorno autoinmunitario. El término "enfermedad o trastorno autoinmunitario" se refiere a una afección en un sujeto caracterizada por una lesión celular, de tejido y/u orgánica provocada por una reacción inmunológica del sujeto a sus

propias células, tejidos y/u órganos. El término “enfermedad inflamatoria” se utiliza de manera intercambiable con el término “trastorno inflamatorio” para referirse a una afección en un sujeto caracterizado por una inflamación, que incluye, pero no se limita a, inflamación crónica. Los trastornos autoinmunitarios pueden o no estar asociados con inflamación. Más aún, la inflamación puede o no ser provocada por un trastorno autoinmunitario. Por lo tanto, ciertos trastornos se pueden caracterizar como trastornos autoinmunitarios e inflamatorios. Las enfermedades o trastornos autoinmunitarios de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooporfitis y orquitis autoinmunitaria, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide bulloso, cardiomiopatía, esperma-dermatitis celíaca, síndrome de disfunción inmune por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, pemphigoid cicatrizal, síndrome CREST, enfermedad de aglutinina fría, enfermedad de Crohn, lupus discoide, hemoglobina mixta esencial diabetes, fascitis eosinófilas, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barrera, tiroiditis de Hashimoto, púrpura de Schönlein, fibrosis pulmonar idiopática, trombocitopenia púrpura idiopática/autoinmunitaria (ITP), neuropatía IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o mediada inmunitaria, miastenia gravis, trastornos relacionados con pénfigo (por ejemplo, penfigus vulgaris), anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, soriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome de Sweet, enfermedad de Still, lupus eritematoso, arteritis takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como dermatitis herpetiforme, vasculitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener. Ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteolisis inflamatoria, enfermedad del injerto contra anfitrión, urticaria, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harelda e inflamación crónica como resultado de infecciones crónicas virales o bacterianas.

5.33.1. Tratamiento del trastorno autoinmunitario

Un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación se puede administrar a un sujeto en necesidad del mismo para evitar, manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo. También se pueden administrar las formulaciones de la divulgación en combinación con una o más de otras terapias, preferiblemente terapias útiles para la prevención, manejo o tratamiento de un trastorno autoinmunitario (que incluye, pero no se limita a los agentes profilácticos o terapéuticos) a un sujeto en necesidad del mismo para evitar, manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo. En una realización específica, la divulgación proporciona un método para evitar, manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo, dicho método que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación. En otra realización, la divulgación proporciona un método para evitar, manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo, dicho método que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación y una dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de una o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) diferentes de los anticuerpos (que incluye fragmentos de anticuerpo de los mismos) que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido ICOS.

La divulgación proporciona métodos para manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo en un sujeto resistente a terapias convencionales para dicho trastorno autoinmunitario, dichos métodos comprenden administrar a dicho sujeto una dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación. La divulgación también proporciona métodos para manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo en un sujeto resistente a las terapias de agente único existentes para dicho trastorno autoinmunitario, dichos métodos comprenden administrar a dicho sujeto una dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación y una dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de una o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) diferentes de los anticuerpos (que incluye fragmentos de anticuerpo de los mismos) que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido ICOS. La divulgación también proporciona métodos para manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo al administrar un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación en combinación con cualquier otro tratamiento a pacientes que han demostrado ser resistentes a otros tratamientos, pero ya no están en estos tratamientos. La divulgación también proporciona métodos alternativos para el manejo o tratamiento de un trastorno autoinmunitario en el que otra terapia ha demostrado o puede resultar demasiado tóxica, es decir, resulta en efectos secundarios inaceptables o insoportables, para el sujeto que es tratado. Particularmente, la divulgación proporciona métodos alternativos para el manejo o tratamiento de un trastorno autoinmunitario en el que el paciente es resistente a otras terapias. Adicionalmente, la divulgación proporciona métodos para evitar la recurrencia de un trastorno autoinmunitario en

pacientes que se han tratado y no tienen actividad de enfermedad al administrar un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación.

Ejemplos de trastornos autoinmunitarios que se pueden tratar con los métodos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitaria, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide bulloso, cardiomiopatía, espermato-dermatitis celíaca, síndrome de disfunción inmunitario por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST enfermedad de aglutinina fría, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, trombocitopenia púrpura idiopática (PTI), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o inmunitaria, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, soriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoidea, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como vasculitis herpetiforme por dermatitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

Las terapias autoinmunitarias y sus dosificaciones, las rutas de administración y el uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en publicaciones tales como Physician's Desk Reference (61^a ed., 2007).

5.33.2. Terapias de trastornos autoinmunitarios

La presente divulgación proporciona métodos para evitar, manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo, dichos métodos que comprenden administrar a un sujeto en necesidad del mismo un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación y una o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) diferentes de los anticuerpos (que incluye fragmentos de anticuerpo de los mismos) que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido ICOS. Cualquier agente o terapia que se sepa que es útil, o que se ha utilizado o se está utilizando actualmente para la prevención, manejo, tratamiento o mejora de un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo se pueden utilizar en combinación con un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación de acuerdo con la divulgación descrito en este documento. Ejemplos de dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios y antagonistas de TNF-alfa. Ejemplos específicos de agentes inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios y antagonistas de TNF-alfa que se pueden utilizar en combinación con un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación para la prevención, manejo, tratamiento o mejora de un trastorno autoinmunitario se divulgan en este documento.

En realizaciones específicas, pacientes con esclerosis múltiple (MS) se administran una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación en combinación con otros agentes o terapias útiles en la prevención, tratamiento, manejo y mejora de MS que incluya pero no se limita a: IFN-beta1b (Betaseron) (por ejemplo, 8.0 millones de unidades internacionales (MIU) se administra por inyección subcutánea cada otro día); IFN-beta1a (Avonex) (por ejemplo, 6.0 MIU se administra mediante inyección intramuscular una vez cada semana); acetato de glatiramer (Copaxone) (por ejemplo, 20 mg se administra mediante inyección subcutánea cada día); mitoxantrona (por ejemplo, 12 mg/m² se administra por infusión intravenosa cada tercer mes); azatioprina (por ejemplo, 2-3 mg/kg de peso corporal se administra por vía oral cada día); metotrexato (por ejemplo, 7.5 mg se administra por vía oral una vez cada semana); ciclofosfamida; inmunoglobulina intravenosa (por ejemplo, 0.15-0.2 g/kg de peso corporal administrados mensualmente durante hasta 2 años); glucocorticoides; metilprednisolona (por ejemplo, administrados en ciclos bimensuales en alta dosis); 2-clorodeoxiadenosina (cladribina); baclofen (por ejemplo, 15 a 80 mg/d en dosis divididas, o por vía oral una dosis mayor hasta 240 mg/d, o por vía intratecal a través de un catéter permanente); clorhidrato de cicloenzaprina (por ejemplo, 5-10 mg bid o tid); clonazepam (por ejemplo, 0.5 a 1.0 mg tid, que incluye dosis antes de acostarse); clorhidrato de clonidina (por ejemplo, 0.1 a 0.2 mg tid, que incluye una dosis antes de acostarse); carbamazepina (por ejemplo, 100-1200 mg/d en dosis escalados divididas); gabapentina (por ejemplo, 300-3600 mg/d); dilantina (por ejemplo, 300-400 mg/d); amitriptilina (por ejemplo, 25-150 mg/d); baclofen (por ejemplo, 10-80 mg/d); primidona (por ejemplo, 125-250 mg bid o tid); ondansetrona (por ejemplo, 4 a 8 mg bid o tid); isoniazid (por ejemplo, hasta 1200 mg en dosis divididas); oxibutinina (por ejemplo, 5 mg bid o tid); tolterodina (por ejemplo, 1-2 mg bid); propantelina (por ejemplo, 7.5 a 15 mg qid); betanecol (por ejemplo, 10-50 mg tid o qid); clorhidrato de terazosina (por ejemplo, 1-5 mg a la hora de acostarse); citrato de sildenafil (por ejemplo, 50-100 mg po prn); amantadina (por ejemplo, 100 mg bid); pemolina (por ejemplo, 37.5 mg bid); alta dosis de vitaminas; orotato de calcio; ganciclovir; antibióticos; e intercambio de plasma.

En realizaciones específicas, a los pacientes con soriasis se les administra una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación en combinación con otros agentes o terapias útiles en la prevención, tratamiento, manejo y mejora de soriasis que incluyen pero no se limitan a: crema o pomada esteroide tópica; alquitrán (ejemplos que incluyen, pero no se limitan

a, Estar, Psorigel, crema Fototar y LCD 10% en loción Nutraderm o mezclados directamente con triamcinolone 0.1% cream); oclusión; análogo tópico de la vitamina D (un ejemplo no limitante es el ungüento de calcipotrieno); luz ultravioleta; PUVA (psoraleno más ultravioleta A); metotrexato (por ejemplo, hasta 25 mg una vez a la semana o en dosis divididas cada 12 horas durante tres dosis una vez a la semana); retinoide sintético (un ejemplo no limitante es etretinato, por ejemplo, en dosificación de 0.5-1 mg/kg/d); terapia inmunomoduladora (un ejemplo no limitante es la ciclosporina); sulfasalazina (por ejemplo, en dosificación de 1 g tres veces al día).

En realizaciones específicas, a los pacientes con enfermedad de Crohn se les administra una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación en combinación con otros agentes o terapias útiles en la prevención, tratamiento, manejo y mejora de enfermedad de Crohn que incluye pero no se limita a: antidiarreicos (por ejemplo, loperamida 2-4 mg hasta 4 veces al día, difenoxilato con atropina 1 comprimido hasta 4 veces al día, tintura de opio 8-15 gotitas hasta 4 veces al día, colestiramina 2-4 g o colestipol 5 g una vez o dos veces al día), antiespasmódicos (por ejemplo, propantelina 15 mg, dicyclomina 10-20 mg, o hiosciamina 0.125 mg dada antes de las comidas), agentes de ácido 5-aminosalicílico (por ejemplo, sulfasalazina 1.5-2 g dos veces al día, mesalamina (ASACOL™) y su forma de liberación lenta (PENTASA™), especialmente en altas dosificaciones, por ejemplo, PENTASA™ 1 g cuatro veces al día y ASACOL™ 0.8-1.2 g cuatro veces al día), corticosteroides, fármacos inmunomoduladores (por ejemplo, azatioprina (1-2 mg/kg), mercaptopurina (50-100 mg), ciclosporina, y metotrexato), antibióticos, TNF inhibitors (por ejemplo, infliximab (REMICADE™)), agentes inmunosupresores (por ejemplo, tacrolimus, micofenolato mofetilo, y thlidomida), citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-10 y IL-11), terapias nutricionales, terapia enteral con dietas elementales (por ejemplo, Vivonex durante 4 semanas), y nutrición parenteral total.

En realizaciones específicas, a los pacientes con lupus eritematoso se les administra una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-ICOS con función efectora mejorada de la divulgación en combinación con otros agentes o terapias útiles en la prevención, tratamiento, manejo y mejora de lupus eritematoso que incluye pero no se limita a: antimaláricos (que incluye pero no se limita a, hidroxicloroquina); glucocorticoides (por ejemplo, se puede utilizar dosis baja, dosis alta, o terapia de impulso de alta dosis intravenosa); agentes inmunosupresores (que incluye pero no se limita a, ciclofosfamida, clorambucilo, y azatioprina); agentes citotóxicos (que incluyen pero no se limita a metotrexato y micofenolato mofetilo); esteroides androgénicos (que incluyen pero no se limita a danazol); anticoagulantes (que incluyen pero no se limitan a warfarina); e inhibidor de estimulador de linfocito B (por ejemplo belimumab). En realizaciones específicas, a los pacientes con lupus eritematoso se les administra una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de una formulación descrita en este documento en combinación con belimumab.

Las formulaciones de anticuerpo de la divulgación o terapias de combinación de la divulgación se puede usar como la primera, segunda, tercera, cuarta o quinta terapia para prevenir, controlar, tratar y/o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas de los mismos. La divulgación también incluye métodos para prevenir, tratar, manejar, y/o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo en un paciente que se somete a terapia para otra enfermedad o trastorno. La divulgación abarca métodos para prevenir, manejar, tratar, y/o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo en un paciente antes de que se desarrolle cualquier efecto adverso de la intolerancia a las terapias diferentes de los anticuerpos de la divulgación. La divulgación también abarca métodos para prevenir, tratar, manejar, y/o mejorar un trastorno autoinmunitario o un síntoma del mismo en pacientes resistentes. La divulgación abarca métodos para prevenir, tratar, manejar, y/o mejorar un trastorno proliferativo o un síntoma del mismo en un paciente quien se ha mostrado resistente a terapias diferentes de anticuerpos, formulaciones, o terapias de combinación de la divulgación. La determinación de si un paciente es resistente se puede hacer in vivo o in vitro por cualquier método conocido en la técnica para ensayar la efectividad de un tratamiento de trastornos autoinmunitarios, utilizando los significados aceptados en la técnica de "resistente" a dicho contexto. En ciertas realizaciones, un paciente con un trastorno autoinmunitario es resistente a una terapia cuando uno o más síntomas de un trastorno autoinmunitario no se previenen, manejan, y/o alivian. La divulgación también abarca métodos para prevenir, manejar, tratar, y/o mejorar un trastorno autoinmunitario o un síntoma del mismo en pacientes que son susceptibles a reacciones adversas a terapias convencionales.

La presente divulgación abarca métodos para prevenir, tratar, manejar, y/o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo como una alternativa a otras terapias convencionales. En realizaciones específicas, el paciente se maneja o trata de acuerdo con los métodos de la divulgación es resistente a otras terapias o es susceptible a reacciones adversas de dichas terapias. El paciente puede ser una persona con un sistema inmunitario suprimido (por ejemplo, pacientes postoperatorios, pacientes de quimioterapia y pacientes con enfermedad de inmunodeficiencia, pacientes con displasia broncopulmonar, pacientes con cardiopatía congénita, pacientes con fibrosis quística, pacientes con enfermedad adquirida o cardiopatía congénita y pacientes que sufren de una infección), una persona con insuficiencia renal o hepática, ancianos, niños, bebés, bebés prematuros, personas con trastornos neuropsiquiátricos o que toman fármacos psicotrópicos, personas con antecedentes de convulsiones o personas que toman medicamentos que interactuarían negativamente con los agentes convencionales que se utilizan para evitar, manejar, tratar o mejorar una enfermedad o trastorno autoinmunitario.

Las terapias autoinmunes y sus dosis, las vías de administración y el uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en publicaciones tales como Physician's Desk Reference (61ª ed., 2007).

5.33.3. Diagnóstico de enfermedades o trastornos autoinmunitarios

El diagnóstico de una enfermedad o trastorno autoinmunitario es complicado porque cada tipo de enfermedad o trastorno autoinmunitario se manifiesta de manera diferente entre los pacientes. Esta heterogeneidad de los síntomas significa que, por lo general, se utilizan múltiples factores para llegar a un diagnóstico clínico. En general, los médicos utilizan factores tales como, pero no limitados a, la presencia de autoanticuerpos, niveles elevados de citoquinas, disfunción orgánica específica, erupciones en la piel, hinchazón de las articulaciones, dolor, remodelación ósea y/o pérdida de movimiento como indicadores principales de una enfermedad autoinmunitaria o trastorno. Para ciertas enfermedades o trastornos autoinmunitarios, tales como la RA y el SLE, los estándares para el diagnóstico son conocidos en la técnica. Para ciertas enfermedades o trastornos autoinmunitarios, las etapas de la enfermedad se han caracterizado y son bien conocidas en la técnica. Estos métodos reconocidos en la técnica para el diagnóstico de enfermedades y trastornos autoinmunitarios, así como las etapas de la enfermedad y las escalas de actividad y/o gravedad de la enfermedad que son bien conocidas en la técnica, se pueden utilizar para identificar pacientes y poblaciones de pacientes que necesitan tratamiento para una enfermedad o trastorno autoinmunitario utilizando formulaciones y métodos de la divulgación.

5.33.4. Criterios clínicos para el diagnóstico de enfermedades o trastornos autoinmunitarios

Los criterios de diagnóstico para diferentes enfermedades o trastornos autoinmunitarios son conocidos en la técnica. Históricamente, el diagnóstico se basa normalmente en una combinación de síntomas físicos. Más recientemente, se han aplicado técnicas moleculares, como los perfiles de expresión génica, para desarrollar definiciones moleculares de enfermedades o trastornos autoinmunitarios. Los métodos de ejemplo para el diagnóstico clínico de enfermedades o trastornos autoinmunitarios particulares se proporcionan a continuación. Otros métodos adecuados serán evidentes para aquellos expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, los pacientes con niveles bajos de actividad de la enfermedad autoinmunitaria o los pacientes con una etapa temprana de una enfermedad autoinmunitaria (para enfermedades donde se reconocen etapas) se pueden identificar para el tratamiento utilizando formulaciones y métodos de anticuerpos anti-ICOS. El diagnóstico temprano de la enfermedad autoinmunitaria es difícil debido a los síntomas generales y la superposición de los síntomas entre las enfermedades. En dichas realizaciones, un paciente tratado en una etapa temprana o con niveles bajos de una actividad de enfermedad autoinmunitaria tiene síntomas que comprenden por lo menos un síntoma de una enfermedad o trastorno autoinmunitario. En realizaciones relacionadas, un paciente tratado en una etapa temprana o con niveles bajos de una enfermedad autoinmunitaria tiene síntomas que comprenden por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 síntomas de una enfermedad o trastorno autoinmunitario. Los síntomas pueden ser de cualquier enfermedad o trastorno autoinmunitario o una combinación de los mismos. A continuación, se describen ejemplos de síntomas de enfermedades y trastornos autoinmunitarios.

5.34. Protocolos inmunoterapéuticos

Las formulaciones de anticuerpos anti-ICOS utilizadas en el régimen/protocolos terapéuticos, referidos en este documento como "inmunoterapia anti-ICOS" pueden ser anticuerpos desnudos, inmunoconjugados y/o proteínas de fusión. Las formulaciones de la divulgación se pueden utilizar como terapia de un solo agente o en combinación con otros agentes terapéuticos o regímenes. Los anticuerpos o inmunoconjugados anti-ICOS se pueden administrar antes, simultáneamente o después de la administración de uno o más agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos que se pueden utilizar en regímenes terapéuticos combinados con formulaciones de la divulgación incluyen cualquier sustancia que inhiba o prevenga la función de las células y/o cause la destrucción de las células. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radiactivos, agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Los regímenes terapéuticos descritos en este documento, o cualquier régimen de tratamiento deseado, pueden probarse para determinar su eficacia utilizando un modelo animal transgénico que exprese antígeno ICOS humano en lugar de antígeno ICOS nativo. Por lo tanto, un régimen de tratamiento con anticuerpos anti-ICOS se puede probar en un modelo animal para determinar la eficacia antes de la administración a un humano.

5.35. Inmunoterapia anti-ICOS

De acuerdo con la presente divulgación, "inmunoterapia anti-ICOS" abarca la administración de cualquiera de los anticuerpos anti-ICOS de la divulgación de acuerdo con cualquier régimen terapéutico descrito en el presente documento. Los anticuerpos anti-ICOS se pueden administrar como anticuerpos desnudos, o inmunoconjugados o proteínas de fusión. En una realización, un sujeto humano que tiene una enfermedad o trastorno mediado por células T se puede tratar al administrar un anticuerpo anti-ICOS capaz de mediar la ADCC humana.

Los anticuerpos de los isotipos humanos IgG1 o IgG3 se prefieren en algunos casos para la terapia. Sin embargo, los isotipos humanos IgG2 o IgG4 también se pueden utilizar, siempre que tengan la función efectora relevante, por ejemplo, ADCC humana. Dicha función efectora se puede evaluar midiendo la capacidad del anticuerpo en cuestión para mediar en la lisis de células objetivo mediante células efectoras in vitro o in vivo.

En una realización, la dosis de anticuerpo utilizada debería ser suficiente para agotar las células T que expresan ICOS circulantes. El progreso de la terapia se puede monitorizar en el paciente al analizar muestras de sangre. Se pueden utilizar otros signos de mejoría clínica para monitorizar la terapia.

Los métodos para medir el agotamiento de las células T que expresan ICOS que se pueden utilizar en relación con las formulaciones y los métodos de la divulgación son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a las siguientes realizaciones. En una realización, el agotamiento de las células T que expresan ICOS se puede medir con citometría de flujo utilizando un reactivo distinto de un anticuerpo anti-ICOS que se une a los células T que expresan ICOS para definir la cantidad de células T que expresan ICOS. En otra realización, el agotamiento de células T que expresa ICOS se puede medir mediante tinción inmunoquímica para identificar células T que expresan ICOS. En dichas realizaciones, las células T que expresan ICOS o tejidos o suero que comprende células T que expresan ICOS extraídas de un paciente pueden colocarse en portaobjetos de microscopio, etiquetarse y examinarse para determinar su presencia o ausencia. En realizaciones relacionadas, se hace una comparación entre las células T que expresan ICOS extraídas antes de la terapia y después de la terapia para determinar las diferencias en la presencia de células T que expresan ICOS.

En realizaciones de la divulgación en las que se administra un anticuerpo anti-ICOS como una terapia de agente único, la divulgación contempla el uso de diferentes regímenes de tratamiento.

De acuerdo con ciertos aspectos de la divulgación, un anticuerpo anti-ICOS utilizado en las formulaciones y métodos de la divulgación, es un anticuerpo desnudo. En realizaciones relacionadas, la dosis de anticuerpo anti-ICOS desnudo utilizado es por lo menos aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, 15, 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, 19.5, 20, 20.5 mg/kg de peso corporal de un paciente. En ciertas realizaciones, la dosis de anticuerpo anti-ICOS desnudo utilizado es por lo menos aproximadamente 1 a 10, 5 a 15, 10 a 20, o 15 a 25 mg/kg de peso corporal de un paciente. En ciertas realizaciones, la dosis de anticuerpo anti-ICOS desnudo utilizado es por lo menos aproximadamente 1 a 20, 3 a 15, o 5 a 10 mg/kg de peso corporal de un paciente. En otras realizaciones, la dosis de anticuerpo anti-ICOS desnudo utilizado es por lo menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, o 10 mg/kg de peso corporal de un paciente.

En ciertas realizaciones, la dosis comprende aproximadamente 375 mg/m² de anticuerpo anti-ICOS administrado semanalmente durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 semanas consecutivas. En ciertas realizaciones, la dosis es por lo menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 mg/kg de peso corporal del paciente administrado semanalmente durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 semanas consecutivas.

Las dosis de ejemplo de anticuerpo anti-ICOS descritas anteriormente se pueden administrar como se describe en el presente documento. En una realización, las dosis anteriores son inyecciones de una sola dosis. En otras realizaciones, las dosis se administran durante un período de tiempo. En otras realizaciones, las dosis se administran varias veces durante un período de tiempo. El período de tiempo se puede medir en días, semanas o meses. Se pueden administrar dosis múltiples de un anticuerpo anti-ICOS a intervalos adecuados para lograr un beneficio terapéutico mientras se equilibran los efectos secundarios tóxicos. Por ejemplo, cuando se utilizan dosis múltiples, puede preferirse cronometrar los intervalos para permitir la recuperación del recuento de monocitos del paciente antes de repetir el tratamiento con anticuerpo. Este régimen de dosificación optimizará la eficacia del tratamiento, ya que la población de monocitos refleja la función de ADCC en el paciente.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de la divulgación se administran a un paciente humano siempre que el paciente responda a la terapia. En otras realizaciones, las formulaciones de la divulgación se administran a un paciente humano siempre que la enfermedad del paciente no progrese. En realizaciones relacionadas, las formulaciones de la divulgación se administran a un paciente humano hasta que la enfermedad de un paciente no progresa o no ha progresado durante un período de tiempo, luego al paciente no se le administran formulaciones de la divulgación a menos que la enfermedad vuelva a ocurrir o comience a progresar nuevamente. Si la progresión de la enfermedad se detiene o se revierte, entonces al paciente no se le administrarán las formulaciones de la divulgación hasta que el paciente tenga una recaída, es decir, la enfermedad que se está tratando vuelve a ocurrir o progresa. Tras esta reincidencia o progresión, el paciente puede ser tratado nuevamente con el mismo régimen de dosificación inicialmente utilizado o utilizando otras dosis descritas anteriormente.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de la divulgación se pueden administrar como una dosis de carga seguida de múltiples dosis más bajas (dosis de mantenimiento) durante un período de tiempo. En dichas realizaciones, las dosis pueden ser cronometradas y la cantidad ajustada para mantener un ICOS efectivo que exprese el agotamiento de las células T. En ciertas realizaciones, la dosis de carga es aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 mg/kg de peso corporal del paciente y la dosis de mantenimiento es de por lo menos aproximadamente 5 a 10 mg/kg de peso corporal del paciente. En otras realizaciones, la dosis de mantenimiento se administra a intervalos de cada 7, 10, 14 o 21 días.

Las composiciones de anticuerpos de la divulgación se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como el lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple (EM), enfermedad inflamatoria del intestino (EII; incluida la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y la enfermedad celíaca), diabetes mellitus

dependiente de insulina (IDDM), soriasis, tiroiditis autoinmunitaria, artritis reumatoide (AR) y glomerulonefritis. Adicionalmente, las composiciones de anticuerpos de la divulgación se pueden utilizar para inhibir o evitar el rechazo del trasplante o en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD).

Las formulaciones líquidas de la presente divulgación se pueden utilizar local o sistémicamente en el cuerpo como un agente terapéutico. Las formulaciones de la presente divulgación también se pueden utilizar en combinación con una o más terapias diferentes (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos). Cuando se utilizan una o más terapias diferentes (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos), se pueden administrar por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier ruta adecuada. Los agentes terapéuticos o profilácticos incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, fármacos sintéticos, péptidos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos (por ejemplo, pero no limitado a, nucleótidos de ADN y ARN que incluyen, pero no se limitan a, secuencias de nucleótidos antisentido, hélices triples, ARNi y secuencias de nucleótidos que codifican proteínas biológicamente activas, polipéptidos o péptidos) anticuerpos, moléculas inorgánicas sintéticas o naturales, agentes miméticos y moléculas orgánicas sintéticas o naturales.

Cualquier terapia (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) que se sepa que sea útil, o que se haya utilizado o se esté utilizando actualmente para la prevención, tratamiento y/o manejo de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o trastorno asociado con o caracterizada por una expresión y/o actividad aberrante de ICOS, una enfermedad o trastorno asociado con o caracterizada por una expresión y/o actividad aberrante del receptor de ICOS o una o más subunidades del mismo, una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra anfitrión puede ser utilizado en combinación con las formulaciones de anticuerpos líquidos de la presente divulgación de acuerdo con la divulgación descrita en el presente documento. Véase, por ejemplo, Gilman et al., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Tenth Ed., McGraw-Hill, New York, 2001; The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Berkow, M.D. et al. (eds.), 17th Ed., Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, NJ, 1999; y Cecil Textbook of Medicine, 20th Ed., Bennett and Plum (eds.), W.B. Saunders, Philadelphia, 1996 para obtener información sobre terapias, en particular agentes profilácticos o terapéuticos, que se han utilizado o se están utilizando actualmente para evitar, tratar y/o controlar enfermedades o trastornos asociados o caracterizados por la expresión y/o actividad aberrantes de ICOS, enfermedades o trastornos asociados o caracterizados por una expresión y/o actividad aberrantes del receptor ICOS o una o más subunidades del mismo, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias o uno o más síntomas del mismo. Los ejemplos de agentes profilácticos y terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios (por ejemplo, pero sin limitarse a, adrenocorticoides, corticosteroides (por ejemplo, pero no limitados a, beclometasona, budesonida, flunisolida, fluticasona, triamcinolona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, hidrocortisona), glucocorticoides, esteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroides (por ejemplo, pero no limitados a, aspirina, ibuprofeno, diclofenaco e inhibidores de COX-2) y antagonistas de leucotina (por ejemplo), pero no limitado a, montelukast, metil xantinas, zafirlukast y zileuton), beta2-agonistas (por ejemplo, pero no se limita a, albuterol, biterol, fenoterol, isoetharie, metaproterenol, pirbuterol, salbutamol, terbutalin formoterol, salmeterol, y salbutamol terbutalina), agentes anticolinérgicos (por ejemplo, pero no limitados a, bromuro de ipratropio y bromuro de oxitropio), sulfasalazina, penicilamina, dapsona, antihistamínicos, agentes antimaláricos (por ejemplo, pero no limitados a, hidroxiclороquina), agentes antivirales y antibióticos (por ejemplo, pero no limitados a, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, eritromicina, penicilina, mitramicina y antramycin (AMC)).

Una formulación líquida de la divulgación se puede administrar a un humano simultáneamente con una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos). El término "concurrentemente" no se limita a la administración de agentes/terapias profilácticas o terapéuticas exactamente al mismo tiempo, sino que más bien significa que una formulación líquida de la divulgación y el otro agente/terapia se administran a un mamífero en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que el anticuerpo (que incluye el fragmento de anticuerpo del mismo) que se une específicamente a ICOS contenido en la formulación líquida puede actuar junto con el otro agente/terapia para proporcionar un beneficio mayor que si se administraran de otra manera.

En diversas realizaciones, una formulación líquida de la divulgación y una o más de otras terapias (por ejemplo, uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos), se administran menos de 1 hora aparte, a aproximadamente 1 hora aparte, a aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas aparte, a aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas aparte, a aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas aparte, a aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas aparte, a aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas aparte, a aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas aparte, a aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas aparte, a aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas aparte, a aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas aparte, a aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas aparte, a aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas aparte, no más de 24 horas aparte o no más de 48 horas aparte. En realizaciones específicas, una formulación líquida de la divulgación y una o más de otras terapias se administran dentro de la misma visita al paciente. En otras realizaciones, una formulación líquida de la divulgación y una o más de otras terapias se administran a aproximadamente 2 a 4 días aparte, a aproximadamente 4 a 6 días aparte, a aproximadamente 1 semana aparte, a aproximadamente 1 a 2 semanas aparte, o más than 2 semanas aparte. En realizaciones específicas, una formulación líquida de la divulgación y una o más de otras terapias se administran en un marco de tiempo en el que ambos agentes todavía están activos. Un experto en la técnica podría determinar dicho marco de tiempo al determinar la vida media de los agentes administrados.

