



MD/EP 3273992 T2 2020.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3273992 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 39/395 (2006.01.01)

C07K 16/28 (2006.01.01)

C07K 16/46 (2006.01.01)

C12P 21/08 (2006.01.01)

A61K 39/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0112 (22) Data de depozit: 2016.03.22 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16769535.2, 2016.03.22 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3273992, 2020.05.13 (31) Numărul cererii prioritare: 201562137034 P; 201562147484 P; 201562156588 P; 201562242489 P; 201562255635 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.03.23; 2015.04.14; 2015.05.04; 2015.10.16; 2015.11.16 (33) Țara cererii prioritare: US; US; US; US; US	(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 08/2020, 2020.08.31 (80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 20/2020, 2020.05.13 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 03/2018, 2018.03.31
(71) Solicitant: Jounce Therapeutics, Inc., US (72) Inventatori: SAZINSKY Stephen, US; MICHAELSON Jennifer S., US; SATHYANARAYANAN Sriram, US; ELPEK Kutlu Goksu, US (73) Titular: Jounce Therapeutics, Inc., US (74) Mandatar autorizat: MARGINE Ion	

(54) Anticorpi pentru ICOS

(57) Rezumat:

1

În prezenta invenție sunt prezentate diferite variante referitoare la anticorpi. Unele dintre realizări includ anticorpi agoniști care leagă ICOS. Astfel de anticorpi pot fi folosiți în metode pentru a trata, de exemplu, cancerul.

2

Secvențe: 191

Revendicări: 18

Figuri: 27

MD/EP 3273992 T2 2020.08.31

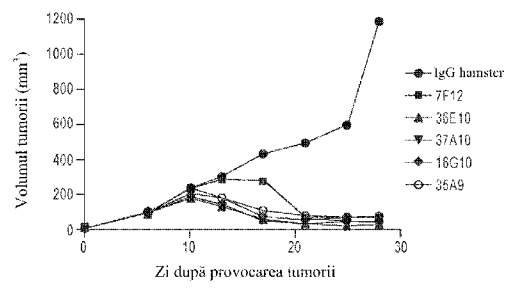


FIG. 15B

(54) Antibodies to icos

(57) Abstract:

1
Provided herein are various embodiments relating to antibodies. Some of the embodiments include agonist antibodies that bind ICOS. Such antibodies can be used in methods to treat, for example, cancer.

2
Sequences: 191
Claims: 18
Fig.: 27

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)****CERERI CONEXE**

5

Această cerere revendică beneficiul priorității Cererii provizorii de brevet US Nr. 62/137.034 depusă în 23 martie 2015; 62/147.484 depusă în 14 aprilie 2015, 62/156.588 depusă în 4 mai 2015; 62/242.489 depusă în 16 octombrie 2015; și 62/255.635 depusă în 16 noiembrie 2015.

10 **DOMENIUL INVENȚIEI**

Sunt prevăzuți anticorpi care se leagă de Costimulatorul inductibil de Celule T (ICOS), precum și utilizarea acestora în metode de tratament care cuprind administrarea anticorpilor anti-ICOS.

15

STADIUL TEHNICII

ICOS este un membru al superfamiliei imunoglobulinei B7/CD28/CTLA-4 și este exprimat în mod specific pe celulele T. Spre deosebire de CD28, care este exprimat în mod constitutiv pe celulele T și furnizează semnale costimulatoare necesare pentru activarea completă a celulelor T în repaus, ICOS este exprimat numai după activarea inițială a celulelor T.

ICOS a fost implicat în diverse aspecte ale răspunsurilor celulelor T (revizuit în Simpson et al., 2010, Curr. Opin. Immunol., 22: 326-332). Acesta joacă un rol în formarea centrelor germinale, în colaborarea celulelor T/B și în comutarea de clasă a imunoglobulinei. Șoarecii ICOS-deficienți prezintă o formare a centrului germinal scăzută și au o producție scăzută de interleukina IL-10. Aceste defecte au fost corelate în mod specific cu deficiențele de celule ajutătoare T-foliculare.

ICOS joacă și un rol în dezvoltarea și funcționarea altor subseturi de celule T, inclusiv Th1, Th2 și Th17. În special, ICOS costimulează proliferarea celulelor T și secreția de citokine asociată atât cu celulele Th1 cât și Th2. În consecință, șoarecii KO ICOS demonstrează o dezvoltare scăzută a fenotipurilor autoimune într-o varietate de modele de boală, inclusiv diabet (Th1), inflamația căilor respiratorii (Th2) și modelele neuro-inflamatorii EAE (Th17).

Pe lângă rolul său în modularea funcției celulelor T-efectoare (Teff), ICOS modulează și celulele T-reglatoare (Treg). ICOS este exprimat la niveluri ridicate pe celule Treg și a fost implicat în homeostaza și funcția Treg.

La activare, ICOS, un homodimer legat de disulfură, induce un semnal prin căile PI3K și AKT. Evenimentele de semnalizare ulterioare au ca rezultat exprimarea de factori de transcriere specifici descendenței (de ex. T-bet, GATA-3) și, în schimb, au efect asupra proliferării și supraviețuirii celulelor T.

Ligandul ICOS (ICOSL; B7-H2; B7RP1; CD275; GL50), fiind de asemenea un membru al superfamiliei B7, este singurul ligand pentru ICOS și este exprimat pe suprafața celulară a celulelor B, macrofagelor și celulelor dendritice. ICOSL funcționează ca un homodimer legat necovalent pe suprafața celulară, în interacțiunea sa cu ICOS. ICOSL uman, deși nu și în cazul ICOSL de la șoarece, s-a raportat a se lega de CD28 uman și CTLA-4 (Yao et al., 2011, Immunity, 34: 729-740).

REZUMAT

Invenția prevede un anticorp monoclonal izolat care se leagă de ICOS, unde anticorpul cuprinde (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 62; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 63; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 64; (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 65; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 66; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 67 și unde anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului greu al IgG1 umane sau o regiune constantă a lanțului greu al IgG3 umane.

Este descris un anticorp izolat care leagă ICOS, unde anticorpul este un agonist al celulelor T CD4 (precum celule T efectoare CD4 (Teff)). În unele cazuri, este descris un anticorp izolat care leagă ICOS, unde anticorpul este un agonist al celulelor T CD4 (precum celule Teff CD4) și consumă celule T reglatoare (Treg). În unele cazuri, este descris un anticorp izolat care leagă ICOS, unde anticorpul consumă celulele Treg, dar nu consumă celulele Teff. În unele cazuri,

este descris un anticorp izolat care leagă ICOS, unde anticorpul induce semnalizare pAKT pe celulele T CD4. În unele cazuri, este descris un anticorp izolat care leagă ICOS, unde anticorpul induce semnalizare pAKT pe celulele T CD4 și consumă celule Treg. În unele cazuri, este descris un anticorp izolat care se leagă de ICOS, unde anticorpul cuprinde:

- 5
 - 10
 - 15
 - 20
 - 25
 - 30
 - 35
 - 40
 - 45
 - 50
 - 55
 - 60
- i) (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 12; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 13; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 14; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 15; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 16; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 17; sau
- ii) (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 42; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 43; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 44; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 45; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 46; și (f) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 47; sau
- iii) (a) HCDR1 cuprinzand o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 22, 62, 72, 82, 92, 102 și 112; (b) HCDR2 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 23, 63, 73, 83, 93, 103 și 113; (c) HCDR3 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 24, 64, 74, 84, 94, 104 și 114; (d) LCDR1 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 25, 65, 75, 85, 95, 105 și 115; (e) LCDR2 cuprinzand o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 26, 66, 76, 86, 96, 106 și 116; și (f) LCDR3 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 27, 67, 77, 87, 97, 107 și 117; sau
- iv) (a) HCDR1 cuprinzand o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 32, 162, 172 și 182; (b) HCDR2 cuprinzand o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 33, 163, 173 și 183; (c) HCDR3 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 34, 164, 174 și 184; (d) LCDR1 cuprinzand o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 35, 165, 175 și 185; (e) LCDR2 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 36, 166, 176 și 186; și (f) LCDR3 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 37, 167, 177 și 187; sau
- v) (a) HCDR1 cuprinzand o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 52, 122, 132, 142 și 152; (b) HCDR2 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 53, 123, 133, 143 și 153; (c) HCDR3 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 54, 124, 134, 144 și 154; (d) LCDR1 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 55, 125, 135, 145 și 155; (e) LCDR2 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 56, 126, 136, 146 și 156; și (f) LCDR3 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 57, 127, 137, 147 și 157; sau
- vi) (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 22; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 23; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 24; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 25; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 26; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 27; sau
- vii) (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 32; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 33; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 34; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 35; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 36; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 37; sau
- viii) (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 52; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 53; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 54; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 55; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 56; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 57; sau
- ix) (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 72; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 73; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 74; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 75; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 76; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 77; sau
- x) (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 82; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 83; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 84; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 85; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 86; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 87; sau

- xi) (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 92; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 93; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 94; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 95; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 96; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 97; sau
- xii)(a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 102; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 103; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 104; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 105; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 106; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 107; sau
- xiii) (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 112; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 113; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 114; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 115; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 116; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 117; sau
- xiv) (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 122; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 123; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 124; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 125; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 126; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 127; sau
- xv) (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 132; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 133; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 134; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 135; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 136; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 137; sau (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 142; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 143; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 144; (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 145; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 146; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 147; sau
- xvi) (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 152; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 153; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 154; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 155; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 156; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 157; sau
- xvii) (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 162; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 163; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 164; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 165; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 166; și (f) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 167; sau
- xviii) (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 172; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 173; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 174; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 175; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 176; și (f) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 177; sau
- xix) (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 182; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 183; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 184; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 185; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 186; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 187.

În unele exemple de realizare, anticorpus cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (V_H) și o regiune variabilă a lanțului ușor (V_L), unde V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 60 și V_L este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 61. În alte cazuri descrise:

- i) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 10 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 11; sau

- ii) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 20 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 21; sau
- 5 iii) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 30 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 31; sau
- iv) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 40 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 41; sau
- 10 v) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 50 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 51; sau
- vi) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 70 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 71; sau
- 15 vii) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 80 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 81; sau
- viii) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 90 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 91; sau
- 20 ix) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 100 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 101; sau
- 25 x) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 110 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 111; sau
- xi) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 120 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 121; sau
- 30 xii) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 130 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 131; sau
- xiii) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 140 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 141; sau
- 35 xiv) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 150 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 151; sau
- 40 xv) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 160 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 161; sau
- xvi) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 170 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 171; sau
- 45 xvii) V_H este cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 180 și V_L este de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 181.
- 50 În unele exemple de realizare, anticorpii cuprind o regiune variabilă a lanțului greu (V_H) și o regiune variabilă a lanțului ușor (V_L), unde V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 60 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 61. De asemenea, sunt descriși anticorpi, unde:
- 55 i) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 10 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 11; sau
- ii) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 20 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 21; sau
- iii) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 30 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 31; sau
- 60

- iv) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 40 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 41; sau
- v) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 50 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi de SECV ID NR: 51; sau
- 5 vi) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 70 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 71; sau
- vii) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 80 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi de SECV ID NR: 81; sau
- viii) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR ID: 90 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 91; sau
- 10 ix) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 100 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi de SECV ID NR: 101; sau
- x) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 110 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi de SECV ID NR: 111; sau
- 15 xi) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 120 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi de SECV ID NR: 121; sau
- xii) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 130 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi de SECV ID NR: 131; sau
- xiii) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 140 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi de SECV ID NR: 141; sau
- 20 xiv) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 150 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi de SECV ID NR: 151; sau
- xv) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 160 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi de SECV ID NR: 161; sau
- 25 xvi) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 170 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi de SECV ID NR: 171; sau
- xvii) V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 180 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 181.

30 Anticorpul este un anticorp monoclonal. În unele exemple de realizare, anticorpul este un anticorp himeric sau un anticorp umanizat. În unele exemple de realizare, anticorpul este un fragment de anticorp selectat dintre un fragment Fab, Fab', Fv, scFv sau (Fab')₂. În unele exemple de realizare, anticorpul este un anticorp cu lungime completă.

În unele exemple de realizare, un anticorp care se leagă de ICOS este prevăzut, unde anticorpul cuprinde un lanț greu cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 188 și un lanț ușor cuprinzând secvența de aminoacizi de SECV ID NR: 189.

În unele exemple de realizare, administrarea anticorpului la un mamifer are ca rezultat o creștere a celulelor T efectoare (Teff) la mamifer. În unele exemple de realizare, administrarea anticorpului la un mamifer are ca rezultat activarea celulelor T efectoare (Teff) la mamifer. În unele exemple de realizare, administrarea anticorpului la un mamifer crește raportul dintre celulele Teff și celulele Treg. În unele exemple de realizare, celulele Teff sunt celule T CD4+ FoxP3-. În unele exemple de realizare, celulele Teff sunt celule T CD4+ FoxP3- și celule T CD8+. În unele exemple de realizare, celulele Teff sunt celule T CD8+. În unele exemple de realizare, administrarea anticorpului la un mamifer are ca rezultat o scădere a celulelor T reglatoare (Treg) la mamifer. În unele exemple de realizare, celulele Treg sunt celule T CD4+ FoxP3+.

În unele cazuri, este prevăzut un anticorp izolat care se leagă de ICOS uman, unde anticorpul se leagă de asemenea de ICOS de la șoarece și/sau ICOS de la șobolan. În unele cazuri, anticorpul izolat se leagă de ICOS uman cu o afinitate (K_D) mai mică de 5 nM. În unele cazuri, anticorpul izolat se leagă de ICOS de la șobolan cu o afinitate (K_D) mai mică de 10 nM. În unele cazuri, afinitatea este determinată prin interferometrie de biostrat (*a se vedea, de ex.*, Abdiche et al., 2008, Anal Biochem, 377: 209-217; și sistemul ForteBio Octet®). În unele cazuri, anticorpul se leagă de ICOS uman, ICOS de la șoarece și ICOS de la șobolan. În unele cazuri, anticorpul se leagă de ICOS de la macac cu coadă lungă (cynomolgus). În unele exemple de realizare, anticorpul este un anticorp himeric sau un anticorp umanizat. În unele exemple de realizare, anticorpul este un fragment de anticorp selectat dintre un fragment Fab, Fab', Fv, scFv sau (Fab')₂. În unele exemple de realizare, anticorpul este un anticorp cu lungime completă. În unele exemple de realizare, administrarea anticorpului la un mamifer are ca rezultat o creștere a celulelor T efectoare (Teff) la mamifer. În unele exemple de realizare, administrarea anticorpului la un mamifer are ca rezultat activarea celulelor T efectoare (Teff) la mamifer. În unele exemple de realizare, celulele Teff sunt celule T CD4+ FoxP3-. În unele exemple de realizare, celulele Teff sunt celule T CD4+ FoxP3- și celule T CD8+. În unele exemple de realizare, celulele Teff sunt celule T CD8+. În

unele exemple de realizare, administrarea anticorpului la un mamifer are ca rezultat o scădere a celulelor T reglatoare (Treg) la mamifer. În unele exemple de realizare, celulele Treg sunt celule T CD4+ FoxP3+. În unele exemple de realizare, mamiferul este selectat dintre un șoarece, șobolan, macac cu coadă lungă și om.

5 În unele cazuri, în urma tratamentului țesutului tumoral pulmonar cu un anticorp prevăzut în prezentul document, nivelul unui chimiokine sau citokine selectate dintre GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 și CXCL13 este de cel puțin de 2 ori sau de cel puțin de 3 ori mai mare decât nivelul chimiokinelor în urma tratamentului țesutului tumoral pulmonar cu un anticorp de control. În unele cazuri, nivelul este un nivel ARNm. În unele exemple de realizare, 10 nivelul este un nivel de proteină. În unele cazuri, un anticorp de control este un anticorp corelat pe bază de izotip, care se leagă de un antigen neasociat și care nu se preconizează a avea un efect asupra nivelurilor de chimiokine. În unele cazuri, nivelul de chimiokine este măsurat la 1 oră, 2 ore, 3 ore, 4 ore, 5 ore sau 6 ore după tratament. În unele cazuri, chimiokina este CXCL11. În unele cazuri, nivelul de chimiokine este măsurat la 6 ore, 8 ore, 10 ore, 12 ore, 14 ore, 16 ore, 18 15 ore, 20 ore, 22 ore, 24 ore, 36 ore sau 48 ore după tratament. În unele cazuri, nivelul de chimiokine este măsurat la 24 ore după tratament. În unele cazuri, țesutul tumoral pulmonar este țesut tumoral pulmonar uman.