En ciertas realizaciones, una formulación líquida de la divulgación y una o más de otras terapias (por ejemplo, uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos), se administran de forma cíclica a un sujeto. La terapia cíclica implica la administración de un primer agente durante un periodo de tiempo, seguido por la administración de un segundo agente y/o tercer agente durante un periodo de tiempo y repitiendo esta administración secuencial. La terapia cíclica puede reducir el desarrollo de la resistencia a una o más terapias, evita o reduce los efectos secundarios de las terapias, y/o mejora la eficacia del tratamiento.

En otras realizaciones, formulación líquida de la divulgación y una o más de otras terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se administran en regímenes de dosificación metronómicos, ya sea por infusión continua o administración frecuente sin periodos de descanso prolongados. Dicha administración metronómica puede implicar la dosificación a intervalos constantes sin periodos de descanso. Normalmente, los agentes profilácticos o terapéuticos, en particular los agentes citotóxicos, se utilizan a dosis más bajas. Dichos regímenes de dosificación abarcan la administración diaria crónica de dosis relativamente bajas durante largos periodos de tiempo. En realizaciones específicas, el uso de dosis más bajas puede minimizar los efectos secundarios tóxicos y eliminar los periodos de descanso. En ciertas realizaciones, los agentes profilácticos y terapéuticos se suministran mediante dosis baja crónica o infusión continua que varía desde aproximadamente 24 horas a aproximadamente 2 días, a aproximadamente 1 semana, a aproximadamente 2 semanas, a aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 meses, a aproximadamente 3 meses, a aproximadamente 4 meses, a aproximadamente 5 meses, a aproximadamente 6 meses.

En una realización, una formulación líquida de la divulgación se administra en un régimen de dosificación que mantiene la concentración en plasma del anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) específico para ICOS a un nivel deseable (por ejemplo, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 µg/ml), que mantiene el agotamiento de células que expresan ICOS. En una realización específica, la concentración en plasma del anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) se mantiene a 0.001 µg/ml, 0.005 µg/ml, 0.01 µg/ml, 0.05 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0.2 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml, 6 µg/ml, 7 µg/ml, 8 µg/ml, 9 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 30 µg/ml, 35 µg/ml, 40 µg/ml, 45 µg/ml o 50 µg/ml. La concentración en plasma que es deseable en un sujeto variará dependiendo de diversos factores, que incluyen, pero no se limitan a, la naturaleza de la enfermedad o trastorno, la severidad de la enfermedad o trastorno y la afección del sujeto. Dichos regímenes de dosificación son especialmente beneficiosos en la prevención, tratamiento y/o manejo de una enfermedad crónica o trastorno.

En una realización, una formulación líquida de la divulgación se administra a un sujeto con una enfermedad o trastorno asociado o caracterizado por una expresión y/o actividad aberrante de ICOS, una enfermedad o trastorno asociado o caracterizado por una expresión y/o actividad aberrante del receptor ICOS o una o más subunidades del mismo, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad maligna, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra anfitrión, o uno o más síntomas del mismo utilizando un régimen de dosificación que mantiene la concentración en plasma del anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) que se une específicamente a ICOS a un nivel que mantiene por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90% o por lo menos 95% de agotamiento de células que expresan ICOS. En una realización específica, la concentración en plasma del anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) que se une específicamente a ICOS se mantiene a aproximadamente 0.001 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml en un sujeto con una enfermedad o trastorno asociado con o caracterizado por expresión aberrante y/o actividad de ICOS, una enfermedad o trastorno asociado con o caracterizado por expresión aberrante y/o actividad del receptor de ICOS o una o más subunidades del mismo, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad maligna, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra anfitrión, o uno o más síntomas de los mismos.

En algunas realizaciones, una formulación líquida de la divulgación se administra de forma intermitente a un sujeto, en el que la formulación líquida comprende un anticuerpo (que incluye fragmento de anticuerpo del mismo) conjugado a una fracción.

Cuando se utiliza en combinación con otras terapias (por ejemplo, agentes profilácticos y/o terapéuticos) las formulaciones líquidas de la divulgación y la otra terapia pueden actuar de forma aditiva o sinérgica. La divulgación contempla la administración de una formulación líquida de la divulgación en combinación con otras terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) por las mismas o diferentes rutas de administración, por ejemplo, pero no se limita a, oral y parenteral. En ciertas realizaciones, cuando una formulación líquida de la divulgación se administra concurrentemente con una o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) que producen potencialmente efectos secundarios adversos (que incluyen, pero no se limitan a, toxicidad), las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se pueden administrar ventajosamente a una dosis que cae por debajo del umbral que provoca el efecto secundario adverso.

5.36. Combinación con agentes quimioterapéuticos

La inmunoterapia anti-ICOS (que utiliza anticuerpos desnudos, inmunoconjugados o proteínas de fusión) se puede utilizar junto con otras terapias, que incluyen, pero no se limitan a quimioterapia, radioinmunoterapia (RIT), quimioterapia y radiación de haz externo (terapia de modalidad combinada, CMT) o Radioinmunoterapia de

modalidad combinada (CMRIT) sola o en combinación, etc. En ciertas realizaciones, una terapia con anticuerpos anti-ICOS de la presente divulgación se puede administrar junto con CHOP (ciclofosfamida-hidroxidoxorrubicina-oncovin (vincristina) -prednisona) Como se utiliza en el presente documento, el término "administrado junto con" significa que La inmunoterapia con ICOS se puede administrar antes, durante o después de la otra terapia empleada.

En ciertas realizaciones, una inmunoterapia anti-ICOS se realiza junto con un radionúclido citotóxico o isótopo radioterapéutico. Por ejemplo, un isótopo de emisión alfa tal como ^{225}Ac , ^{224}Ac , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{224}Ra , o ^{223}Ra . El radionúclido citotóxico también puede ser un isótopo emisor de beta tal como ^{186}Re , ^{188}Re , ^{90}Y , ^{131}I , ^{67}Cu , ^{177}Lu , ^{153}Sm , ^{166}Ho , o ^{64}Cu . Adicionalmente, el radionúclido citotóxico puede emitir electrodos de baja energía y sinérgicos e incluir los isótopos ^{125}I , ^{123}I o ^{77}Br . En otras realizaciones el isótopo puede ser ^{198}Au , ^{32}P , y similares. En ciertas realizaciones, la cantidad del radionucleido administrado al sujeto está entre aproximadamente 0.001 mCi/kg y aproximadamente 10 mCi/kg.

En algunas realizaciones, la cantidad del radionucleido administrado al sujeto está entre aproximadamente 0.1 mCi/kg y aproximadamente 1.0 mCi/kg. En otras realizaciones, la cantidad del radionucleido administrado al sujeto está entre aproximadamente 0.005 mCi/kg y 0.1 mCi/kg.

En ciertas realizaciones, una inmunoterapia anti-ICOS se combina con una toxina química o agente quimioterapéutico. La toxina química o agente quimioterapéutico se puede seleccionar del grupo que consiste de una enediina tal como caliqueamicina y esperamicina; duocarmicina, metotrexato, doxorubicina, melfalan, clorambucilo, ARA-C, vindesina, mitomicina C, cis-platino, etopósido, bleomicina y 5-fluorouracilo.

Las toxinas químicas adecuadas o los agentes quimioterapéuticos que se pueden utilizar en terapias de combinación con una inmunoterapia anti-ICOS incluyen miembros de la familia de moléculas enediina, talwa como la caliqueamicina y esperamicina. Las toxinas químicas también pueden tomarse del grupo que consiste en duocarmicina (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5,703,080 y la Patente de Estados Unidos No. 4,923,990), metotrexato, doxorubicina, melfalan, clorambucilo, ARA-C, vindesina, mitomicina C, cis -platino, etopósido, bleomicina y 5-fluorouracilo. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos también incluyen Adriamicina, Doxonrubicina, 5-Fluorouracilo, Citosina arabinósido ("Ara-C"), Ciclofosfamida, Tiotepa, Taxotere (docetaxel), Busulfan, Citoxina, Taxol, Metotrexato, Cisplatino, Melfalan, Vinblastina, Bleomicina, Etopósido, Ifosfamida, Mitomicina C, Mitoxantrona, Vincristina, Vinorelbina, Carboplatino, Teniposide, Daunomicina, Carminomicina, Aminopterin, Dactinomicina, Mitomicinas, esperamicinas (véase, Patente de Estados Unidos No. 4,675,187), Melfalan y otras cantidades de nitrógeno relacionadas.

En otras realizaciones, por ejemplo, "CVB" (1.5 g/m² de ciclofosfamida, 200-400 mg/m² de etopósido, y 150-200 mg/m² de carmustina) se puede utilizar en terapias combinadas de la divulgación. CVB es un régimen que se utiliza para tratar el linfoma no Hodgkin. Patti et al., Eur. J. Haematol. 51:18 (1993). Otros regímenes quimioterapéuticos de combinación adecuados son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Freedman et al., "Non-Hodgkin's Lymphomas," in CANCER MEDICINE, VOLUME 2, 3rd Edition, Holland et al. (eds.), pp. 2028-2068 (Lea & Febiger 1993). Como ilustración, los regímenes quimioterapéuticos de primera generación para el tratamiento del linfoma no Hodgkin de grado intermedio incluyen C-MOPP (ciclofosfamida, vincristina, procarbazona y prednisona) y CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona). Un régimen quimioterapéutico de segunda generación útil es m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametazona y leucovorina), mientras que un régimen adecuado de tercera generación es el MACOP (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina y leucovorina). Fármacos útiles adicionales incluyen butirato de fenilo y brostatin-1. En una terapia multimodal, tanto los fármacos quimioterapéuticos como las citoquinas se administran conjuntamente con un anticuerpo, inmunoconjugado o proteína de fusión de acuerdo con la presente divulgación. Las citoquinas, los fármacos quimioterapéuticos y el anticuerpo, el inmunoconjugado o la proteína de fusión se pueden administrar en cualquier orden, o en conjunto.

Otras toxinas que se pueden utilizar en las formulaciones y métodos de la divulgación incluyen lectinas venenosas, toxinas de plantas tales como toxinas de ricina, abrina, modeccin, botulina y difteria. Por supuesto, las combinaciones de las diversas toxinas también podrían estar acopladas a una molécula de anticuerpo, por lo que se acomoda a la citotoxicidad variable. Ilustrativos de las toxinas que se emplean adecuadamente en las terapias de combinación de la divulgación son ricina, abrina, ribonucleasa, DNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antiviral de hierba carmín, gelonina, toxina de la difteria, exotoxina de Pseudomonas y endotoxina de Pseudomonas. Véase, por ejemplo, Pastan et al., Cell 47: 641 (1986), y Goldenberg et al., Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994). Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena A de la difteria, los fragmentos activos no vinculantes de la toxina de la difteria, la cadena A de la exotoxina (de Pseudomonas aeruginosa), la cadena A de la ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de Modeccin, la cadena alfa-sarcina, proteínas Aleuritesfordii, proteínas diantinas, proteínas Phytolaca americana (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restriccina, fenomicina, enomicina y tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado en octubre. 28, 1993.

Las toxinas y los agentes quimioterapéuticos adecuados se describen en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995), and in GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985). Aquellos expertos en la técnica conocen otras toxinas y/o agentes quimioterapéuticos adecuados.

- 5 Una inmunoterapia anti-ICOS de la presente descripción también puede estar en conjunto con una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO81/01145) en un fármaco activo contra el cáncer. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la Patente de Estados Unidos No. 4,975,278. El componente enzimático de dichas combinaciones incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal manera que lo convierta en su forma más activa y citotóxica. El término "profármaco", como se utiliza en esta solicitud, se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco original y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma original más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) and Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al. (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos que se pueden utilizar en combinación con anticuerpos anti-ICOS incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácido, profármacos glucosilados, profármacos que contienen α -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre de citotóxicos más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivarse en una forma de profármaco para su uso en esta divulgación incluyen, pero no se limitan a, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

- 25 En ciertas realizaciones, la administración de formulaciones y los métodos de la divulgación pueden permitir el aplazamiento de la terapia tóxica y pueden ayudar a evitar efectos secundarios innecesarios y los riesgos de complicaciones asociadas con la quimioterapia y retrasar el desarrollo de resistencia a la quimioterapia. En ciertas realizaciones, las terapias tóxicas y/o la resistencia a las terapias tóxicas se retrasan en los pacientes a los que se les administran formulaciones y los métodos de retardo de la divulgación hasta aproximadamente 6 meses, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 años.

30 5.37. Combinación con Anticuerpos Terapéuticos

- Una inmunoterapia anti-ICOS descrita en este documento se puede administrar en combinación con otros anticuerpos, que incluyen, pero no se limitan a, mAb anti-CD19, mAb anti-CD52, anticuerpo anti-CD22 y anticuerpos anti-CD20, tales como RITUXAN™ (C2B8; RITUXIMAB™; IDEC Pharmaceuticals). Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que se pueden utilizar en combinación con anticuerpos de la divulgación o utilizados en formulaciones de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, HERCEPTIN™ (Trastuzumab; Genentech), MYLOTARG™ (Gemtuzumab ozogamicina; Wyeth Pharmaceuticals), CAMPATH™ (Alemtuzumab; Berlex), ZEVALIN™ (Ipriumomab tiuxetan; Biogen Idec), BEXXAR™ (Tositumomab; Glaxo- SmithKline Corixa), ERBITUX™ (Cetuximab; Imclone), y AVASTIN™ (Bevacizumab; Genentech).

5.38. Compuestos de combinación que mejoran la función de monocitos o macrófagos

- 40 En ciertas realizaciones de los métodos de la divulgación, un compuesto que mejora la función de los monocitos o macrófagos (por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95% o más) se puede utilizar junto con un inmunoterapia anti-ICOS. Dichos compuestos son conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, citoquinas tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-12) e interferones (por ejemplo, interferón alfa o gamma).
- 45 El compuesto que mejora la función o la mejora de monocitos o macrófagos puede formularse en la misma formulación farmacéutica que el anticuerpo, inmunoconjugado o fragmento de unión a antígeno. Cuando se administran por separado, el anticuerpo/fragmento y el compuesto se pueden administrar simultáneamente (dentro de un período de horas entre sí), se pueden administrar durante el mismo curso de terapia, o se pueden administrar secuencialmente (es decir, el paciente recibe primero un curso). del tratamiento del anticuerpo/fragmento y luego un curso del compuesto que mejora la función de macrófagos/monocitos o viceversa). En dichas realizaciones, el compuesto que mejora la función de los monocitos o macrófagos se administra al sujeto humano antes, al mismo tiempo o después del tratamiento con otros regímenes terapéuticos y/o formulaciones de la divulgación. En una realización, el sujeto humano tiene un recuento de leucocitos, monocitos, neutrófilos, linfocitos y/o basófilos en la sangre que está dentro del rango normal para los humanos. Los rangos normales para los leucocitos de la sangre humana (total) son aproximadamente 3.5- aproximadamente 10.5 ($10^9/L$). Los rangos normales para los neutrófilos de la sangre humana son aproximadamente 1.7- aproximadamente 7.0 ($10^9/L$), monocitos son aproximadamente 0.3- aproximadamente 0.9 ($10^9/L$), linfocitos son aproximadamente 0.9- aproximadamente 2.9 ($10^9/L$), basófilos son aproximadamente 0- aproximadamente 0.3 ($10^9/L$), y eosinófilos son aproximadamente 0.05- aproximadamente 0.5 ($10^9/L$). En otras realizaciones, el sujeto humano tiene un recuento de leucocitos en sangre que es menor del rango

normal para humanos, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, o 0.8 (10⁹/L) leucocitos.

5.39. Combinación con agentes inmunorreguladores

5 La inmunoterapia anti-ICOS de la presente divulgación también puede realizarse junto con un agente inmunorregulador. El término "agente inmunorregulador", como se utiliza en el presente documento para terapia de combinación, se refiere a sustancias que actúan para suprimir, enmascarar o mejorar el sistema inmunológico del anfitrión.

10 Ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, agentes proteínicos tales como citoquinas, miméticos de péptidos y anticuerpos (por ejemplo, fragmentos humanos, humanizados, quiméricos, monoclonales, policlonales, Fvs, ScFvs, Fab o F(ab)₂ o fragmentos de unión a epítopos), moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico antisentido, ARNi y hélices triples), moléculas pequeñas, compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos. En particular, los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, citoxano, inmurano, ciclosporina A, minociclina, azatioprina, antibióticos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitriloamindes (por ejemplo, leflunamida), moduladores del receptor de células T y moduladores del receptor de citocinas. Los ejemplos de inmunosupresores incluyen, pero no se limitan a, micofenolato mofetilo (CELLCEPT™), D-penicilamina (CUPRIMINE™, DEPEN™), metotrexato (RHEUMATREX™, TREXALL™), e hidroxicloroquina sulfato (PLAQUENIL™).

20 Los agentes inmunomoduladores también incluirían sustancias que suprimen la producción de citoquinas, disminuyen o suprimen la expresión de autoantígenos, o enmascaran los antígenos de MHC. Ejemplos de dichos agentes incluyen 2-amino-6-aryl-5-pirimidinas sustituidas (véase, Patente de Estados Unidos No. 4,665,077), azatioprina (o ciclofosfamida, si hay una reacción adversa a la azatioprina); bromocriptina; glutaraldehído (que enmascara los antígenos MHC, como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 4,120,649); anticuerpos anti-idiotípicos para antígenos de MHC y fragmentos de MHC; ciclosporina A; esteroides tales como glucocorticosteroides, por ejemplo, prednisona, metilprednisolona y dexametasona; antagonistas de los receptores de citoquinas o citoquinas, que incluyen anticuerpos anti-interferón-gamma, -beta o alfa; anticuerpos del factor alfa de necrosis antitumoral; anticuerpos contra el factor beta de necrosis tumoral; anticuerpos anti-interleucina-2 y anticuerpos anti-receptor de IL-2; anticuerpos anti-L3T4; globulina anti-linfocito heteróloga; anticuerpos pan-T, preferiblemente anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4/CD4a; péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3 (documento WO 90/08187 publicado el 26 de julio de 1990); estreptoquinasa; TGF-beta.; estreptodomas; ARN o ADN del anfitrión; FK506; RS-61443; desoxiespergualina; rapamicina; Receptor de células T (Patente U.S. No. 5,114,721); Fragmentos de receptores de células T (Offner et al., Science 251: 430-432 (1991); WO 90/11294; y WO 91/01133); y anticuerpos del receptor de células T (documento EP 340.109) tales como T10B9.

35 Ejemplos de citoquinas incluyen, pero no se limitan a, linfoquinas, monokinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen la hormona del crecimiento, tales como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo y hormona del crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina prorelaxina; hormonas glucoproteínas tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-alfa; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF), tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófagos-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CgP (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (ILs) tal como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Como se utiliza en este documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen además administrar al sujeto uno o más agentes inmunomoduladores, preferiblemente una citoquina. Las citoquinas preferidas se seleccionan del grupo que consiste en interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-12, IL-15, IL-18, G-CSF, GM-CSF, trombopoyetina y gamma interferon

50 En ciertas realizaciones, el agente inmunomodulador es un modulador del receptor de citoquina. Ejemplos de moduladores del receptor de citoquina incluyen, pero no se limitan a, receptores de citoquina solubles (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor TNF-alfa o un fragmento del mismo, el dominio extracelular de un receptor IL-1beta o un fragmento del mismo, y el dominio extracelular de un receptor IL-6 o un fragmento del mismo), citoquinas o fragmentos de las mismas (por ejemplo, interleucina (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, TNF-alfa, TNF-beta, interferón (IFN)-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, y GM-CSF), anticuerpos del receptor anti-citoquina (por ejemplo, anticuerpos del receptor anti-IL-2, anticuerpos del receptor anti-IL-4, anticuerpos del receptor anti-IL-6, anticuerpos del receptor anti-IL-10, y anticuerpos del receptor anti-IL-12), anticuerpos anti-citoquina (por ejemplo, anticuerpos anti-IFN del receptor, anticuerpos anti-TNF-alfa, anticuerpos anti-IL-1beta, anticuerpos anticuerpos anti-IL-6, anti-IL-9, anticuerpos anti-IL-17, y anticuerpos anti-IL-12). En una realización específica, un

modulador del receptor de citoquina es IL-4, IL-10, o un fragmento del mismo. En otra realización, un modulador del receptor de citoquina es un anticuerpo anti-IL-1beta, anticuerpo anti-IL-6, anticuerpo del receptor anti-IL-12, anticuerpo anti-TNF-alfa. En otra realización, a modulador del receptor de citoquina es el dominio extracelular de un receptor TNF-alfa o un fragmento del mismo. En ciertas realizaciones, un modulador del receptor de citoquina no es un antagonista TNF-alfa.

En ciertas realizaciones, el agente inmunomodulador es un modulador del receptor de células T. Ejemplos de moduladores del receptor de células T incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos del receptor anti-célula T (por ejemplo anticuerpos, anti-CD4 (por ejemplo, cM-T412 (Boeringer), IDEC-CE9.1 (IDEC y SKB), mAB 4162W94, Ortoclon y OKTcdr4a (Janssen-Cilag)), anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD5 (por ejemplo, un inmunoconjugado ligado a ricina anti-CD5), anticuerpos anti-CD7 (por ejemplo, CHH-380 (Novartis)), anticuerpos anti-CD8, anticuerpos monoclonales del ligando anti-CD40, anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, CAMPATH 1H (Ilex)), anticuerpos monoclonales anti-CD2) y CTLA4-inmunoglobulina.

En ciertas realizaciones, el agente inmunomodulador es un antagonista TNF-alfa. Ejemplos de antagonistas de TNF-alfa incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos (por ejemplo, infliximab (REMICADE™; Centocor), D2E7 (Abbott Laboratories/ Knoll Pharmaceuticals Co., Mt. Olive, N.J.), CDP571 que también se conoce como HUMIRA™ y CDP-870 (ambos de Celltech/Farmacia, Slough, U.K.), y TN3-19.12 (Williams et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2762-2766; Thorbecke et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7375-7379)) receptores TNF-alfa solubles (por ejemplo, sTNF-R1 (Amgen), etanercept (ENBRELE™; Immunex) y su homólogo de rata RENBRELE™, inhibidores solubles de TNF-alfa derivados de TNFRI, TNFRII (Kohn et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:8331-8335), y TNF-alfa Inh (Seckinger et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:5188-5192)), IL-10, TNFR-IgG (Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:10535-10539), el producto de murino TBP-1 (Serono/Yeda), la vacuna CytoTAB (Protherics), molécula antisentido 104838 (ISIS), el péptido RDP-58 (SangStat), thlidomida (Celgene), CDC-801 (Celgene), DPC-333 (Dupont), VX- 745 (Vertex), AGIX-4207 (AtheroGenics), ITF-2357 (Italfarmaco), NPI-13021-31 (Nereus), SCIO-469 (Scios), objetivo TACE (Immunix/AHP), CLX-120500 (Calyx), Thiazolopyrim (Dynavax), auranofin (Ridaura) (SmithKline Beecham Pharmaceuticals), quinacrina (diclorhidrato de mepacrina), tenidap (Enablex), Melanina (Large Scale Biological), y agentes anti-p38 MAPK por Uriach.

Una inmunoterapia anti-ICOS también puede estar en combinación con un agente inmunorregulador. En este enfoque, se puede utilizar un anticuerpo anti-ICOS quimérico, humano o humanizado. El término "agente inmunorregulador", como se utiliza en el presente documento para terapia de combinación, se refiere a sustancias que actúan para suprimir, enmascarar o mejorar el sistema inmunológico del anfitrión. Esto incluiría sustancias que suprimen la producción de citoquinas, regulan a la baja o suprimen la expresión del auto-antígeno, o enmascaran los antígenos MHC. Los ejemplos de dichos agentes incluyen 2-amino-6-aril-5-pirimidinas sustituidas (véase, Patente de Estados Unidos No. 4,665,077), azatioprina (o ciclofosfamida, si hay una reacción adversa a la azatioprina); bromocriptina; glutaraldehído (que enmascara los antígenos MHC, como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 4,120,649); anticuerpos antiidiotípicos para antígenos de MHC y fragmentos de MHC; ciclosporina A; esteroides tales como glucocorticosteroides, por ejemplo, prednisona, metilprednisolona y dexametasona; antagonistas de los receptores de citoquinas o citoquinas que incluyen anticuerpos anti-interferón-γ, -β o -α; anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral-α; anticuerpos contra el factor β de necrosis tumoral; anticuerpos anti-interleuquina-2 y anticuerpos anti-receptor de IL-2; anticuerpos anti-L3T4; globulina anti-linfocito heteróloga; anticuerpos pan-T, por ejemplo anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4/CD4a; péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3 (documento WO 90/08187 publicado el 26 de julio de 1990); estreptoquinasa; TGF-β; estreptodornasa; ARN o ADN del anfitrión; FK506; RS-61443; desoxiespergualina; rapamicina; Receptor de células T (Patente U.S. No. 5,114,721); Fragmentos de receptores de células T (Offner et al., Science 251: 430-432 (1991); WO 90/11294; y WO 91/01133); y anticuerpos del receptor de células T (documento EP 340.109) tales como T10B9. Ejemplos de citoquinas incluyen, pero no se limitan a, linfoquinas, monokinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen la hormona del crecimiento, tales como la hormona del crecimiento humano, la hormona del crecimiento humano N-metionilo y la hormona del crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina pror relaxina; hormonas glucoproteínas tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral-α; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina activa; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-α; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF), tales como TGF-α y TGF-β; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófagos-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CgP (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (ILs) tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-1 I, IL-12, IL-5; un factor de necrosis tumoral tal como TNF-α o TNF-β; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Como se utiliza en este documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen además administrar al sujeto uno o más agentes inmunomoduladores, por ejemplo, una citoquina. Las citoquinas adecuadas se pueden seleccionar del grupo que consiste en interleuquina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-12, IL-15, IL-18, G-CSF, GM-CSF, trombopoyetina y y interferón.

Estos agentes inmunorreguladores se administran al mismo tiempo o en momentos separados de los anticuerpos anti-ICOS. El agente inmunorregulador preferido dependerá de muchos factores, que incluye el tipo de trastorno que se está tratando, así como la historia del paciente, pero el agente se puede seleccionar con frecuencia de la ciclosporina A, un glucocorticosteroide (por ejemplo, prednisona o metilprednisolona), azatioprina, bromocriptina, globulina heteróloga anti-linfocitos, o una mezcla de los mismos.

5.40. Combinación con otros agentes terapéuticos

Los agentes que actúan sobre la neovascularización tumoral también se pueden utilizar junto con la inmunoterapia anti-ICOS e incluyen agentes de unión a tubulina tales como la combrestatina A4 (Griggs et al., *Lancet Oncol.* 2:82, (2001)) y angiostatina y endostatina (revisado en Rosen, *Oncologist* 5:20 (2000)). Los inmunomoduladores adecuados para uso en combinación con anticuerpos anti-ICOS incluyen, pero no se limitan a, interferón α , interferón γ y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). En ciertas realizaciones, los agentes terapéuticos utilizados en terapias de combinación que utilizan formulaciones y métodos de la divulgación son péptidos.

En ciertas realizaciones, una inmunoterapia anti-ICOS se realiza junto con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas de ADN de doble cadena en concentraciones subpicomolares. Los análogos estructurales de la caliqueamicina que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, γ^1 , γ^2 , γ^3 , N-acetil- γ^1 , PSAG y 011 Hinman et al., *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993) y Lode et al., *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)).

En ciertas realizaciones, un régimen de tratamiento incluye compuestos que mitigan los efectos citotóxicos de una formulación de anticuerpo anti-ICOS. Dichos compuestos incluyen analgésicos (por ejemplo, acetaminofén), bifosfonatos, antihistamínicos (por ejemplo, maleato de clorfeniramina) y esteroides (por ejemplo, dexametasona, retinoides, deltoids, betamethasona, cortisol, cortisona, prednisona, dehidrotestosterona, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógeno, testosterona, progestinas)

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico utilizado en combinación con una inmunoterapia anti-ICOS es una molécula pequeña (es decir, compuestos inorgánicos u orgánicos que tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 2500 daltons). Por ejemplo, las bibliotecas de moléculas pequeñas pueden obtenerse comercialmente de Specs y BioSpecs B.V. (Rijswijk, Países Bajos), Chembridge Corporation (San Diego, California), Comgenex utiliza Inc. (Princeton, N.J.), y Maybridge Chemicals Ltd. (Cornwall PL34 OHW, Reino Unido).

En ciertas realizaciones, se puede administrar una inmunoterapia anti-ICOS en combinación con un agente antibacteriano. Ejemplos no limitantes de agentes antibacterianos incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas de ácido nucleico, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas y moléculas pequeñas que inhiben y/o reducen una infección bacteriana, inhiben y/o reducen la replicación de bacterias, o inhibir y/o reducir la propagación de bacterias a otras células o sujetos. Ejemplos específicos de agentes antibacterianos incluyen, pero no se limitan a, antibióticos tales como penicilina, cefalosporina, imipenem, axtreonam, vancomicina, cicloserina, bacitracina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, estreptomina, tobramicina, gentamicina, amikacina, kanamicina, neomicina, espectinomina, trimetoprim, norfloxacin, rifampin, polimixina, anfotericina B, nistatina, ketoconazol, isoniazid, metronidazol, y pentamidina.

En ciertas realizaciones, se puede administrar una inmunoterapia anti-ICOS en combinación con un agente antifúngico. Los ejemplos específicos de agentes antifúngicos incluyen, pero no se limitan a, fármacos azólicos (por ejemplo, miconazol, ketoconazol (NIZORAL®), acetato de caspofungina (CANCIDAS®), imidazol, triazoles (por ejemplo, fluconazol (DIFLUCAN®)) e itraconazol. (SPORANOX®), polieno (por ejemplo, nistatina, anfotericina B (FUNGIZONE®), complejo de lípidos de anfotericina B ("ABLC") (ABELCET®), anfotericina B dispersión coloidal ("ABCD") (AMPHOTEC®), anfotericina B anfotericina B (AMBISONE®), yoduro de potasio (KI), pirimidina (por ejemplo, flucitosina (ANCOBON®) y voriconazol (VFEND®)). La administración de agentes antibacterianos y antifúngicos puede mitigar los efectos o la escalada de enfermedades infecciosas que pueden ocurrir en los métodos de la divulgación en los que las células T que expresan ICOS de un paciente se agotan significativamente.

En ciertas realizaciones de la divulgación, se puede administrar una inmunoterapia anti-ICOS en combinación con uno o más de los agentes descritos anteriormente para mitigar los efectos secundarios tóxicos que pueden acompañar la administración de las formulaciones de la divulgación. En otras realizaciones, se puede administrar una inmunoterapia anti-ICOS en combinación con uno o más agentes que son bien conocidos en la técnica para utilizar en la mitigación de los efectos secundarios de la administración de anticuerpos, quimioterapia, toxinas o fármacos.

En realizaciones de la divulgación en las que se administra una inmunoterapia anti-ICOS en combinación con otro anticuerpo o anticuerpo y/o agente, el anticuerpo o anticuerpos y/o agentes adicionales se pueden administrar en cualquier secuencia relativa a la administración del anticuerpo de esta divulgación. Por ejemplo, el anticuerpo o anticuerpos adicionales se pueden administrar antes, simultáneamente con y/o después de la administración de un anticuerpo anti-ICOS o inmunoconjugado al sujeto humano. El anticuerpo o anticuerpos adicionales pueden estar presentes en la misma formulación farmacéutica que un anticuerpo de la divulgación, y/o estar presentes en una formulación farmacéutica diferente. La dosis y el modo de administración de un anticuerpo de esta divulgación y la

dosis del anticuerpo o anticuerpos adicionales pueden ser iguales o diferentes, de acuerdo con cualquiera de las enseñanzas de las cantidades de dosificación y modos de administración que se proporcionan en esta solicitud y como son bien conocido en la técnica.

5.41. Uso de anticuerpos anti-ICOS en el diagnóstico de tumores malignos de células T

La presente divulgación también abarca anticuerpos anti-ICOS, y formulaciones de los mismos, que se unen inmuno-específicamente al antígeno ICOS humano, cuyos anticuerpos anti-ICOS se conjugan con un agente de diagnóstico o detectable. En ciertas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos anti-ICOS con una función efectora mejorada. Dichos anticuerpos anti-ICOS pueden ser útiles para monitorizar o pronosticar el desarrollo o la progresión de una enfermedad maligna de células T como parte de un procedimiento de prueba clínica, tal como determinar la eficacia de una terapia particular. Dicho diagnóstico y detección se pueden realizar mediante el acoplamiento de un anticuerpo anti-ICOS que se une inmuno-específicamente al antígeno ICOS humano a una sustancia detectable que incluye, entre otras, diversas enzimas, tales como, pero no limitadas a peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos protésicos, tales como, pero sin limitación, estreptavidina biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no limitados a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocinato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero sin limitarse a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero sin limitación, luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radioactivos, tales como pero no limitado a yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), y tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , y ^{117}Tl ; metales emisores de positrones que utilizan diversas tomografías de emisión de positrones, iones metálicos paramagnéticos norradioactivos y moléculas que están radiomarcadas o conjugadas con radioisótopos específicos. Cualquier etiqueta detectable que se pueda medir fácilmente se puede conjugar con un anticuerpo anti-ICOS y utilizarse en el diagnóstico de tumores malignos de células T. La sustancia detectable se puede acoplar o conjugar ya sea directamente a un anticuerpo o indirectamente, a través de un intermedio (tales como, por ejemplo, un ligador conocido en la técnica) utilizando técnicas conocidas en el arte. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 4,741,900 para iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para uso como diagnóstico según la presente descripción. En ciertas realizaciones, la descripción proporciona kits de diagnóstico que comprenden un anticuerpo anti-ICOS conjugado con un agente de diagnóstico o detectable.

5.42. Uso de anticuerpos anti-ICOS en la monitorización de la reconstitución inmunitaria

La presente divulgación también abarca anticuerpos anti-ICOS, y formulaciones de los mismos, que se unen inmuno-específicamente al antígeno ICOS humano, cuyos anticuerpos anti-ICOS se conjugan con un agente de diagnóstico o detectable. Dichos anticuerpos anti-ICOS pueden ser útiles para monitorizar la reconstitución del sistema inmunológico después de una terapia inmunosupresora o un trasplante de médula ósea. Dicha monitorización se puede realizar mediante el acoplamiento de un anticuerpo anti-ICOS que se une inmuno-específicamente al antígeno ICOS humano a una sustancia detectable que incluye, entre otras, diversas enzimas, como la peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos protésicos, tales como, pero sin limitación, estreptavidina biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no limitados a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocinato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero no limitado a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero no limitados a, luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radioactivos, tales como, pero no limitado a, yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), y tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , y ^{117}Tl ; metales emisores de positrones que utilizan diversas tomografías de emisión de positrones, iones metálicos paramagnéticos no radioactivos y moléculas que están radiomarcadas o conjugadas con radioisótopos específicos. Cualquier etiqueta detectable que pueda medirse fácilmente se puede conjugar con un anticuerpo anti-ICOS y utilizarse en el diagnóstico de una enfermedad o trastorno autoinmunitario. La sustancia detectable se puede acoplar o conjugar ya sea directamente a un anticuerpo o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un ligador conocido en la técnica) utilizando técnicas conocidas en el artw. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 4,741,900 para iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para uso como diagnóstico según la presente divulgación. En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona kits de diagnóstico que comprenden un anticuerpo anti-ICOS conjugado con un agente de diagnóstico o detectable.

5.43. Uso de anticuerpos anti-ICOS en el diagnóstico de enfermedades o trastornos autoinmunitarios

La presente divulgación también abarca anticuerpos anti-ICOS, y formulaciones de los mismos, que se unen inmuno-específicamente al antígeno ICOS humano, cuyos anticuerpos anti-ICOS se conjugan con un agente de diagnóstico o detectable. En ciertas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos anti-ICOS con una función efectora mejorada. Dichos anticuerpos anti-ICOS pueden ser útiles para monitorizar o pronosticar el desarrollo o la progresión de una enfermedad o trastorno autoinmunitario como parte de un procedimiento de prueba clínica, como determinar la eficacia de una terapia particular. Dicho diagnóstico y detección se pueden realizar mediante el

acoplamiento de un anticuerpo anti-ICOS que se une inmunoespecíficamente al antígeno ICOS humano a una sustancia detectable que incluye, pero no se limita a, diversas enzimas, como la peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta -galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos protésicos, tales como, pero sin limitación, estreptavidina biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no limitados a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocinato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero sin limitarse a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero no se limita a, luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radioactivos, tales como pero no limitado a yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), y tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , y ^{117}In ; metales emisores de positrones que utilizan diversas tomografías de emisión de positrones, iones metálicos paramagnéticos no radioactivos y moléculas que están radiomarcadas o conjugadas con radioisótopos específicos. Cualquier etiqueta detectable que pueda medirse fácilmente se puede conjugar con un anticuerpo anti-ICOS y utilizarse en el diagnóstico de una enfermedad o trastorno autoinmunitario. La sustancia detectable se puede acoplar o conjugar ya sea directamente a un anticuerpo o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un ligador conocido en la técnica) utilizando técnicas conocidas en el artw. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 4,741,900 para iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para uso como diagnóstico según la presente divulgación. En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona kits de diagnóstico que comprenden un anticuerpo anti-ICOS conjugado con un agente de diagnóstico o detectable.

5.44. Kits

La divulgación proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes cargados con una formulación líquida de la divulgación. En una realización, un recinete cargado con una formulación líquida de la divulgación es una jeringa precargada. En una realización específica, las formulaciones líquidas de la divulgación comprenden anticuerpos (que incluye fragmentos de anticuerpo de los mismos) fusionados de forma recombinante o conjugados químicamente con otra fracción, que incluye, pero no se limita a, una proteína heteróloga, un polipéptido heterólogo, un péptido heterólogo, una molécula grande, una molécula pequeña, una secuencia marcadora, un agente de diagnóstico o detectable, una fracción terapéutica, una fracción de fármaco, un ión metálico radiactivo, un segundo anticuerpo y un soporte sólido. La divulgación también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende en uno o más primeros recipientes una formulación líquida de la divulgación y en uno o más segundos recipientes uno o más agentes profilácticos o terapéuticos útiles para la prevención, manejo o tratamiento de una enfermedad o trastorno, por ejemplo, una enfermedad o trastorno asociado o caracterizado por una expresión y/o actividad aberrantes de ICOS, una enfermedad o trastorno asociado o caracterizado por una expresión y/o actividad aberrante del receptor de ICOS, una enfermedad o trastorno autoinmunitario, una enfermedad o trastorno inflamatorio, una enfermedad o trastorno proliferativo de células T, un tumor maligno de células T, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra anfitrión, o uno o más síntomas de los mismos. En una realización específica, las formulaciones líquidas de la divulgación se formulan en frascos de dosis única como un líquido estéril que contiene tampón de 10 mM de histidina a pH 6.0, 80 mM de NaCl, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80. Las formulaciones de la divulgación se pueden suministrar en frascos de 3 cc de ámbar de borosilicato tipo I de USP (West Pharmaceutical Services, número de pieza 6800-0675) con un volumen objetivo de 1.2 mL. Opcionalmente asociado con dichos recipientes puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación de la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana. En otra realización, una formulación de la divulgación puede suministrarse en una jeringa precargada.

En una realización, un recipiente cargado con una formulación líquida de la divulgación es una jeringa precargada. Cualquier jeringa precargada conocida por un experto en la técnica se puede utilizar en combinación con una formulación líquida de la divulgación. Las jeringas precargadas que se pueden utilizar se describen, por ejemplo, pero no se limitan a Publicaciones PCT WO05032627, WO08094984, WO9945985, WO03077976, Patentes de Estados Unidos US6792743, US5607400, US5893842, US7081107, US7041087, US5989227, US6807797, US6142976, US5899889, Publicación de Patentes de Estados Unidos US20070161961A1, US20050075611A1, US20070092487A1, US20040267194A1, US20060129108A1. Las jeringas precargadas se pueden elaborar de diversos materiales. En una realización una jeringa precargada es una jeringa de vidrio. En otra realización una jeringa precargada es una jeringa de plástico. Un experto en la técnica entiende que la naturaleza y/o la calidad de los materiales utilizados para fabricar la jeringa puede influir en la estabilidad de una formulación de proteína almacenada en la jeringa. Por ejemplo, se entiende que los lubricantes a base de silicio depositados en la superficie interior de la cámara de la jeringa pueden afectar la formación de partículas en la formulación de proteína. En una realización, una jeringa precargada comprende un lubricante a base de silicona. En una realización, una jeringa precargada comprende cocido sobre silicona. En otra realización, una jeringa precargada está libre de lubricantes a base de silicona. Un experto en la técnica también entiende que pequeñas cantidades de elementos contaminantes que se filtran en la formulación desde el cilindro de la jeringa, la tapa de la punta de la jeringa, el émbolo o el tapón también pueden influir en la estabilidad de la formulación. Por ejemplo, se entiende que el tungsteno introducido durante el proceso de fabricación puede afectar adversamente la estabilidad de la formulación. En una realización, una jeringa precargada puede comprender tungsteno a un nivel superior a 500 ppb. En otra realización, una jeringa precargada es una jeringa baja en tungsteno. En otra realización, una jeringa precargada puede comprender

tungstenoo a un nivel entre aproximadamente 500 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 400 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 300 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 200 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 100 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 50 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 25 ppb y aproximadamente 10 ppb.

- 5 La presente divulgación proporciona kits que se pueden utilizar en los métodos anteriores. En una realización, un kit comprende una formulación líquida de la divulgación, en uno o más recipientes. En otra realización, un kit comprende una formulación líquida de la divulgación, en uno o más recipientes, y uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para la prevención, manejo o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con o caracterizado por caracterizado por expresión y/o actividad aberrante de ICOS, una enfermedad o trastorno asociado con o caracterizado por expresión y/o actividad aberrante del receptor ICOS, una enfermedad o trastorno autoinmunitario, una enfermedad o trastorno inmunitario, una enfermedad o trastorno proliferativo de células T, una enfermedad maligna de células T, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra anfitrión, o uno o más síntomas del mismo. En una realización específica, el anticuerpo (que incluye fragmentos de anticuerpo de los mismos) incluido en dichas formulaciones líquidas es un fragmento de unión a antígeno. El kit puede comprender adicionalmente instrucciones para prevenir, tratar y/o manejar un trastorno (por ejemplo, utilizando las formulaciones líquidas de la divulgación solas o en combinación con otro agente profiláctico o terapéutico), así como también efectos secundarios e información de dosificación para el método de administración.

5.45. Artículos de Fabricación

- 20 La presente divulgación también abarca un producto farmacéutico etiquetado y empaquetado terminado. Este artículo de fabricación incluye la forma de dosificación unitaria apropiada en un recipiente o contenedor apropiado, como un frasco de vidrio, una jeringa precargada u otro recipiente que esté herméticamente cerrado. La forma de dosificación unitaria se proporciona como una solución libre de partículas estéril que comprende un anticuerpo anti-ICOS que es adecuado para la administración parenteral.

- 25 En una realización, la forma de dosificación unitaria es adecuada para suministro intravenoso, intramuscular, intranasal, oral, tópico o subcutáneo. Por lo tanto, la divulgación abarca soluciones estériles adecuadas para cada ruta de suministro.

- 30 Al igual que con cualquier producto farmacéutico, el material de empaque y el recipiente están diseñados para proteger la estabilidad del producto durante el almacenamiento y envío. Adicionalmente, los productos de la divulgación incluyen instrucciones de uso u otro material informativo que aconseje al médico, técnico o paciente sobre cómo evitar o tratar adecuadamente la enfermedad o trastorno en cuestión. En otras palabras, el artículo de fabricación incluye medios de instrucción que indican o sugieren un régimen de dosificación que incluye, pero no se limita a, dosis reales, procedimientos de monitorización y otra información de monitorización.

- 35 Específicamente, la divulgación proporciona un artículo de manufactura que comprende material de empaque, tal como una caja, botella, tubo, frasco, recipiente, jeringa precargada, rociador, insuflador, bolsa intravenosa (i.v.), envoltura y similares; y por lo menos una forma de dosificación unitaria de un agente farmacéutico contenido dentro de dicho material de envasado, en el que dicho agente farmacéutico comprende una formulación líquida que contiene un anticuerpo. El material de empaque incluye medios de instrucción que indican que dicho anticuerpo se puede utilizar para evitar, tratar y/o manejar uno o más síntomas asociados con una enfermedad o trastorno asociado o caracterizado por una expresión y/o actividad aberrante de ICOS, una enfermedad o trastorno asociada con o caracterizada por una expresión y/o actividad aberrantes del receptor ICOS, una enfermedad o trastorno autoinmunitario, una enfermedad o trastorno inflamatorio, una enfermedad o trastorno proliferativo de células T, una enfermedad maligna de células T, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra anfitrión, o una o más síntomas de los mismos mediante la administración de dosis específicas y el uso de regímenes de dosificación específicos como se describe en el presente documento.

- 45 La divulgación también proporciona un artículo de fabricación que comprende material de empaque, tal como una caja, botella, tubo, frasco, recipiente, jeringa precargada, pulverizador, insuflador, bolsa intravenosa (i.v.), envoltura y similares; y por lo menos una forma de dosificación unitaria de cada agente farmacéutico contenido dentro de dicho material de empaque, en donde un agente farmacéutico comprende una formulación líquida que contiene un anticuerpo que se une específicamente a ICOS y el otro agente farmacéutico comprende un agente profiláctico o terapéutico distinto de un anticuerpo que específicamente se une a ICOS, y en donde dicho material de empaque incluye medios de instrucción que indican que dichos agentes se pueden utilizar para evitar, tratar y/o manejar uno o más síntomas asociados con una enfermedad o trastorno asociado o caracterizado por una expresión y/o actividad aberrantes de ICOS, una enfermedad o trastorno asociado con o caracterizado por una expresión y/o actividad aberrantes del receptor ICOS, una enfermedad o trastorno autoinmunitario, una enfermedad o trastorno inflamatorio, una enfermedad o trastorno proliferativo de células T, una enfermedad maligna de células T, rechazo de trasplante, injerto Enfermedad versus anfitrión, o uno o más síntomas de la misma mediante la administración de una dosis específica sy utilizando regímenes de dosificación específicos como se describe en el presente documento.

La presente divulgación establece que los efectos adversos que se pueden reducir o evitarse mediante los métodos de la divulgación se indican en el material informativo incluido en un artículo de fabricación para su uso en la

prevención, tratamiento y/o manejo de uno o más síntomas asociados con un trastorno autoinmunitario, un trastorno inflamatorio, una enfermedad maligna o una infección. Los efectos adversos que se pueden reducir o evitarse mediante los métodos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, anomalías de signos vitales (fiebre, taquicardia, bradicardia, hipertensión, hipotensión), eventos hematológicos (anemia, linfopenia, leucopenia, trombocitopenia), cefalea, escalofríos, mareos, náuseas, astenia, dolor de espalda, dolor de pecho (presión en el pecho), diarrea, mialgia, dolor, prurito, psoriasis, rinitis, sudoración, reacción en el lugar de la inyección y vasodilatación.

Adicionalmente, el material de información incluido en un artículo de fabricación descrito en el presente documento puede indicar que las proteínas extrañas también pueden provocar reacciones alérgicas, que incluyen anafilaxis o el síndrome de liberación de citosina. El material de información debe indicar que las reacciones alérgicas pueden mostrarse solo como erupciones pruríticas leves o pueden ser graves, como eritrodermia, síndrome de Stevens-Johnson, vasculitis o anafilaxia. El material informativo también debe indicar que las reacciones anafilácticas (anafilaxis) son reacciones de hipersensibilidad graves y, en ocasiones, mortales. Las reacciones alérgicas, incluida la anafilaxis, pueden ocurrir cuando se inyecta alguna proteína extraña en el cuerpo. Pueden abarcar desde manifestaciones leves tales como urticaria o erupción hasta reacciones sistémicas letales. Las reacciones anafilácticas ocurren poco después de la exposición, generalmente en 10 minutos. Los pacientes pueden experimentar parestesia, hipotensión, edema laríngeo, cambios en el estado mental, angioedema facial o faríngeo, obstrucción de las vías respiratorias, broncoespasmo, urticaria y prurito, enfermedad del suero, artritis, nefritis alérgica, glomerulonefritis, artritis temporal o eosinofilia.

5.46. Realizaciones específicas

1. Una formulación acuosa estable que comprende un anticuerpo que une específicamente ICOS humano, en la que el anticuerpo comprende una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.

2. La formulación de la realización 1, en la que dicho anticuerpo no se somete a liofilización.

3. La formulación de la realización 1, en la que dicho anticuerpo es de un tipo de inmunoglobulina seleccionada el grupo que consiste de IgA, IgE, IgM, IgD, IgY y IgG.

4. La formulación de la realización 1, en la que dicho anticuerpo es del sitio humano IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4.

5. La formulación de la realización 1, en la que dicho anticuerpo es un anticuerpo de murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

6. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en la que dicho anticuerpo comprende una secuencia variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 7.

7. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en la que dicho anticuerpo comprende una secuencia variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 2.

8. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en la que dicho anticuerpo comprende una secuencia variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 7 y una secuencia variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 2.

9. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en la que dicho anticuerpo comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6 y una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1.

10. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo es por lo menos aproximadamente 1 mg/ml, por lo menos aproximadamente 2 mg/ml, por lo menos aproximadamente 3 mg/ml, por lo menos aproximadamente 4 mg/ml, por lo menos aproximadamente 5 mg/ml, por lo menos aproximadamente 10 mg/ml, por lo menos aproximadamente 15 mg/ml, por lo menos aproximadamente 20 mg/ml, por lo menos aproximadamente 25 mg/ml, por lo menos aproximadamente 30 mg/ml, por lo menos aproximadamente 40 mg/ml, por lo menos aproximadamente 50 mg/ml, por lo menos aproximadamente 60 mg/ml, por lo menos aproximadamente 70 mg/ml, por lo menos aproximadamente 80 mg/ml, por lo menos aproximadamente 90 mg/ml, por lo menos aproximadamente 100 mg/ml, por lo menos aproximadamente 120 mg/ml, por lo menos aproximadamente 150 mg/ml, por lo menos aproximadamente 160 mg/ml, por lo menos aproximadamente 180 mg/ml, por lo menos aproximadamente 200 mg/ml, por lo menos aproximadamente 250 mg/ml, o por lo menos aproximadamente 300 mg/ml.

11A. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo es por lo menos aproximadamente 1 mg/ml.

11B. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo es por lo menos aproximadamente 2 mg/ml.

11C. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo es por lo menos aproximadamente 3 mg/ml.

- 11D. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo es por lo menos aproximadamente 4 mg/ml.
- 11E. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo es por lo menos aproximadamente 5 mg/ml.
- 5 11F. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo es por lo menos aproximadamente 10 mg/ml.
- 11G. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo es por lo menos aproximadamente 20 mg/ml.
- 10 11H. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo es por lo menos aproximadamente 50 mg/ml.
- 11I. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo es por lo menos aproximadamente 100 mg/ml.
12. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo es por lo menos aproximadamente 125 mg/ml.
- 15 13. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo es por lo menos aproximadamente 150 mg/ml.
14. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo es por lo menos aproximadamente 175 mg/ml.
- 20 15. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo es por lo menos aproximadamente 200 mg/ml.
- 16A. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo está entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml.
- 16B. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo está entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml.
- 25 16C. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo está entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml.
- 16D. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo está entre aproximadamente 90 mg/ml y aproximadamente 250 mg/ml.
- 30 17. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la concentración de dicho anticuerpo es de entre aproximadamente 110 mg/ml y aproximadamente 250 mg/ml.
18. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 17, en la que dicha formulación comprende adicionalmente por lo menos aproximadamente un componente de tamponamiento.
19. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 18, en la que dicha formulación comprende adicionalmente por lo menos aproximadamente un excipiente.
- 35 20. La formulación de las realizaciones 18 o 19, en la que dicho componente de tamponamiento se selecciona del grupo que consiste de histidina, citrato, fosfato, glicina, y acetato.
21. La formulación de las realizaciones 18 o 19, en la que dicho componente de tamponamiento es histidina.
22. La formulación de la realización 21, en la que dicha histidina está a una concentración desde aproximadamente 1 nM a aproximadamente 200 nM.
- 40 23. La formulación de la realización 21, en la que dicha histidina está a una concentración desde aproximadamente 1 nM a aproximadamente 50 nM.
24. La formulación de la realización 21, en la que dicha histidina está a una concentración desde aproximadamente 5 nM a aproximadamente 20 nM.
- 45 25. La formulación de la realización 21, en la que dicha histidina está a una concentración de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 15 nM o aproximadamente 20 nM.
26. La formulación de la realización 19, en la que dicho excipiente es un sacárido.

27. La formulación de la realización 26, en la que dicho sacárido es un disacárido.
28. La formulación de la realización 27, en la que dicho disacárido es trehalosa o sacarosa.
29. La formulación de la realización 27, en la que dicho disacárido es trehalosa.
- 5 30. La formulación de la realización 29, en la que dicha trehalosa está a una concentración desde aproximadamente 1% a aproximadamente 40%.
31. La formulación de la realización 29, en la que dicha trehalosa está a una concentración desde aproximadamente 2% a aproximadamente 20%.
32. La formulación de la realización 29, en la que dicha trehalosa está a una concentración desde aproximadamente 2% a aproximadamente 10%.
- 10 33. La formulación de la realización 29, en la que dicha trehalosa está a una concentración de aproximadamente 2%, aproximadamente 4% o aproximadamente 8%.
34. La formulación de la realización 19, en la que dicho excipiente es una sal.
35. La formulación de la realización 34, en la que dicha sal es cloruro de sodio.
- 15 36. La formulación de la realización 35, en la que dicho cloruro de sodio está a una concentración desde aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM.
37. La formulación de la realización 35, en la que dicho cloruro de sodio está a una concentración de aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 120 mM, o aproximadamente 150 mM.
38. La formulación de la realización 19, en la que dicho excipiente es un surfactante.
- 20 39. La formulación de la realización 38, en la que dicho surfactante es un polisorbato.
40. La formulación de la realización 39, en la que dicho polisorbato es polisorbato 20 o polisorbato 80.
41. La formulación de la realización 39, en la que dicho polisorbato es polisorbato 80.
42. La formulación de la realización 41, en la que dicho polisorbato 80 está a una concentración desde aproximadamente 0.001% a aproximadamente 2%.
- 25 43. La formulación de la realización 41, en la que dicho polisorbato 80 está a una concentración de aproximadamente 0.01%, aproximadamente 0.02%, aproximadamente 0.04% o aproximadamente 0.08%.
44. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 43, en la que dicha formulación tiene un pH de entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 6.5.
- 30 45. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 43, en la que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0.
46. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 45, en la que dicha formulación es isotónica.
47. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que dicha formulación es estable luego de almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas.
- 35 48. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que dicha formulación es estable luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses.
49. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que dicha formulación es estable luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses.
- 40 50. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 80% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas.
- 45 51. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 80% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses.

52. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 80% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses.
- 5 53. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 90% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas.
- 10 54. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 90% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses.
- 15 55. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 90% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses.
- 20 56. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 95% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas.
57. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 95% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses.
- 25 58. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 95% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses.
- 30 59. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que dicho anticuerpo es susceptible a agregación, o fragmentación.
60. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que menos de aproximadamente 2% de dicho anticuerpo forma un agregado luego de almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas según se determina por HPSEC.
- 35 61. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que menos de aproximadamente 2% de dicho anticuerpo forma un agregado luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses según se determina por HPSEC.
62. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que menos de aproximadamente 2% de dicho anticuerpo forma un agregado luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses según se determina por HPSEC.
- 40 63. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que menos de aproximadamente 5% de dicho anticuerpo se fragmenta luego de almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas según se determina por RP-HPLC.
- 45 64. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que menos de aproximadamente 5% de dicho anticuerpo se fragmenta luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses según se determina por RP-HPLC.
65. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en la que menos de aproximadamente 5% de dicho anticuerpo se fragmenta luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses según se determina por RP-HPLC.
- 50 66. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 65, en la que dicha formulación es una formulación inyectable.
67. La formulación de la realización 66, en la que dicha formulación es adecuada para administración intravenosa, subcutánea, o intramuscular.

68. La formulación de la realización 67, en la que dicha formulación es adecuada para administración intravenosa y el anticuerpo o concentración de fragmento de anticuerpo es desde aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml.
- 5 69. La formulación de la realización 67, en la que dicha formulación es adecuada para administración subcutánea y el anticuerpo o concentración de fragmento de anticuerpo es desde aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml.
70. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 65, en la que dicha formulación es adecuada para administración en aerosol.
- 10 71. Una forma de dosificación farmacéutica adecuada para administración parenteral a un humano que comprende una formulación de anticuerpo de una cualquiera de las realizaciones 1 a 65 en un recipiente adecuado.
72. La forma de dosificación farmacéutica de la realización 71, en la que la formulación de anticuerpo se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea, o por vía intramuscular.
73. Una forma de dosificación farmacéutica adecuada para administración en aerosol a un humano que comprende una formulación de anticuerpo de una cualquiera de las realizaciones 1 a 65 en un recipiente adecuado.
- 15 74. La dosificación unitaria farmacéutica de la realización 73, en la que la formulación de anticuerpo se administra por vía intranasal.
75. Un recipiente sellado que contiene la formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 74.
76. Un kit que comprende la formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 74.
- 20 77. Un método de tratar una enfermedad o trastorno autoinmunitario en un humano, que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 74.
78. El método de la realización 77, en el que la enfermedad o trastorno autoinmunitario es SLE o escleroderma.
- 25 79. Un método de tratar o prevenir el rechazo en un paciente de transplante humano, que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 74.
80. Un método de tratar una enfermedad maligna de células T en un humano que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 74.
- 30 81. Un método de tratar una enfermedad o trastorno inmunitario en un humano, que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 74.
82. El método de la realización 81, en el que la enfermedad o trastorno inmunitario es miositis.
83. El método de la realización 82, en el que la miositis es miositis de cuerpo de inclusión (IBM), polimiositis (PM) o dermatomiositis (DM).
- 35 84. Un método para agotar células T que expresan ICOS en un paciente humano que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 74.
- 40 85. El método de la realización 84, en el que el agotamiento persiste sustancialmente durante por lo menos aproximadamente 1, por lo menos aproximadamente 2, por lo menos aproximadamente 3 o por lo menos aproximadamente 4 semanas luego de la administración del anticuerpo.
86. El método de la realización 84, en el que por lo menos aproximadamente 95% de las células T se agotan.
87. El método de la realización 84, en el que las células T que expresan ICOS es una célula T de memoria.
88. El método de la realización 84, en el que las células T que expresan ICOS es una célula T de circulación.
- 45 89. Un método para interrumpir arquitectura del centro germinal en un órgano linfóide secundario de un primate, que comprende administrar una cantidad efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 74.
90. El método de la realización 89, en el que el primate es un primate no humano.