În unele cazuri, un anticorp prevăzut în prezentul crește nivelul a cel puțin o chimiokină și/sau citokină selectate dintre GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 și CXCL13 la un mamifer cărui i s-a administrat anticorpul de cel puțin 2 ori. În unele cazuri, 20 nivelul de chimiokine este măsurat la 1 oră, 2 ore, 3 ore, 4 ore, 5 ore sau 6 ore după administrarea anticorpului. În unele cazuri, nivelul este un nivel ARNm. În unele cazuri, nivelul este un nivel de proteină. În unele cazuri, chimiokina este CXCL11. În unele cazuri, nivelul de chimiokine este măsurat la 6 ore, 8 ore, 10 ore, 12 ore, 14 ore, 16 ore, 18 ore, 20 ore, 22 ore, 24 ore, 36 ore sau 48 25 ore după administrarea anticorpului. În unele cazuri, nivelul de chimiokine este măsurat la 24 ore după administrarea anticorpului.

În unele cazuri, un anticorp agonist anti-ICOS este prevăzut, unde anticorpul crește nivelul a cel puțin o chimiokină și/sau citokină selectate dintre GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 și CXCL13 la un mamifer cărui i s-a administrat anticorpul de cel puțin 2 ori. 30 În unele cazuri, un anticorp agonist anti-ICOS este prevăzut, unde anticorpul crește nivelul a cel puțin o chimiokină și/sau citokină selectate dintre GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10 și CXCL11 la un mamifer cărui i s-a administrat anticorpul de cel puțin 2 ori. În unele cazuri, nivelul de chimiokine este măsurat la 1 oră, 2 ore, 3 ore, 4 ore, 5 ore sau 6 ore după administrarea anticorpului. În unele cazuri, nivelul este un nivel ARNm. În unele exemple de 35 realizare, nivelul este un nivel de proteină. În unele cazuri, chimiokina este CXCL11. În unele exemple de realizare, nivelul de chimiokine este măsurat la 6 ore, 8 ore, 10 ore, 12 ore, 14 ore, 16 ore, 18 ore, 20 ore, 22 ore, 24 ore, 36 ore sau 48 ore după administrarea anticorpului. În unele cazuri, nivelul de chimiokine este măsurat la 24 ore după administrarea anticorpului. În unele exemple de realizare, mamiferul este om. În unele exemple de realizare, omul suferă de cancer. În 40 unele exemple de realizare, cancerul este selectat dintre melanom, cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC), carcinom cu celule renale (RCC), cancer gastric, cancer de vezică urinară, limfom difuz cu celule B mari (DLBCL), limfom Hodgkin, cancer ovarian, cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC). În unele exemple de realizare, cancerul este selectat dintre melanom, cancer gastric, cancer de cap și gât cu celule scuamoase 45 (HNSCC), cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC).

În unele cazuri, un anticorp care se leagă de ICOS este descris, unde anticorpul crește nivelul ligandului pentru NKp46 (NKp46-L) pe celulele T. În unele cazuri, nivelul crescut de NKp46-L pe celulele T este determinat utilizând un domeniu extracelular NKp46 solubil într-o analiză de citometrie în flux. În unele cazuri, anticorpul crește nivelul NKp46-L pe celulele Treg 50 mai mult decât crește anticorpul nivelul NKp46-L pe celulele Teff. În unele cazuri, anticorpul crește pierderea CD16 pe celulele NK.

În unele exemple de realizare, este prevăzut un acid nucleic izolat care codifică un anticorp descris în prezentul document. În unele exemple de realizare, este prevăzut un vector care cuprinde acidul nucleic. În unele exemple de realizare, este prevăzută o celulă gazdă care cuprinde 55 vectorul. În unele exemple de realizare, este prevăzută o celulă gazdă care produce un anticorp descris în prezentul. În unele exemple de realizare, este prevăzută o metodă pentru realizarea unui anticorp anti-ICOS, care cuprinde cultivarea celei gazdă în condiții adecvate pentru exprimarea anticorpului și recuperarea anticorpului produs de celula gazdă.

În unele cazuri, este descrisă o compoziție farmaceutică, care cuprinde un anticorp anti- 60 ICOS descris aici și un excipient acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

În unele exemple de realizare, anticorpul anti-ICOS descris aici este destinat utilizării în metode de tratare a cancerului, care cuprind administrarea unei cantități eficiente dintr-un anticorp anti-ICOS descris aici sau o compoziție farmaceutică descrisă aici. În unele exemple de realizare, cancerul este selectat dintre melanom, cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC), carcinom cu celule renale (RCC), cancer gastric, cancer de vezică urinară, limfom difuz cu celule B mari (DLBCL), limfom Hodgkin, cancer ovarian, cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC). În unele exemple de realizare, cancerul este selectat dintre melanom, cancer gastric, cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC), cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC).

În unele cazuri, este descrisă o metodă de creștere a numărului celulelor T efectoare (Teff) la un mamifer, care cuprinde administrarea unei cantități eficiente dintr-un anticorp anti-ICOS descris aici sau o compoziție farmaceutică descrisă aici. În unele cazuri, metoda mai cuprinde activarea celulelor Teff. În unele cazuri, este descrisă o metodă de activare a celulelor T efectoare (Teff) la un mamifer, care cuprinde administrarea unei cantități eficiente dintr-un anticorp anti-ICOS descris aici sau o compoziție farmaceutică descrisă aici. În unele cazuri, se descrie o metodă de creștere a raportului celulelor Teff la celulele Treg la un mamifer, care cuprinde administrarea unei cantități eficiente dintr-un anticorp anti-ICOS descris aici sau o compoziție farmaceutică descrisă aici. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD4+ FoxP3-. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD4+ FoxP3- și celule T CD8+. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD8+. În unele cazuri, metoda cuprinde suplimentar scăderea numărului de celule T reglatoare (Treg).

În unele cazuri, este descrisă o metodă de scădere a numărului celulelor T reglatoare (Treg) la un mamifer, care cuprinde administrarea unei cantități eficiente dintr-un anticorp anti-ICOS descris aici sau o compoziție farmaceutică descrisă aici. În unele cazuri, celulele Treg sunt celule T CD4+ FoxP3+.

În unele cazuri, este descrisă o metodă de creștere a nivelului a cel puțin unei chimiokine și/sau citokine selectate dintre GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 și CXCL13 la un mamifer, cuprinzând administrarea la mamifer a unui anticorp prevăzut în prezentul. În unele cazuri, nivelul a cel puțin unei chimiokine este crescut de cel puțin 2 ori sau de cel puțin 3 ori. În unele cazuri, nivelul de chimiokine este măsurat la 1 oră, 2 ore, 3 ore, 4 ore, 5 ore sau 6 ore după administrarea anticorpului. În unele cazuri, nivelul este un nivel ARNm. În unele cazuri, nivelul este un nivel de proteină. În unele cazuri, chimiokina este CXCL11. În unele cazuri, nivelul de chimiokine este măsurat la 6 ore, 8 ore, 10 ore, 12 ore, 14 ore, 16 ore, 18 ore, 20 ore, 22 ore, 24 ore, 36 ore sau 48 ore după administrarea anticorpului. În unele cazuri, nivelul de chimiokine este măsurat la 24 ore după administrarea anticorpului. În unele exemple de realizare, mamiferul este om. În unele exemple de realizare, omul suferă de cancer. În unele exemple de realizare, cancerul este selectat dintre melanom, cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC), carcinom cu celule renale (RCC), cancer gastric, cancer de vezică urinară, limfom difuz cu celule B mari (DLBCL), limfom Hodgkin, cancer ovarian, cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC). În unele exemple de realizare, cancerul este selectat dintre melanom, cancer gastric, cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC), cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC).

În unele exemple de realizare, mamiferul este un om.

În unele exemple de realizare, mamiferului i se administrează cel puțin unui agent terapeutic suplimentar. În unele cazuri, agentul terapeutic suplimentar este administrat concomitent sau în secvență cu anticorpul anti-ICOS. În unele cazuri, agentul terapeutic suplimentar este o terapie PD-1. În unele exemple de realizare, agentul terapeutic suplimentar este selectat dintre un anticorp anti-PD-1 și un anticorp anti-PD-L1. În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS prevăzut aici este administrat cu nivolumab. În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS prevăzut aici este administrat cu pembrolizumab. În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS prevăzut aici este administrat cu atezolizumab. În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS prevăzut aici este administrat cu durvalumab.

În unele exemple de realizare, terapia suplimentară este un vaccin anticancer. În unele astfel de exemple de realizare, vaccinul anticancer este dezvoltat folosind un neoantigen. În unele exemple de realizare, vaccinul anticancer este un virus proiectat în laborator care cuprinde un antigen de cancer, cum ar fi PROSTVAC (rilimogene galvacirepvec/rilimogene glafolivec). În unele exemple de realizare, vaccinul anticancer cuprinde celule tumorale create în laborator, cum ar fi GVAX.

În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS prevăzut în prezentul este administrat împreună cu un anticorp agonist anti-OX40. În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS prevăzut în prezentul este

administrat împreună cu un anticorp anti-CTLA4. În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS prevăzut aici este administrat cu ipilimumab.

În unele cazuri, agentul terapeutic suplimentar este un agent de chimioterapie. Agenți chimioterapeutici exemplificativi nelimitativi includ capectiabină, ciclofosfamidă, dacarbazină, temozolomidă, ciclofosfamidă, docetaxel, doxorubicină, daunorubicină, cisplatină, carboplatină, epirubicină, eribulină, 5-FU, gemcitabină, irinotecan, ixabepilonă, metotrexat, mitoxantronă, oxaliplatină, paclitaxel, nab-paclitaxel, ABRAXANE® (paclitaxel legat de proteină), pemetrexed, vinorelbina și vincristină. În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS prevăzut aici este administrat cu cel puțin un inhibitor de kinază. Exemple nelimitative de inhibitori de kinază includ erlotinib, afatinib, gefitinib, crizotinib, dabrafenib, trametinib, vemurafenib și cobimetanib.

În unele cazuri, agentul terapeutic suplimentar este un inhibitor IDO. Exemple nelimitative de inhibitori IDO includ Indoximod (New Link Genetics), INCB024360 (Incyte Corp), 1-metil-D-triptofan (New Link Genetics) și GDC-0919 (Genentech). În unele cazuri, agentul terapeutic suplimentar este un medicament de modificare a imunității (IMiD). Exemple nelimitative de IMiD includ talidomida, lenalidomida și pomalidomida.

În unele cazuri, mamiferul primește terapie CAR-T pe lângă administrarea de un anticorp anti-ICOS descris aici.

În unele cazuri, mamiferul este supus unei intervenții chirurgicale și/sau radioterapie pe lângă administrarea unui anticorp anti-ICOS descris aici, cu sau fără un agent terapeutic suplimentar. În unele cazuri, mamiferul este supus radioterapiei pe lângă administrarea unui anticorp anti-ICOS descris aici, cu sau fără un agent terapeutic suplimentar.

În unele cazuri, utilizarea unui anticorp descris aici este prevăzută pentru fabricarea unui medicament pentru tratarea cancerului. În unele cazuri, cancerul este selectat dintre melanom, cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC), carcinom cu celule renale (RCC), cancer gastric, cancer de vezică urinară, limfom difuz cu celule B mari (DLBCL), limfom Hodgkin, cancer ovarian, cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC). În unele cazuri, cancerul este selectat dintre melanom, cancer gastric, cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC), cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC). În unele cazuri, medicamentul este pentru administrare cu cel puțin un agent terapeutic suplimentar. În unele exemple de realizare, agentul terapeutic suplimentar este selectat dintre un anticorp anti-PD-1 și un anticorp anti-PD-L1.

În unele cazuri, utilizarea unui anticorp descris în prezentul sau a unei compoziții farmaceutice descrise în prezentul este prevăzută pentru tratarea cancerului. În unele cazuri, cancerul este selectat dintre melanom, cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC), carcinom cu celule renale (RCC), cancer gastric, cancer de vezică urinară, limfom difuz cu celule B mari (DLBCL), limfom Hodgkin, cancer ovarian, cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC). În unele cazuri, cancerul este selectat dintre melanom, cancer gastric, cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC), cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC).

În unele cazuri, utilizarea unui anticorp descris aici sau a unei compoziții farmaceutice descrise aici și a cel puțin unui agent terapeutic suplimentar este prevăzută pentru tratarea cancerului. În unele cazuri, agentul terapeutic suplimentar este selectat dintre un anticorp anti-PD-1 și un anticorp anti-PD-L1. În unele cazuri, cancerul este selectat dintre melanom, cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC), carcinom cu celule renale (RCC), cancer gastric, cancer de vezică urinară, limfom difuz cu celule B mari (DLBCL), limfom Hodgkin, cancer ovarian, cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC). În unele cazuri, cancerul este selectat dintre melanom, cancer gastric, cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC), cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC).

În unele exemple de realizare, un anticorp descris aici sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este prevăzută pentru utilizare în tratarea cancerului. În unele exemple de realizare, cancerul este selectat dintre melanom, cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC), carcinom cu celule renale (RCC), cancer gastric, cancer de vezică urinară, limfom difuz cu celule B mari (DLBCL), limfom Hodgkin, cancer ovarian, cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC). În unele exemple de realizare, cancerul este selectat dintre melanom, cancer gastric, cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC), cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC).

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figura 1A-B. Nivelurile de ARNm ICOS la mai multe tumori umane. A) Intensitatea medie și intervalele de încredere de 75% ale nivelurilor normalizate de ARNm ICOS în diferite indicații sunt reprezentate grafic. Sunt indicate probe cu intensități în afara intervalului de încredere de 75% (punct). B) Procentajul fiecărui tip de tumoare indicat care prezintă 0, 1+, 2+ sau

5 3+ colorație ICOS prin imunohistochimie (IHC).

Figura 2. Corelarea expresiei ICOS cu infiltrarea celulelor T. Niveluri ARNm ICOS din 450 tumori HNSCC au fost comparate cu un scor semnătură a chimiokinei asociată celulelor T cu 12 gene sau cu niveluri ARNm FoxP3. Nivelurile de semnătură a chimiokinelor normalizată sau de ARNm FoxP3 pentru fiecare tumoare sunt reprezentate grafic pe axa Y, nivelurile ARNm ale ICOS sunt reprezentate grafic pe axa X. Corelația Spearman (R) de asociere este ilustrată pe

10 graficul [Corr(S)]. O corelație de $>0,75$ (Spearman R) este privită ca referință pentru o corelație puternică.

Figura 3. Exprimarea ARNm ICOS a fost comparată pentru 450 de tumori HNSCC utilizând date de secvențiere ARN TCGA (NCI). Nivelurile de CTLA-4 sau PD-1 sau PD-L1 normalizată pentru fiecare tumoare sunt reprezentate grafic pe axa Y, nivelurile ARNm ale ICOS sunt reprezentate grafic pe axa X. Corelația Spearman (R) de asociere este ilustrată pe graficul [Corr(S)]. Nivelurile de exprimare a ICOS sunt corelate semnificativ cu exprimarea moleculelor checkpoint (punct de verificare) CTLA-4, PD-1. S-a observat o corelație slabă între ICOS și PD-L1. O corelație de $>0,75$ (Spearman R) este privită ca referință pentru o corelație puternică.

20 Figura 4. Imagini reprezentative ale intensităților variabile ale colorației ICOS în tumora NSCLC umană.

Figura 5. Distribuția densității celulare ICOS de la tumorile umane. Densitatea celulară ICOS a fost determinată în fiecare dintre tumorile umane și densitatea ICOS medie din fiecare tip de tumoare este reprezentată grafic în axa Y [NSCLC (N=100); HNSCC (N=102); cancer de sân, toate subtipurile majore (N=94); subtipul triplu negativ de cancer de sân, TNBC (N=95); cancer ovarian (N=94)]. Analiza statistică a fost efectuată folosind ANOVA.

25 Figura 6. Diversitatea densității celulare ICOS în probele NSCLC. A) Densitatea exprimării ICOS a fost evaluată într-un panou de probe tumorale pulmonare (N=98) și tumorile au fost clasificate pe baza densității ICOS+ a celulelor pozitive / mm². B) Diversitatea exprimării ICOS într-o a doua cohortă independentă de probe clinice NSCLC (N=204).

Figura 7. Distribuția densității celulare ICOS în diferite subseturi de celule T față de cancerul uman. A) Imagine reprezentativă care ilustrează colorația ICOS în compartimente distincte ale celulelor T. Săgețile indică celulele Treg ICOS+ FOXP3+ sau celule efectoare ICOS+ CD8- CD4. B) Densitatea celulară ICOS din tumorile individuale a fost analizată în celulele Treg CD4 FoxP3 pozitiv sau celule T CD8 pozitiv sau celule Teff CD4 CD8 negativ și FoxP3 negativ. Densitatea ICOS medie și abaterea standard de la fiecare dintre aceste tipuri de tumori sunt reprezentate grafic. [Cancer pulmonar (N=100); HNSCC (N=102); Subtipul triplu negativ de cancer de sân, TNBC (N=95); Cancer ovarian (N=94)].