91. Un método para agotar células B de centro germinal de un órgano linfoide secundario de un primate que comprende administrar una cantidad efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 74.
92. El método de la realización 91, en el que el primate es un primate no humano.
93. El método de la realización 91, en el que el primate es un humano.
- 5 94. El método de la realización 91, en el que el agotamiento persiste sustancialmente durante por lo menos aproximadamente 1, por lo menos aproximadamente 2, por lo menos aproximadamente 3 o por lo menos aproximadamente 4 semanas luego de la administración del anticuerpo.
95. Un método para agotar células B cambiadas de clase circulante en un primate que comprende administrar una cantidad efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 74.
- 10 96. El método de la realización 95, en el que el primate es un primate no humano.
97. El método de la realización 95, en el que el primate es un humano.
98. El método de la realización 95, en el que el agotamiento persiste sustancialmente durante por lo menos aproximadamente 1, por lo menos aproximadamente 2, por lo menos aproximadamente 3 o por lo menos aproximadamente 4 semanas luego de la administración del anticuerpo.
- 15 99. El método de la realización 95, en el que por lo menos aproximadamente 95% de las células B cambiadas de clase circulante se agotan.
100. Una formulación acuosa estable que comprende un anticuerpo ICOS anti-humano, y comprende adicionalmente histidina, cloruro de sodio, trehalosa o polisorbato 80, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una
20 región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.
101. Una formulación acuosa estable que comprende un anticuerpo ICOS anti-humano, y comprende adicionalmente histidina, cloruro de sodio, trehalosa y polisorbato 80, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una
25 región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.
- 102A. La formulación de la realización 101, en la que dicha formulación comprende entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml del anticuerpo ICOS anti-humano, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM de histidina, entre aproximadamente 1% y aproximadamente 40% de trehalosa y aproximadamente entre
30 aproximadamente 0.001% y aproximadamente 5% de polisorbato 80 y en la que el pH de dicha formulación es entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7.
- 102B. La formulación de la realización 101, en la que dicha formulación comprende entre aproximadamente 50 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml del anticuerpo ICOS anti-humano, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM de histidina, entre aproximadamente 1% y aproximadamente 40% de trehalosa y
35 aproximadamente entre aproximadamente 0.001% y aproximadamente 5% de polisorbato 80 y en la que el pH de dicha formulación es entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7.
- 103A. La formulación de la realización 101, en la que dicha formulación comprende entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml del anticuerpo ICOS anti-humano, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente histidina 25 mM, entre aproximadamente 2% y aproximadamente 15% de trehalosa y entre aproximadamente
40 0.005% y aproximadamente 1% de polisorbato 80 y en la que el pH de dicha formulación es entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 6.5.
- 103B. La formulación de la realización 101, en la que dicha formulación comprende entre aproximadamente 80 mg/ml y aproximadamente 120 mg/ml del anticuerpo ICOS anti-humano, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente histidina 25 mM, entre aproximadamente 2% y aproximadamente 15% de trehalosa y entre
45 aproximadamente 0.005% y aproximadamente 1% de polisorbato 80 y en la que el pH de dicha formulación es entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 6.5.
- 104A. La formulación de la realización 101, en la que dicha formulación comprende aproximadamente 10 mg/ml del anticuerpo ICOS anti-humano, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 4% de trehalosa y aproximadamente 0.02% de polisorbato 80 y en la que el pH de dicha formulación es aproximadamente 6.
- 50 104B. La formulación de la realización 101, en la que dicha formulación comprende aproximadamente 100 mg/ml del anticuerpo ICOS anti-humano, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 4% de trehalosa y aproximadamente 0.02% de polisorbato 80 y en la que el pH de dicha formulación es aproximadamente 6.

105. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicha formulación es isotónica.
106. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicha formulación es estable luego de almacenamiento a 40 °C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas.
- 5 107. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicha formulación es estable luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses.
108. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicha formulación es estable luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses.
- 10 109. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 80% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas.
- 15 110. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 80% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses.
111. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 80% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses.
- 20 112. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 90% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas.
- 25 113. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 90% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses.
114. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 90% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses.
- 30 115. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 95% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas.
- 35 116. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 95% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses.
- 40 117. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 95% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses.
- 45 118. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicho anticuerpo es susceptible a agregación o fragmentación.
119. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que menos de aproximadamente 2% de dicho anticuerpo forma un agregado luego de almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas según se determina por según se determina por HPSEC.
- 50 120. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que menos de aproximadamente 2% de dicho anticuerpo forma un agregado luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses según se determina por HPSEC.

121. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que menos de aproximadamente 2% de dicho anticuerpo forma un agregado luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses según se determina por HPSEC.
- 5 122. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que menos de aproximadamente 5% de dicho anticuerpo se fragmenta luego de almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas según se determina por RP-HPLC.
123. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que menos de aproximadamente 5% de dicho anticuerpo se fragmenta luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses según se determina por RP-HPLC.
- 10 124. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que menos de aproximadamente 5% de dicho anticuerpo se fragmenta luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses según se determina por RP-HPLC.
- 15 125. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicha formulación es transparente e incolora luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses según se determina por inspección visual.
126. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 104, en la que dicha formulación es transparente e incolora luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses según se determina por inspección visual.
- 20 127. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 126, en la que dicha formulación es una formulación inyectable.
128. La formulación de la realización 127, en la que dicha formulación es adecuada para administración intravenosa, subcutánea, o intramuscular.
129. La formulación de la realización 128, en la que dicha formulación es adecuada para administración intravenosa.
130. La formulación de la realización 128, en la que dicha formulación es adecuada para administración subcutánea.
- 25 131. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 126, en la que dicha formulación es adecuada para administración en aerosol.
132. Un proceso para la preparación de una formulación de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 101 a 126, que comprende:
- 30 a) concentrar la solución de anticuerpo ICOS anti-humano a entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml;
- b) diafiltrar dicho anticuerpo concentrado con una solución que comprende histidina.
133. El proceso de la realización 132 que comprende adicionalmente:
- (c) concentrar el anticuerpo diafiltrado con una solución que comprende histidina entre aproximadamente 50 mg/ml y aproximadamente 250 mg/ml;
- 35 (d) mezclar la solución de anticuerpo concentrado con por lo menos aproximadamente una solución que comprende por lo menos aproximadamente un excipiente.
134. Un método para estabilizar un anticuerpo ICOS anti-humano que comprende combinar dicho anticuerpo con histidina-HCl, cloruro de sodio, trehalosa y polisorbato 80 a un pH de 6, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.
- 40 135. El método de la realización 134, en el que la concentración de anticuerpo está entre aproximadamente 80 mg/ml y aproximadamente 120 mg/ml.
136. Una forma de dosificación farmacéutica adecuada para administración parenteral a un humano que comprende una formulación de anticuerpo de una cualquiera de las realizaciones 101 a 131 en un recipiente adecuado.
- 45 137. La forma de dosificación farmacéutica de la realización 136, en la que la acción de anticuerpo se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea, o por vía intramuscular.
138. Una forma de dosificación farmacéutica adecuada para administración en aerosol a un humano que comprende una formulación de anticuerpo de una cualquiera de las realizaciones 101 a 131 en un recipiente adecuado.

139. La dosificación unitaria farmacéutica de la realización 138, en la que la formulación de anticuerpo se administra por vía intranasal.
140. Un recipiente sellado que contiene la formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 131.
141. Un kit que comprende la formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 131.
- 5 142. Un método de tratar una enfermedad o trastorno autoinmunitario en un humano, que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 131.
143. El método de la realización 142, en el que la enfermedad o trastorno autoinmunitario es SLE o escleroderma.
- 10 144. Un método de tratar o prevenir el rechazo en un paciente de trasplante humano, que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 131.
145. Un método de tratar una enfermedad maligna de células T en un humano que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 131.
- 15 146. Un método de tratar una enfermedad o trastorno inmunitario en un humano, que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 131.
147. El método de la realización 180, en el que la enfermedad o trastorno inmunitario es miositis.
- 20 148. El método de la realización 147, en el que la miositis es miositis de cuerpo de inclusión (IBM), polimiositis (PM) o dermatomiositis (DM).
149. Un método para agotar células T que expresan ICOS en un paciente humano que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 131.
- 25 150. El método de la realización 149, en el que el agotamiento persiste sustancialmente durante por lo menos aproximadamente 1, por lo menos aproximadamente 2, por lo menos aproximadamente 3 o por lo menos aproximadamente 4 semanas luego de la administración del anticuerpo.
151. El método de la realización 149, en el que por lo menos aproximadamente 95% de las células T se agotan.
152. El método de la realización 149, en el que las células T que expresan ICOS es una célula T de memoria.
153. El método de la realización 149, en el que las células T que expresan ICOS es una célula T de circulación.
- 30 154. Un método para interrumpir arquitectura del centro germinal en un órgano linfóide secundario de un primate, que comprende administrar una cantidad efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 131.
155. El método de la realización 149, en el que el primate es un primate no humano.
- 35 156. Un método para agotar células B de centro germinal de un órgano linfóide secundario de un primate que comprende administrar una cantidad efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 131.
157. El método de la realización 156, en el que el primate es un primate no humano.
158. El método de la realización 156, en el que el primate es un humano.
- 40 159. El método de la realización 156, en el que el agotamiento persiste sustancialmente durante por lo menos aproximadamente 1, por lo menos aproximadamente 2, por lo menos aproximadamente 3 o por lo menos aproximadamente 4 semanas luego de la administración del anticuerpo.
160. Un método para agotar células B cambiadas de clase circulante en un primate que comprende administrar una cantidad efectiva de la formulación de una cualquiera de las realizaciones 101 a 131.
161. El método de la realización 194, en el que el primate es un primate no humano.
162. El método de la realización 194, en el que el primate es un humano.

163. El método de la realización 194, en el que el agotamiento persiste sustancialmente durante por lo menos aproximadamente 1, por lo menos aproximadamente 2, por lo menos aproximadamente 3 o por lo menos aproximadamente 4 semanas luego de la administración del anticuerpo.
- 5 164. El método de la realización 194, en el que por lo menos aproximadamente 95% de las células B cambiadas de clase circulante se agotan.
165. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 1 a 70 o 101 a 131, en la que dicha formulación es una formulación farmacéuticamente aceptable.
166. La formulación de una cualquiera de las realizaciones 66, 67, 69, 127, 128 o 130 en la que la formulación es en una jeringa precargada.
- 10 167. La formulación de la realización 166, en la que la jeringa precargada comprende una aguja.
168. La formulación de la realización 166, en la que la jeringa precargada es una jeringa plástica o una jeringa de vidrio.
169. La formulación de la realización 166, en la que la jeringa precargada es una jeringa plástica.
170. La formulación de la realización 168, en la que la jeringa precargada es una jeringa de vidrio.
- 15 171. La formulación de la realización 166, en la que la jeringa precargada se elabora de materiales que están sustancialmente libres de tungsteno.
172. La formulación de la realización 166, en la que la jeringa precargada está sustancialmente libre de silicona.
173. La formulación de la realización 166, en la que la jeringa precargada no comprende un lubricante a base de silicona.
- 20 174. La formulación de la realización 166, en la que la jeringa precargada comprende un émbolo que tiene un disco de resina de fluoropolímero.
175. La dosificación unitaria farmacéutica de una cualquiera de las realizaciones 71, 72, 136 o 137, en la que the recipiente adecuado es una jeringa precargada.
- 25 176. La dosificación unitaria farmacéutica de la realización 172, en la que la jeringa precargada comprende una aguja.
177. La dosificación unitaria farmacéutica de la realización 172, en la que la jeringa precargada es una jeringa plástica o una jeringa de vidrio.
178. La dosificación unitaria farmacéutica de la realización 178, en la que la jeringa precargada es una jeringa plástica.
- 30 179. La dosificación unitaria farmacéutica de la realización 178, en la que la jeringa precargada es una jeringa de vidrio.
180. La dosificación unitaria farmacéutica de la realización 172, en la que la jeringa precargada se elabora de materiales que están sustancialmente libres de tungsteno.
- 35 181. La dosificación unitaria farmacéutica de la realización 172, en la que la jeringa precargada está sustancialmente libre de silicona.
182. La dosificación unitaria farmacéutica de la realización 172, en la que la jeringa precargada no comprende un lubricante a base de silicona.
183. La dosificación unitaria farmacéutica de la realización 172, en la que la jeringa precargada comprende un émbolo que tiene un disco de resina de fluoropolímero.
- 40 184. El recipiente sellado de una cualquiera de las realizaciones 75 o 140, en el que el recipiente sellado está en una jeringa precargada.
185. El recipiente sellado de la realización 184, en el que la jeringa precargada comprende una aguja.
186. El recipiente sellado de la realización 184, en el que la jeringa precargada es una jeringa plástica o una jeringa de vidrio.
- 45 187. El recipiente sellado de la realización 186, en el que la jeringa precargada es una jeringa plástica.

188. El recipiente sellado de la realización 186, en el que la jeringa precargada es una jeringa de vidrio.
189. El recipiente sellado de la realización 184, en el que la jeringa precargada se elabora de materiales que están sustancialmente libres de tungsteno.
- 5 190. El recipiente sellado de la realización 184, en el que la jeringa precargada está sustancialmente libre de silicona.
191. El recipiente sellado de la realización 184, en el que la jeringa precargada no comprende un lubricante a base de silicona.
192. El recipiente sellado de la realización 184, en el que la jeringa precargada comprende un émbolo, en el que el émbolo comprende un disco de resina de fluoropolímero.
- 10 193. El kit de una cualquiera de las realizaciones 76 o 141, en el que el kit comprende una jeringa precargada.
194. El kit de la realización 193, en el que la jeringa precargada comprende una aguja.
195. El kit de la realización 193, en el que la jeringa precargada es una jeringa plástica o una jeringa de vidrio.
196. El kit de la realización 195, en el que la jeringa precargada es una jeringa plástica.
197. El kit de la realización 195, en el que la jeringa precargada es una jeringa de vidrio.
- 15 198. El kit de la realización 193, en el que la jeringa precargada se elabora de materiales que están sustancialmente libres de tungsteno.
199. El kit de la realización 193, en el que la jeringa precargada está sustancialmente libre de silicona.
200. El kit de la realización 193, en el que la jeringa precargada no comprende un lubricante a base de silicona.
- 20 201. El kit de la realización 193, en el que la jeringa precargada comprende un émbolo, en el que el émbolo comprende un disco de resina de fluoropolímero.
202. Una jeringa precargada que contiene una formulación acuosa estable que comprende un anticuerpo ICOS anti-humano, y comprende adicionalmente histidina, cloruro de sodio, trehalosa o polisorbato 80, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar.
- 25 203. La jeringa precargada de la realización 202, en la que la jeringa precargada comprende una aguja.
204. La jeringa precargada de la realización 202, en la que la jeringa precargada se sella.
205. La jeringa precargada de la realización 202, en la que la jeringa precargada es una jeringa plástica o una jeringa de vidrio.
- 30 206. La jeringa precargada de la realización 211, en la que la jeringa precargada es una jeringa plástica.
207. La jeringa precargada de la realización 211, en la que la jeringa precargada es una jeringa de vidrio.
208. La jeringa precargada de la realización 202, en la que la jeringa precargada se elabora de materiales que están sustancialmente libres de tungsteno.
- 35 209. La jeringa precargada de la realización 202, en la que la jeringa precargada está sustancialmente libre de silicona.
210. La jeringa precargada de la realización 202, en la que la jeringa precargada no comprende un lubricante a base de silicona.
211. La jeringa precargada de la realización 202, en la que la jeringa precargada comprende un émbolo que tiene un disco de resina de fluoropolímero.
- 40 212. La jeringa precargada de la realización 202, en la que la jeringa es una jeringa plástica sustancialmente libre de silicona y tungsteno que comprende un émbolo que tiene un disco de resina de fluoropolímero.
213. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202-212, en la que dicha formulación comprende el anticuerpo ICOS anti-humano, histidina, cloruro de sodio, trehalosa y polisorbato 80.
- 45 214. La jeringa precargada de la realización 202, en la que dicha formulación comprende entre aproximadamente 50 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml del anticuerpo ICOS anti-humano, entre aproximadamente 1 mM y

aproximadamente 100 mM de histidina, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 200 mM NaCl, entre aproximadamente 1% y aproximadamente 40% de trehalosa y entre aproximadamente 0.001% y aproximadamente 5% de polisorbato 80 y en la que el pH de dicha formulación es entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7.

- 5 215. La jeringa precargada de la realización 202, en la que dicha formulación comprende entre aproximadamente 80 mg/ml y aproximadamente 120 mg/ml del anticuerpo ICOS anti-humano, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 50 mM de histidina, entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 150 mM NaCl, entre aproximadamente 1% y aproximadamente 20% de trehalosa y entre aproximadamente 0.005% y aproximadamente 1% de polisorbato 80 y en la que el pH de dicha formulación es entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 6.5.
- 10 216. La jeringa precargada de la realización 202, en la que dicha formulación comprende aproximadamente 100 mg/ml del anticuerpo ICOS anti-humano, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 80 mM de NaCl, aproximadamente 4% de trehalosa y entre aproximadamente 0.01% y aproximadamente 0.05% de polisorbato 80 y en la que el pH de dicha formulación es aproximadamente 6.
- 15 217. La jeringa precargada de la realización 202, en la que dicha formulación comprende aproximadamente 100 mg/ml del anticuerpo ICOS anti-humano, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 80 mM de NaCl, aproximadamente 4% de trehalosa y aproximadamente 0.02% de polisorbato 80 y en la que el pH de dicha formulación es aproximadamente 6.
- 20 218. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicha formulación es isotónica.
219. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicha formulación es estable luego de almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas.
220. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicha formulación es estable luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses.
221. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicha formulación es estable luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses.
- 25 222. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 80% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas.
- 30 223. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 80% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses.
- 35 224. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 80% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses.
- 40 225. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 90% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas.
226. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 90% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses.
- 45 227. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 90% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses.
- 50 228. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 95% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas.
229. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 95% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un

anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses.

5 230. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicho anticuerpo retiene por lo menos aproximadamente 95% de capacidad de unión a un ICOS humano polipéptido en comparación con un anticuerpo de referencia que representa el anticuerpo antes del almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses.

231. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicho anticuerpo es susceptible a agregación o fragmentación.

10 232. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que menos de aproximadamente 2% de dicho anticuerpo forma un agregado luego de almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas según se determina por HPSEC.

233. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que menos de aproximadamente 2% de dicho anticuerpo forma un agregado luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses según se determina por HPSEC.

15 234. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que menos de aproximadamente 2% de dicho anticuerpo forma un agregado luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses según se determina por HPSEC.

20 235. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que menos de aproximadamente 5% de dicho anticuerpo se fragmenta luego de almacenamiento a 40°C durante por lo menos aproximadamente 4 semanas según se determina por RP-HPLC.

236. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que menos de aproximadamente 5% de dicho anticuerpo se fragmenta luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses según se determina por RP-HPLC.

25 237. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que menos de aproximadamente 5% de dicho anticuerpo se fragmenta luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses según se determina por RP-HPLC.

238. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicha formulación es transparente e incolora luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses según se determina por inspección visual.

30 239. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicha formulación es transparente e incolora luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses según se determina por inspección visual.

35 240. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicha formulación es sustancialmente libre de partículas luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 3 meses según se determina por inspección visual.

241. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicha formulación es sustancialmente libre de partículas luego de almacenamiento a 5°C durante por lo menos aproximadamente 12 meses según se determina por inspección visual.

40 242. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 217, en la que dicha formulación es una formulación inyectable.

243. La jeringa precargada de la realización 242, en la que dicha formulación es adecuada para administración subcutánea o intramuscular.

244. La jeringa precargada de la realización 243, en la que dicha formulación es adecuada para administración subcutánea.

45 245. La jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 244, en la que dicha formulación es una formulación farmacéuticamente aceptable.

246. Un kit que comprende la jeringa precargada de una cualquiera de las realizaciones 202 a 245.

Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, utilizando solo la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la descripción descrita en este documento.

La cita o discusión de una referencia en este documento no se debe interpretar como una admisión de que tal es el estado de la técnica de la presente divulgación.

6. EJEMPLOS

La siguiente sección describe el desarrollo de formulaciones que comprenden un anticuerpo ICOS anti-humano. A menos que se indique lo contrario, los resultados experimentales presentados aquí se generaron utilizando el anticuerpo ICOS anti-humano 136 que comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1 y una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar (véase, Solicitud de Patente de Estados Unidos 12/116,512, presentada en 7 de mayo de 2008).

6.1. Métodos experimentales

El anticuerpo ICOS antihumano purificado se puede generar siguiendo los protocolos de escala industrial estándar descritos en este documento. La concentración de proteína se puede estimar a partir de la medición de densidad óptica a 280 nm.

El anticuerpo ICOS antihumano purificado se nanofiltrando utilizando un filtro Planova 20N para eliminar las partículas. Las formulaciones de anticuerpos anti-humanos ICOS se preparan utilizando filtración de flujo tangencial (TFF). El anticuerpo anti-humano ICOS nanofiltrado se concentra a aproximadamente 25 mg/ml en un dispositivo Millipore LabScale TFF. El anticuerpo anti-humano ICOS luego se diafiltra 5 veces en el tampón apropiado (por ejemplo, 10 mM de histidina-HCl (pH 6.0), 80 mM de NaCl). Una vez que se completa el intercambio de tampón, el anticuerpo se concentra a aproximadamente 150 mg/ml. Los excipientes se introducen mediante la adición de la preparación concentrada de anticuerpos con las soluciones madre concentradas apropiadas. Por ejemplo, se logra una concentración final de 4% de trehalosa agregando 11 ml de 10 mM de histidina-HCl, 80 mM de NaCl, 40% de trehalosa (pH 6.0) a cada 100 ml de preparación concentrada de anticuerpos. Se pueden introducir múltiples excipientes en etapas consecutivas. Por ejemplo, una concentración final de 0.02% de polisorbato 80 se introduce después de la adición de Trehalosa diluyendo 100 veces una solución de 10 mM de histidina-HCl (pH 6.0), 80 mM de NaCl, 4% de trehalosa, 2% de solución de polisorbato 80 con trehalosa que contiene preparación de anticuerpos. La concentración final de anticuerpo se ajusta a 100±5 mg/ml con el tampón de formulación final (por ejemplo, 10 mM de histidina-HCl (pH 6.0), 80 mM de NaCl, 4% de trehalosa, 0.02% de polisorbato 80).

La siguiente sección describe los métodos que se pueden utilizar para caracterizar la formulación que comprende 100 mg/ml de anticuerpo anti-ICOS en 10 mM de histidina (pH 6.0), 80 mM de NaCl, 4% de trehalosa, 0.02% de polisorbato 80 en una solución acuosa estéril.

La estabilidad de la formulación se prueba analizando las propiedades físicas de las alícuotas de dosis únicas almacenadas durante largos períodos de tiempo. Algunas alícuotas se almacenan bajo temperaturas recomendadas para el almacenamiento clínico (5°C). Otras alícuotas se almacenan a temperaturas elevadas (25°C o 40°C) para simular los efectos del almacenamiento a largo plazo.

Las condiciones de almacenamiento adicionales que pueden afectar la estabilidad de una formulación incluyen, pero no se limitan a, intensidad de luz, longitud de onda de la luz, humedad, composición del frasco y composición del tapón. El efecto de estos parámetros sobre la estabilidad de la formulación también se puede determinar utilizando los métodos descritos en este documento.

La cromatografía de exclusión por tamaño se puede utilizar para medir la cantidad de agregados de anticuerpos (por ejemplo, reguladores de luz) y el grado de fragmentación en la formulación. La SEC puede realizarse utilizando el sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent serie 1100 (HPLC) de la siguiente manera. Las muestras se diluyen a 10 mg/ml, se inyectan 25 µl de muestra diluida que contiene 250 µg de proteína en una columna TSK-Gel 3000 (tamaño 7.8 mm x 30.0 cm; Tosoh Biosciences Corporation). El perfil de elución de proteínas se determina siguiendo la densidad óptica del eluato a 280 nm. El análisis de datos se puede realizar utilizando los parámetros de integración automática de ChemStation (Agilent).

La cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) también se puede utilizar para determinar la cantidad de fragmentos de anticuerpos en la formulación. RP-HPLC se realiza utilizando el sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent serie 1100 (HPLC). Las muestras se analizan en una columna PLRP-S (8 µm, 4000 Å, 2.0 x 150 mm) de Michrom Bioresources. El perfil de elución de proteínas se determina siguiendo la densidad óptica del eluato a 280 nm. El análisis de datos se puede realizar utilizando los parámetros de integración automática de ChemStation (Agilent).

La cromatografía de intercambio iónico (IEC) se puede emplear para medir la heterogeneidad de isoformas de carga en diversas formulaciones. Para este análisis se pueden utilizar los sistemas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) Agilent serie 1100. Las muestras se analizan sobre una columna analítica Propac WCX-10G (4 x 250 mm) (Dionex). El análisis de los datos se realiza utilizando los parámetros de integración automática de ChemStation (Agilent).

Inspección visual: el color, la claridad y la cantidad de partículas en una formulación dada se determinan inspeccionando la muestra a simple vista.

6.1.1. Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)

La cromatografía de exclusión por tamaño se puede realizar para analizar la formulación de anticuerpos para detectar la presencia de agregados y fragmentos de anticuerpos. Las muestras de prueba se inyectan sobre una columna de exclusión de tamaño de alta resolución (por ejemplo, G3000 SW_{XL} 5 µm, 300 Å, 7.8 × 300 mm, Toso Haas). La fase móvil es 0.1 M de fosfato de sodio, 0.1 M de sulfato de sodio y 0.05% de azida de sodio (pH 6.7), que se ejecuta isocráticamente a una velocidad de flujo de 0.25-1.0 mL/min. La proteína eluida se puede detectar por absorbancia UV a 280 nm y recolectarse para una caracterización adicional. La cantidad relativa de cualquier especie de proteína detectada se informa como el porcentaje de área del pico del producto en comparación con el área total de todos los otros picos detectados, excluyendo el pico de volumen inicial excluido. Los picos que eluyen antes del pico del monómero de anticuerpo se registran en el percentil agregado, mientras que los picos que eluyen más tarde que el pico del monómero de anticuerpo, pero antes del pico del tampón, se registran en el percentil del fragmento. El radio hidrodinámico y el peso molecular de los picos individuales se pueden obtener con un detector de dispersión de luz de múltiples triángulos acoplado.

La SEC se puede utilizar para monitorizar la formación de agregados de anticuerpos y la fragmentación de anticuerpos en formulaciones almacenadas por períodos de tiempo prolongados (por ejemplo, mediciones múltiples realizadas durante 9 meses). La formulación se puede almacenar a diferentes rangos de temperatura (por ejemplo, 2-8°C, 20-24°C y 38-42°C). Los rangos de temperatura por encima de la temperatura de almacenamiento clínico propuesta (2-8°C) se utilizan para estresar la formulación con el objetivo de simular los efectos del almacenamiento durante más de 9 meses. Se espera que la relación de fragmentos y agregados aumente con el tiempo; este aumento es probable que se acelere a temperaturas elevadas. Un hallazgo de que las tasas de fragmentación y agregación son constantes dentro de cada rango de temperatura mostraría que las temperaturas de almacenamiento más altas simulan con precisión una escala de tiempo acelerada.

También se puede determinar el logaritmo de las tasas estimadas de fragmentación/agregación (log (tasa)). Un hallazgo de que el log (tasa) muestra una dependencia lineal con el recíproco de la temperatura de almacenamiento (1/T (K⁻¹)) permitiría al investigador predecir la tasa de agregación/fragmentación de la formulación a cualquier temperatura o, más importante aún, las características de la formulación en cualquier momento a una temperatura dada.

En situaciones en las que los picos de cromatografía correspondientes a agregados y fragmentos no son lo suficientemente distintos entre sí, o del pico de monómero (por ejemplo, a niveles relativos bajos de agregados/fragmentos), la SEC puede no servir como una medida precisa de fragmentación/agregación.

6.1.2. Ultracentrifugación analítica

La ultracentrifugación analítica (AUC) también se puede utilizar para caracterizar la formulación de anticuerpos para la presencia de agregados y fragmentos de anticuerpos. La AUC es una técnica ortogonal que determina los coeficientes de sedimentación (informados en Svedberg, S) de macromoléculas en una muestra líquida. Al igual que la SEC, el AUC es capaz de separar y detectar fragmentos/agregados de anticuerpos de monómeros y además puede proporcionar información sobre la masa molecular. En comparación con la SEC, el AUC elimina la posibilidad de pérdida agregada debido a la interacción en fase sólida y es más capaz de resolver diferentes especies de una macromolécula determinada.

Los experimentos de velocidad de sedimentación pueden realizarse utilizando una ultracentrífuga analítica, por ejemplo, Beckman Optima XL-A. Las muestras de prueba se diluyen a una concentración de anticuerpo de 0.5 mg/ml con tampón de referencia (por ejemplo, 20 mM de ácido cítrico, 100 mM de NaCl, 1.5% de manitol, 0.02% de dietilentiamina-ácido pentaacético, 0.02% de polisorbato 80, pH 6.0). 415 µl de la muestra de anticuerpo diluida y 412 µl o el tampón de referencia se cargan en una celda de centrífuga de 12 mm en la muestra y los canales de referencia, respectivamente. Las células cargadas se colocan en un rotor analítico AN-50Ti y se equilibran a 25°C. Las muestras se escanean a 280 nm con una velocidad del rotor de 42000 rpm a vacío total. Un total de 80 exploraciones para cada célula se recogen para su análisis. La primera exploración para cada muestra se excluye del procesamiento de datos en sentido descendente para evitar los artefactos causados por el menisco.

Los datos se analizan utilizando el método c(s) desarrollado por Peter Shuck en N.I.H. y el programa SEDFIT (versión 8.8) con c(s) implementado. Usando el método c(s), las exploraciones de datos sin procesar se ajustan directamente a la función Lamm de S para obtener una distribución de los coeficientes de sedimentación. Los parámetros utilizados para el procedimiento de ajuste son resolución, 400; intervalo de confianza, 0.75; tamaño de cuadrícula, 1000; volumen específico parcial, 0.7245; densidad amortiguadora, 1.000; y viscosidad del tampón, 0.1002. La relación de fricción, el menisco y las posiciones inferiores se establecen como parámetros ajustados. También se ajusta ruido independiente del tiempo. Los picos detectados se integran y clasifican de la siguiente manera: de 0 a 6 S, fragmentos; de 6 a 9 S, monómero; y de 9 a 20 S, agregados.

El AUC se puede utilizar para caracterizar formulaciones de anticuerpos con bajos niveles relativos de agregación y fragmentación. AUC puede ser capaz de resolver mejor los fragmentos de anticuerpos y agregados de las especies de monómeros en situaciones que están más allá de las capacidades de resolución de los picos SEC. Las estimaciones de AUC de la masa molecular de un pico agregado también se pueden utilizar como un indicador de su composición (por ejemplo, dímeros frente a multímeros más altos).

En comparación con la SEC, el AUC también puede resolver mejor las diferentes especies de una macromolécula determinada. Sin embargo, es necesario establecer primero la tasa adecuada de dilución de la muestra, ya que la relación ruido/señal de AUC depende de la concentración de anticuerpos en la muestra.

6.1.3. Medición de la turbidez:

La agregación de proteínas en la formulación de anticuerpos también puede caracterizarse por la medición de la turbidez. La turbidez es una medida de la cantidad por la cual las partículas en una solución dispersan la luz y, por lo tanto, se pueden utilizar como un indicador general de agregación o desnaturalización de proteínas. La turbidez elevada puede indicar un mayor nivel de agregación o un mayor número/mayor tamaño de partículas.

La medición de turbidez se puede realizar con un turbidímetro (por ejemplo, 2100AN o 2100N, Hatch) siguiendo las instrucciones del fabricante. Aproximadamente de 3 a 4 ml de muestra de formulación se transfiere a un tubo de ensayo de vidrio y se desgasifica durante 2 minutos utilizando un sistema de vacío en línea. La muestra desgasificada luego se coloca en un turbidímetro (por ejemplo, 2100AN o 2100N, Hatch) en el compartimiento de la muestra a temperatura ambiente para análisis. El turbidímetro se calibra con el estándar de turbidez de formazina estabilizada STABLCAL® (Hatch) a 40, 200, 1000 y 4000 NTU (unidad de turbidez nefelométrica) y se verifica analizando las suspensiones de control de formazina a 3, 6, 18, 30 y 60 NTU.

6.1.4. Recuento de partículas

El número y el tamaño de las partículas en una formulación particular se pueden determinar utilizando un contador de partículas (por ejemplo, Beckman Coulter Multisizer 3) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

6.1.5. Perfil de viscosidad

Las viscosidades de las formulaciones de anticuerpos pueden medirse utilizando un viscosímetro (por ejemplo, ViscoLab 4000 Viscometer System de Cambridge Applied Systems equipado con un ViscoLab Piston (0.3055", 1-20 cP)). El viscosímetro se calibra antes de utilizarlo con los estándares apropiados (por ejemplo, S6S Reference Standard de Koehler Instrument Company, Inc.). El viscosímetro está conectado a un baño de agua para equilibrar el sistema a 20°C. El pistón se verifica utilizando el estándar de referencia de viscosidad S6S (8.530 cP @ 20.00°C). El pistón también se comprueba utilizando RODI H₂O (1.00 cP @ 20.0°C). El pistón se limpia y se enjuaga a fondo con agua y jabón entre las mediciones de cada tipo de solución diferente. Posteriormente, el sistema se enfría a ≤2°C. Una vez que la temperatura del sistema es de 2°C o menos, la muestra se carga en la cámara y el pistón se introduce en la muestra. Una vez que la muestra se equilibra a la temperatura de la cámara, se inicia la medición. La temperatura se incrementa a intervalos de 1°C cada 7-10 minutos hasta una temperatura final de ≥25°C. El resultado de la viscosidad se registra inmediatamente antes de aumentar la temperatura. El pistón permanece en movimiento durante las mediciones para minimizar la necesidad de re-equilibrio.

6.1.6. Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se puede utilizar para determinar cambios a lo largo del tiempo en la estabilidad térmica de un anticuerpo en una formulación particular. Las temperaturas de fusión térmica (T_m) se determinan con un calorímetro de barrido diferencial (por ejemplo, VP-DSC de MicroCal, LLC) siguiendo las instrucciones del fabricante. En un ejemplo, VP-DSC se utiliza a una velocidad de escaneo de 1.0°C/min y con un rango de temperatura de 25-120°C. Se utiliza un período de filtro de 8 segundos junto con un termostato de exploración previa de 5 minutos. Las muestras se preparan mediante diálisis en histidina-HCl 25 mM, pH 6 utilizando vasos de diálisis Pierce (3.5 kD). Las concentraciones promedio de Mab son 500 µg/mL según lo determinado por A₂₈₀. Las temperaturas de fusión se determinan siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando el software suministrado con el sistema.

6.1.7. Cromatografía líquida de espectrometría de masas (LC-MS)

La espectrometría de masas por cromatografía líquida (LC-MS) se puede utilizar para caracterizar un fragmento de degradación detectado por SEC o AUC en la formulación de anticuerpos.

Las fracciones de la columna de SEC máxima que contienen el fragmento de degradación se recogen y se digieren con N-glucosidasa F, también conocida como PNGasa F, a 37°C durante la noche. PNGasa F es una amidasa utilizada para desglucosilar muestras de proteínas. La enzima se divide entre el GlcNAc más interno y los residuos de asparagina de oligosacáridos híbridos y complejos con alto contenido de manosa en las glucoproteínas unidas a N. Las muestras desglucosiladas se mezclaron con un tampón reductor (por ejemplo, 2.5 mg/ml de DTT, 6.0 M de guanidina HCl, pH 8.2) y se mantuvieron a 56°C en un baño de agua durante 60 minutos. Luego se agrega 4-

vinilpiridina pura (por ejemplo, Aldrich Chem. Co., WI) a la muestra, y la mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 30 minutos. La muestra desglucosilada, reducida y alquilada se carga inmediatamente en una columna de fase inversa para separar las muestras modificadas de los reactivos.

Las muestras desglucosiladas, reducidas y alquiladas se fraccionan utilizando una columna de fase inversa (por ejemplo, Jupiter 5 μ m C4, 300 Å, 250 $\times$ 2.00 mm, Phenomenex) con un sistema de HPLC de gradiente binario (Agilent 1100). La fase móvil A consiste en 30% de acetonitrilo en agua con 0.1% de ácido trifluoroacético y la fase móvil B consiste en 50% de acetonitrilo en agua con 0.1% de ácido trifluoroacético. Las muestras se separan utilizando un gradiente lineal de 30-50% de acetonitrilo en agua, durante 16 min. con un índice de flujo de aproximadamente 200 μ L/min. El efluente de la columna se dirige a un detector de UV y luego se divide 1:1, la mitad pasa por una válvula de conmutación en un espectrómetro de masas de trampa de iones (por ejemplo, LTQ, ThermoElectro, San Jose, California), y la mitad restante se desecha.

El espectrómetro de masas con trampa de iones se calibra antes de la prueba experimental utilizando una mezcla de cafeína. Acetato de L-metionil-arginil-fenilalanil-alanina H₂O, y Ultramark 162. Los datos de espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS) se adquieren en el modo de escaneo completo de ESI positivo. El programa de deconvolución de BioWork (ThermoFinnigan) se puede utilizar para reconstruir los espectros de masas y obtener las masas moleculares de los péptidos/proteínas a partir de sus espectros de masas originales. Los datos de masa posteriormente se utilizan para determinar la identidad del fragmento de degradación.

6.1.8. Electroforesis en gel de enfoque isoelectrico

Se pueden utilizar mediciones de puntos isoelectricos para determinar la estabilidad química del anticuerpo en una formulación dada. Los puntos isoelectricos se determinan utilizando un sistema de electroforesis Pharmacia Biotech Multiphor 2 con una unidad de recirculación de baño refrigerado de temperatura múltiple 3 y una fuente de alimentación EPS 3501 XL. Los geles de anfolina pre-fundidos (Amersham Biosciences, rango de pI 2.5-10) se cargan con 5 μ g de proteína. Los estándares de marcadores de pI de amplio rango (Amersham, pI rango 3-10, 8 μ L) se utilizan para determinar el pI relativo para los Mabs. La electroforesis se realiza a 1500 V, 50 mA durante 105 minutos. El gel se fija utilizando una solución de fijación Sigma (5 $\times$) diluida con agua purificada a 1 $\times$. La tinción se realiza durante la noche a temperatura ambiente utilizando la tinción Simply Blue (Invitrogen). La decoloración se realiza con una solución de etanol al 25%, ácido acético al 8% y agua purificada al 67%. Los puntos isoelectricos se determinan utilizando un densitómetro Bio-Rad en relación con las curvas de calibración de los estándares.

6.1.9. Determinación de enlaces disulfuro

Se pueden utilizar protocolos de determinación de enlaces disulfuro para monitorizar la estabilidad de los enlaces cruzados del puente disulfuro en una formulación de anticuerpo particular. Las muestras de anticuerpos se desnaturalizan, por ejemplo, en 10 mM de tampón fosfato, 250 mM de NaCl, 5 mM de NEM, guanidina 6 M, pH 7.0 a 37°C durante 1 a 3 horas. Las muestras desnaturalizadas se diluyen 6 veces con tampón fosfato 100 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.0, a lo que se agrega endoproteinasa Lys-C (por ejemplo, Roche) en una relación de enzima a proteína de 1:10. Las mezclas de reacción se incuban a 37°C durante 16 a 24 horas. En la mitad de la mezcla de reacción, los puentes disulfuro se reducen al agregar 5-10 μ L de DTI 100 mM, seguido de una incubación a 37°C durante 1 h. Las muestras digeridas con Lys-C se fraccionan mediante HPLC de fase inversa (por ejemplo, columna Phenomenex Jupiter 5m C18; 250 $\times$ 2.1 mm). El eluyente se analiza mediante un detector de UV y un espectrómetro de masas LCQ o LTQ Ion Trap en línea (por ejemplo, ThermoElectron). La fase móvil A de RP-HPLC es un 0.1% de TFA en H₂O y la fase móvil B es un 0.1% de TFA en acetonitrilo. Los péptidos se eluyen a una velocidad de flujo de 0.2 mL/min con el siguiente gradiente de pasos: 1) 0-2 min, 5% de fase móvil B; 2) 2-32 min, 5-20% de fase móvil B; 3) 32-132 min, 20-40% de Fase móvil B; 4) 132-152 min, 40-60% de fase móvil B; 5) 152-155 min, 60-95% de Fase Móvil B.

El espectrómetro de masas trampa de iones se calibra antes de la prueba experimental utilizando una mezcla de cafeína, acetato de L-metionil-arginil-fenilalanil-alanina H₂O, y Ultramark 162. Los datos de espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS) se adquieren en el modo de escaneo completo de ESI positivo. El programa de deconvolución de BioWork (ThermoFinnigan) se puede utilizar para reconstruir los espectros de masas y obtener las masas moleculares de los péptidos a partir de sus espectros de masas originales. La comparación de los datos de masa adquiridos utilizando las muestras reducidas y no reducidas de DTT permite la identificación de los péptidos reticulados con disulfuro.

6.1.10. Caracterización de afinidad de unión

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal recuperado de la formulación después del almacenamiento a largo plazo (por ejemplo, 1 mes a 40°C, o 6 meses a 5°C) se puede determinar por resonancia de plasmón de superficie (véase, por ejemplo, Jonsson et al., Biotechniques 11(5): 620-627 (1991); Johne, B., Molecular Biotechnology 9(1): 65-71 (1989) utilizando un instrumento BIAcore 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ), el anticuerpo es capturado en un chip CM5 recubierto con Prot-G. Un chip CM5 recubierto con Prot-G con control de isotipo capturado de anticuerpo humano-IgG (Sigma) se utiliza para propósitos de referencia. La proteína de fusión ICOS-Fc disuelta en el tampón de ejecución HBS-EP se pasa sobre el chip a una velocidad de 25 μ L/min. 5 minutos de tiempo de

asociación son seguidos por un período de disociación de 10 minutos. Las mediciones independientes se realizan al exponer los chips a diferentes concentraciones de ICOS-Fc (por ejemplo, concentraciones entre 10 nM y 80 nM). Los chips se regeneran mediante un lavado de 0.4 minutos con NaOH 20 mM + NaCl 400 mM a una velocidad de flujo de 100 ul/min. Una vez que se recopila todo el conjunto de datos, las curvas de enlace resultantes se ajustan globalmente a un modelo de enlace Langmuir 1:1 utilizando el software BIAevaluation (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.). Este algoritmo calcula tanto la tasa de asociación (k_{on}) como la tasa de disociación (k_{off}), a partir de la cual la constante de enlace de equilibrio aparente, K_D , se deduce como la relación de las dos constantes de tasa, k_{off}/k_{on} . Una explicación más detallada de cómo se derivan las constantes de velocidad individuales se puede encontrar en el BIAevaluation Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)

6.2. Desarrollo de Formulación

Las propiedades fisicoquímicas del anticuerpo 136 afucosilado se caracterizaron de la siguiente manera. El perfil de DSC de los 136 afucosilados se determinó como se describe anteriormente. Las mediciones de DSC se realizaron en un tampón de histidina 25 mM (pH 6.0). El perfil de DSC del anticuerpo 136 afucosilado (figura 1) es esencialmente idéntico al del anticuerpo original fucosilado.

El efecto del pH sobre la estabilidad térmica del anticuerpo 136 se determinó midiendo la fluorescencia del triptófano en función de la temperatura a diversos pH. Una muestra representativa de los resultados experimentales se muestra en la Figura 2. El anticuerpo 136 parecía estable en el rango de pH 5-7.

El efecto del pH de la formulación sobre la estabilidad coloidal se evaluó midiendo la turbidez (A350 nm) de varias formulaciones 136 en función de la temperatura. Una muestra representativa de los resultados experimentales se muestra en la Figura 3. El anticuerpo 136 apareció estable en el rango de pH de 4-7.

Se diseñó una pantalla de alto rendimiento para identificar los excipientes que pueden estabilizar el anticuerpo 136. Se seleccionó un tampón de control metaestable (fosfato 20 mM a pH 7.2) para el cribado en función de la sensibilidad del pH del anticuerpo 136. Los excipientes se seleccionaron comparando la estabilidad coloidal de 136 en el tampón de control con la estabilidad coloidal de 136 en un tampón que comprende un único excipiente adicional. Los cambios en la estabilidad coloidal se siguieron midiendo la turbidez (A 350 nm) de la formulación a lo largo del tiempo. Los excipientes estabilizantes desaceleran o eliminan el aumento de la turbidez a lo largo del tiempo, mientras que los excipientes desestabilizadores aceleran el aumento de la turbidez. Un resultado representativo se muestra en la Figura 4. Los cambios de turbidez en un tampón que comprende un excipiente estabilizante se redujeron o eliminaron en comparación con la tasa de cambio de turbidez observada en el tampón de control. El cribado de alto rendimiento identificó histidina, citrato, arginina, lisina, cloruro de sodio y trehalosa como excipientes estabilizadores para el anticuerpo 136 (Figuras 5-7). Se realizaron experimentos adicionales para determinar el efecto de las combinaciones de estos excipientes sobre la estabilidad de 136 (Figura 8). El efecto estabilizador más pronunciado se observó con arginina o lisina 100 mM cuando se usó en combinación con 4% de trehalosa.

Sobre la base de los resultados de la pantalla de alto rendimiento, se seleccionaron tres formulaciones candidatas para experimentos de estabilidad a largo plazo. La formulación 1 comprendía 10 mM de histidina (pH 6.0); La formulación 2 comprendía 10 mM de histidina (pH 6.0) y 150 mM de NaCl; La formulación 3 comprendía 10 mM de histidina (pH 6.0), 100 mM de arginina-HCl y 4% de trehalosa. La estabilidad del anticuerpo 136 (60 mg/ml) en estas formulaciones se evaluó midiendo la concentración de monómero después del almacenamiento a 40°C. La concentración de monómero se determinó por SEC como se describe en este documento. Un ejemplo de los resultados de estabilidad obtenidos se muestra en la Figura 9. Los resultados confirmaron que la adición de arginina/trehalosa o NaCl aumentaba la estabilidad del anticuerpo 136. La arginina/trehalosa tuvo un efecto estabilizador más fuerte que el de NaCl solo.

La estabilidad del anticuerpo 136 también se determinó en formulaciones que contienen lisina. Los anticuerpos 136 recuperados de la Formulación 2 (histidina 10 mM (pH 6.0) y NaCl 150 mM) y Formulación 4 (histidina 10 mM (pH 6.0), lisina-HCl 100 mM y 4% de trehalosa) después de 1 mes de incubación a 40°C. se analizaron en HP-SEC. Los perfiles de elución representativos se muestran en la Figura 10. El pico de monómero principal en el perfil de elución de 136 de la forma recuperada Formulación 4 muestra un hombro pronunciado. El pico de monómero principal del anticuerpo recuperado de formulaciones 136 que contienen arginina también mostró el mismo hombro. La presencia del hombro indica la formación de mezcla de monómero/dímero en formulaciones que contienen lisina y arginina. Dicho hombro no se detecta en el perfil de elución de 136 anticuerpos recuperados de la Formulación 2.

Se seleccionó una formulación que comprende 10 mM de histidina (pH 6.0), 80 mM de NaCl, 4% de trehalosa y polisorbato al 0%, 0.02% o 0.05% para estudios de estabilidad adicionales. La agregación y el perfil de fragmentación de 136 en estas formulaciones después del almacenamiento a 5°C, 2°C o 40°C se determinaron utilizando los métodos descritos en este documento. Los resultados representativos de estos experimentos se presentan en las Figuras 11-15. Los datos mostrados demuestran que la formulación que comprende 100 mg/ml, 10 mM de histidina (pH 6.0), 80 mM de NaCl, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80 es una formulación líquida altamente estable.

6.3. Estabilidad de la formulación en jeringas precargadas.

La estabilidad de una formulación que comprende 100 mg/ml de anticuerpo, 10 mM de histidina, 80 mM de NaCl, 4% de trehalosa y 0.02% de PS-80 a pH 6.0 se puede probar en jeringas precargadas. La prueba de estabilidad se realiza cargando 1 ml de la formulación en una jeringa y almacenando la jeringa llena de formulación a 5°C, 25°C o 40°C durante largos períodos de tiempo. La estabilidad de la formulación se analiza utilizando los métodos analíticos descritos en este documento. La formación de partículas, un determinante clave de la estabilidad de la formulación en jeringas precargadas, se evalúa mediante inspección visual. La agregación y/o fragmentación de proteínas se evalúa al someter la formulación recuperada de la jeringa a un método analítico conocido por un experto (por ejemplo, SEC).

6.4. Agotamiento de células T que llevan ICOS previene la enfermedad en un modelo GvH de esclerodermia.

En este estudio, se investigó la función de ICOS en la patogénesis de un modelo de esclerodermia en ratones con enfermedad de injerto contra anfitrión (GvHD) utilizando un MAb de ICOS anti-ratón de ingesta de glucoingentes con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mejorada (ADCC). Se produjo un anticuerpo monoclonal ICOS anti-murino de ratas afucosilado (IgG2a) dirigido contra el dominio de unión al ligando de ICOS murino en una estirpe celular productora de Ovario de Hámster Chino (CHO) deficiente en fucosiltransferasa 8 (BioWa Potelligent® Technology). La actividad del anti-ratón ICOS MAb afucosilado se evaluó en un modelo de GvHD murino, que recapitula aspectos clave de la SSc humana, que incluye inflamación, fibrosis y vasculopatía.

La dosificación del MAb anti-ICOS-aFuc redujo la gravedad y la incidencia de lesiones dérmicas en comparación con el MAb de control de isotipo y el injerto singénico de control. Las puntuaciones clínicas medias se redujeron significativamente en los grupos tratados con anti-ICOS en comparación con los ratones tratados con MAb de control de isotipo, tan pronto como 11 días después del injerto (3.4 veces, $p < 0.05$), y hasta 4 semanas después del injerto (8.1 veces, $p < 0.005$). El MAb anti-ICOS-aFuc también previno la acumulación de células TFH asociada a la enfermedad y la expansión asociada de las células B del centro germinal y las células B secretoras de inmunoglobulina. No hubo signos clínicos relacionados con ICOS MAb o cambios en el peso corporal en animales durante el estudio.

Los resultados indican que ICOS desempeña un papel importante en la patología dérmica de GvHD-SSc murino, ya que el agotamiento de las células T ICOS + reduce el puntaje general de la enfermedad clínica. La identificación de células ICOS + TFH desreguladas en GvHD-SSc subraya su función crítica para impulsar la generación de células B patógenas en las células B del centro germinal en tejidos linfoides secundarios y en la diferenciación de células B secretoras de inmunoglobulina en la piel. Es importante destacar que el tratamiento con el MAb anti-ratón ICOS-aFuc produjo una reducción significativa de los signos clínicos de la enfermedad.

La afinidad de unión BIAcore del MAb anti-ICOS fucosilado y afucosilado al FcγRIV de ratón se muestra en la Figura 15A. Se esperaba que la unión mejorada de ICOS MAb Fc al FcγRIV expresado en células efectoras aumentara la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La Figura 15B muestra la caracterización del inmunofenotipo en el estado estable de la expresión de ICOS sobre células nultitradas esplénicas y de memoria auxiliares T (central y efector). Los esplenocitos aislados de ratones Balb/c nultitrados se procesaron y se tiñeron con los marcadores indicados para identificar el perfil de expresión de ICOS en subpoblaciones de células T auxiliares. El MAb anti-ICOS libre de fucosa (IgG2a-aFuc) medió un agotamiento más eficaz de las células T que llevan ICOS (Figura 15C). El análisis farmacodinámico de las células T con ICOS que llevan la memoria efectora y la memoria efectora se determinó mediante una única inyección intraperitoneal de los MAb anti-ICOS indicados en ratones Balb/c nultitrados (250 µg/animal).

El modelo GvH utilizado en este estudio se describió en Zhou L., J Invest Dermatol, 2006, 126(2): 305-14. Los anfitriones Balb/c se injertaron con células T de un donante BIOD2. Los animales de control se injertaron con células T balb/c sintéticas. El anticuerpo se administró los días 7, 14 y 21 después del injerto. La administración de MAb anti-ICOS (IgG2a-aFuc) redujo la puntuación clínica de injerto contra anfitrión de esclerodermia (Figura 16). La puntuación media de la enfermedad clínica se evaluó después de un tratamiento quincenal (hora de inicio: día 8) con ICOS IG2a-aFuc anti-ratón o MAb de control de isotipo ($n=10$). Las mediciones de las puntuaciones cutáneas iniciales se obtuvieron el día 6 del estudio y cada dos semanas hasta el día 26 del estudio, cuando los animales se sacrificaron para la recolección de tejido. La piel se puntuó como sigue: 0=normal; 1 = lesión <1 cm²; 2 = lesión 1-2 cm²; 3 = lesión >2 cm². Las extremidades (orejas, cola, patas) que aparecen escamosas recibieron una puntuación de 0.3, para una puntuación máxima total de 3,9 por animal (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$).

MAb Anti-ICOS mediada por la eliminación efectiva de ICOS con TFH e inhibe la expansión de las células B del centro germinal. La Figura 17 muestra el análisis de inmunofenotipo de las células ICOS+ de memoria Th, y de memoria Th de bazo, nódulos linfáticos y sangre periférica (cerradas como se indica en la Figura 1C) aisladas de ratones de control Balb/c y de ratones deficientes en rag2 tratados con MAb de control de isotipos o anti-ICOS. La terapia anti-ICOS previene la expansión de las células TFH (Figura 17D). Si bien el MAb anti-ICOS no altera el número total de células B esplénicas totales (CD19+) (Figura 17E), inhibe significativamente la expansión mediada por TFH de las células B del centro germinal (Figura 17F). El agotamiento de las células T que llevan ICOS no perturbó los compartimientos de células T CD4+ (Figura 17G) y CD8+ (Figura 17H).

La histología de RAG2 -/- bazo y riñón de un animal tratado con MAb de control de isotipo y animal tratado con MAb anti-ICOS se muestra en la Figura 18. Un aumento mayor ($\times 200$) del bazo demuestra la falta de formación del centro germinal en animales tratados con anti-ICOS en comparación con el isotipo. En el riñón, se observaron manguitos perivasculares (E) moderados con linfocitos mezclados con menos células plasmáticas (F, recuadro). Ampliación original, $\times 100$; recuadro $\times 1000$.

El tratamiento con MAb anti-ICOS inhibió significativamente el desarrollo de la patología cutánea por GvHD-SSc. La histología de la piel de la espalda de ratones Balb/c, o RAG2-/- injertados con esplenocitos a las 4 semanas del grupo de MAb de control de isotipo y el grupo tratado con MAb anti-ICOS se muestra en la Figura 19. Tinción de hematoxilina y eosina (Figuras 19 A, C y E) de la piel que representa 2/10 animales en el grupo de isotipos. El MAb muestra una marcada inflamación dérmica profunda con infiltración de linfocitos, neutrófilos dispersos y macrófagos dentro de una matriz de colágeno aumentada. Difícilmente, la epidermis está engrosada con apoptosis y necrosis de células basales individuales y dentro de la vaina interna de la raíz de los folículos pilosos. La tinción tricrómica de Masson (figuras 19 B, D y F) muestra un aumento del colágeno inmaduro dentro de la dermis del grupo de isotipos. Hubo una inflamación de la piel mínima o nula en los animales tratados con MAb anti-ICOS. Ampliaciones originales, $\times 200$.

El tratamiento con ICOS MAb afectó la expresión de los genes asociados con T auxiliar y TFH y la huella del gen autoinmunitario en la piel. El ARN total se extrajo de las biopsias de la piel y la preamplificación del ADNc y la PCR en tiempo real se prepararon utilizando el kit de mezcla maestra PreAmp TaqMan (Applied Biosystems). Las muestras de ARN de la piel, recolectadas de ratones de control Balb/c y de ratones inactivados para Rag2 tratados con anti-ICOS o MAb de control de isotipo, se procesaron por triplicado utilizando los ensayos de expresión de genes TaqMan en los chips BioMark 48.48 Dynamic Array (Fluidigm Corp). Los Delta-delta Cts ($\Delta\Delta Ct$) se calcularon utilizando la media de los 3 genes de referencia (GAPDH, 18S, ACTB) y una muestra de calibrador, y se convirtieron para plegar el cambio de expresión mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los resultados se presentan en la Figura 20.

6.5. Autoasociación reversible del anticuerpo anti-ICOS 136

El análisis de ultracentrifugación analítica realizado en anticuerpos anti-ICOS 136 mostró que el pico principal era más amplio que el observado para una IgG típica. En concentraciones de proteína de 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL y 2.0 mg/mL, a 25°C en PBS, el análisis de distribución de tamaño mostró una ampliación del pico y cambio a valores más altos de S (coeficiente de sedimentación; Svedberg) con el aumento de la concentración de proteínas, lo que es indicativo de auto-asociación. Los experimentos de equilibrio de sedimentación demostraron que la estequiometría de la autoasociación se ajusta mejor a un modelo de equilibrio monómero-trímero, con una constante de asociación de $2.5 \times 10^8 \text{ M}^{-2}$.

La dispersión dinámica de la luz (DLS) se utilizó para estudiar autoasociaciones de anticuerpos anti-ICOS 136 y para detectar condiciones/excipientes para evitar o minimizar la auto asociación. El sistema DLS determina el tamaño de una partícula midiendo primero el movimiento browniano, que es el movimiento aleatorio de partículas suspendidas en un fluido. Cuando un haz de luz coherente y monocromático pasa a través de una dispersión coloidal, las partículas dispersan la luz y, debido al movimiento browniano, se produce una fluctuación dependiente del tiempo en la intensidad dispersada. El análisis de la dependencia temporal de la fluctuación de intensidad puede producir el coeficiente de difusión de las partículas que depende del tamaño de la partícula. El radio hidrodinámico de las partículas luego se calcula a partir del coeficiente de difusión a través de la ecuación de Stokes Einstein.

6.5.1. Métodos

Dispersión dinámica de la luz: la distribución del tamaño de la proteína y, por lo tanto, el tamaño molecular es monitorizado mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Pa.). Este instrumento incorporó una óptica de retrodispersión no invasiva que podía medir tamaños de proteínas en el rango de 0.6 nm a 6 μm . DLS mide las fluctuaciones dependientes del tiempo en la intensidad de la luz dispersada debido al movimiento browniano de las moléculas de proteína. El análisis de estas fluctuaciones de intensidad permitió la determinación de los coeficientes de difusión de las partículas, que se convirtieron matemáticamente en un diámetro hidrodinámico aparente promedio de una esfera equivalente utilizando la relación Stokes Einstein. El coeficiente de difusión se calculó a partir de la función de correlación temporal. Para comprender la autoasociación reversible de proteínas, la función de autocorrelación dependiente del tiempo de la fotocorriente se adquirió cada 10 segundos, con 15-18 adquisiciones para cada serie. La solución de la muestra se iluminó con un láser de 633 nm y la intensidad de la luz dispersada se midió en un ángulo de 173 grados. Después de corregir la viscosidad, el índice de refracción y la absorbancia, las mediciones de DLS proporcionaron estimaciones precisas tanto del diámetro hidrodinámico como de su distribución gaussiana, que se usó para monitorizar el comportamiento potencial de autoasociación.