Figura 8A-B. Exprimarea ICOS ridicată este observată la tumorile NSCLC cu PD-L1 ridicat. Utilizând IHC PD-L1/ICOS/PD-1 multiplex, IHC a evaluat nivelurile ICOS și PD-L1 într-un set de adenocarcinom NSCLC (n=150). A) Imagini reprezentative ale unei tumori cu PD-L1 ridicat (panoul stâng) sau cu PD-L1 scăzut (panou din dreapta) colorată cu ICOS, PD-1 și PD-L1. B) Cuantificarea densității celulare ICOS în carcinomul cu celule scuamoase (panoul din stânga) și adenocarcinom (panoul din dreapta) cu PD-L1 ridicat ($>5\%$ din celule sunt PD-L1 pozitive) sau cu PD-L1 scăzut ($<5\%$ din celule sunt PD-L1 pozitive).

Figura 9A-C. Analiza TIL a tumorii umane arată exprimarea ICOS în celulele Treg și efectoare CD4. A) Grafice de contur reprezentative ale exprimării PD-1 și ICOS în diferite subseturi de celule T de la pacienții cu HNSCC (N=4). B) Este indicată frecvența celulelor pozitive doar cu ICOS sau celulelor dublu-pozitive ICOS PD-1 dublu pozitive din compartimentul celulelor T (HNSCC N=4; NSCLC N=3; Ovarian N=4). C) Compararea nivelurilor ICOS în celulele Treg CD4 și Teff CD4. Intensitatea colorației ICOS măsurată prin intensitatea medie a fluorescenței (MFI; sau media geometrică ICOS) în subseturile de celule T CD4 de la probe tumorale de la pacienți este reprezentată grafic.

Figura 10A-C. A) Este ilustrat efectul anticorpilor anti-ICOS asupra proliferării celulelor T CD4+ umane primare în format legat de placă în prezența anti-CD3 suboptim. Este reprezentat grafic procentul de celule divizate. B) Efectul anticorpilor anti-ICOS asupra proliferării celulelor T CD4+ umane în format solubil în prezența PMA suboptim este ilustrat. Este reprezentat grafic procentul de celule divizate. C) Efectul anticorpului anti-ICOS 37A10S713-hIgG1 asupra proliferării celulelor T CD4+ umane primare în format legat de placă în prezența anti-CD3 suboptim.

60

Figura 11A-B. Evaluarea anticorpilor anti-ICOS într-o analiză de raportare NF-Kb este indicată. Graficele arată procentul de celule GFP+.

Figura 12. Este ilustrată evaluarea anticorpilor anti-ICOS solubili într-o analiză PBMC cu stimulare super-antigen (SEB). Datele citite reprezintă producția IFN γ .

5 Figura 13. Anticorpul anti-ICOS a fost evaluat pentru superagonism potențial în cadrul unei analize de proliferare a celulelor T umane în absența anti-CD3. Datele citite din această analiză reprezintă proliferarea procentuală.

Figura 14A-B. Evaluarea unui anticorp anti-ICOS într-o analiză fosfo-AKT (pAKT) în prezența sau absența unui cross-linker secundar. Datele citite reprezintă procentul de celule T CD4 care sunt pozitive pentru sistemul pAKT. A) Rezultatele în absența unui cross-linker secundar. B) Rezultatele în prezența unui cross-linker secundar.

Figura 15A-B. Anticorpul anti-ICOS a fost evaluat în modelul tumoral sinogen de fibrosarcom Sa1/N. Creșterea tumorală este reprezentată grafic pe axa y. A) Liniile punctate indică creșterea tumorii la șoarecii individuali; linia continuă indică curba de creștere medie pentru grup. Este indicat numărul de șoareci fără tumori per grup. B) Volumul tumoral mediu în fiecare grup de tratament.

Figura 16. Șoarecii fără tumori care au fost tratați anterior cu anti-ICOS 7F12 au fost provocați din nou cu tumori Sa1/N. Creșterea tumorală este reprezentată grafic pe axa y.

Figura 17. Efectul anticorpului anti-ICOS de la hamster 37A10 cu mG1 și mG2a Fc asupra creșterii tumorale Sa1/N. Liniile punctate indică o creștere tumorală individuală la șoarecii individuali; linia continuă indică curba de creștere tumorală medie pentru grup. Este indicat numărul de șoareci fără tumori per grup.

Figura 18. Evaluarea anticorpilor anti-ICOS ca agenți unici sau în combinație cu anti-PD1 în modelul tumoral singenic CT26. Liniile punctate indică șoarecii individuali; linia continuă indică curba de creștere medie pentru grup. Este indicat numărul de șoareci fără tumori per grup.

Figura 19. Epuizarea Treg Foxp3+ în tumorile Sa1/N la tratamentul anti-ICOS. Este prezentată frecvența celulelor Teff și Treg CD8, CD4 în splină și tumoare, precum și numărul de Treg per mg de tumoare. Fiecare formă indică un șoarece individual.

Figura 20. Epuizarea Treg și activarea celulelor Teff în tumorile Sa1/N la tratamentul anti-ICOS. Randul superior: Frecvența celulelor Teff și Treg CD8, CD4, raportul dintre CD8 și Treg și frecvența celulelor T PD-1+ CD8 în tumori. Randul inferior: Frecvența divizării celulelor Teff Ki-67+ CD8 și CD4 și celulelor Teff Tbet+ CD4 în rândul celulelor CD3+ în tumori. Fiecare formă indică un șoarece individual.

Figura 21. Evaluarea unui anticorp anti-ICOS în modelul tumoral Sa1/N ca urmare a epuizării celulelor T. Creșterea tumorală în timp este reprezentată grafic. Este indicat numărul de șoareci fără tumori.

Figura 22A-B. A) Reducerea celulelor Treg într-o analiză PBMC în urma tratamentului cu un anticorp anti-ICOS umanizat. B) Celulele Treg și Teff exprimă niveluri similare ale ICOS după cinci zile de tratament IL-2.

Figura 23. Reprovocare tumorală după tratamentul cu anticorpi anti-ICOS. Panoul din stanga indică volumul tumoral la șoareci după administrarea uneia sau a două doze de anticorpi anti-ICOS. Panoul din dreapta indică volumul tumoral la șoareci de control sau șoareci care nu au prezentat tumori în urma administrării unui anticorp anti-ICOS, în urma reprovocării tumorale.

Figura 24A-B. Creșterea exprimării ICOS la șoareci purtători de tumori Sa1/N (A) și la macaci cu coadă lungă (B) cărora li s-a administrat anticorpului anti-ICOS.

Figura 25. Modificarea exprimării chimiokinelor și citokinelor Th-1 după tratamentul țesutului tumoral pulmonar cu anticorp anti-ICOS (panourile din dreapta) sau cu anticorp anti-PD-1 (panourile din stanga), la 6 ore (panourile de sus) sau la 24 ore (panourile de jos).

Figura 26. Nivelurile ligandului NKp46 pe celulele Teff (A, C, E) și celulele Treg (B, D, F) de la trei donatori diferiți, după tratamentul cu anticorpi anti-ICOS agoniști și antagoniști.

Figura 27. Pierderea CD16 (CD16 shedding) din celulele NK tratate cu anticorp anti-ICOS agonist.

DESCRIEREA DETALIATĂ A UNOR EXEMPLE DE REALIZARE

55

Sunt prevăzuți anticorpi care leagă ICOS. Sunt prevăzute, de asemenea, lanțuri grele și lanțuri ușoare de anticorp care sunt capabile să formeze anticorpi care leagă ICOS. În plus, sunt prevăzuți anticorpi, lanțuri grele și lanțuri ușoare care cuprind una sau mai multe regiuni particulare de determinare a complementarității (CDR). Sunt prevăzute polinucleotide care codifică anticorpi pentru ICOS. Sunt prevăzute, de asemenea, polinucleotide care codifică lanțuri grele sau lanțuri ușoare de anticorpi. Sunt prevăzute metode de producere și/sau de purificare a

60

anticorpilor pentru ICOS. Sunt prevăzute metode de tratament folosind anticorpi pentru ICOS. Aceste metode includ, fără limitare, metode de tratare a cancerului. Sunt prevăzute metode de detectare a ICOS. Aceste metode includ metode de identificare a unei persoane care poate beneficia de tratament cu un anticorp anti-ICOS, de monitorizare a tratamentului unei persoane cu un anticorp anti-ICOS și de îmbunătățire a eficacității terapeutice a unui anticorp anti-ICOS la o persoană.

Titlurile de secțiune utilizate aici sunt exclusiv în scop organizațional și nu trebuie interpretate ca limitând subiectul descris.

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

I. Definiții

Cu excepția cazului în care sunt altfel definiți, termenii științifici și tehnici utilizați în legătură cu prezenta dezvăluire vor avea înțelesurile înțelese în mod obișnuit de persoanele de specialitate în domeniu. În plus, cu excepția cazului în care se impune de context sau se indică în mod expres, termenii la singular vor include și pluralul și termenii la plural vor include și singularul. Pentru orice conflict în definițiile dintre diverse surse sau referințe, definiția prevăzută în prezentul document va prevala.

Se înțelege că exemplele de realizare a invenției descrise aici includ sensul de „a consta în” și/sau de „a consta în mod esențial în” exemple de realizare. Așa cum este utilizat aici, forma singulară a articolelor nehotărât și hotărât include referințe la plural, cu excepția cazului în care se indică altfel. Utilizarea termenului „sau” în prezentul nu este destinată să implice excluderea reciprocă a alternativelor.

În această cerere, utilizarea lui „sau” înseamnă „și/sau”, cu excepția cazului în care se specifică sau se înțelege în mod expres de o persoană de specialitate în domeniu. În contextul unei revendicări dependente multiple, utilizarea lui „sau” se referă la mai mult de o revendicare independentă sau dependentă anterioară.

Așa cum este înțeles de o persoană de specialitate în domeniu, referirea la „aproximativ” o valoare sau parametru aici include (și descrie) exemple de realizare care sunt îndreptate către acea valoare sau parametru în sine. De exemplu, descrierea referitoare la „aproximativ X” include descrierea lui „X”.

Termenii „moleculă de acid nucleic”, „acid nucleic” și „polinucleotidă” pot fi utilizați interschimbabil și se referă la un polimer de nucleotide. Astfel de polimeri de nucleotide pot conține nucleotide naturale și/sau nenaturale și includ, dar nu sunt limitate la ADN, ARN și APN. „Secvență de acid nucleic” se referă la secvența liniară de nucleotide care cuprinde molecula de acid nucleic sau polinucleotida.

Termenii „polipeptidă” și „proteină” sunt utilizați interschimbabil pentru a se referi la un polimer al reziduurilor de aminoacizi și nu sunt limitate la o lungime minimă. Acești polimeri ai

reziduurilor de aminoacizi pot conține reziduuri de aminoacizi naturale sau nenaturale și includ, dar nu se limitează la, peptide, oligopeptide, dimeri, trimeri și multimeri ai reziduurilor de aminoacizi. Atât proteinele cu lungime completă cât și fragmentele acestora sunt cuprinse în definiție. Termenii includ, de asemenea, modificări post-exprimare ale polipeptidei, de exemplu, glicozilare, sialilare, acetilare, fosforilare și alte asemenea. Mai mult, în scopurile prezentei invenții, o „polipeptidă” se referă la o proteină care include modificări, cum ar fi deleții, adăugiri și substituții (în general, de natură conservatoare), la secvența nativă, cât timp proteina menține activitatea dorită. Aceste modificări pot fi deliberate, ca prin mutageneză situs-direcționată, sau pot fi accidentale, cum ar fi prin mutații ale gazdelor care produc proteinele sau erorile datorate amplificării PCR.

„ICOS” și „costimulator inductibil de celule T”, așa cum este utilizat aici, se referă la orice ICOS nativ care rezultă din exprimarea și prelucrarea ICOS într-o celulă. Termenul include ICOS de la orice sursă vertebrată, inclusiv mamifere, cum ar fi primatetele (de ex., oameni și macaci cu coada lungă) și rozătoare (de ex. șoareci și șobolani), cu excepția cazului în care se indică altfel. Termenul include, de asemenea, variante în stare naturală ale ICOS, de exemplu variante de matisare sau variante alelice. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de proteină precursoră ICOS umană, cu secvență de semnal (cu secvență de semnal, aminoacizii 1-20) este ilustrată în SECV ID NR: 1. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de ICOS matur uman este ilustrată în SECV ID NR: 2. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de proteină precursoră ICOS de la șoarece, cu secvență de semnal (cu secvență de semnal, aminoacizii 1-20) este ilustrată în SECV ID NR: 3. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de ICOS matur de la șoarece este ilustrată în SECV ID NR: 4. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de proteină precursoră ICOS de la șobolan, cu secvență de semnal (cu secvență de semnal, aminoacizii 1-20) este ilustrată în SECV ID NR: 190. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de ICOS matur de la șobolan este ilustrată în SECV ID NR: 191. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de proteină precursoră ICOS de la macac cu coadă lungă, cu secvență de semnal (cu secvență de semnal, aminoacizii 1-20) este ilustrată în SECV ID NR: 5. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de ICOS matur de la macac cu coadă lungă este ilustrată în SECV ID NR: 6.

Termenul „se leagă în mod specific” la un antigen sau epitop este un termen bine înțeles în stadiul tehnicii, iar metodele de determinare a unei astfel de legări specifice sunt de asemenea bine cunoscute în stadiul tehnicii. Se spune că o moleculă prezintă „legare specifică” sau „legare preferențială” dacă reacționează sau se asociază mai frecvent, mai rapid, cu o durată mai mare și/sau cu o afinitate mai mare cu o anumită celulă sau substanță decât cu celule sau substanțe alternative. Un anticorp „se leagă în mod specific” sau „se leagă preferențial” de o țintă dacă se leagă cu o afinitate, aviditate mai mare, mai repede și/sau cu o durată mai mare decât se leagă de alte substanțe. De exemplu, un anticorp care se leagă în mod specific sau preferențial de un epitop ICOS este un anticorp care leagă acest epitop cu afinitate, aviditate mai mare, mai repede și/sau cu o durată mai mare decât se leagă de alți epitopi ICOS sau epitopi non-ICOS. Este de asemenea înțeles prin citirea acestei definiții că, de exemplu, un anticorp (sau fracțiune sau epitop) care se leagă în mod specific sau preferențial de o primă țintă poate sau nu să se lege în mod specific sau preferențial de o a doua țintă. Ca atare, „legarea specifică” sau „legarea preferențială” nu necesită neapărat (deși poate include) legarea exclusivă. În general, dar nu neapărat, referința la legare înseamnă legare preferențială. „Specificitate” se referă la capacitatea unei proteine de legare de a lega selectiv un antigen.

Așa cum este utilizat aici, „substanțial pur” se referă la material ce este cel puțin 50% pur (adică, fără contaminanți), mai preferabil, cel puțin 90% pur, mai preferabil, cel puțin 95% pur, și mai preferabil cel puțin 98% pur, și cel mai mult preferat, cel puțin 99% pur.