Análisis de datos para calcular el porcentaje de monómero y la fracción de trímero: los experimentos de equilibrio de sedimentación demostraron que la estequiometría de la autoasociación se ajusta mejor a un modelo de equilibrio monómero-trímero. El tamaño hidrodinámico obtenido por DLS en diversas condiciones se ajustó a un equilibrio monómero-trímero para derivar una constante de asociación a partir de la cual se calculó el porcentaje molar de especies autoasociadas bajo diversas condiciones. El tamaño aparente en las mediciones de DLS se tomó como un

promedio ponderado del monómero (9.0 nm) y el trímero (35.6 nm), multiplicado por su respectiva presencia fraccional (de 0 a 1, dependiendo de las condiciones de la solución). Como se conoce la concentración total, la concentración de monómero es igual a:

$$P_{\text{Monómero}} = P_{\text{Total}} \times 1 - \frac{[R_{H-\text{Obs}} - R_{H-\text{Monómero}}]}{[R_{H-\text{Trímero}} - R_{H-\text{Monómero}}]}$$

5 La concentración de trímero es entonces:

$$P_{\text{Trímero}} = \frac{\{[P_{\text{Total}}] - [P_{\text{Monómero}}]\}}{3}$$

Y la constante de asociación (en M⁻²) es:

$$\frac{[P_{\text{Trímero}}]}{([P_{\text{Monómero}}])^3}$$

10 En la que, P_{Total} es la concentración de anticuerpo anti-ICOS 136 en M, R_{H-Obs} se observa diámetro hidrodinámico en nm, R_{H-Monómero} es el diámetro hidrodinámico del monómero y R_{H-Trímero} es el diámetro hidrodinámico de Trímero.

6.5.2. Datos y discusión

15 La autoasociación reversible (RSA) de las proteínas puede ser el resultado de interacciones de proteínas no covalentes relativamente débiles, que suelen ser interacciones de carga e hidrófobas. Dado que el sistema es reversible, habrá un equilibrio entre el monómero y las formas de orden superior y este equilibrio puede cambiar dependiendo de las condiciones de la solución. La siguiente sección describe el efecto del cambio de la concentración de proteínas, el pH, la fuerza iónica y la temperatura en la auto asociación de anticuerpos anti-ICOS 136 que se discutirán.

6.5.2.1. Desarrollo de DLS como una herramienta eficaz para estudiar RSA en Correlación de anticuerpos anti-ICOS 136 entre DLS y AUC

20 Los anticuerpos monoclonales (MW 150 kDa) normalmente tienen un diámetro hidrodinámico de 9-12 nm y una distribución gaussiana de ~3 nm. Un mayor diámetro hidrodinámico y una distribución gaussiana más amplia pueden ser indicativos de autoasociación. Por lo tanto, el diámetro hidrodinámico se monitorizó bajo diversas condiciones de solución para determinar el comportamiento de auto asociación de anticuerpos anti-ICOS 136. Antes de estudiar el efecto de varias condiciones de solución en RSA de anticuerpos anti-ICOS 136 utilizando DLS, establecimos la correlación entre DLS y una técnica ortogonal bien establecida (para estudiar RSA) como AUC.

6.5.2.2. Tamaño hidrodinámico del anticuerpo anti-ICOS 136 en diversas condiciones. Efecto de la concentración

30 El análisis de AUC de los anticuerpos 136 anti-ICOS mostró una ampliación del pico y el cambio a valores más altos de S (coeficiente de sedimentación; Svedberg) al aumentar la concentración de proteínas. Para confirmar estas observaciones y también verificar si DLS puede detectar una autoasociación similar, se determinó el diámetro hidrodinámico del anticuerpo anti-ICOS 136 a varias concentraciones de proteína. De manera similar al AUC (un aumento en el coeficiente de sedimentación promedio en peso) se esperaba un aumento en el diámetro hidrodinámico a una concentración de proteína más alta si está presente una autoasociación significativa. La Figura 21 muestra el diámetro hidrodinámico del anticuerpo anti-ICOS 136 en un amplio rango de concentraciones. Se observó un aumento dependiente de la concentración en el diámetro hidrodinámico en el amplio rango estudiado.

35 Esto indica fuertemente que el anticuerpo anti-ICOS 136 está experimentando RSA en una concentración de proteína alta. Donde, como un anticuerpo monoclonal de control no interactivo de tamaño similar no mostró cambios en el diámetro hidrodinámico a la misma concentración.

Efecto del pH y la fuerza iónica.

40 El anticuerpo anti-ICOS 136 RSA fue sensible al aumento de la fuerza iónica (aumento de la concentración de NaCl) y al pH, lo que sugiere la importancia de las interacciones de carga. La Figura 22 muestra el tamaño hidrodinámico del anticuerpo anti-ICOS 136 para una concentración fija (10 mg/ml) en presencia de concentraciones crecientes de NaCl.

45 Las mediciones de DLS del anticuerpo anti-ICOS 136 a varios pH revelaron que el grado de autoasociación también aumentó con el pH (Figura 23). El impacto significativo tanto del pH como de la fuerza iónica sugirió la importancia de las interacciones de carga en el anticuerpo anti-ICOS 136 RSA.

Efecto de la temperatura

El tamaño hidrodinámico del anticuerpo anti-ICOS 136 se determinó a varias temperaturas para comprender el efecto de la temperatura sobre el anticuerpo RSA anti-ICOS 136. La Figura 24 muestra el tamaño hidrodinámico del anticuerpo anti-ICOS 136 a diversas temperaturas a pH 6 y pH 7.2 junto con un anticuerpo de control (mAbB).

5 Cinética de disociación inducida por temperatura

La cinética de disociación inducida por dilución o temperatura del anticuerpo anti-ICOS 136 se midió mediante dos métodos: dilución rápida por dispersión de luz estática y cambio de temperatura por DLS. Los experimentos de dilución rápida con detección de dispersión de luz de ángulo único demostraron que la velocidad de disociación es rápida con un medio tiempo inferior al límite de detección de 0.1 segundo. La cinética de la disociación inducida por la temperatura de la autoasociación del anticuerpo anti-ICOS 136 (10 mg/ml, en PBS) medida por DLS se presenta en. Con un aumento de temperatura de 25°C a 37°C, se observó una disminución sustancial en el diámetro hidrodinámico dentro del primer punto de tiempo medible de 1 minuto. Se observó una disminución similar en el diámetro hidrodinámico al aumentar la temperatura de 4°C a 37°C dentro del primer punto de tiempo medible de 3 minutos. Estos resultados indicaron que la disociación inducida por la temperatura fue rápida.

15 6.5.2.3. Nivel de la 136 auto-asociación de anticuerpos anti-ICOS bajo varias condiciones de solución

Los estudios de dispersión dinámica de la luz mostraron un aumento en el tamaño hidrodinámico del anticuerpo anti-ICOS 136 (indicativo de autoasociación) a mayor concentración, menor temperatura, mayor pH y mayor concentración de sal. Adicionalmente, los datos analíticos de ultracentrifugación sugirieron un equilibrio monómero-trímero. Por lo tanto, el tamaño hidrodinámico del anticuerpo anti-ICOS 136 obtenido bajo diversas condiciones se ajustó a un equilibrio monómero-trímero para derivar una constante de asociación a partir de la cual se calculó el porcentaje molar de especies autoasociadas en diversas condiciones. Se usó el modelado para determinar el porcentaje molar del anticuerpo anti-ICOS 136 autoasociado de las afinidades de unión a la asociación derivada de DLS, en función de la concentración de proteína.

25 TABLA 2 Porcentaje en moles de anticuerpos anti-ICOS 136 autoasociados del DLS. El tampón de formulación comprende 10 mM de histidina (pH 6.0), 80 mM de NaCl, 4% de trehalosa y (0.02% de polisorbato 80.

Conc. de proteína	Tampón	Temperatura	Porcentaje de monómero
10	Tampón de formulación	23°C	80
1	Tampón de formulación	23°C	99
0.01	Tampón de formulación	23°C	100
10	PBS	37°C	85
1	PBS	37°C	99
0.01	PBS	37°C	100

30 En conclusión, la autoasociación reversible del anticuerpo anti-ICOS 136 observado por análisis de ultracentrifugación analítica dependió de la concentración de proteínas y la temperatura. Los estudios cinéticos indicaron que se produjo una rápida disociación tras la dilución y al aumento de la temperatura. La auto-asociación reversible no indujo la formación de agregados. Sobre la base de los experimentos de dilución rápida y los cálculos de modelación, tras la inyección subcutánea de la dosis clínica más alta (3 mg), la dilución rápida y el equilibrio de la temperatura a 37°C (temperatura corporal) darán como resultado una forma principalmente monomérica del anticuerpo anti-ICOS 136.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MedImmune LLC Sathish, Hasige Shah, Ambarish Carlesso, Gianluca Delaney, Tracy

<120> Formulaci3n de anticuerpos

5 <130> IC320PCT

<150> 61/113,796

<151> 2008-11-12

<150> 61/249,365

<151> 2009-10-07

10 <160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 719 496 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Leu
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Leu
          20           25           30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
          85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 3

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Leu Leu Ala
1           5           10

```

<210> 4

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1           5

```

15 <210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 719 496 T3

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 6

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr His Asp Ala Phe
100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

ES 2 719 496 T3

115					120					125						
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	
130					135					140						
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	
145					150					155					160	
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	
165					170					175						
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	
180					185					190						
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	
195					200					205						
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	
210					215					220						
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
225					230					235					240	
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
245					250					255						
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
260					265					270						
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
275					280					285						
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
290					295					300						
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
305					310					315					320	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
325					330					335						
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
340					345					350						
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
355					360					365						

ES 2 719 496 T3

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr His Asp Ala Phe
100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

ES 2 719 496 T3

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 8

Gly	Tyr	Tyr	Met	His
1				5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 9

Trp	Ile	Asn	Pro	His	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 10

<211> 16

15 <212> PRT

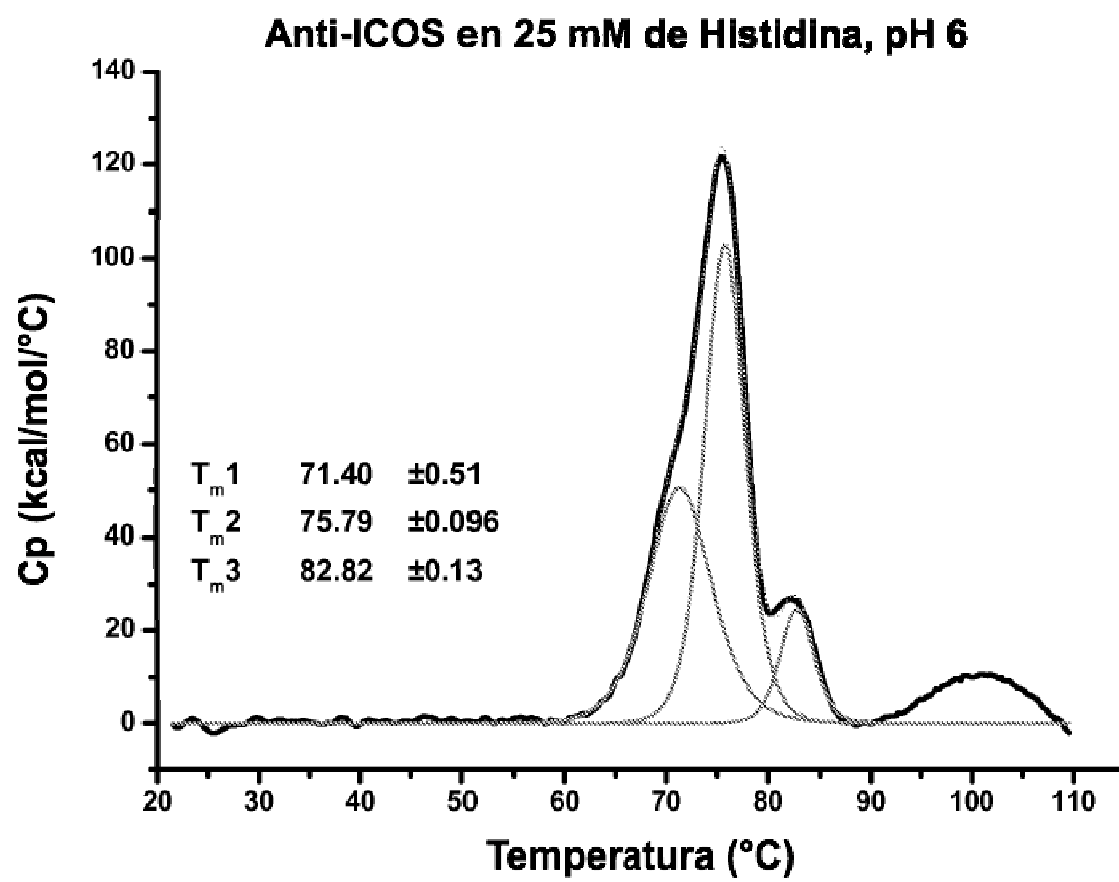
<213> Homo sapiens

<400> 10

Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	His	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile
1				5					10					15	

REIVINDICACIONES

1. Una formulación acuosa estable que comprende un anticuerpo que une específicamente ICOS humano, en la que dicha formulación comprende 10 mg/ml del anticuerpo, 80 mM de NaCl, 10 mM de histidina, 4% de trehalosa y 0.02% de polisorbato 80 y en la que el pH de la formulación es 6; y
- 5 en la que
 - a) el anticuerpo comprende una región Fc que tiene cadenas de azúcares ligadas a N-glucósidos complejas en las que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo de reducción en la cadena de azúcar,
 - b) el anticuerpo se somete a autoasociación reversible en solución, en el que la autoasociación reversible no induce formación agregada, y
- 10 c) por lo menos 10 por ciento en moles del anticuerpo existe como un trímero en PBS a 10 mg/ml de concentración de anticuerpo a 37°C; y
en la que el anticuerpo comprende una secuencia de cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 6 y una secuencia de cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 1.
2. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicha formulación es isotónica.
- 15 3. La formulación de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que dicha formulación es una formulación farmacéuticamente aceptable.
4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha formulación es una formulación inyectable, y opcionalmente en la que la formulación es adecuada para administración intravenosa, subcutánea, o intramuscular.
- 20 5. Una forma de dosificación farmacéutica adecuada para administración parenteral a un humano que comprende una formulación de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en un recipiente adecuado.
6. Una jeringa precargada que contiene la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;
 - a) para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno autoinmunitario en un humano; o
 - 25 b) para uso en el tratamiento de o prevenir el rechazo en un paciente de trasplante humano; o
 - c) para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno inmunitario en un humano; o
 - d) para uso en el agotamiento de las células T que expresan ICOS en un paciente humano; o
 - e) para uso en interrumpir la arquitectura del centro germinal en un órgano linfóide secundario de un primate.
- 30 8. La formulación para uso de la reivindicación 7, en el que la enfermedad o trastorno autoinmunitario es SLE o escleroderma.

**Fig. 1**

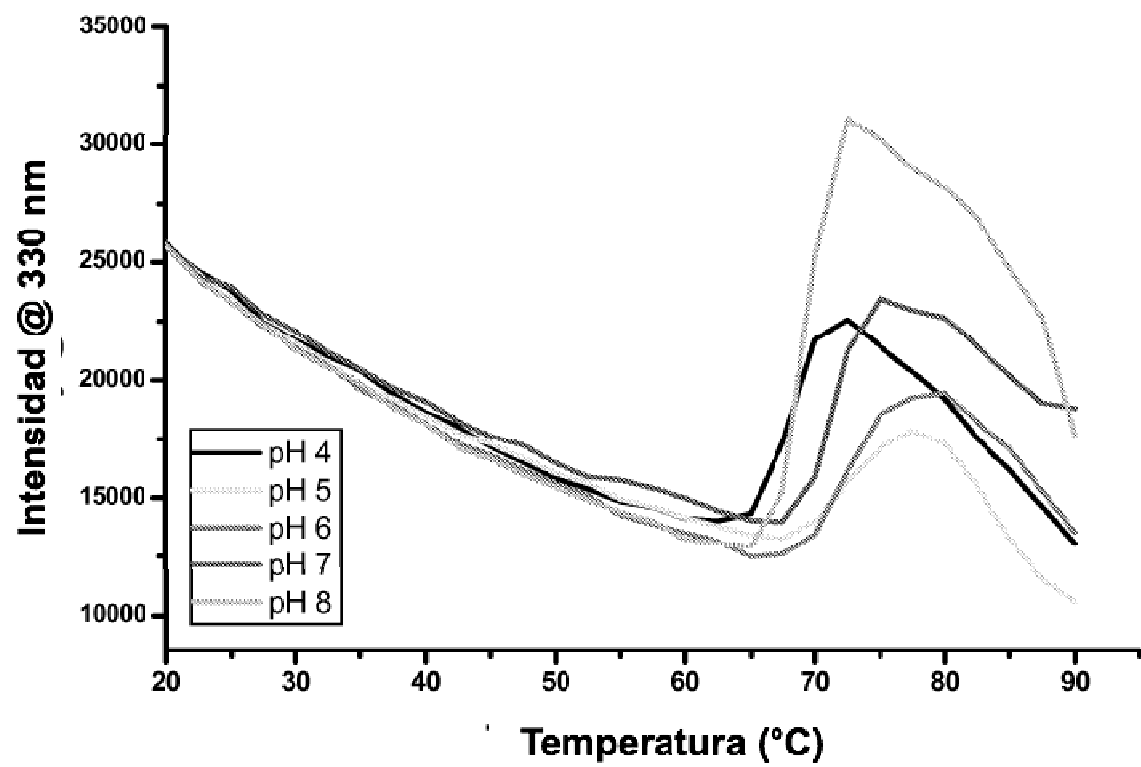


Fig. 2

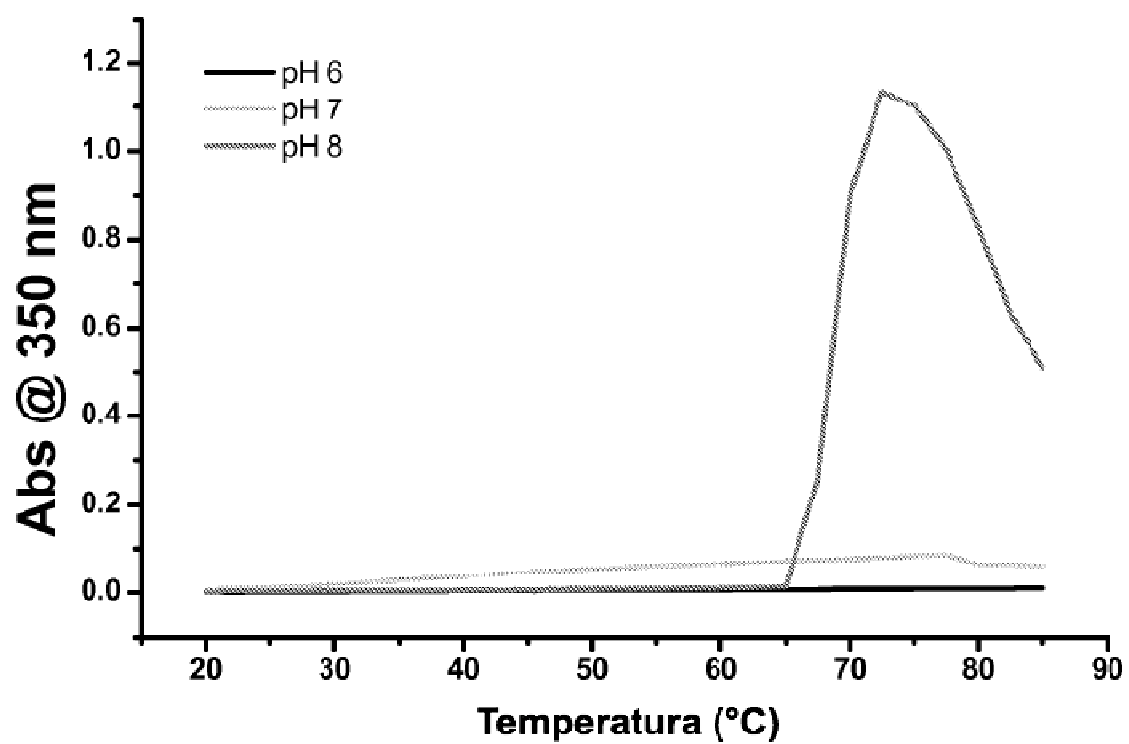


Fig. 3

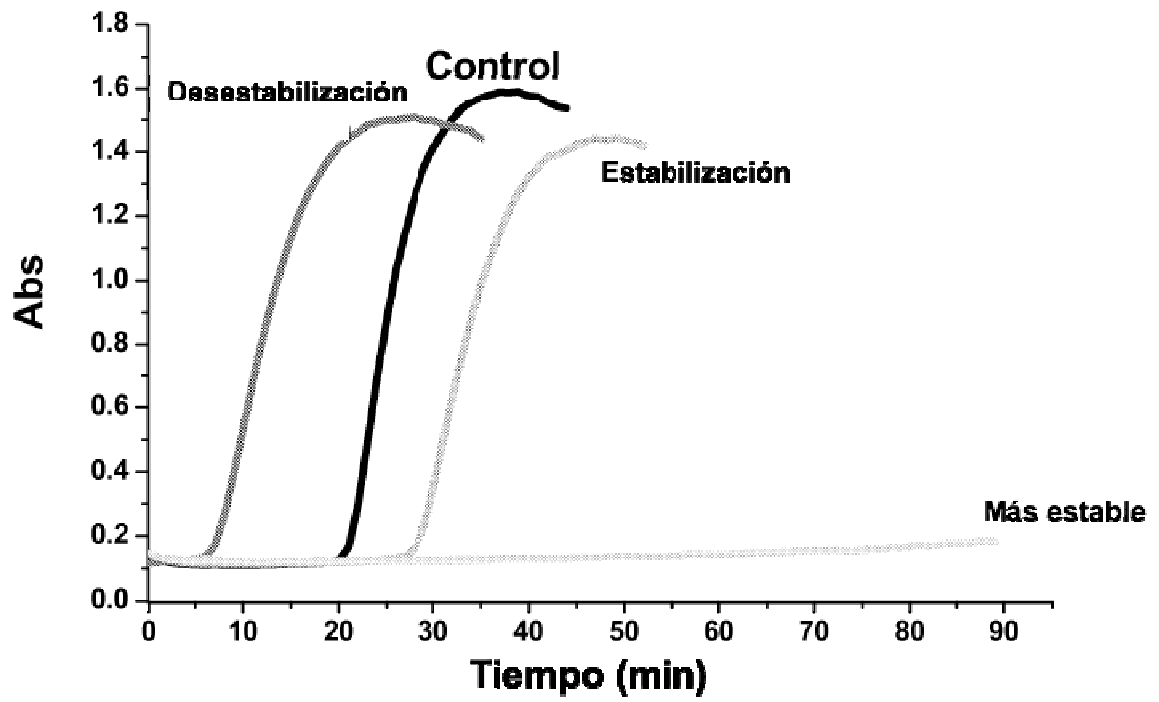


Fig. 4

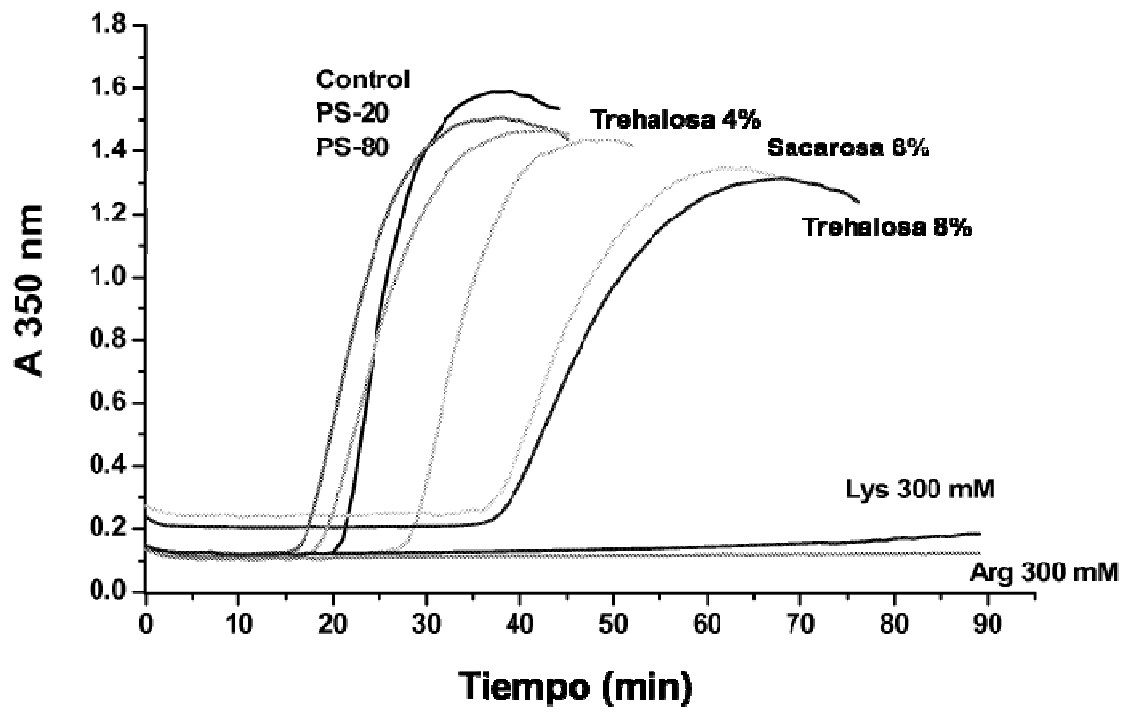


Fig. 5

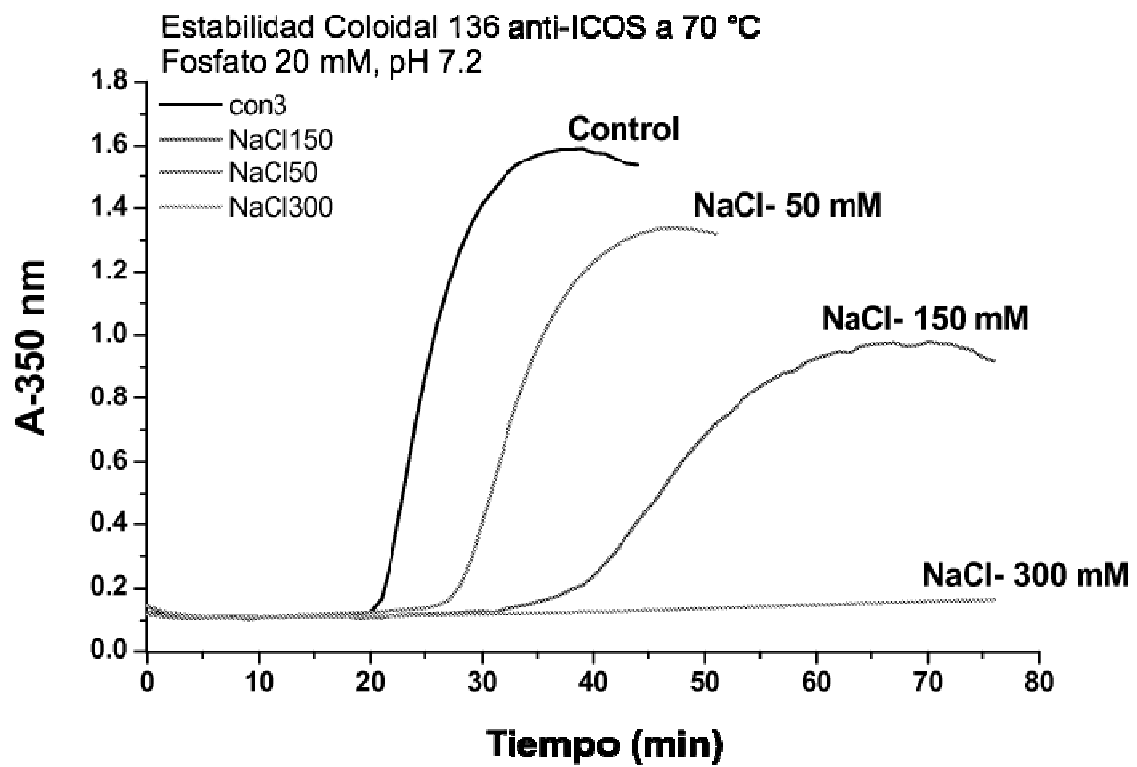
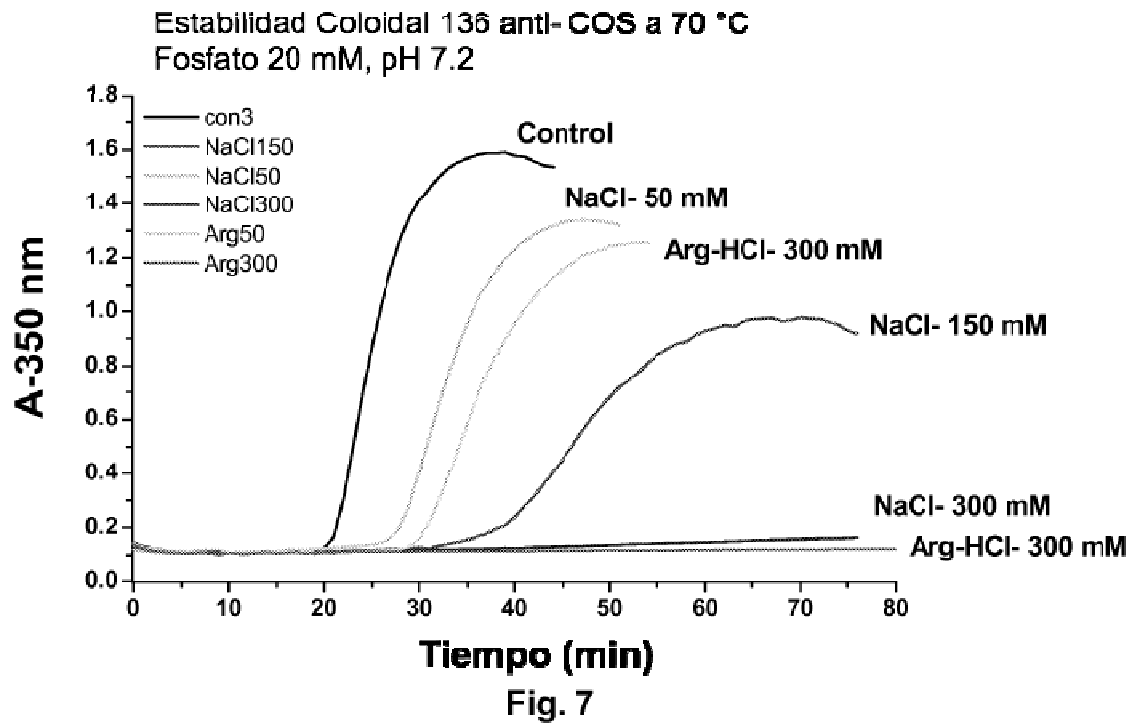


Fig. 6



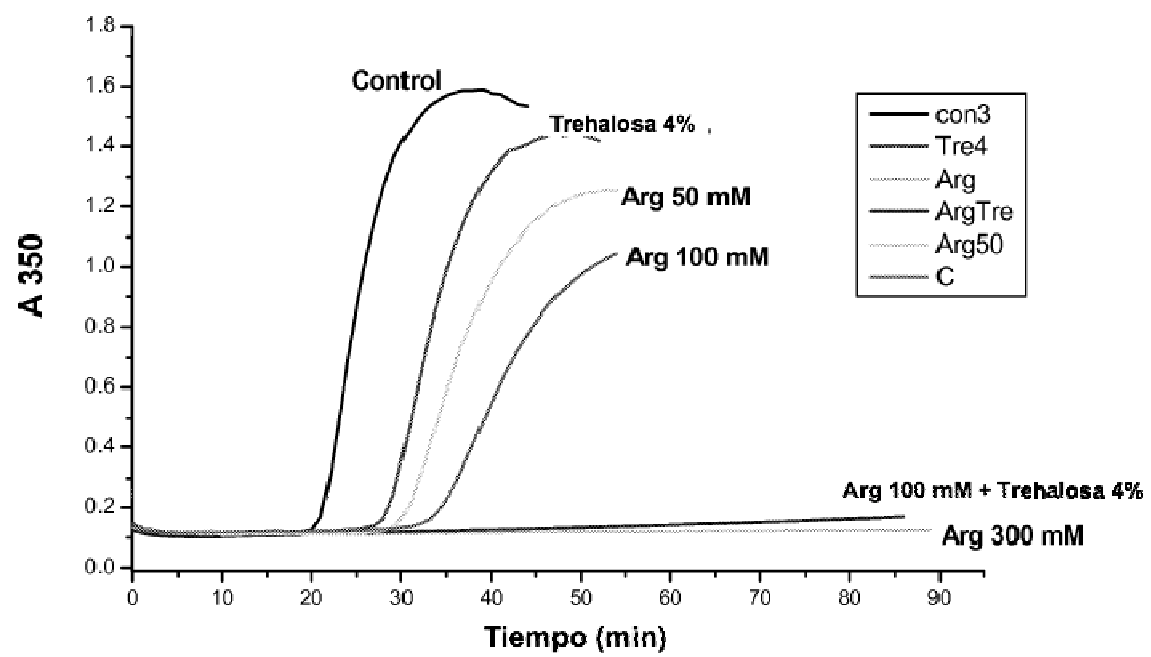


Fig. 8

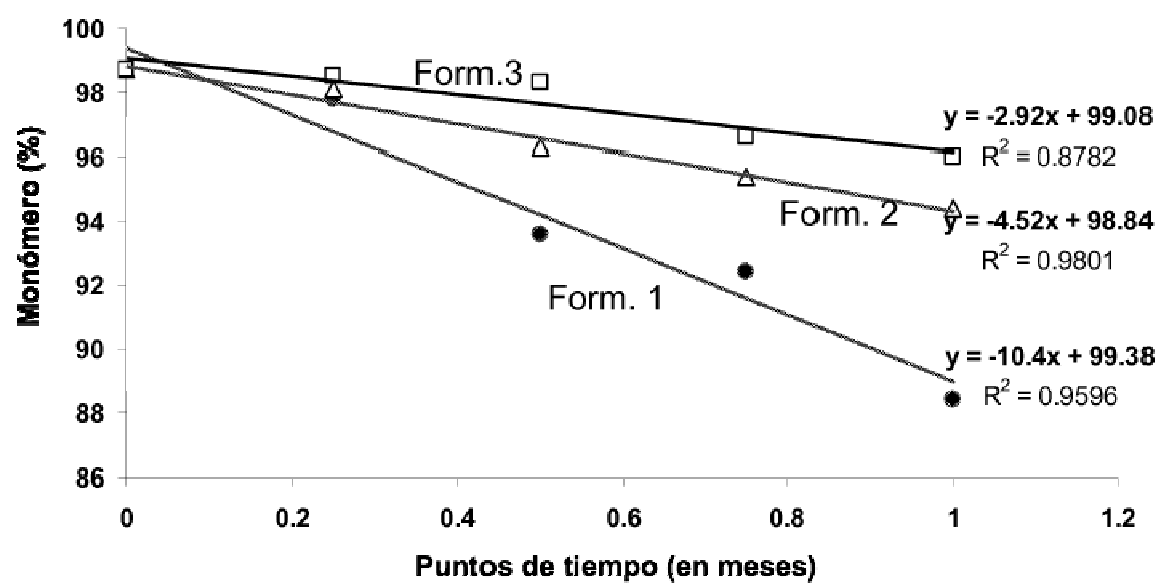


Fig. 9

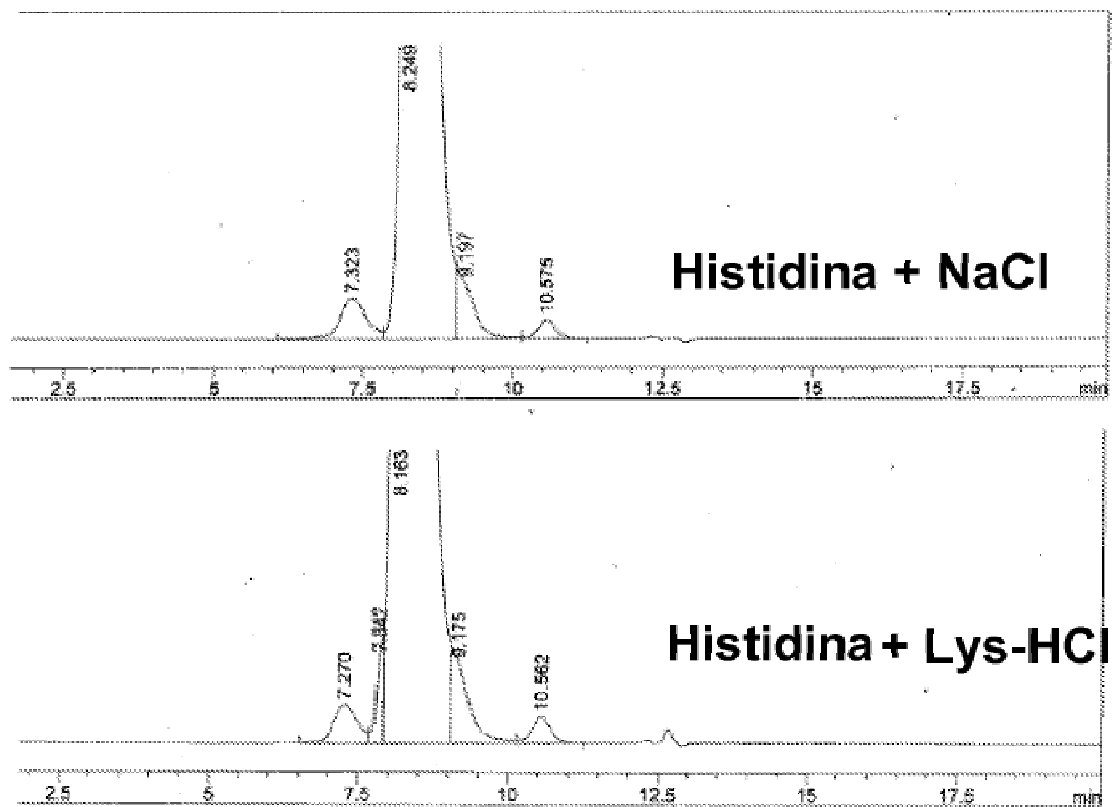
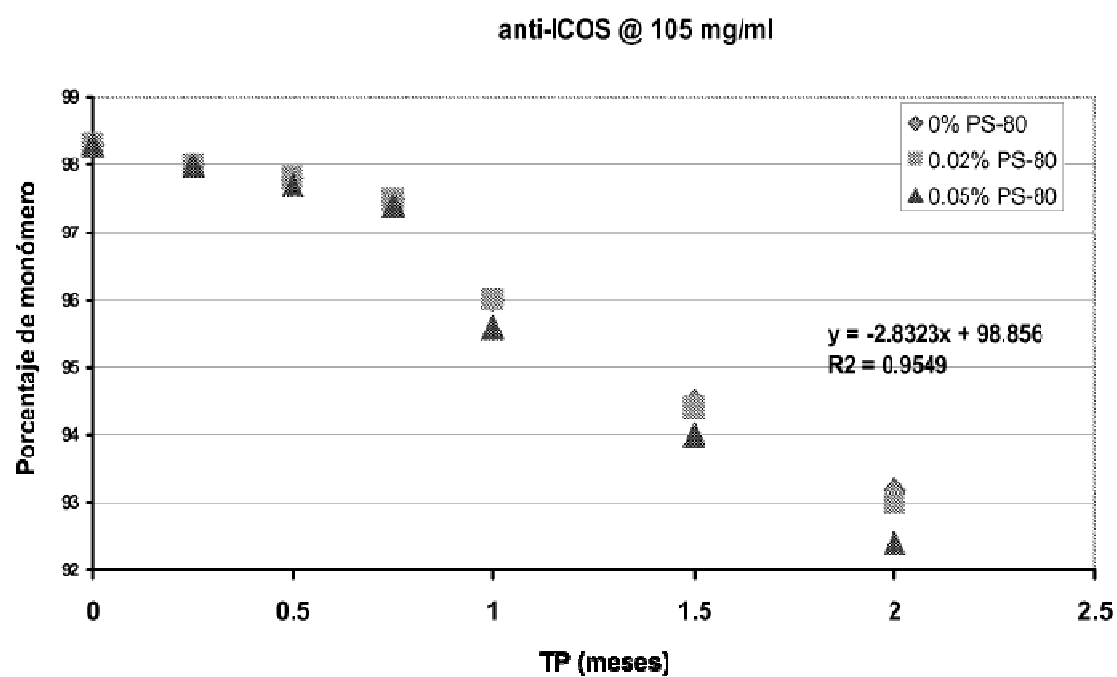


Fig. 10

**Fig. 11**

Anti-ICOS en 10 mM His, 4% de Trehalosa, pH 6

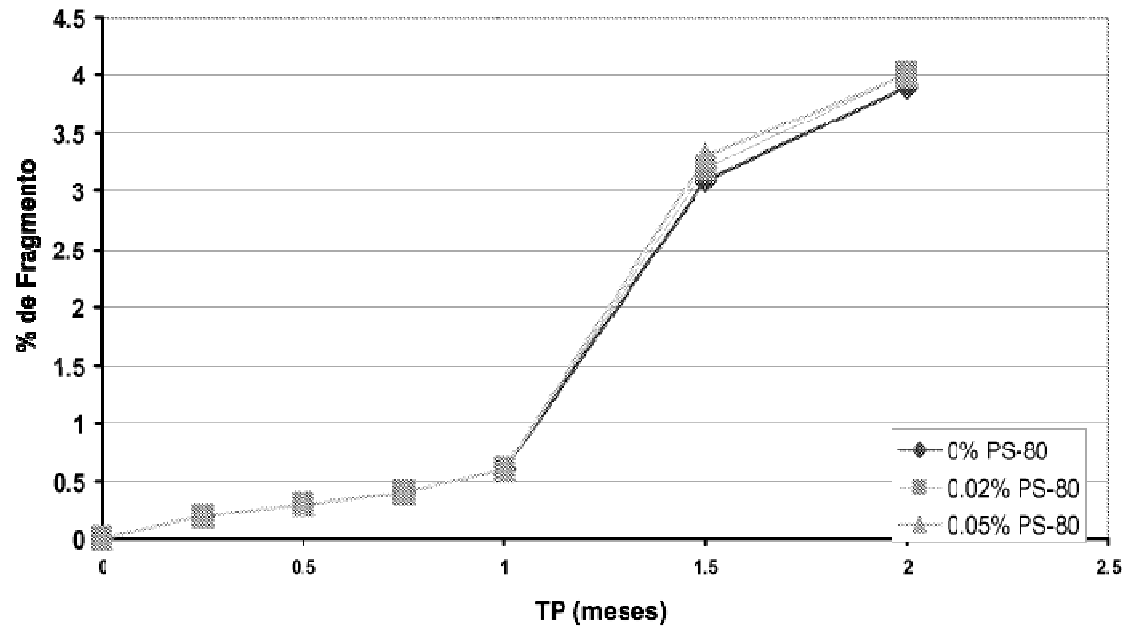
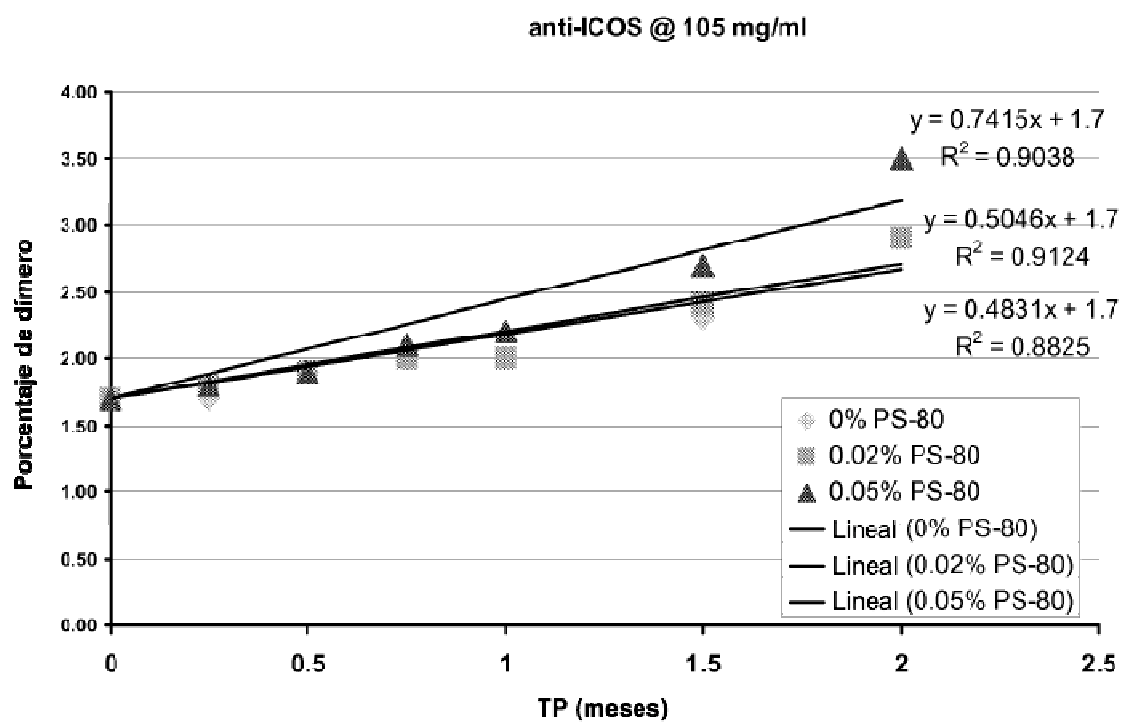


Fig. 12

**Fig. 13**

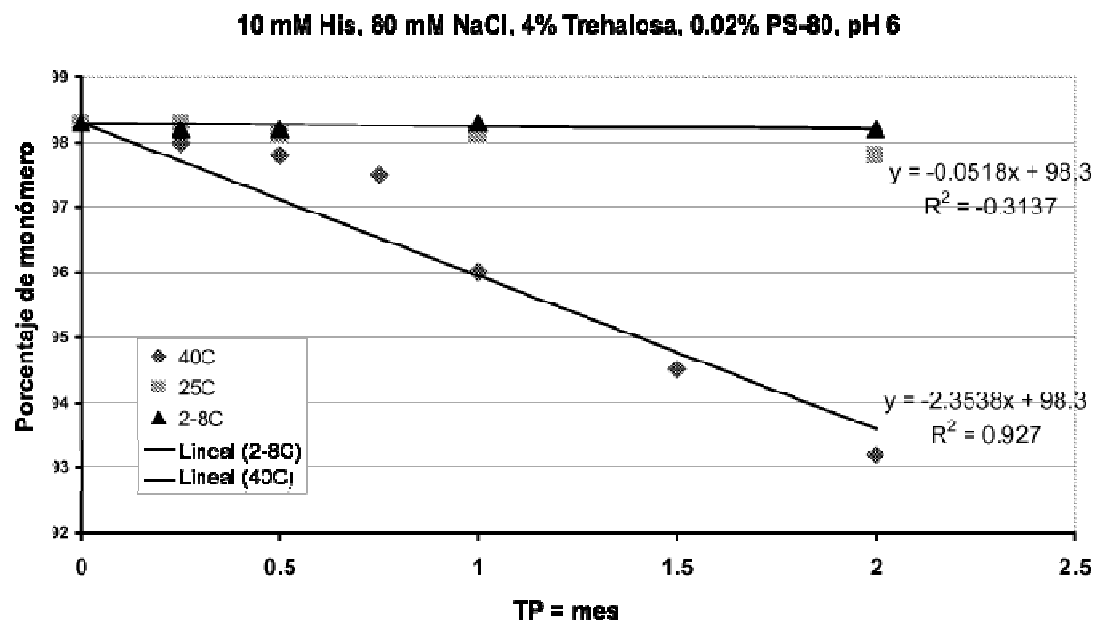


Fig. 14

MAb	FcγRIV de ratón (nM)
ICOS anti- ratón IgG2a	219
ICOS anti- ratón IgG2a- aFuc	5