Așa cum este utilizat aici, termenul „epitop” se referă la un situs pe o moleculă țintă (de exemplu, un antigen, cum ar fi o proteină, acid nucleic, carbohidrat sau lipidă) de care se leagă o moleculă de legare a antigenului (de exemplu, un anticorp, fragment de anticorp sau proteină-schelă care conține regiuni de legare a anticorpului). Epitopii includ adesea o grupare de suprafață activă chimic de molecule, cum ar fi aminoacizi, polipeptide sau lanțuri laterale de zaharuri și au caracteristici structurale tridimensionale specifice, precum și caracteristici specifice de încărcare. Epitopii pot fi formați atât din reziduuri contigue și/sau necontigue juxtapuse (de exemplu, aminoacizi, nucleotide, zaharuri, fracțiune lipidică) ale moleculei țintă. Epitopii formați din reziduuri contigue (de exemplu aminoacizi, nucleotide, zaharuri, fracțiune lipidică) sunt de obicei păstrați la expunerea la solvenți denaturați, în timp ce epitopii formați prin pliere terțiară sunt pierduți în mod obișnuit la tratamentul cu solvenți denaturați. Un epitop poate include, dar nu este limitat la, cel puțin 3, cel puțin 5 sau 8-10 reziduuri (de exemplu, aminoacizi sau nucleotide). În unele exemple un epitop este mai mic de 20 de reziduuri (de exemplu, aminoacizi sau nucleotide) în lungime, mai mic de 15 reziduuri sau mai mic de 12 reziduuri. Doi anticorpi pot lega același

epitop în interiorul unui antigen dacă prezintă o legare competitivă pentru antigen. În unele exemple de realizare, un epitop poate fi identificat de o anumită distanță minimă față de un reziduu CDR pe molecula de legare a antigenului. În unele exemple de realizare, un epitop poate fi identificat de distanța de mai sus și este limitat suplimentar la acele reziduuri implicate într-o legătură (de exemplu, o legătură de hidrogen) între un reziduu de anticorp și un reziduu de antigen. Un epitop poate fi identificat și prin diverse scanări, de exemplu, o scanare cu alanină sau cu arginină poate indica una sau mai multe reziduuri cu care molecula de legare a antigenului poate interacționa. Cu excepția cazului în care este specificat explicit, un set de reziduuri ca epitop nu exclude alte reziduuri din a face parte din epitopul pentru un anumit anticorp. În schimb, prezența unui astfel de set desemnează o serie minimă (sau un set de specii) de epitopi. Astfel, în unele exemple de realizare, un set de reziduuri identificate ca un epitop desemnează un epitop minim de relevanță pentru antigen, nu o listă exclusivă de reziduuri pentru un epitop pe un antigen.

Un „epitop neliniar” sau „epitop conformațional” cuprinde polipeptide necontigue, aminoacizi și/sau zaharuri din proteina antigenică, la care un anticorp specific se leagă de epitop. În unele exemple de realizare, cel puțin unul dintre reziduuri va fi necontiguu cu celelalte reziduuri observate ale epitopului; totuși, unul sau mai multe reziduuri pot fi, de asemenea, contigue cu celelalte reziduuri.

Un „epitop liniar” cuprinde polipeptide, aminoacizi și/sau zaharuri contigue din proteina antigenică, la care un anticorp specific se leagă de epitop. Se observă că, în unele exemple de realizare, nu fiecare dintre reziduurile din epitopul liniar trebuie să fie direct legat (sau implicat într-o legătură) cu anticorpul. În unele exemple de realizare, epitopii liniari pot fi din imunizări cu o peptidă care a constat efectiv din secvența epitopului liniar sau din secțiunile structurale ale unei proteine care sunt relativ izolate de restul proteinei (astfel încât anticorpul să poată interacționa, cel puțin în primul rând) doar cu acea secțiune de secvență.

Termenul „anticorp” din prezentul este utilizat în cel mai larg sens și înglobează diverse structuri de anticorpi, incluzând, dar fără a se limita la anticorpi monoclonali, anticorpi policlonali, anticorpi multispecifici (de exemplu, anticorpi bispecifici (precum anticorpi de angrenare celule T specifice) și anticorpi trispecifici) și fragmente de anticorpi atât timp cât aceștia prezintă activitatea dorită de legare cu antigenul.

Termenul anticorp include, dar nu se limitează la fragmente care sunt capabile să se lege un antigen, cum ar fi Fv, Fv cu un singur lanț (scFv), Fab, Fab', di-scFv, sdAb (anticorp cu un singur domeniu) și (Fab')₂ (inclusiv un F(ab')₂ legat chimic). Digestia papainei a anticorpilor produce două fragmente identice de legare a antigenului, denumite fragmente „Fab”, fiecare cu un singur situs de legare a antigenului și un fragment „Fc” rezidual, al cărui nume reflectă capacitatea sa de a se cristaliza rapid. Tratamentul cu pepsină produce un fragment F(ab')₂ care are două situsuri de combinare a antigenului și este capabil în continuare să lege încrucișat antigenul. Termenul anticorp include, de asemenea, fără limitare la, anticorpi himerici, anticorpi umanizați și anticorpi de la diferite specii, cum ar fi șoarece, om, macac cu coadă lungă *etc.* Mai mult, pentru toate structurile de anticorpi prevăzute aici, sunt considerate și variante având secvențe de la alte organisme. Astfel, dacă este dezvăluită o versiune umană a unui anticorp, o persoană de specialitate în domeniu va aprecia cum să transforme anticorpul pe bază de secvență umană într-o secvență de șoarece, șobolan, pisică, câine, cal *etc.* Fragmentele de anticorpi includ, de asemenea, orice orientare a scFv cu un singur lanț, di-scFv în tandem, diacorpi, tri-sdcFv în tandem, minicorpi *etc.* Fragmentele de anticorpi includ, de asemenea, nanocorpi (sdAb, un anticorp având un singur domeniu monomeric, precum o pereche de domenii variabile ale lanțurilor grele, fără un lanț ușor). Un fragment de anticorp poate fi denumit ca fiind o specie specifică în unele exemple de realizare (de exemplu, scFv uman sau un scFv de șoarece). Acesta desemnează secvențele a cel puțin unei părți din regiunile non-CDR, și nu sursa constructului.

Termenul „anticorp monoclonal” se referă la un anticorp al unei populații în mod substanțial omogene de anticorpi, adică anticorpii individuali care cuprind populația sunt identici, cu excepția mutațiilor ce pot apărea în mod natural care pot fi prezente în cantități mai mici. Anticorpii monoclonali sunt extrem de specifici, fiind direcționați împotriva unui singur situs antigenic. Mai mult, în contrast cu preparatele de anticorpi policlonali, care includ de obicei anticorpi diferiți direcționați împotriva determinantilor diferiți (epitopi), fiecare anticorp monoclonal este direcționat împotriva unui singur determinant de pe antigen. Astfel, o probă de anticorp monoclonal se poate lega de același epitop pe antigen. Adjectivul „monoclonal” indică trăsătura anticorpului de a fi obținut de la o populație în mod substanțial omogenă de anticorpi și nu trebuie interpretat ca necesitând producția de anticorpi prin orice metodă particulară. De exemplu, anticorpii monoclonali pot fi produși prin metoda de hibridom descrisă mai întâi de Kohler și Milstein, 1975, Nature 256:495 sau pot fi produși prin metode de ADN recombinant, cum ar fi cele descrise în Brevetul US nr. 4.816.567. Anticorpii monoclonali pot fi, de asemenea,

izolați din biblioteci fage generate folosind tehnicile descrise în McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554, de exemplu.

Termenul „CDR” denotă o regiune care determină complementaritatea, așa cum este definită prin cel puțin o manieră de identificare pentru o persoană de specialitate în domeniu. În unele exemple de realizare, CDR pot fi definite în conformitate cu oricare dintre schemele de numerotare Chothia, schema de numerotare Kabat, o combinație între Kabat și Chothia, definiția AbM, definiția de contact și/sau o combinație de definiții ale Kabat, Chothia AbM și/sau de contact. Exemple de CDR (CDR-L1, CDRL2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3) apar la reziduurile de aminoacizi 24-34 ale L1, 50-56 ale L2, 89-97 ale L3, 31-35B ale H1, 50-65 ale H2 și 95-102 ale H3. (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Definiția AbM poate include, de exemplu, CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3) la reziduurile de aminoacizi 24-34 ale L1, 50-56 ale L2, 89-97 ale L3, H26-H35B ale H1, 50-58 ale H2 și 95-102 ale H3. Definiția de contact poate include, de exemplu, CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3) la reziduurile de aminoacizi 30-36 ale L1, 46-55 ale L2, 89-96 ale L3, 30-35 ale H1, 47-58 ale H2 și 93-101 ale H3. Definiția Chothia poate include, de exemplu, CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3) la reziduurile de aminoacizi 24-34 ale L1, 50-56 ale L2, 89-97 ale L3, 26-32...34 ale H1, 52-56 ale H2 și 95-102 ale H3. De asemenea, pot fi prevăzute CDR așa cum se arată în oricare una sau mai multe din figurile însoțitoare. Cu excepția CDR1 în V_H, în general, CDR cuprind reziduurile de aminoacizi care formează buclele hipervariabile. Diferitele CDR dintr-un anticorp pot fi denumite prin numărul și tipul de lanț corespunzător, incluzând, dar fără limitare: a) CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3; b) CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 și CDRH3; c) LCDR-1, LCDR-2, LCDR-3, HCDR-1, HCDR-2 și HCDR-3; sau d) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 și HCDR3; etc. Termenul „CDR” este utilizat aici pentru a cuprinde și HVR sau o „regiune hipervariabilă”, inclusiv bucle hipervariabile. Exemple de bucle hipervariabile au loc la reziduurile de aminoacizi 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) și 96-101 (H3). (Chothia și Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987).)

Termenul „regiune variabilă a lanțului greu” așa cum este utilizat aici se referă la o regiune care cuprinde cel puțin trei CDR ale lanțului greu. În unele exemple de realizare, regiunea variabilă a lanțului greu include cele trei CDR și cel puțin FR2 și FR3. În unele exemple de realizare, regiunea variabilă a lanțului greu include cel puțin lanțul greu HCDR1, cadrul (FR) 2, HCDR2, FR3 și HCDR3. În unele exemple de realizare, o regiune variabilă a lanțului greu cuprinde de asemenea cel puțin o porțiune a unui FR1 și/sau cel puțin o porțiune a unui FR4.

Termenul „regiune constantă a lanțului greu” așa cum este utilizat aici, se referă la o regiune care cuprinde cel puțin trei domenii constante ale lanțului greu, C_{H1}, C_{H2} și C_{H3}. Desigur, delețiile și modificările fără alterarea funcțiilor în cadrul domeniilor sunt cuprinse în domeniul de aplicare a termenului „regiune constantă a lanțului greu”, cu excepția cazului în care se specifică altfel. Exemple nelimitative de regiuni constante ale lanțului greu includ γ , δ și α . Exemple nelimitative de regiuni constante ale lanțului greu includ, de asemenea, ϵ și m . Fiecare regiune constantă a lanțului greu corespunde unui izotip de anticorpi. De exemplu, un anticorp care cuprinde o regiune constantă γ este un anticorp IgG, un anticorp care cuprinde o regiune constantă δ este un anticorp IgD și un anticorp care cuprinde o regiune constantă α este un anticorp IgA. În plus, un anticorp care cuprinde o regiune constantă m este un anticorp IgM și un anticorp care cuprinde o regiune constantă ϵ este un anticorp IgE. Anumite izotipuri pot fi subdivizate suplimentar în subclase. De exemplu, anticorpii IgG includ, dar nu se limitează la, anticorpi IgG1 (cuprinzând o regiune constantă $\gamma 1$), IgG2 (cuprinzând o regiune constantă $\gamma 2$), IgG3 (cuprinzând o regiune constantă $\gamma 3$) și IgG4 (cuprinzând o regiune constantă $\gamma 4$); anticorpii IgA includ, dar nu se limitează la, anticorpi IgA1 (cuprinzând o regiune constantă $\gamma 1$) și IgA2 (cuprinzând o regiune constantă $\alpha 2$); și anticorpii IgM includ, dar nu se limitează la, IgM1 și IgM2.

Termenul „lanț greu” așa cum este utilizat aici se referă la o polipeptidă care cuprinde cel puțin o regiune variabilă a lanțului greu, cu sau fără o secvență lider. În unele exemple de realizare, un lanț greu cuprinde cel puțin o porțiune a unei regiuni constante a lanțului greu. Termenul „lanț greu cu lungime completă” așa cum este utilizat aici se referă la o polipeptidă care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu și o regiune constantă a lanțului greu, cu sau fără o secvență lider.

Termenul „regiune variabilă a lanțului ușor” așa cum este utilizat aici se referă la o regiune care cuprinde cel puțin trei CDR ale lanțului ușor. În unele exemple de realizare, regiunea variabilă a lanțului ușor include cele trei CDR și cel puțin FR2 și FR3. În unele exemple de realizare, regiunea variabilă a lanțului ușor include cel puțin lanțul ușor LCDR1, cadrul (FR) 2, LCDR2, FR3 și LCDR3. De exemplu, o regiune variabilă a lanțului ușor poate cuprinde un lanț

ușor CDR1, cadrul (FR) 2, CDR2, FR3 și CDR3. În unele exemple de realizare, o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinde de asemenea cel puțin o porțiune a unui FR1 și/sau cel puțin o porțiune a unui FR4.

Termenul „regiune constantă a lanțului ușor” așa cum este utilizat aici se referă la o regiune care cuprinde un domeniu constant al lanțului ușor, C_L . Exemple nelimitative de regiuni constante ale lanțului ușor includ λ și κ . Desigur, delețiile și modificările fără alterarea funcțiilor în cadrul domeniilor sunt cuprinse în domeniul de aplicare a termenului „regiune constantă a lanțului ușor”, cu excepția cazului în care se specifică altfel.

Termenul „lanț ușor” așa cum este utilizat aici se referă la o polipeptidă care cuprinde cel puțin o regiune variabilă a lanțului ușor, cu sau fără o secvență lider. În unele exemple de realizare, un lanț ușor cuprinde cel puțin o porțiune a unei regiuni constante a lanțului ușor. Termenul „lanț ușor cu lungime completă” așa cum este utilizat aici se referă la o polipeptidă care cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor și o regiune constantă a lanțului ușor, cu sau fără o secvență lider.

Un „cadru uman acceptor” în scopurile prezentului document este un cadru care cuprinde secvența de aminoacizi a unui cadru al domeniului variabil al lanțului ușor (V_L) a unui cadru al domeniului variabil al lanțului greu (V_H) derivat dintr-un cadru de imunoglobulină umană sau un cadru de consens uman, conform definiției de mai jos. Un cadru uman acceptor derivat dintr-un cadru de imunoglobulină umană sau un cadru de consens uman poate cuprinde aceeași secvență de aminoacizi a acestuia sau poate conține modificări ale secvenței de aminoacizi. În unele exemple de realizare, numărul de modificări ale aminoacizilor este de 10 sau mai mic, 9 sau mai mic, 8 sau mai mic, 7 sau mai mic, 6 sau mai mic, 5 sau mai mic, 4 sau mai mic, 3 sau mai mic sau 2 sau mai mic. În unele exemple de realizare, cadrul uman acceptor V_L este identic ca secvență cu secvența cadrului imunoglobulinei umane V_L sau cu secvența cadrului de consens uman.

„Afinitate” se referă la puterea însumată totală a interacțiunilor necovalente între un singur situs de legare a moleculei (de exemplu, un anticorp) și partenerul său de legare (de exemplu, un antigen). Afinitatea unei molecule X pentru partenerul său Y poate fi reprezentată în general de constanta de disociere (K_D). Afinitatea poate fi măsurată prin metode comune cunoscute în stadiul tehnicii (de exemplu, ELISA K_D , KinExA, interferometrie de biostrat (BLI) și/sau dispozitive de rezonanță plasmonică de suprafață (cum ar fi un dispozitiv BIAcore®), inclusiv cele descrise în prezentul document).

Termenul „ K_D ”, așa cum este utilizat aici, se referă la constanta de disociere de echilibru a unei interacțiuni anticorp-antigen.

În unele exemple de realizare, „ K_D ”, „ K_d ”, „ Kd ” sau „valoarea K_d ” a anticorpului este măsurată utilizând analize de rezonanță plasmonică de suprafață folosind un BIAcore®-2000 sau un BIAcore®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) la 25 °C cu cipuri CM5 imobilizate de antigen la $\square 10$ unități de răspuns (RU). Pe scurt, cipurile biosenzori din dextran carboximetilat (CM5, BIAcore, Inc.) sunt activate cu hidrociorură de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă (EDC) și N-hidroxisuccinimidă (NHS) conform instrucțiunilor furnizorului. Antigenul este diluat cu 10 mM de acetat de sodiu, pH 4,8, până la 5 mg/ml ($\square 0,2$ mM) înainte de injectare, la un debit de 5 ml/minut, pentru a obține aproximativ 10 unități de răspuns (RU) de proteină cuplată. După injectarea antigenului, 1 M etanolamină este injectată pentru a bloca grupările nereacționate. Pentru măsurători cinetice, diluțiile serice de polipeptidă, de exemplu, anticorp cu lungime completă, sunt injectate în PBS cu 0,05% tensioactiv TWEEN-20™ (PBST) la 25 °C la un debit de aproximativ 25 mL/min. Ratele de asociere (k_{activ}) și ratele de disociere (k_{inactiv}) se calculează utilizând un model simplu de legare Langmuir unu-la-unu (software de evaluare BIAcore® versiunea 3.2) prin potrivirea simultană a senzogramelor de asociere și disociere. Constanta de disociere de echilibru (K_d) este calculată ca raportul $k_{\text{oprit}}/k_{\text{pomit}}$. A se vedea, de exemplu, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Dacă rata de activitate (on-rate) depășește $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ la analiza de rezonanță plasmonică de suprafață, atunci rata de activitate poate fi determinată utilizând o tehnică de stingere fluorescentă care măsoară creșterea sau scăderea intensității emisiei fluorescente (excitație=295 nm; emisie=340 nm; 16 nm trecere bandă) la 25 °C a 20 nM anticorp anti-antigen în PBS, pH 7,2, în prezența concentrațiilor în creștere de antigen, așa cum este măsurat într-un spectrometru, precum un spectrofometru echipat cu opritor de flux (Aviv Instruments) or a 8000-series SLM-AMINCO™ (ThermoSpectronic) cu o cuvă amestecată.

În unele exemple de realizare, diferența dintre cele două valori menționate (de exemplu, valorile K_d) este în mod substanțial aceeași, de exemplu, mai mică de aproximativ 50%, mai mică de aproximativ 40%, mai mică de aproximativ 30%, mai mică de aproximativ 20% și/sau mai mică de aproximativ 10% în funcție de valoarea de referință/comparativă.

În unele exemple de realizare, diferența dintre cele două valori menționate (de exemplu, valorile K_d) este în mod substanțial diferită, de exemplu, mai mare de aproximativ 10%, mai mare

de aproximativ 20%, mai mare de aproximativ 30%, mai mare de aproximativ 40% și/sau mai mare de aproximativ 50% în funcție de valoarea pentru molecula de referință/comparativă.

„Rezonanța plasmonică de suprafață” denotă un fenomen optic care permite analiza interacțiunilor biospecifice în timp real prin detectarea modificărilor concentrațiilor de proteine în cadrul unei matrice biosenzor, de exemplu, utilizând sistemul BIAcore™ (BIAcore International AB, o companie GE Healthcare, Uppsala, Suedia și Piscataway, N.J.). Pentru descrieri suplimentare, consultați Jonsson et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26.

„Interferometria de biostrat” se referă la o tehnică analitică optică care analizează modelul de interferență a luminii reflectate dintr-un strat de proteină imobilizată pe un vârf de biosenzor și un strat interior de referință. Schimbări ale numărului de molecule legate de vârful biosenzorului cauzează modificări ale modelului de interferență care poate fi măsurat în timp real. Un exemplu nelimitativ de dispozitiv pentru interferometria de biostrat este sistemul ForteBio Octet® RED96 (Pall Corporation). *A se vedea, de exemplu*, Abdiche et al., 2008, *Anal. Biochem.* 377: 209-277.

Termenul „ k_{activ} ”, așa cum este utilizat aici, se referă la constanta ratei de asociere a unui anticorp la un antigen. Mai specific, constantele de rată (k_{activ} și k_{inactiv}) și constantele de disociere de echilibru sunt măsurate folosind IgG (bivalent) cu antigen ICOS monovalent. „ K_{activ} ”, „ k_{activ} ”, „constanta ratei de asociere”, sau „ k_a ” se utilizează interschimbabil în acest document. Valoarea indică rata de legare a unei proteine de legare la antigenul său țintă sau rata de formare a unui complex între un anticorp și antigen, ilustrată prin ecuația:

$$\text{Anticorp}(\text{„Ab”}) + \text{Antigen}(\text{„Ag”}) \rightleftharpoons \text{Ab-Ag}.$$

Termenul „ k_{inactiv} ”, așa cum este utilizat aici, se referă la constanta ratei de disociere a unui anticorp din complexul anticorp/antigen. k_{inactiv} este, de asemenea, denotat cu „ K_{inactiv} ” sau „constanta ratei de disociere”.

Această valoare indică rata de disociere a unui anticorp de la antigenul său țintă sau separarea complexului Ab-Ag în timp în anticorp și antigen liberi, conform ecuației:

$$\text{Ab} + \text{Ag} \rightleftharpoons \text{Ab-Ag}.$$

Termenul „activitate biologică” se referă la oricare una sau mai multe proprietăți biologice ale unei molecule (fie prezente în mod natural, așa cum se găsesc *in vivo*, sau furnizate sau activate prin mijloace recombinante). Proprietățile biologice includ, dar nu se limitează la, legarea unui receptor, inducerea proliferării celulelor, inhibarea creșterii celulare, inducerea altor citokine, inducerea apoptozei și activitate enzimatică. În unele exemple de realizare, activitatea biologică a unei proteine ICOS include, de exemplu, costimularea proliferării celulelor T și secreția citokinelor asociată cu celulele Th1 și Th2; modularea celulelor Treg; efecte asupra diferențierii celulelor T, inclusiv modularea exprimării genice a factorului de transcripție; inducerea semnalării prin căile IP3K și AKT, și medierea ADCC.

Un anticorp „maturat de afinitate” se referă la un anticorp cu una sau mai multe modificări ale unui sau mai multor CDR, comparativ cu un anticorp părinte care nu posedă astfel de modificări, astfel de modificări având ca rezultat o îmbunătățire a afinității anticorpului pentru antigen.

Un „anticorp himeric” așa cum este utilizat aici se referă la un anticorp în care o porțiune a lanțului greu și/sau ușor este derivată dintr-o sursă sau specie particulară, în timp ce cel puțin o parte din restul lanțului greu și/sau ușor este derivată dintr-o sursă sau specie diferită. În unele exemple de realizare, un anticorp himeric se referă la un anticorp care cuprinde cel puțin o regiune variabilă dintr-o primă specie (cum ar fi șoarece, șobolan, macac cu coadă lungă *etc.*) și cel puțin o regiune constantă de la o a doua specie (cum ar fi om, maca cu coadă lungă *etc.*). În unele exemple de realizare, un anticorp himeric cuprinde cel puțin o regiune variabilă de la șoarece și cel puțin o regiune constantă umană. În unele exemple de realizare, un anticorp himeric cuprinde cel puțin o regiune variabilă de la macac cu coadă lungă și cel puțin o regiune constantă umană. În unele exemple de realizare, toate regiunile variabile ale unui anticorp himeric provin de la o primă specie și toate regiunile constante ale anticorpului himeric provin de la o a doua specie. Constructul himeric poate fi de asemenea un fragment funcțional, așa cum este menționat mai sus.

Un „anticorp umanizat” așa cum este utilizat aici se referă la un anticorp în care cel puțin un aminoacid într-o regiune cadru a unei regiuni variabile non-umane a fost înlocuit cu aminoacidul corespunzător dintr-o regiune variabilă umană. În unele exemple de realizare, un anticorp umanizat cuprinde cel puțin o regiune constantă umană sau fragment al acesteia. În unele exemple de realizare, un anticorp umanizat este un fragment de anticorp, cum ar fi Fab, un scFv,

un (Fab')₂ *etc.* Termenul umanizat denotă, de asemenea, forme de anticorpi non-umani (de exemplu, murini) care sunt imunoglobuline himerice, lanțuri imunoglobulinice sau fragmente ale acestora (cum ar fi Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ sau alte subsecvențe de legare la antigen ale anticorpilor) care conțin secvența minimă a imunoglobulinei non-umane. Anticorpii umanizați pot include

5 imunoglobulinele umane (anticorp beneficiar) în care reziduurile de la o regiune de determinare complementară (CDR) a beneficiarului sunt înlocuite de reziduuri de la un CDR de la o specie non-umană (anticorp donator), precum șoarece, șobolan sau iepure având specificitatea, afinitatea și capacitatea dorite. În unele cazuri, reziduurile din regiunea cadru Fv (FR) ale imunoglobulinei umane sunt înlocuite de reziduurile non-umane corespunzătoare. În plus, anticorpul umanizat

10 poate cuprinde reziduuri care nu se regăsesc nici anticorpul beneficiar, nici în CDR importat sau în secvențe cadru, dar sunt incluse pentru a rafina și optimiza suplimentar performanța anticorpilor. În general, anticorpul umanizat poate cuprinde în mod substanțial toate dintre cel puțin unul și, în mod tipic, două domenii variabile, în care toate sau substanțial toate regiunile CDR corespund celor ale imunoglobulinei non-umane și toate sau substanțial toate regiunile FR sunt cele ale unei

15 secvențe consens a imunoglobulinei umane. În unele exemple de realizare, anticorpul umanizat poate cuprinde, de asemenea, cel puțin o porțiune a unei regiuni sau domeniu constant al imunoglobulinei (Fc), în mod tipic, al imunoglobulinei umane. Alte forme de anticorpi umanizați au una sau mai multe CDR (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2 și/sau CDR H3) care sunt modificate în raport cu anticorpul original, care sunt denumite, de asemenea, una sau mai

20 multe CDR „derivate din” una sau mai multe CDR din anticorpul inițial. Așa cum se va aprecia, o secvență umanizată poate fi identificată de secvența sa principală și nu denotă neapărat procesul prin care a fost creat anticorpul.

Un „anticorp cu grefă CDR” așa cum este utilizat aici se referă la un anticorp umanizat în care una sau mai multe regiuni de determinare a complementarității (CDR) ale unei prime specii (non-umane) au fost grefate pe regiunile cadru (FR) ale unei a doua specii (umane).

25

Un „anticorp uman” așa cum este utilizat aici înglobează anticorpi produși la oameni, anticorpi produși la animale non-umane care cuprind gene ale imunoglobulinei umane, cum ar fi șoarecii XenoMouse® și anticorpi selectați folosind metode *in vitro*, cum ar fi afișarea fagelor (Vaughan et al., 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314; Sheets et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom și Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581), unde repertoriul de anticorpi este bazat pe o secvență a imunoglobulină umană. Termenul „anticorp uman” denotă genul secvențelor care sunt secvențe umane. Astfel, termenul nu desemnează procesul prin care a fost creată anticorpul, ci genul secvențelor relevante.

30

O „regiune Fc funcțională” posedă o „funcție efectorie” a unei regiuni Fc cu secvență nativă. Exemple de „funcții efectoare” includ legarea receptorului Fc; legarea C1q; CDC; ADCC; fagocitoză; reglarea descendentă a receptorilor de suprafață celulară (de exemplu, receptor de celule B; BCR) *etc.* Astfel de funcții efectoare necesită în general ca regiunea Fc să fie combinată cu un domeniu de legare (de exemplu, un domeniu variabil de anticorpi) și poate fi evaluat

35

40 utilizând diverse analize.

O „regiune Fc cu secvență nativă” cuprinde o secvență de aminoacizi identică secvenței de aminoacizi a unei regiuni Fc care se găsește în natură. Regiunile Fc umane cu secvență nativă includ o regiune Fc umană a IgG1 umane cu secvență nativă (alotipuri non-A și A); o regiune Fc a IgG2 umane cu secvență nativă; o regiune Fc a IgG3 umane cu secvență nativă; și o regiune Fc a IgG4 cu secvență nativă, precum și variante naturale ale acestora.

45

O „regiune Fc variantă” cuprinde o secvență de aminoacizi care diferă de cea a unei regiuni Fc cu secvență nativă în baza a cel puțin unei modificări a aminoacizilor. În unele exemple de realizare, o „regiune Fc variantă” cuprinde o secvență de aminoacizi care diferă de cea a unei regiuni Fc cu secvență nativă în baza a cel puțin unei modificări a aminoacizilor, reținând totuși cel puțin o funcție efectorie a regiunii Fc cu secvență nativă. În unele exemple de realizare, regiunea Fc variantă are cel puțin o substituție de aminoacizi comparativ cu o regiune Fc cu secvență nativă sau cu regiunea Fc a polipeptidei mamă, de exemplu, de la aproximativ unu la aproximativ zece substituții de aminoacizi, și de preferință, de la aproximativ unu la aproximativ cinci substituții de aminoacizi într-o regiune Fc cu secvență nativă sau în regiunea Fc a polipeptidei mamă. În unele

50

55 exemple de realizare, regiunea Fc variantă de aici va avea o identitate de secvență de cel puțin aproximativ 80% cu o regiune Fc cu secvență nativă și/sau cu o regiune Fc a unei polipeptide mamă, cel puțin aproximativ 90% identitate a secvenței cu aceasta, cel puțin aproximativ 95%, cel puțin aproximativ 96%, cel puțin aproximativ 97%, cel puțin aproximativ 98% sau cel puțin aproximativ 99% identitate a secvenței cu aceasta.

„Receptor Fc” sau „FcR” descrie un receptor care se leagă de regiunea Fc a unui anticorp. În unele exemple de realizare, un FcγR este un FcR uman nativ. În unele exemple de realizare, un

60

FcR este unul care leagă un anticorp IgG (un receptor gamma) și include receptori din subclasele FcγRI, FcγRII și FcγRIII, inclusiv variante alelice și forme matisate alternativ ale acelor receptori. Receptorii FcγRII includ FcγRIIA (un „receptor de activare”) și FcγRIIB (un „receptor de inhibare”), care au secvențe de aminoacizi similare care diferă în principal în domeniile citoplasmice ale acestora. Receptorul de activare FcγRIIA conține un motiv de activare imunoreceptor pe bază de tirozină (ITAM) în domeniul său citoplasmatic. Receptorul de inhibare FcγRIIB conține un motiv de inhibare imunoreceptor pe bază de tirozină (ITIM) în domeniul său citoplasmatic (a se vedea, de exemplu, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR sunt revizuite, de exemplu, în Ravetch și Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); and de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Alte FcR, inclusiv cele care vor fi identificate în viitor, sunt cuprinse în termenul „FcR” din prezentul document.

Termenul „receptor Fc” sau „FcR” include, de asemenea, receptorul neonatal, FcRn, care este responsabil pentru transferul IgG materne către făt (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) și Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)) și pentru reglarea homeostazei imunoglobulinelor. Metode de măsurare a legării de FcRn sunt cunoscute (a se vedea, de exemplu, Ghetie și Ward., *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al., *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al.)).

„Funcții efectoare” se referă la activitățile biologice atribuite regiunii Fc a unui anticorp, care variază cu izotipul anticorpului. Exemple de funcții efectoare ale anticorpilor includ: legarea Clq și citotoxicitatea dependentă de complement (CDC); legarea receptorului Fc; citotoxicitatea mediată celular dependentă de anticorpi (ADCC); fagocitoză; reglarea descendentă a receptorilor de suprafață celulară (de exemplu, receptor de celule B) și activarea celulelor B.

„Celulele efectoare umane” sunt leucocite care exprimă unul sau mai mulți FcR și indeplinesc funcții efectoare. În unele exemple de realizare, celulele exprimă cel puțin FcγRIII și indeplinesc funcția(iile) ADCC efectoare. Exemple de leucocite umane care mediază ADCC includ celule mononucleare din sângele periferic (PBMC), celule natural killer (NK), monocite, celule T citotoxice și neutrofile. Celulele efectoare pot fi izolate de la o sursă nativă, de exemplu, din sânge.

„Citotoxicitate mediată celular dependentă de anticorpi” sau „ADCC” se referă la o formă de citotoxicitate în care Ig legată pe receptorii Fc (FcR) prezenți pe anumite celule citotoxice (de exemplu, celulele NK, neutrofile și macrofage) permite acestor celule efectoare citotoxice să se lege în mod specific de o celulă țintă purtătoare de antigen și să omoare ulterior celula țintă cu citotoxine. Celulele primare pentru medierea ADCC, celulele NK, exprimă FcγRIII doar, în timp ce monocitele exprimă FcγRI, FcγRII și FcγRIII. Expriarea FcR pe celulele hematopoietice este rezumată în Tabelul 3 de la pagina 464 din Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Pentru a evalua activitatea ADCC a unei molecule de interes, o analiză in vitro ADCC, cum ar fi cea descrisă Brevetul US Nr. 5,500,362 sau 5,821,337 sau Brevetul US Nr. 6,737,056 (Presta), poate fi realizată. Celule efectoare utile pentru aceste analize includ celule PBMC și NK. Alternativ sau suplimentar, activitatea ADCC a moleculei de interes poate fi evaluată in vivo, de exemplu, într-un model animal, cum ar fi cele dezvăluite în Clynes et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)* 95:652-656 (1998). Variantele de polipeptidă suplimentare cu secvențe de aminoacizi modificate ale regiunii Fc (polipeptide cu o regiune Fc variantă) și o activitate ADCC crescută sau scăzută sunt descrise, de exemplu, în Brevetul US Nr. 7,923,538 și Brevetul US Nr. 7,994,290.