Fig. 15A

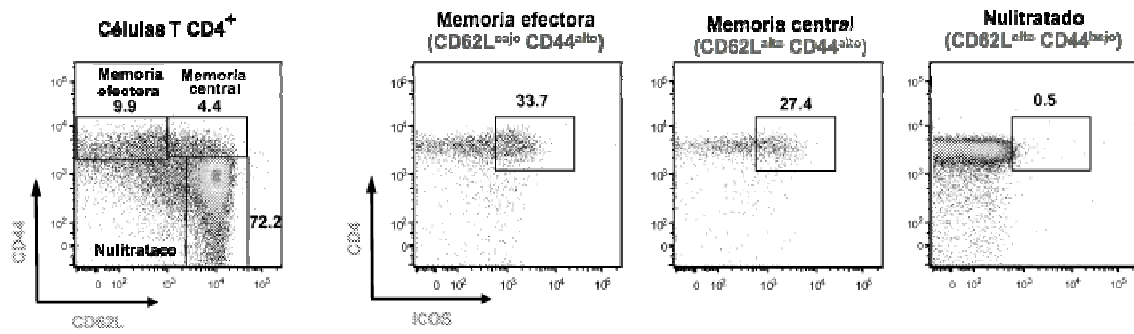


Fig. 15B

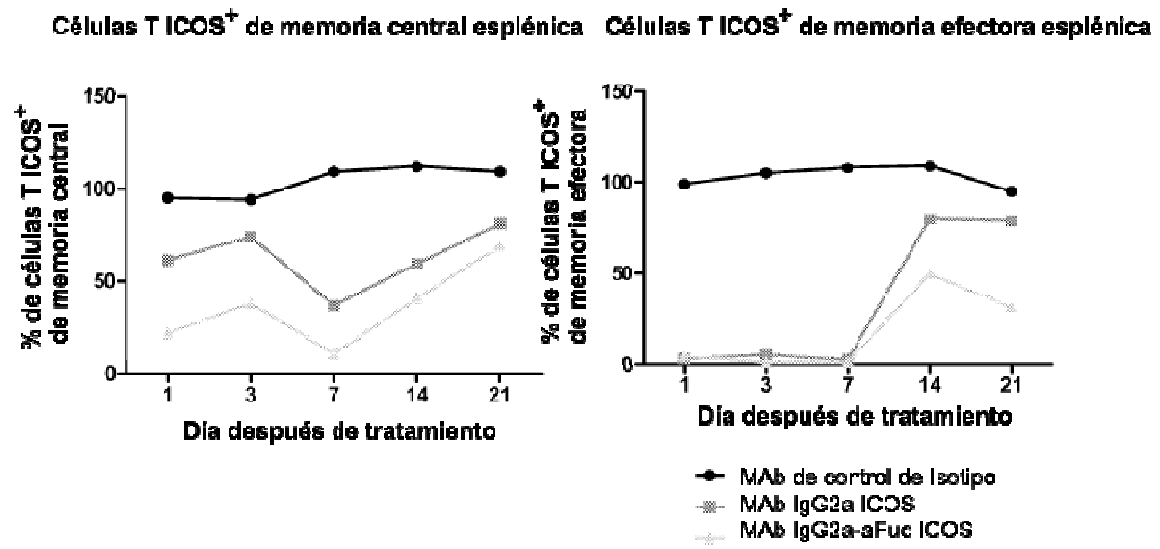


Fig. 15C

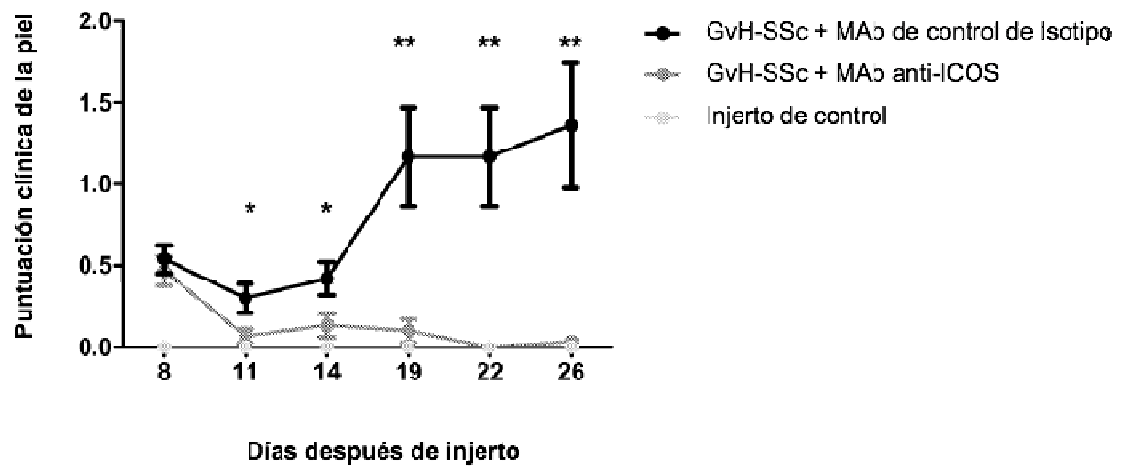


Fig. 16

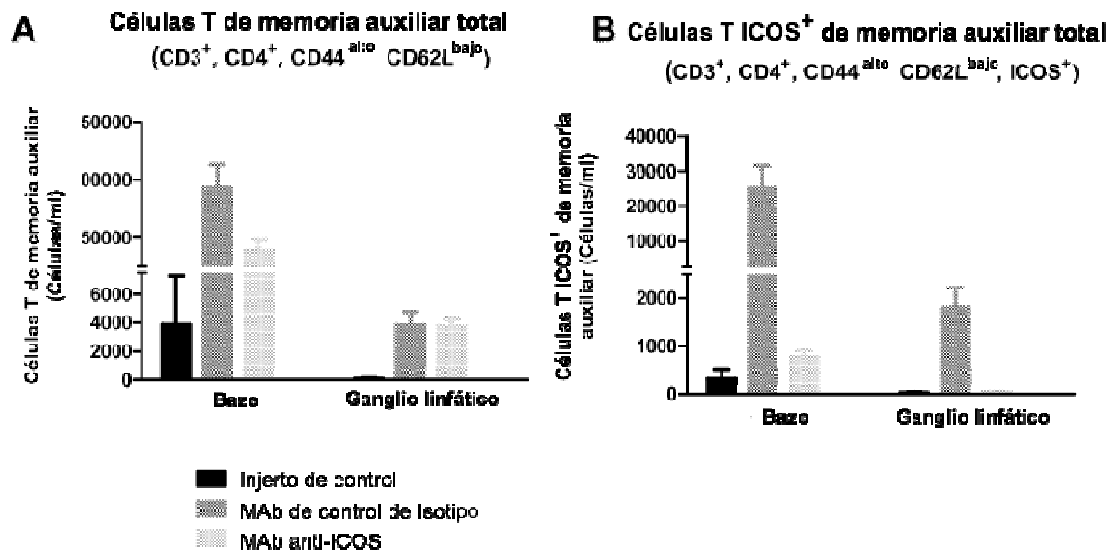


Fig. 17

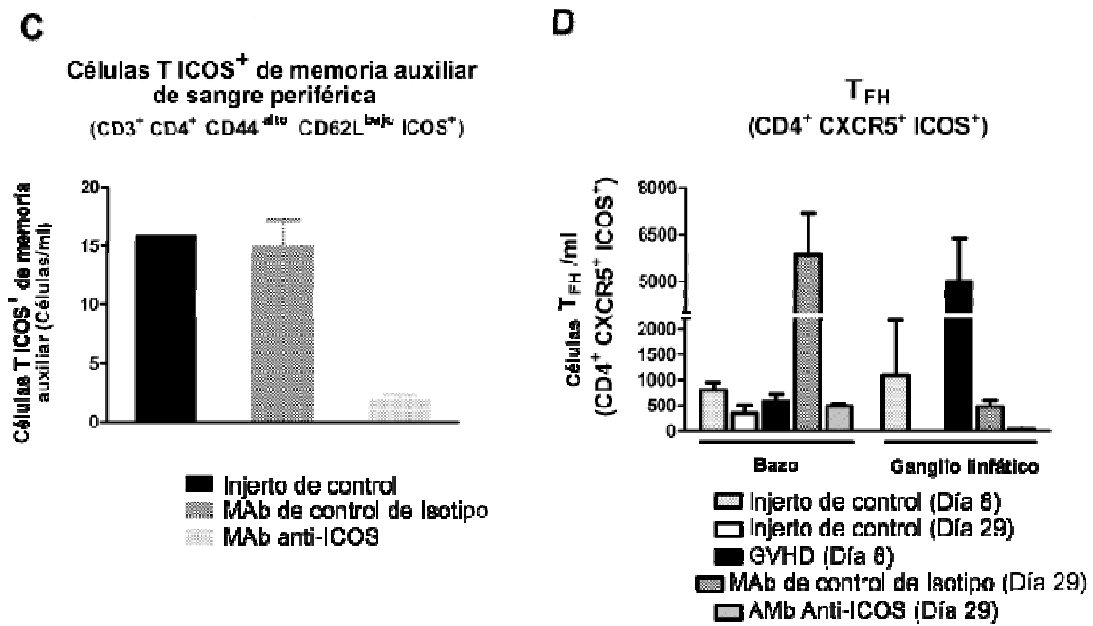


Fig. 17

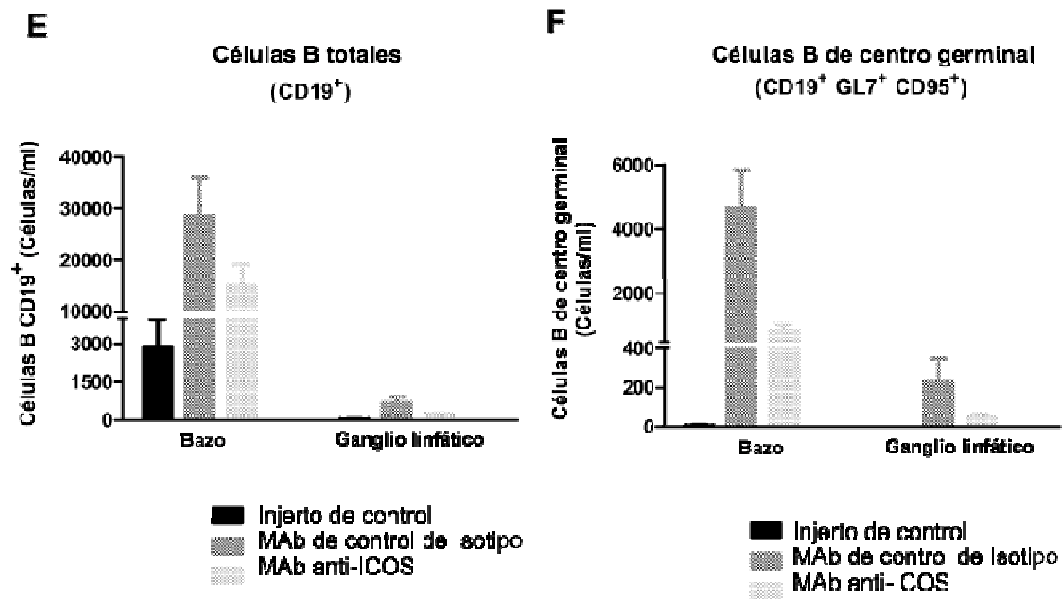


Fig. 17

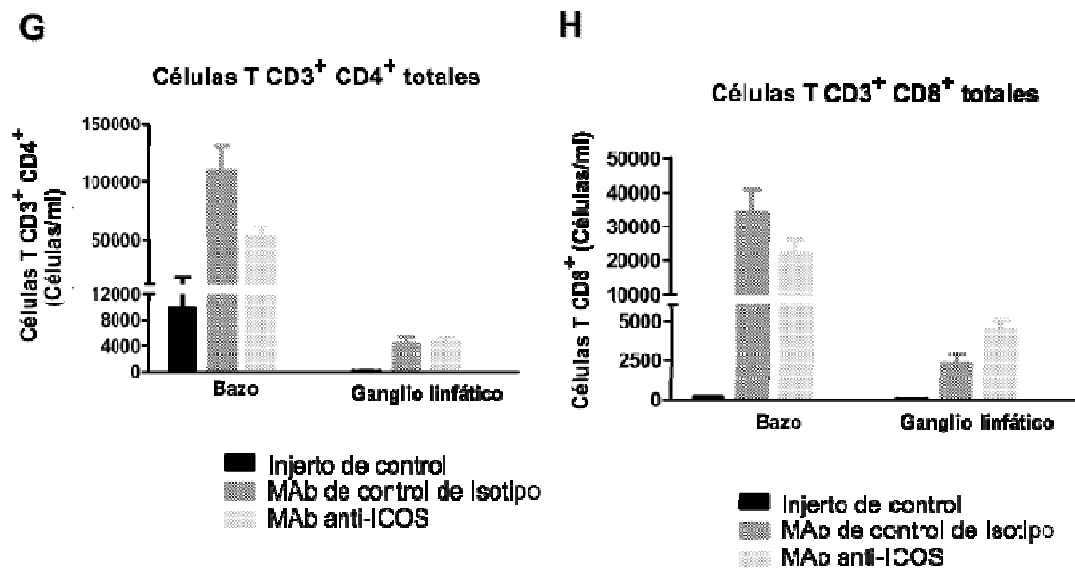


Fig. 17

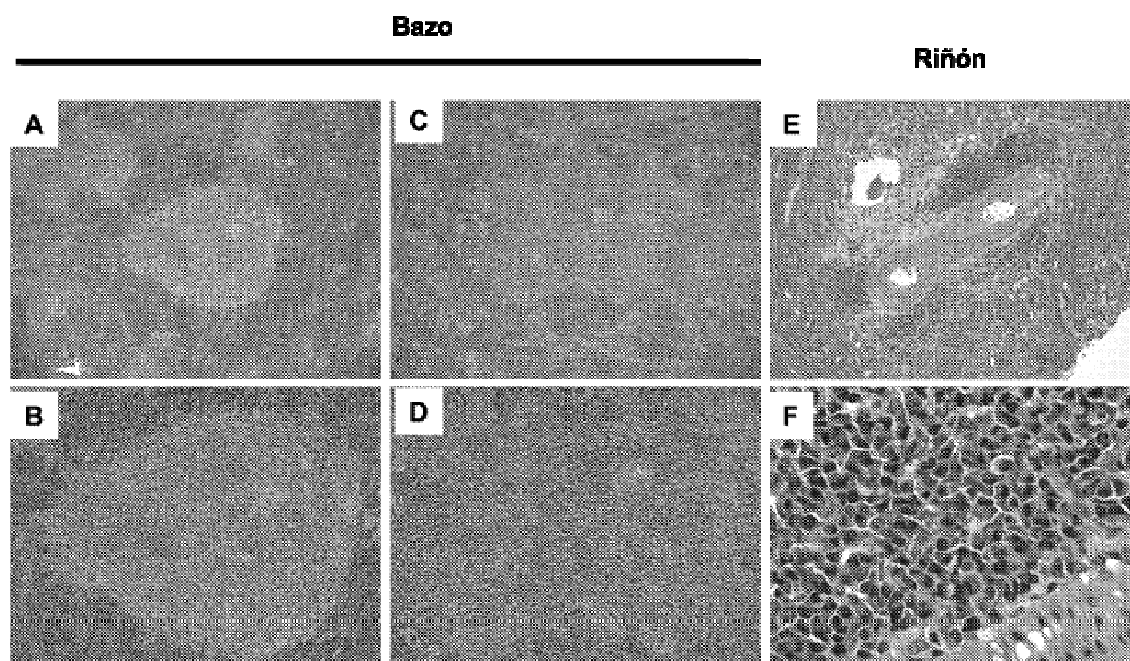


Fig. 18

Piel

Balb/c de control

**GvHD-SSc + MAb
de control de Isotipo**

**GvHD-SSc +
MAb anti-ICOS**

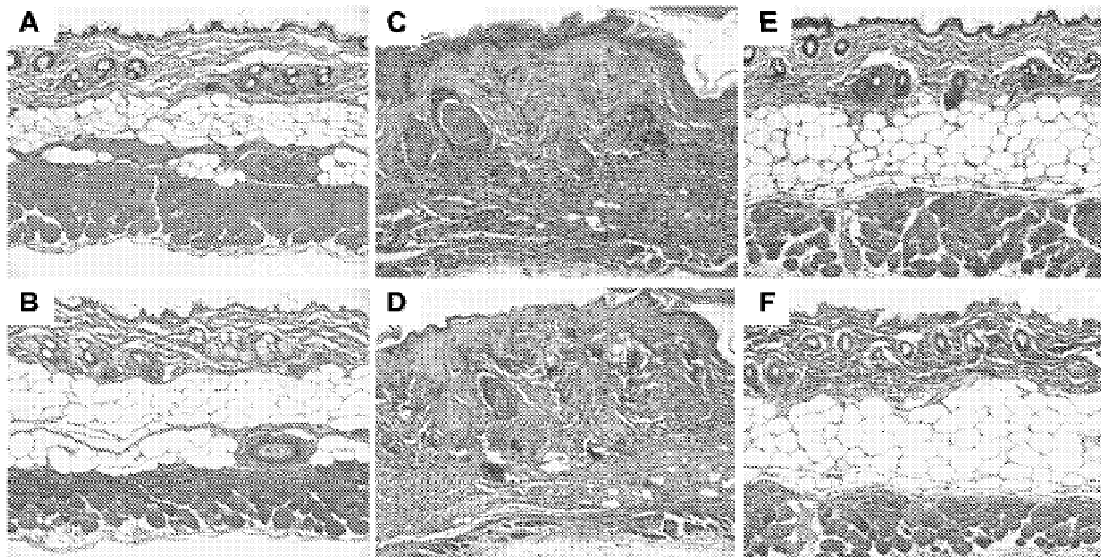


Fig. 19

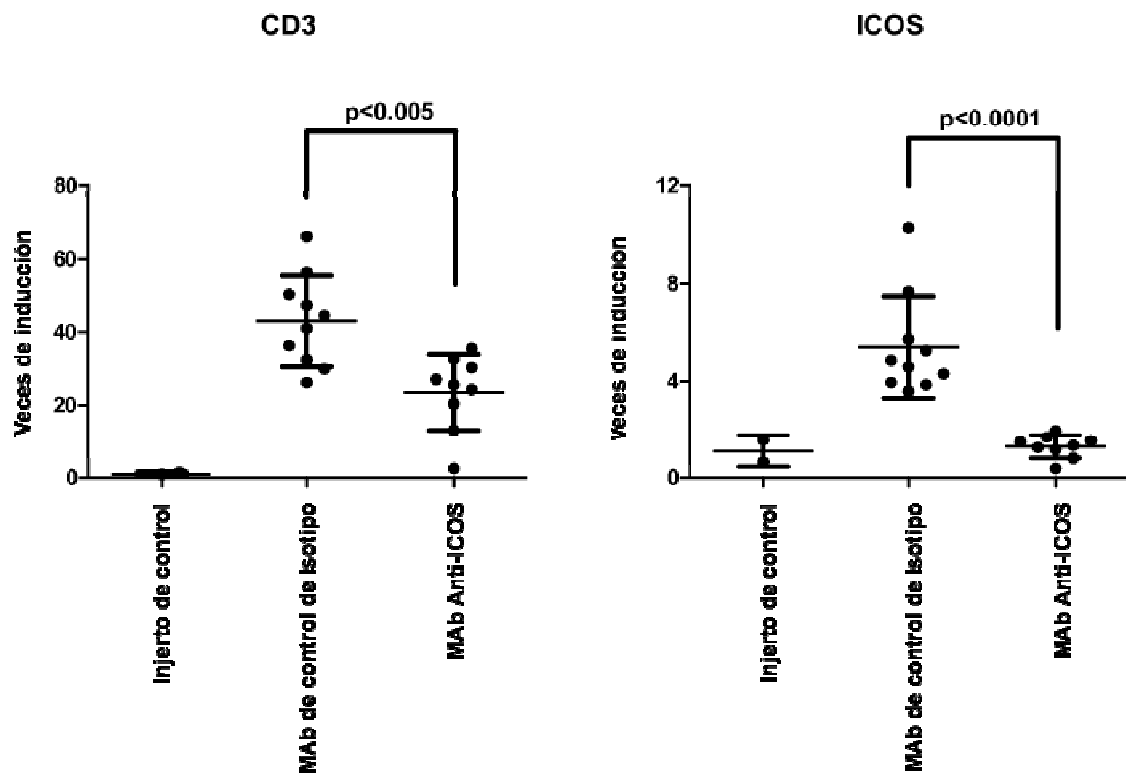
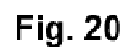


Fig. 20



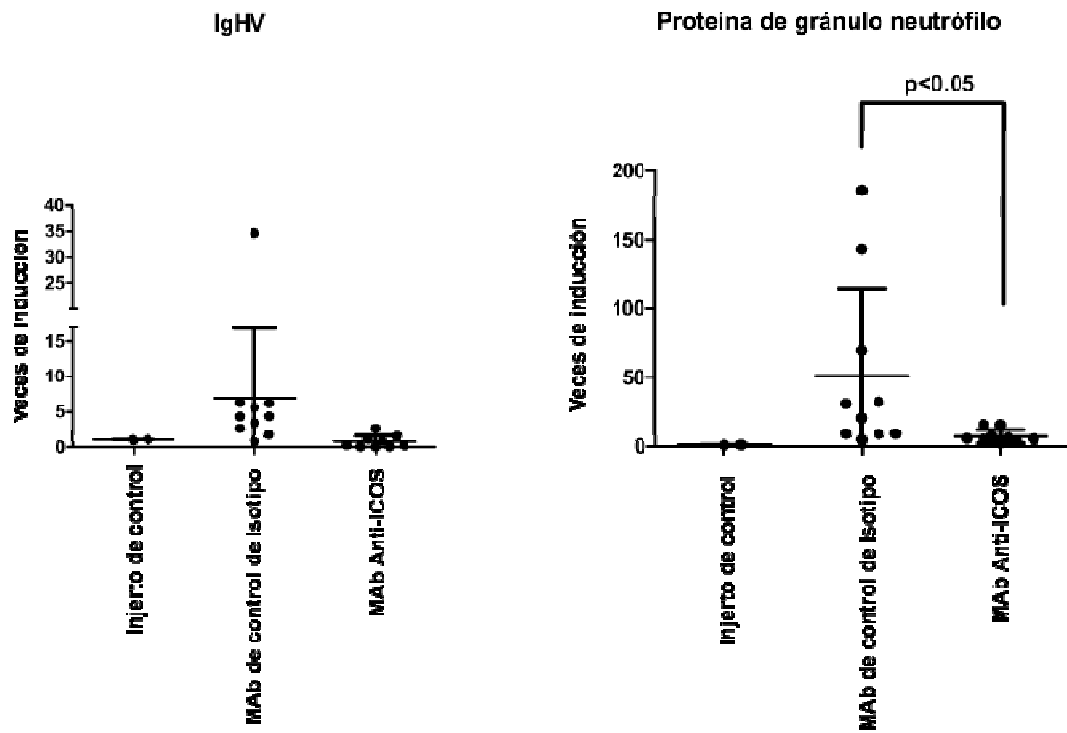


Fig. 20

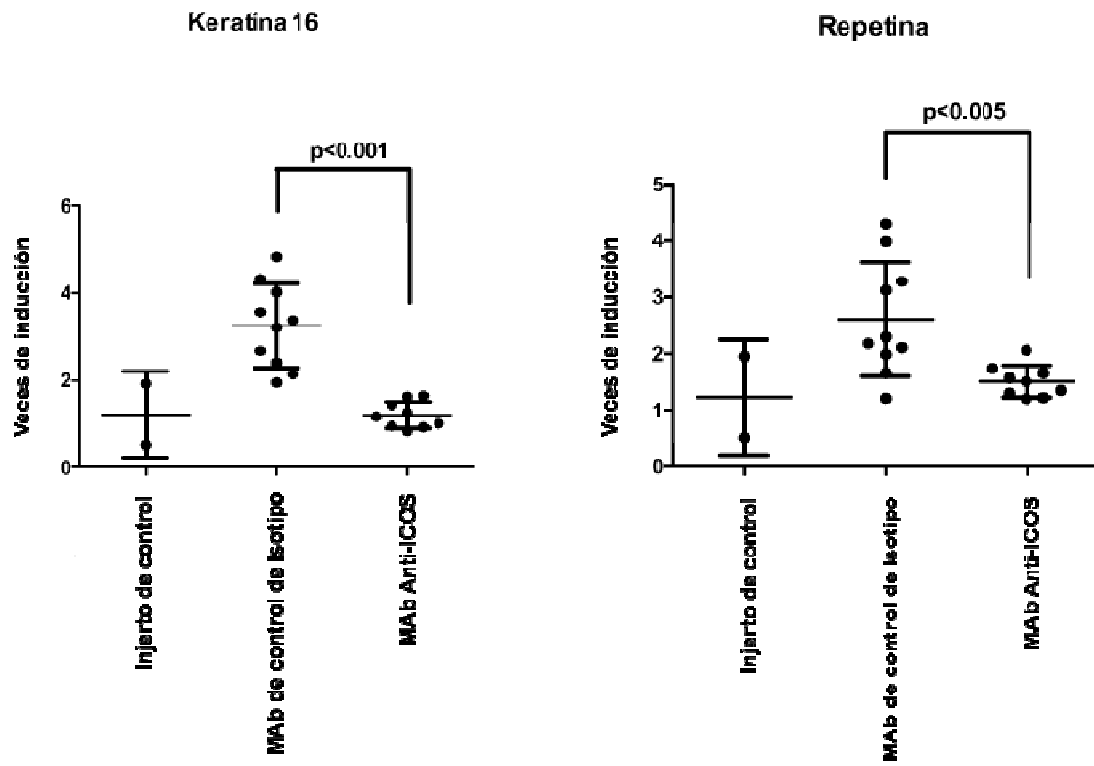
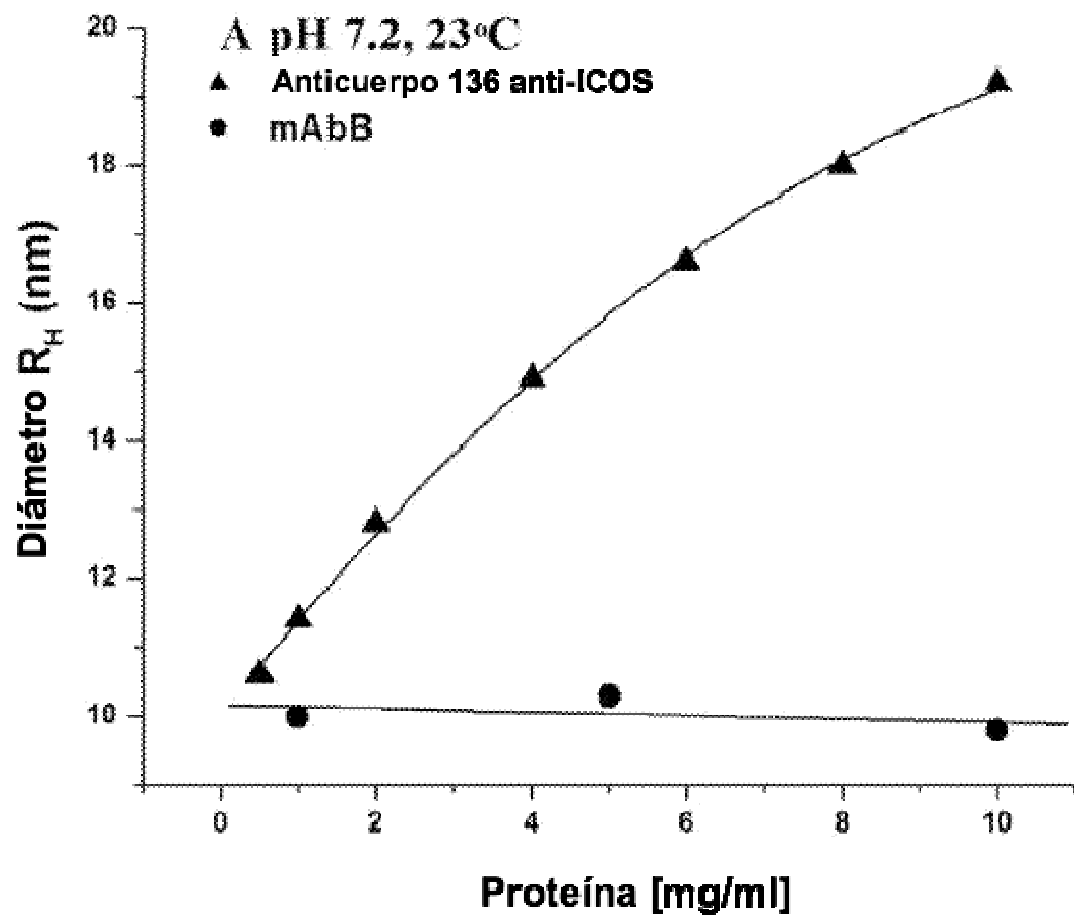
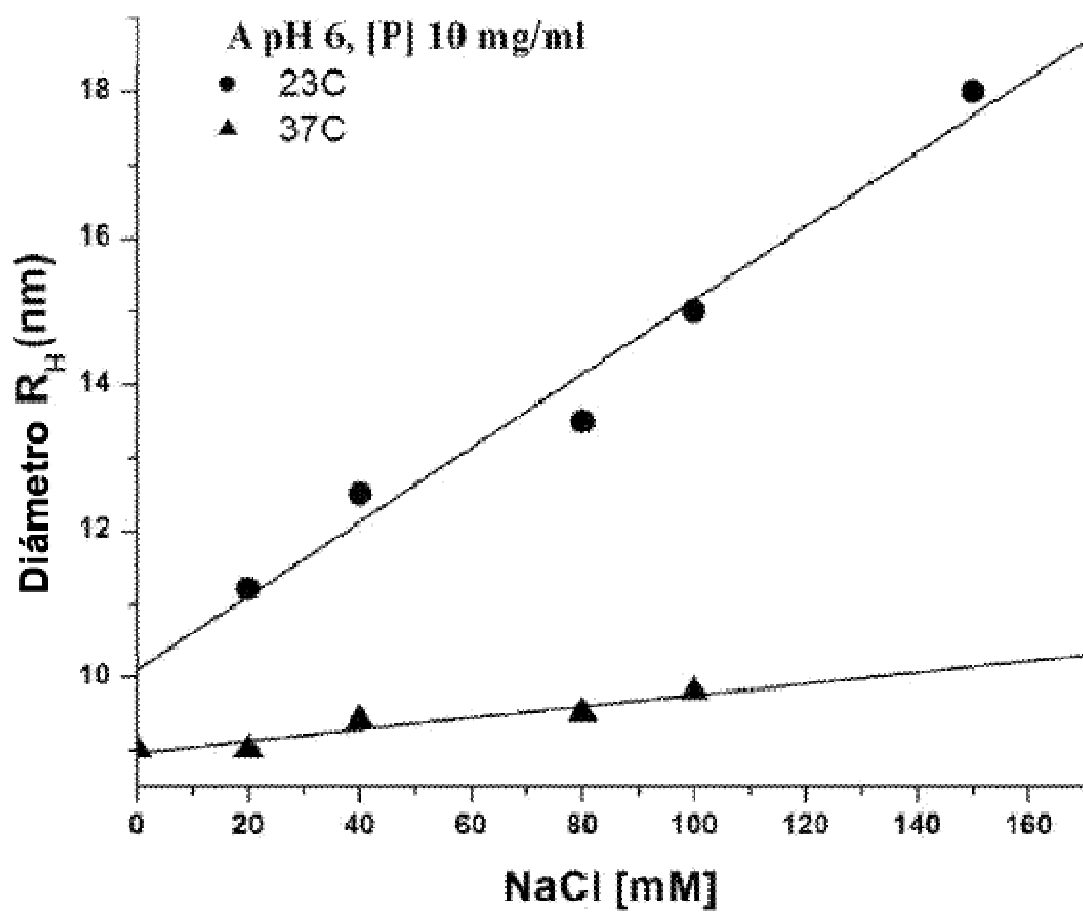


Fig. 20

**Fig. 21**

**Fig. 22**

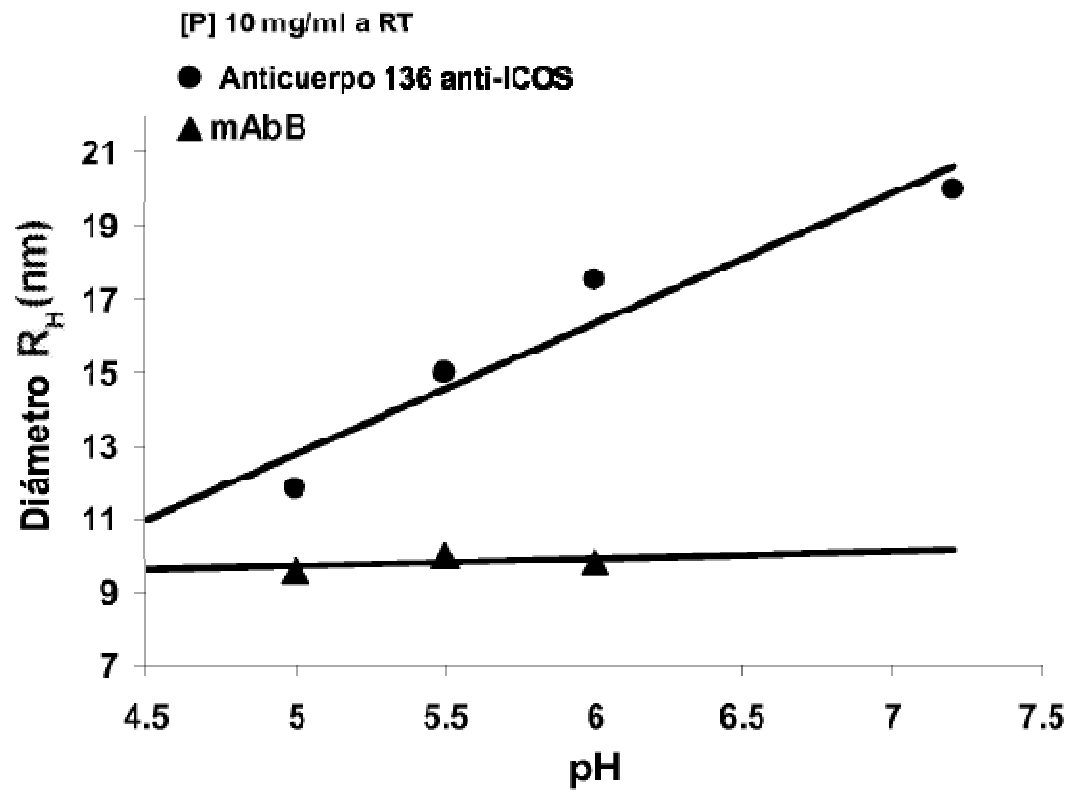
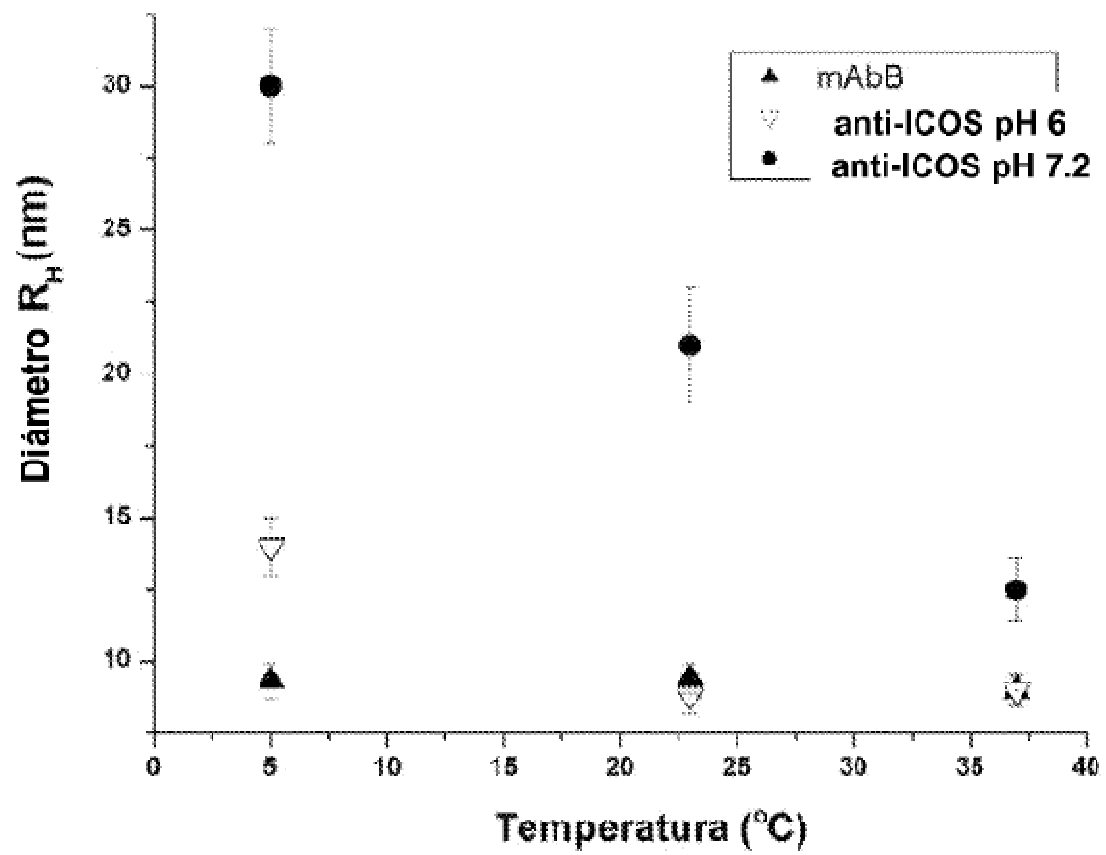


Fig. 23

**Fig. 24**

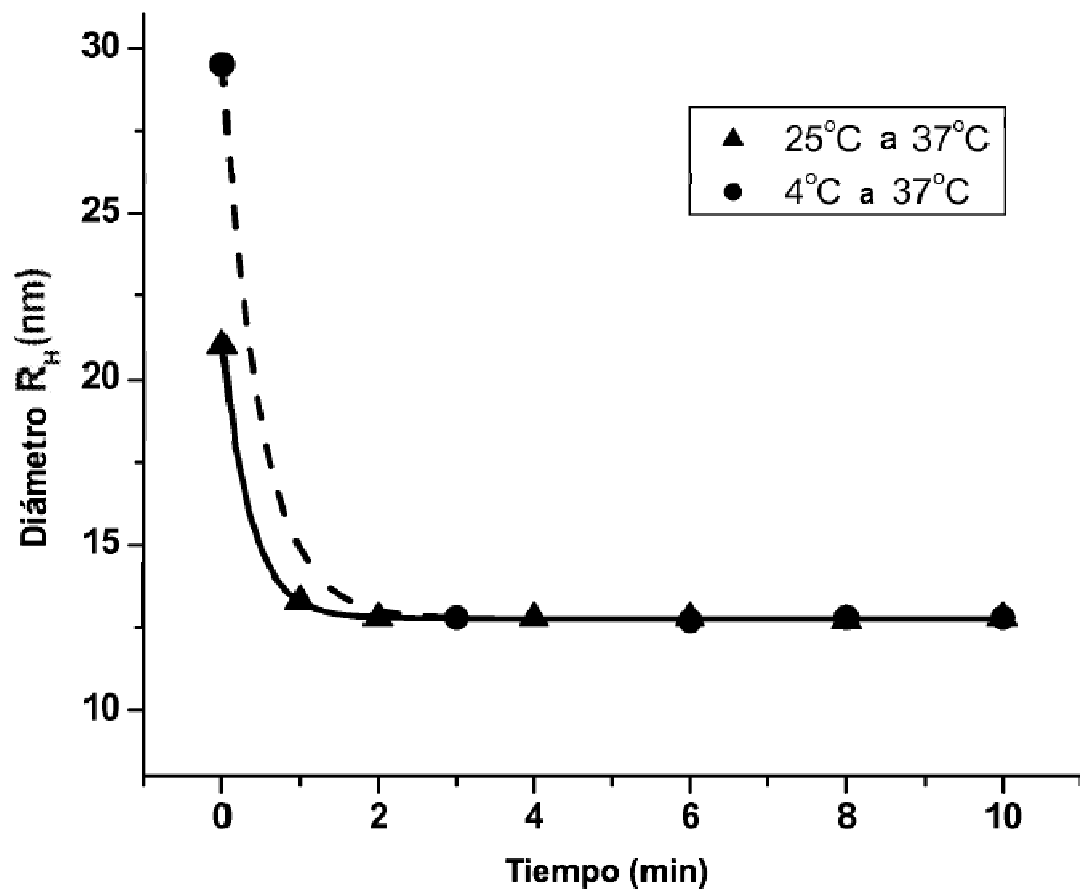


Fig. 25