„Citotoxicitate dependentă de complement” sau „CDC” se referă la liza unei celule țintă în prezența unui complement. Activarea căii complementului clasic este inițiată de legarea primei componente a sistemului de complement (C1q) la anticorpi (din subclasa corespunzătoare), care sunt legați de antigenul lor înrudit. Pentru a evalua activarea complementului, o analiză CDC, de exemplu, așa cum este descris în Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), poate fi efectuată. Variantele de polipeptidă cu secvențe de aminoacizi modificate ale regiunii Fc (polipeptide cu o regiune Fc variantă) și capacitate de legare a C1q crescută sau scăzută sunt descrise, de exemplu, în Brevetul US Nr. 6,194,551 B1, Brevetul US No. 7,923,538, Brevetul US nr. 7,994,290 și WO 1999/51642. A se vedea de asemenea, de exemplu, Idusogie et al., *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

O variantă de polipeptidă cu afinitate de legare FcR sau activitate ADCC „modificată” este una care are o activitate de legare a FcR și/sau activitate ADCC fie îmbunătățită, fie diminuată în comparație cu o polipeptidă mamă sau cu o polipeptidă care cuprinde o regiune Fc cu secvență nativă. Varianta de polipeptidă care „prezintă o legare crescută” de un FcR leagă cel puțin un FcR cu o afinitate mai bună decât polipeptida mamă. Varianta de polipeptidă care „prezintă o legare scăzută” de un FcR leagă cel puțin un FcR cu o afinitate mai scăzută decât o polipeptidă mamă. Asemenea variante care prezintă o legare scăzută cu un FcR pot avea o legătură foarte mică sau

deloc apreciabilă cu un FcR, de exemplu, legarea de 0-20% la FcR comparativ cu o regiune Fc cu secvență nativă.

Varianta de polipeptidă care „mediază mai eficient citotoxicitatea mediata celular dependentă de anticorp (ADCC) în prezența celulelor efectoare umane” decât un anticorp mamă este una care in vitro sau in vivo este mai eficientă în a media ADCC, atunci când cantitatea de variantă de polipeptidă și anticorpi mamă utilizată în analiză este în esență aceeași. În general, astfel de variante vor fi identificate utilizând analiza in vitro ADCC conform celor dezvăluite aici, dar alte analize sau metode pentru determinarea activității ADCC, de exemplu, într-un model animal *etc.*, sunt avute în vedere.

Termenul „substanțial similar” sau „substanțial același”, așa cum este utilizat aici, denotă un grad suficient de ridicat de similaritate între două sau mai multe valori numerice, astfel încât o persoană de specialitate în domeniu ar considera diferența între cele două sau mai multe valori ca a nu avea sau a avea puțină însemnătate biologică și/sau statistică în contextul caracteristicii biologice măsurate de valoarea menționată. În unele exemple de realizare, cele două sau mai multe valori in mod substanțial similare diferă cu nu mai mult de aproximativ oricare dintre 5%, 10%, 15%, 20%, 25% sau 50%.

Sintagma „substanțial diferită”, așa cum este utilizată aici, denotă un grad suficient de ridicat de diferență între două valori numerice, astfel încât o persoană de specialitate în domeniu ar considera diferența dintre cele două valori ca având o semnificație statistică în contextul caracteristicii biologice măsurate prin valorile menționate. În unele exemple de realizare, cele două valori numerice in mod substanțial diferite diferă cu mai mult de aproximativ oricare dintre 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% sau 100%.

Sintagma „substanțial redusă”, așa cum este utilizată aici, denotă un grad suficient de ridicat de reducere între o valoare numerică și o valoare numerică de referință, astfel încât o persoană de specialitate în domeniu ar considera diferența dintre cele două valori ca având o semnificație statistică în contextul caracteristicii biologice măsurate prin valorile menționate. În unele exemple de realizare, valorile numerice in mod substanțial reduse sunt reduse cu mai mult de aproximativ oricare dintre 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% sau 100% în comparație cu valoarea de referință.

Termenul „secvență lider” se referă la o secvență de reziduuri de aminoacizi localizate la terminalul N al unei polipeptide care facilitează secreția unei polipeptide dintr-o celulă de mamifer. O secvență lider poate fi clivată la exportul polipeptidei din celula de mamifer, formând o proteină matură. Secvențele lider pot fi naturale sau sintetice, iar acestea pot fi heteroloage sau omoloage proteinei la care se atașează.

O polipeptidă cu „secvență nativă” cuprinde o polipeptidă având aceeași secvență de aminoacizi ca și polipeptida găsită în natură. Astfel, polipeptida cu secvență nativă poate avea secvența de aminoacizi a polipeptidei disponibile în stare naturală de la orice mamifer. Astfel de polipeptidă cu secvență nativă poate fi izolată din natură sau poate fi produsă prin mijloace recombinante sau sintetice. Termenul polipeptidă „cu secvență nativă” înglobează specific forme trunchiate sau secretate în stare naturală ale polipeptidei (de exemplu, o secvență de domeniu extracelular), forme de variante în stare naturală (de exemplu, forme matisate alternativ) și variante alelice în stare naturală ale polipeptidei.

O „variantă” de polipeptidă înseamnă o polipeptidă activă biologic având o identitate a secvenței de aminoacizi de cel puțin aproximativ 80% cu polipeptida cu secvență nativă după alinierea secvențelor și introducerea spațiilor, dacă este necesar, pentru a obține o identitate de secvență procentuală maximă, și fără a lua în considerare orice substituții conservatoare ca parte din identitatea secvenței. Astfel de variante includ, de exemplu, polipeptide în care unul sau mai multe reziduuri de aminoacizi sunt adăugate sau șterse, la terminalul N- sau C- al polipeptidei. În unele exemple de realizare, o variantă va avea o identitate a secvenței de aminoacizi de cel puțin aproximativ 80%. În unele exemple de realizare, o variantă va avea o identitate a secvenței de aminoacizi de cel puțin aproximativ 90%. În unele exemple de realizare, o variantă va avea o identitate a secvenței de aminoacizi de cel puțin aproximativ 95% cu polipeptida cu secvență nativă.

Așa cum este utilizat aici, „procent (%) de identitate a secvenței de aminoacizi” și „omologie” în ceea ce privește o peptidă, polipeptidă sau secvență de anticorpi sunt definite ca procentajul de reziduuri de aminoacizi într-o secvență candidat identice cu reziduurile de aminoacizi din secvența specifică a peptidei sau polipeptidei, după alinierea secvenței și introducerea spațiilor, dacă este necesar, pentru a obține o identitate de secvență procentuală maximă, și fără a lua în considerare orice substituții conservatoare ca parte din identitatea secvenței. Alinierea în scopul determinării identității procentuale maxime a secvenței de aminoacizi poate fi obținută în diverse moduri din domeniul tehnicii, de exemplu, utilizând

software de computer disponibil public cum ar fi software-ul BLAST, BLAST-2, ALIGN sau MEGALIGN™ (DNASTAR). Persoanele de specialitate în domeniu pot determina parametri corespunzători pentru măsurarea alinierii, inclusiv orice algoritmi necesari pentru a obține alinierea maximă pe întreaga lungime a secvențelor comparate.

- 5 Substituirea aminoacizilor poate include, dar nu se limitează la înlocuirea unui aminoacid la o polipeptidă, cu un alt aminoacid. Exemple de substituții sunt prezentate în Tabelul 1. Substituțiile de aminoacizi pot fi introduse într-un anticorp de interes și produșii selectați pentru o activitate dorită, de exemplu, legarea de antigen păstrată/îmbunătățită, imunogenicitate scăzută sau ADCC sau CDC îmbunătățite.

10

TABELUL 1

Reziduu original	Exemple de substituții
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucină
Leu (L)	Norleucină; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucină

Aminoacizii pot fi grupați în funcție de proprietățile obișnuite ale lanțului lateral:

- 15 (1) hidrofobe: Norleucină, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
 (2) hidrofile neutre: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
 (3) acide: Asp, Glu;
 (4) bazice: His, Lys, Arg;
 (5) reziduuri care influențează orientarea lanțului: Gly, Pro;
 (6) aromatice: Trp, Tyr, Phe.

20

Substituții neconservatoare vor implica schimbarea unui membru al uneia dintre aceste clase cu o altă clasă.

- 25 Termenul „vector” este folosit pentru a descrie o polinucleotidă ce poate fi modificată prin inginerie pentru a conține o polinucleotidă clonată sau polinucleotide clonate care pot fi propagate într-o celulă gazdă. Un vector poate include unul sau mai multe dintre următoarele elemente: o origine de replicare, una sau mai multe secvențe reglatoare (precum, de exemplu, promotori și/sau intensificatori) care reglează exprimarea polipeptidei de interes și/sau a uneia sau

mai multor gene marker selectabile (precum, de exemplu, gene de rezistență la antibiotice și gene care pot fi utilizate în analize colorimetrice, de exemplu, β -galactozidază). Termenul „vector de exprimare” se referă la un vector folosit pentru a exprima o polipeptidă de interes într-o celulă gazdă.

5 O „celulă gazdă” se referă la o celulă care poate fi sau a fost un beneficiar al unui vector sau al polinucleotidei izolate. Celulele gazdă pot fi celule procariote sau celule eucariote. Exemple de celule eucariote includ celule de mamifere, cum ar fi amorsarea sau celule de la animale primare sau non-primate; celule fungice, cum ar fi levura; celulele vegetale și celulele de la insecte. Exemple nelimitative de celulele de mamifere includ, dar nu sunt limitate la, celule NSO, 10 celulele PER.C6® (CruCell) și 293 și celule CHO și derivatele acestora, precum celulele 293-6E și, respectiv, DG44. Celulele gazdă includ descendența unei singure celule gazdă, iar descendența poate să nu fie neapărat complet identică (ca morfologie sau complement ADN genomic) cu celula originală mamă, din cauza mutației naturale, accidentale sau deliberate. O celulă gazdă include celule transfectate in vivo cu o polinucleotidă(e) prevăzută(e) aici.

15 Termenul „izolat” așa cum este utilizat aici se referă la o moleculă care a fost separată de cel puțin o parte a componentelor cu care se găsește în mod obișnuit în natură sau este produsă. De exemplu, o polipeptidă este denumită ca fiind „izolată” atunci când este separată de cel puțin o parte din componentele celulei în care a fost produsă. Atunci când o polipeptidă este secretată de o celulă după expresie, separarea fizică a supernatantului care conține polipeptida din celula care a 20 produs-o este considerată ca „izolarea” polipeptidei. În mod similar, o polinucleotidă este denumită „izolată” atunci când nu face parte din polinucleotida mai mare (de exemplu, ADN genomic sau ADN mitocondrial, în cazul unei polinucleotide ADN) în care se găsește în mod tipic în natură, sau este separată de cel puțin o parte a componentelor celulei în care a fost produsă, de exemplu, în cazul unei polinucleotide ARN. Astfel, o polinucleotidă ADN care este conținută într- 25 un vector în interiorul unei celule gazdă poate fi denumită ca fiind „izolată”.

Termenii „persoană” sau „subiect” sunt utilizați interschimbabil aici pentru a se referi la un animal; de exemplu, un mamifer. În unele exemple de realizare, sunt prevăzute metode de tratare a mamiferelor, inclusiv, dar fără a se limita la, oameni, rozătoare, maimuțe antropoide, 30 feline, canide, cabaline, bovine, porcine, ovine, caprine, animale de laborator mamifere, animale de fermă mamifere, animale sportive mamifere și animale de companie mamifere. În unele exemple, o „persoană” sau „subiect” se referă la o persoană sau un subiect care are nevoie de tratament pentru o boală sau tulburare. În unele exemple de realizare, subiectul care trebuie să primească tratamentul poate fi un pacient, indicând faptul că subiectul a fost identificat ca având o tulburare de relevanță pentru tratament sau că prezintă un risc adecvat de a contacta tulburarea.

35 O „boală” sau „tulburare” așa cum este utilizată aici se referă la o afecțiune în care este necesar și/sau dorește tratamentul.

„Cancer” și „tumoare”, așa cum sunt utilizați aici, sunt termeni interschimbabili care se referă la orice creștere sau proliferare anormală a celulelor sau țesuturilor la un animal. Așa cum sunt utilizați aici, termenii „cancer” și „tumoare” cuprind cancerurile solide și 40 hematologice/limfatice și cuprind, de asemenea, creșterile maligne, pre-maligne și benigne, cum ar fi displazia. Exemple de cancer includ, dar nu sunt limitate la, carcinom, limfom, blastom, sarcom și leucemie. Exemple nelimitative mai particulare de astfel de canceruri includ cancerul cu celule scuamoase, cancerul pulmonar cu celule mici, cancerul de esofag, astrocitom, sarcom de țesut moale, cancer pulmonar cu celule non-mici, adenocarcinom de plămân, carcinom scuamos al 45 plămânului, cancer de peritoneu, cancer hepatocelular, cancer gastrointestinal, cancer pancreatic, glioblastom, cancer cervical, cancer ovarian, cancer de ficat, cancer de vezică urinară, hepatom, cancer de san, cancer de colon, cancer colorectal, carcinom endometrial sau uterin, carcinom al glandei salivare, cancer de rinichi, cancer renal, cancer de ficat, cancer de prostată, cancer vulvar, cancer de tiroidă, carcinom hepatic, cancer cerebral, cancer endometrial, cancer testicular, 50 colangiocarcinom, carcinom de vezică biliară, cancer gastric, melanom și diverse tipuri de cancer al capului și gâtului.

Așa cum este utilizat aici, „tratamentul” este o abordare pentru obținerea de rezultate clinice benefice sau dorite. „Tratamentul” așa cum este utilizat aici acoperă orice administrare sau aplicare a unei terapii pentru o boală la un mamifer, inclusiv un om. În scopurile acestei dezvăluiri, 55 rezultatele clinice benefice sau dorite includ, dar nu se limitează la, oricare una sau mai multe dintre: ameliorarea unei sau mai multor simptome, diminuarea gradului de boală, prevenirea sau întârzierea răspândirii (de exemplu, metastază, de exemplu metastază la plămân sau la ganglion limfatic) bolii, prevenirea sau întârzierea reapariției bolii, întârzierea sau încetinirea progresiei bolii, ameliorarea stării bolii, inhibarea bolii sau a progresiei bolii, inhibarea sau încetinirea bolii sau a progresiei acesteia, oprirea dezvoltării acesteia și remisia (fie parțială, fie totală). De 60 asemenea, „tratament” înglobează și o reducere a consecințelor patologice ale unei boli

proliferative. Metodele prevăzute aici au în vedere oricare una sau mai multe dintre aceste aspecte ale tratamentului. În conformitate cu cele de mai sus, termenul tratament nu necesită îndepărtarea sută la sută a tuturor aspectelor tulburării.

5 „Ameliorare” înseamnă o diminuare sau îmbunătățire a unui sau mai multor simptome în comparație cu lipsa administrării unui anticorp anti-ICOS. „Ameliorarea” include, de asemenea, scurtarea sau reducerea duratei unui simptom.

În contextul cancerului, termenul „tratare” include oricare sau toate dintre: inhibarea creșterii celulelor canceroase, inhibarea replicării celulelor canceroase, reducerea poverii generale a tumorii și ameliorarea unui sau mai multor simptome asociate cu boala.

10 Termenul „probă biologică” înseamnă o cantitate dintr-o substanță de la o vietate sau o fostă vietate. Aceste substanțe includ, fără limitare la, sânge, (de exemplu, sânge integral), plasmă, limfă, urină, lichid amniotic, lichid sinovial, celule endoteliale, leucocite, monocite, alte celule, organe, țesuturi, măduvă osoasă, ganglioni limfatici și splină.

O probă care are un „nivel ridicat de ICOS” sau „exprimă ICOS la un nivel ridicat” sau
15 este cu „ICOS^{RIDICAT}” înseamnă că nivelul ICOS este astfel încât o persoană de specialitate în domeniu ar concluziona că forma de cancer poate fi tratată cu o terapie anti-ICOS, cum ar fi un anticorp prevăzut în prezentul. În unele exemple de realizare, un „nivel ridicat de ICOS” este unul în care 1% din celulele dintr-o probă tumorală prezintă colorație pentru ICOS. În unele exemple de realizare un „nivel ridicat” în ceea ce privește ICOS este o colorație de 1% sau mai mare, de
20 exemplu, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 sau 100% din celulele din proba tumorală prezintă colorație. În unele exemple de realizare, nivelurile ICOS pot fi măsurate prin IHC cromogenic sau imunofluorescență IHC (scor Aqua).

O probă care „exprimă ICOS” sau are „colorație pozitivă pentru ICOS” sau este „ICOS pozitivă” înseamnă că 1% sau mai multe celule dintr-o probă prezintă colorație pentru ICOS. În
25 unele exemple de realizare, o probă care este ICOS pozitivă prezintă cel puțin o colorație slabă, moderată și/sau puternică a celulelor (pe baza exprimării membranare a ICOS). O probă cu colorație moderată sau puternică a celulelor pentru ICOS este considerată a fi cu „ICOS^{RIDICAT}.”

O probă care are un „nivel scăzut de PD-L1” sau exprimă „PD-L1 la nivel scăzut” sau
30 este cu „PD-L1^{SCĂZUT}” înseamnă că nivelul PD-L1 este sub nivelul prag de expresie pentru un cancer care este indicat în mod normal pentru tratamentul cu o terapie PD-1. În unele exemple de realizare, un „nivel scăzut de PD-L1” este unul în care mai puțin de 5% din celulele din tumoare indică colorație membranară pentru PD-L1. În unele exemple de realizare un „nivel scăzut” în ceea ce privește PD-L1 este o colorație mai mică de 5%, de exemplu, 4%, 3%, 2%, 1% sau 0% din celulele tumorii prezintă colorație. În unele exemple de realizare, nivelurile PD-L1 pot fi măsurate
35 prin IHC cromogenic sau imunofluorescență IHC (scor Aqua). O probă care nu exprimă PD-L1 detectabil poate fi, de asemenea, denumită ca „exprimând un nivel scăzut de PD-L1.” Astfel, un PD-L1 nedetectabil este înglobat în termenul „scăzut.”

O probă care are un „nivel ridicat de PD-L1” sau „exprimă PD-L1 la nivel ridicat” sau
40 este cu „PD-L1^{RIDICAT}” înseamnă că nivelul PD-L1 este astfel încât o persoană de specialitate în domeniu ar concluziona că forma de cancer poate fi tratată cu o terapie PD-1. În unele exemple de realizare, un „nivel ridicat de PD-L1” este unul în care 5% din celulele din tumoare sau mai multe prezintă colorație membranară pentru PD-L1. În unele exemple de realizare un „nivel ridicat” în ceea ce privește PD-L1 este o colorație de 5% sau mai mare, de exemplu, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 sau 100% din celulele din tumoare prezintă colorație. În unele exemple de realizare,
45 nivelurile PD-L1 pot fi măsurate prin IHC cromogenic sau imunofluorescență IHC (scor Aqua).

O probă care „exprimă PD-L1” sau are „colorație pozitivă pentru PD-L1” sau este „PD-L1 pozitivă” înseamnă că 1% sau mai multe celule prezintă colorație membranară pentru PD-L1. În unele exemple de realizare, o probă care este PD-L1 pozitivă prezintă cel puțin o colorație slabă, moderată și/sau puternică a celulelor (pe baza exprimării membranare a PD-L1). O probă cu
50 colorație moderată sau puternică a celulelor pentru PD-L1 este considerată a fi cu „PD-L1^{RIDICAT}.”

O probă căreia îi „lipsește exprimarea PD-L1” sau prezintă „colorație negativă pentru PD-L1” sau este „PD-L1 negativă” înseamnă că exprimarea PD-L1 pe suprafața celulelor probei este nedetectabilă prin IHC, precum IHC cromogenic sau prin imunofluorescență IHC (scor Aqua). O probă PD-L1 negativă este considerată, de asemenea, cu „PD-L1^{SCĂZUT}.”

55 În unele exemple de realizare, orice metodă pentru măsurarea nivelului de PD-L1 poate fi utilizată. În unele exemple de realizare, acest lucru poate include testul PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Inc., Carpinteria, CA), care este un test validat clinic și aprobat de FDA pentru evaluarea exprimării PD-L1 în NSCLC. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx este o analiză imunohistochimică calitativă folosind anticorpi anti-PD-L1 monoclonali de la șoarece (clona 22C3), care poate fi utilizată în detectarea proteinei PD-L1 în țesuturi cu cancer pulmonar cu
60 celule non-mici (NSCLC) fixate în formol, încorporate în parafină. Analiza poate fi efectuată pe

sistemul Autostainer Link 48 și vizualizată utilizând sistemul EnVision FLEX. Exprimarea proteinei PD-L1 este calificată folosind Scorul proporției tumorale (TPS), care este procentul de celulele tumorale viabile care prezintă colorație parțială sau completă a membranei. În unele exemple de realizare, proba este considerată PD-L1 pozitivă dacă $TPS \geq 50\%$ din celulele tumorale viabile prezintă colorație membranară în orice intensitate. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx este indicat ca un ajutor la identificarea pacienților cu NSCLC pentru tratamentul cu KEYTRUDA® (pembrolizumab). Detalii suplimentare privind sistemul de punctare și răspunsul la pembrolizumab sunt descrise în articolul Garon et al. (N Engl J Med 2015;372:2018-28). În unele exemple de realizare, probele de la pacienți cu NSCLC pot fi considerate pozitive pentru exprimarea PD-L1 dacă Scorul proporției tumorale este $\geq 50\%$ din celulele tumorale viabile prezintă colorație membranară (parțială sau completă) la orice intensitate (adică $\geq 1+$). În unele exemple de realizare, acest lucru poate fi cu referire specifică la clona anticorpului 22C3. În unele exemple de realizare, dacă $TPS = 5\%$ până la 50% din celulele tumorale viabile prezintă colorație membranară în orice intensitate, proba și/sau pacientul este considerat a fi PD-L1 pozitiv. În unele exemple de realizare, dacă $TPS \geq 50\%$ din celulele tumorale viabile prezintă colorație membranară în orice intensitate, proba și/sau pacientul este considerat a fi cu PD-L1 ^{RIDICAT}.

Termenul „control” se referă la o compoziție cunoscută a nu conține un analit („control negativ”) sau a conține analit („control pozitiv”). Un control pozitiv poate cuprinde o concentrație cunoscută de analit. „Control”, „control pozitiv” și „calibrator” pot fi folosite interschimbabil în prezentul document pentru a face referire la o compoziție care cuprinde o concentrație cunoscută de analit. Un „control pozitiv” poate fi utilizat pentru a stabili caracteristicile de performanță a analizei și este un indicator util al integrității reactivilor (de exemplu, analiți).

„Referință predeterminată” și „nivel predeterminat” se referă în general la o valoare de referință a analizei utilizată pentru evaluarea rezultatelor eficienței diagnosticului/pronosticului/terapiei prin compararea rezultatelor analizei cu o referință/nivel predeterminat(ă), unde referința/nivelul predeterminat(ă) a fost deja corelat(ă) sau asociat(ă) cu diverși parametri clinici (de exemplu, gravitatea bolii, progresie/lipsa progresiei/îmbunătățire etc.). În timp ce prezenta invenție poate furniza exemple de niveluri predeterminate, este bine cunoscut faptul că valorile de referință pot varia în funcție de natura imunoanalizei (de exemplu, anticorpi utilizați etc.). De asemenea, se află în capacitățile unei persoane de specialitate în domeniu să adapteze dezvoltarea din prezentul pentru alte imunoanalize pentru a obține valori de referință specifice imunoanalizei pentru acele celelalte imunoanalize pe baza acestei dezvoltări. În timp ce valoarea exactă a referinței/nivelului predeterminat(e) poate varia între analize, corelațiile descrise aici (dacă există) pot fi în general aplicabile.

Termenii „inhibare” sau „inhibă” se referă la o scădere sau încetare a oricărei caracteristici fenotipice sau la scăderea sau încetarea incidenței, gradului sau probabilității acelei caracteristici. „A reduce” sau „a inhiba” înseamnă a scădea, reduce sau opri o activitate, o funcție și/sau o valoare, comparativ cu o referință. În unele exemple de realizare, prin „reducere” sau „inhibare” se înțelege capacitatea de a cauza o scădere generală de 20% sau mai mare. În unele exemple de realizare, prin „reducere” sau „inhibare” se înțelege capacitatea de a cauza o scădere generală de 50% sau mai mare. În unele exemple de realizare, prin „reducere” sau „inhibare” se înțelege capacitatea de a cauza o scădere generală de 75% , 85% , 90% , 95% sau mai mare. În unele exemple de realizare, cantitatea observată mai sus este inhibată sau scăzută pe o perioadă de timp, în raport cu o doză de control (cum ar fi placebo) în aceeași perioadă de timp. O „referință” așa cum este utilizată aici se referă la orice probă, standard sau nivel care este utilizat în scopuri de comparație. O referință poate fi obținută de la o probă sănătoasă și/sau nebolnavă. În unele exemple, se poate obține o referință de la o probă netratată. În unele exemple, o referință este obținută de la o probă nebolnavă sau netratată de la o persoană subiect. În unele exemple, o referință este obținută de la una sau mai multe persoane sănătoase care nu sunt subiectul sau pacientul.

Așa cum este utilizat aici, „întârzierea dezvoltării unei boli” înseamnă amânarea, împiedicarea, încetinirea, stabilizarea, suprimarea și/sau întârzierea evoluția bolii (cum ar fi cancerul). Această întârziere se poate întinde pe durate diferite, în funcție de istoricul bolii și/sau a persoanei care este tratată. Așa cum este evident pentru o persoană de specialitate în domeniu, o întârziere suficientă sau semnificativă poate, în fapt, să cuprindă prevenția, în sensul că persoana nu dezvoltă boala. De exemplu, un cancer în stadiu avansat, cum ar fi dezvoltarea de metastaze, poate fi întârziat.

„Prevenirea”, așa cum este utilizat aici, include asigurarea profilaxiei în ceea ce privește apariția sau reapariția unei boli la un subiect care poate fi predispus la boală, dar nu a fost încă diagnosticat cu boala. Dacă nu se specifică altfel, termenii „reducere”, „inhibare”, „prevenire” nu denotă sau necesită o prevenție completă tot timpul.

Așa cum este utilizat aici, „suprimarea” unei funcții sau activități este reducerea funcției sau activității în comparație cu aceleași condiții de altfel, cu excepția unei condiții sau parametru de interes, sau alternativ, în comparație cu o altă condiție. De exemplu, un anticorp care suprimă creșterea tumorii reduce rata de creștere a tumorii comparativ cu rata de creștere a tumorii în

5 absența anticorpului.

O „cantitate eficientă terapeutică” a unei substanțe/molecule, agonist sau antagonist poate varia în funcție de factori precum starea bolii, vârsta, sexul și greutatea persoanei și capacitatea substanței/moleculei, agonistului sau antagonistului de a obține un răspuns dorit la nivelul persoanei. O cantitate eficientă terapeutică este, de asemenea, una în care orice efecte toxice sau

10 dăunătoare ale substanței/moleculei, agonistului sau antagonistului sunt depășite de efectele benefice ale acesteia. O cantitate eficientă terapeutică poate fi livrată într-una sau mai multe administrări. O cantitate eficientă terapeutică se referă la o cantitate eficientă, la doze și pe perioade de timp necesare, pentru a obține rezultatul terapeutic și/sau profilactic dorit.

O „cantitate eficientă profilactică” se referă la o cantitate eficientă, la doze și pe perioade de timp necesare, pentru a obține rezultatul profilactic dorit. În mod tipic, dar nu neapărat, deoarece o doză profilactică este utilizată la subiecți înainte de sau într-o etapă incipientă a bolii, cantitatea eficientă profilactică va fi mai mică decât cantitatea eficientă terapeutică.

Termenii „preparat farmaceutic” și „compoziție farmaceutică” se referă la un preparat care se află într-o astfel de formă, pentru a permite ca activitatea biologică a ingredientului(elor) activ(e) să fie eficientă și care nu conține componente suplimentare care sunt toxice în mod

20 neacceptabil pentru un subiect cărui i se administrează preparatul. Aceste preparate pot fi sterile.

Un „agent purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic” se referă la un material de umplere, diluant, de incapsulare solid, semisolid sau lichid netoxic, produs auxiliar pentru preparat sau agent purtător convențional din stadiul tehnicii pentru utilizarea cu un agent terapeutic care cuprind împreună o „compoziție farmaceutică” pentru administrare unui subiect. Un agent purtător

25 acceptabil din punct de vedere farmaceutic este netoxic pentru beneficiari în dozele și concentrațiile utilizate și este compatibil cu alte ingrediente ale formulei. Agentul purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic este adecvat pentru preparatul utilizat.

Un preparat „steril” este aseptice sau, în mod esențial, liber de microorganisme vii și sporii acestora.

30

O „terapie PD-1” cuprinde orice terapie care modulează legarea PD-1 la PD-L1 și/sau PD-L2. Terapiile PD-1 pot, de exemplu, interacționa direct cu PD-1 și/sau PD-L1. În unele exemple de realizare, o terapie PD-1 include o moleculă care se leagă direct de și/sau influențează activitatea PD-1. În unele exemple de realizare, o terapie PD-1 include o moleculă care se leagă

35 direct de și/sau influențează activitatea PD-L1. Astfel, un anticorp care se leagă de PD-1 sau PD-L1 și blochează interacțiunea PD-1 cu PD-L1 este o terapie PD-1. Atunci când se intenționează un subtip dorit de terapie PD-1, aceasta va fi desemnată de sintagma „PD-1 specifică” pentru o terapie care implică o moleculă care interacționează direct cu PD-1 sau „PD-L1 specifică” pentru o moleculă care interacționează direct cu PD-L1, după caz. Cu excepția cazului în care este desemnată altfel, toate dezvăluirile conținute în prezentul document privind terapia PD-1 se aplică în general terapiei PD-1, precum și terapiilor PD-1 specifice și/sau PD-L1 specifice. Exemple nelimitative de terapii PD-1 includ nivolumab (anticorp anti-PD-1; BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538; OPDIVO®; Bristol-Myers Squibb); pidilizumab (anticorp anti-PD-1, CureTech), pembrolizumab (anticorp anti-PD-1; KEYTRUDA®, MK-3475, lambrolizumab); durvalumab

45 (anticorp anti-PD-L1, MEDI-4736; AstraZeneca/MedImmune); RG-7446; MSB-0010718C; AMP-224; BMS-936559 (un anticorp anti-PD-L1; Bristol-Myers Squibb); AMP-514; MDX-1105; ANB-011; anti-LAG-3/PD-1; anti-PD-1 Ab (CoStim); anti-PD-1 Ab (Kadmon Pharm.); anti-PD-1 Ab (Immunovo); anti-TIM-3/PD-1 Ab (AnaptysBio); anti-PD-L1 Ab (CoStim/Novartis); atezolizumab (un anticorp anti-PD-L1, Genentech/Roche); avelumab (un anticorp anti-PD-L1, MSB0010718C, Pfizer); KD-033, antagonist PD-1 (Agenus); STI-A1010; STI-A1110; TSR-042; și alți anticorpi care sunt îndreptați către moartea celulară programată-1 (PD-1) sau moartea celulară programată ligand 1 (PD-L1).

Termenul „inhibitor IDO” se referă la un agent capabil să inhibe activitatea indoleamin 2,3-dioxigenază (IDO) și astfel să inverseze imunosupresia mediată de IDO. Inhibitorul IDO poate inhiba IDO1 și/sau IDO2 (INDOL1). Un inhibitor IDO poate fi un inhibitor IDO reversibil sau ireversibil. Un „inhibitor IDO reversibil” este un compus care inhibă reversibil activitatea enzimei IDO fie la situsul catalitic, fie la un situs necatalitic, iar un „inhibitor IDO ireversibil” este un compus care inhibă ireversibil activitatea enzimei IDO prin formarea unei legături covalente cu enzima. Exemple nelimitative de inhibitori IDO includ Indoximod (New Link Genetics),

55 INCB024360 (Incyte Corp), 1-metil-Dtriptofan (New Link Genetics) și GDC-0919 (Genentech).

60

O „terapie cu celule T cu receptor antigen himeric” sau „terapie CAR-T” se referă la un agent terapeutic care cuprinde o celulă T modificată genetic pentru a exprima un receptor care recunoaște un antigen exprimat de celula tumorală. Antigenul poate fi un antigen exprimat în mod specific de tumoare sau un antigen exprimat atât de celulele canceroase, cât și de țesutul sănătos.

5 In unele exemple de realizare, terapia CAR-T este terapie CAR-T adoptivă, în care celulele T ale unui pacient sunt eliminate și modificate pentru a exprima receptorul antigenului himeric și apoi a restituite pacientului. *A se vedea, de exemplu*, Dai et al., 2016, J Natl Cancer Inst, 108 (7): djv439, doi: 10.1093/jnci/djv439; Gill et al., 2015, Blood Rev, pii: S0268-960X(15)00080-6, doi: 10.1016/j.blre.2015.10.003; Gill et al., 2015, Immunol Rev, 263(1):68-89. doi: 10.1111/imr.12243.

10 Administrarea „în combinație cu” unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari include administrarea simultană (concurentă) și administrarea consecutivă sau secvențială în orice ordine.

Termenul „concurent” este utilizat aici pentru a se referi la administrarea a doi sau mai mulți agenți terapeutici, unde cel puțin o parte din administrare se suprapune în timp sau unde
15 administrarea unui agent terapeutic se încadrează într-o perioadă scurtă de timp raportat la administrarea celuilalt agent terapeutic. De exemplu, cei doi sau mai mulți agenți terapeutici sunt administrați cu o separare de timp de cel mult aproximativ un număr de minute specificat.

Termenul „secvențial” este utilizat aici pentru a se referi la administrarea a doi sau mai mulți agenți terapeutici, în care administrarea unuia sau mai multor agenți continuă după
20 întreruperea administrării unuia sau mai multor alți agenți, sau unde administrarea unuia sau mai multor agenți începe înainte de administrarea unuia sau mai multor alți agenți. De exemplu, administrarea a celor doi sau mai mulți agenți terapeutici sunt administrați cu o separare de timp de peste aproximativ un număr de minute specificat.

Așa cum este utilizat aici, „în conjuncție cu” se referă la administrarea unei modalități de
25 tratament pe lângă o altă modalitate de tratament. Ca atare, „în conjuncție cu” se referă la administrarea unei modalități de tratament înainte, în timpul sau după administrarea celeilalte modalități de tratament la persoană.

Termenul „prospect” este folosit pentru a face referire la instrucțiunile incluse în mod obișnuit în ambalajele comerciale cu produse terapeutice, care conțin informații despre indicații,
30 utilizare, dozaj, administrare, tratament combinat, contraindicații și/sau avertizări privind utilizarea unor astfel de produse terapeutice.

Un „articol de fabricație” este orice produs de fabricație (de exemplu, un ambalaj sau un recipient) sau un kit care cuprinde cel puțin un reactiv, de exemplu, un medicament pentru
35 tratamentul unei boli sau tulburări (de exemplu, cancer), sau o sondă pentru detectarea în mod specific a unui biomarker descris aici. În unele exemple de realizare, produsul de fabricație sau kitul este promovat sau comercializat ca o unitate pentru realizarea metodelor descrise aici.

Termenii „etichetă” și „etichetă detectabilă” înseamnă o fracțiune atașată unui anticorp sau analitului său pentru a obține o reacție (de exemplu, legare) între membrii perechii de legare specifice, detectabile. Membrul etichetat al perechii de legare specifice este denumit „etichetat
40 detectabil”. Astfel, termenul „proteină de legare etichetată” se referă la o proteină cu o etichetă incorporată care prevede identificarea proteinei de legare. În unele exemple de realizare, eticheta este un marker detectabil care poate produce un semnal detectabil prin mijloace vizuale sau instrumentale, de exemplu, incorporarea unui aminoacid sau atașament radioetichetat la o polipeptidă cu fracțiuni biotinil care pot fi detectate prin avidină marcată (de exemplu,
45 streptavidină conținând un marker fluorescent sau activitate enzimatică ce poate fi detectată prin metode optice sau colorimetrice). Exemple de etichete pentru polipeptide includ, dar nu se limitează la următoarele: radioizotopi sau radionuclide (de exemplu, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , or ^{153}Sm); cromogeni, etichete fluorescente (de exemplu FITC, rodamină, fosfori lantanidici), etichete enzimatică (de exemplu peroxidază din hrean, luciferază, fosfatază
50 alcalină); markeri chimioluminiscenti; grupări biotinil; epitopi de polipeptidă predeterminați recunoscuți de un raportor secundar (de exemplu secvențe pereche fermoar de leucină, situsuri de legare pentru anticorpi secundari, domenii de legare a metalului, etichete epitop); și agenți magnetici, precum chelați de gadolinu. Exemplele reprezentative de etichete utilizate în mod obișnuit pentru imunoanalize includ fracțiunile care produc lumină, de exemplu, compuși de
55 acridiniu și fracțiunile care produc fluorescență, de exemplu, fluoresceină. În acest sens, este posibil ca fracțiunea însăși să nu poată fi etichetată detectabil, ci poate deveni detectabilă după reacția cu o altă fracțiune.

Termenul „conjugat” se referă la un anticorp care este legat chimic de o a doua fracțiune chimică, cum ar fi un agent terapeutic sau citotoxic. Termenul „agent” include un compus chimic,
60 un amestec de compuși chimici, o macromoleculă biologică sau un extract produs din materiale biologice. În unele exemple de realizare, agenții terapeutici sau citotoxici includ, dar nu se

limitează la, toxina pertussis, taxol, citocalazina B, gramicidina D, bromura de etidui, emetina, mitomicina, etopozida, tenopozida, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosteronul, glucocorticoide, procaină, tetracaină, lidocaină, propranolol și puromicină și analogi și omologi ai acestora. Atunci când este utilizat în contextul unei imunoanalize, anticorpii conjugat poate fi un anticorp etichetat detectabil, utilizat ca anticorp de detecție.

II. Anticorpi anti-ICOS

Sunt prevăzuți anticorpi noi direcționați împotriva ICOS. Anticorpii anti-ICOS includ, dar nu se limitează la, anticorpi umanizați, anticorpi himerici, anticorpi de șoarece, anticorpi umani și anticorpi care cuprind CDR ale lanțului greu și/sau lanțului ușor discutate în prezentul document. În unele cazuri, este prevăzut un anticorp izolat care se leagă de ICOS. În unele cazuri, este prevăzut un anticorp monoclonal care se leagă de ICOS. În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS este un anticorp anti-ICOS agonist. În unele cazuri, administrarea anticorpilor anti-ICOS descriși în prezentul crește numărul de celule de Teff; activează celulele Teff; consumă celulele Treg la un subiect; și/sau crește raportul celulelor Teff la celulele Treg. În unele cazuri, celulele Treg sunt celule T CD4+ FoxP3+. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD8+. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD4+ FoxP3- și celule T CD8+.

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS cuprinde cel puțin unul, două, trei, patru, cinci sau șase CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 12; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 13; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 14; (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 15; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 16; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 17.

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS cuprinde cel puțin unul, două, trei, patru, cinci sau șase CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 42; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 43; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 44; (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 45; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 46; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 47.

În invenție, anticorpii anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 62; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 63; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 64; (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 65; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 66; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 67.

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS cuprinde cel puțin una, două, trei, patru, cinci sau șase CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 22, 62, 72, 82, 92, 102 și 112; (b) HCDR2 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 23, 63, 73, 83, 93, 103 și 113; (c) HCDR3 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 24, 64, 74, 84, 94, 104 și 114; (d) LCDR1 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 25, 65, 75, 85, 95, 105 și 115; (e) LCDR2 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 26, 66, 76, 86, 96, 106 și 116; și (f) LCDR3 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 27, 67, 77, 87, 97, 107 și 117.

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS cuprinde cel puțin una, două, trei, patru, cinci sau șase CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 32, 162, 172 și 182; (b) HCDR2 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 33, 163, 173 și 183; (c) HCDR3 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 34, 164, 174 și 184; (d) LCDR1 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 35, 165, 175 și 185; (e) LCDR2 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 36, 166, 176 și 186; și (f) LCDR3 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 37, 167, 177 și 187.

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS cuprinde cel puțin una, două, trei, patru, cinci sau șase CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 52, 122, 132, 142 și 152; (b) HCDR2 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 53, 123, 133, 143 și 153; (c) HCDR3 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 54, 124, 134, 144 și 154; (d) LCDR1 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 55, 125, 135, 145 și 155; (e) LCDR2 cuprinzând o secvență de

aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 56, 126, 136, 146 și 156; și (f) LCDR3 cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată dintre SECV ID NR: 57, 127, 137, 147 și 157.

5 În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu și o regiune variabilă a lanțului ușor. În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS cuprinde cel puțin un lanț greu care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu și cel puțin o porțiune a unei regiuni
10 constante a lanțului greu și cel puțin un lanț ușor care cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor și cel puțin o porțiune a unei regiuni constante a lanțului ușor. În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS cuprinde două lanțuri grele, unde fiecare lanț greu cuprinde o regiune variabilă a lanțului
15 greu și cel puțin o porțiune a unei regiuni constante a lanțului greu și două lanțuri ușoare, unde fiecare lanț ușor cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor și cel puțin o porțiune a unei regiuni constante a lanțului ușor. Așa cum este utilizat aici, un Fv cu un singur lanț (scFv) sau orice alt anticorp care cuprinde, de exemplu, un singur lanț de polipeptidă cuprinzând toate cele șase CDR (trei CDR cu lanț greu și trei CDR cu lanț ușor) este considerat a avea un lanț greu și un lanț ușor. În unele cazuri, lanțul greu este regiunea anticorpului anti-ICOS care cuprinde cele trei CDR cu lanț greu. În unele cazuri, lanțul ușor este regiunea anticorpului anti-ICOS care cuprinde cele trei CDR cu lanț ușor.

20 În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 12; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 13; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 14; (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 15; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 16; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 17.

25 În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 22; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 23; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 24; (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 25; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 26; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 27.

30 În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 32; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 33; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 34; (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 35; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 36; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 37.

35 În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 42; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 43; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 44; (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 45; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 46; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 47.

40 În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 52; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 53; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 54; (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 55; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 56; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 57.

45 În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 72; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 73; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 74; (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 75; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 76; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 77.

50 În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 82; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 83; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 84; (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 85; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 86; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 87.

60 În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 92; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 93; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR:

94; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 95; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 96; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 97.

5 In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 102; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 103; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 104; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 105; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 106; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 107.

10 In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 112; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 113; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 114; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 115; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 116; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 117.

15 In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 122; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 123; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 124; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 125; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 126; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 127.

20 In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 132; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 133; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 134; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 135; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 136; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 137.

30 In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 142; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 143; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 144; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 145; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 146; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 147.

35 In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 152; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 153; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 154; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 155; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 156; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 157.

40 In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 162; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 163; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 164; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 165; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 166; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 167.

45 In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 172; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 173; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 174; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 175; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 176; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 177.

50 In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde șase CDR care includ (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 182; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 183; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 184; (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 185; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 186; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 187.

60 In unele exemple de realizare, anticorpus anti-ICOS cuprinde cele șase CDR așa cum este descris mai sus și se leagă de ICOS. În unele exemple de realizare, anticorpus anti-ICOS cuprinde cele șase CDR descrise mai sus, se leagă de ICOS și crește numărul de celule Teff și/sau activează celulele Teff și/sau scade numărul celulelor Treg și/sau crește raportul dintre celulele Teff și

celulele Treg la un mamifer, precum un om. In unele exemple de realizare, celulele Treg sunt celule T CD4+ FoxP3+. In unele exemple de realizare, celulele Teff sunt celule T CD8+. In unele exemple de realizare, celulele Teff sunt celule T CD4+ FoxP3- și/sau celule T CD8+.

5 In unele cazuri, este prevăzut un anticorp anti-ICOS care concurează cu un anticorp anti-ICOS descris aici pentru legarea la ICOS. În unele cazuri, un anticorp care concurează pentru legarea cu oricare dintre anticorpilor prevăzuți aici poate fi realizat și/sau utilizat.

10 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 12; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 13; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 14.

In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 22; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 23; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 24.

15 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 32; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 33; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 34.

20 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 42; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 43; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 44.

25 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 52; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 53; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 54.

In unele exemple de realizare, anticorpul anti-ICOS cuprinde toate trei secvențele VH CDR (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 62; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 63; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 64.

30 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 72; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 73; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 74.

35 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 82; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 83; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 84.

40 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 92; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 93; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 94.

45 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 102; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 103; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 104.

50 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 112; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 113; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 114.

In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 122; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 123; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 124.

55 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 132; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 133; (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 134.

60 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID

LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 116; (c) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 117.

In unele cazuri, anticorpus cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (a) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 125; (b) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 126; (c) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 127.

In unele cazuri, anticorpus cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (a) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 135; (b) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 136; (c) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 137.

In unele cazuri, anticorpus cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (a) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 145; (b) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 146; (c) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 147.

In unele cazuri, anticorpus cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (a) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 155; (b) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 156; (c) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 157.

In unele cazuri, anticorpus cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (a) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 165; (b) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 166; (c) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 167.

In unele cazuri, anticorpus cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (a) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 175; (b) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 176; (c) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 177.

In unele cazuri, anticorpus cuprinde cel puțin una, cel puțin două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (a) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 185; (b) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 186; (c) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 187.

In unele cazuri, oricare dintre cele șase CDR prevăzute aici pot fi combinate ca subpărți cu oricare dintre celelalte CDR prevăzute aici, pentru un total de șase CDR într-un construct. Astfel, în unele cazuri, două CDR de la un prim anticorpus (de exemplu HCDR1 și HCDR2) pot fi combinate cu patru CDR de la un al doilea anticorpus (HCDR3, LCDR1, LCDR2 și LCDR3). În unele cazuri, două sau mai puține reziduuri în una sau mai multe dintre CDR pot fi înlocuite pentru a obține o variantă a acestora. În unele cazuri, două sau mai puține reziduuri pot fi înlocuite în 1, 2, 3, 4, 5 sau 6 dintre CDR.

In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzand cel puțin una, două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 12; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 13; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 14; și (II) un domeniu VL care cuprinde cel puțin una, două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 15; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 16; și (f) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 17.

In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzand cel puțin una, două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 22; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 23; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 24; și (II) un domeniu VL care cuprinde cel puțin una, două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 25; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 26; și (f) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 27.

In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzand cel puțin una, două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 32; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 33; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 34; și (II) un domeniu VL care cuprinde cel puțin una, două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 35; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 36; și (f) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 37.

5

10

20

25

35

40

50

60

secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 116; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 117.

5 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzand cel puțin una, două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 122; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 123; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 124; și (II) un domeniu VL care cuprinde cel puțin una, două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 125; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 126; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 127.

10 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzand cel puțin una, două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 132; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 133; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 134; și (II) un domeniu VL care cuprinde cel puțin una, două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 135; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 136; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 137.

20 In unele exemple de realizare, anticorpul anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzand cel puțin una, două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 142; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 143; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 144; și (II) un domeniu VL care cuprinde cel puțin una, două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 145; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 146; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 147.

25 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzand cel puțin una, două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 152; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 153; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 154; și (II) un domeniu VL care cuprinde cel puțin una, două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 155; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 156; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 157.

35 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzand cel puțin una, două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 162; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 163; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 164; și (II) un domeniu VL care cuprinde cel puțin una, două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 165; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 166; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 167.

40 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzand cel puțin una, două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 172; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 173; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 174; și (II) un domeniu VL care cuprinde cel puțin una, două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 175; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 176; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 177.

50 In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzand cel puțin una, două sau toate trei secvențele VH CDR selectate dintre (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 182; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 183; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 184; și (II) un domeniu VL care cuprinde cel puțin una, două sau toate trei secvențele VL CDR selectate dintre (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 185; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 186; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 187.

60 In unele exemple de realizare, un anticorp anti-ICOS cuprinde o secvență a domeniului variabil al lanțului greu (VH) având cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate de secvență cu secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 60. În unele

cazuri, o secvență VH având cel puțin o identitate 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% conține substituții (de exemplu, substituții conservatoare), inserții sau deleții în relație cu secvența de referință, însă un anticorp anti-ICOS care cuprinde acea secvență își păstrează abilitatea de a se lega de ICOS. În unele cazuri, un total de 1 până la 10 aminoacizi au fost înlocuiți, inserați și/sau șterși în SECV ID NR: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 sau 180. În unele cazuri, substituțiile, inserțiile sau delețiile apar în regiuni din afara CDR (adică în FR). Opțional, anticorpul anti-ICOS cuprinde secvența VH cu SECV ID NR: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 sau 180, incluzând modificări posttranslaționale ale secvenței respective.

10 In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 12; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 13; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 14.

15 In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 22; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 23; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 24.

In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 32; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 33; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 34.

20 In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 42; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 43; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 44.

In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 52; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 53; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 54.

25 In invenție, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 62; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 63; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 64.

In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 72; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 73; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 74.

30 In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 82; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 83; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 84.

35 In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 92; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 93; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 94.

In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 102; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 103; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 104.

40 In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 112; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 113; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 114.

45 In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 122; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 123; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 124.

In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 132; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 133; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 134.

50 In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 142; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 143; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 144.

In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 152; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 153; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 154.

55 In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 162; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 163; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 164.

60 In unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 172; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 173; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 174.

În unele cazuri, VH cuprinde: (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 182; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 183; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 184.

În unele exemple de realizare, un anticorp anti-ICOS este prevăzut, unde anticorpul cuprinde un domeniul variabil al lanțului ușor (VL) având cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate de secvență cu secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 61. În unele cazuri, o secvență VL având cel puțin o identitate 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% conține substituții (de exemplu, substituții conservatoare), inserții sau deleții în relație cu secvența de referință, însă un anticorp anti-ICOS care cuprinde acea secvență își păstrează abilitatea de a se lega de ICOS. În unele cazuri, un total de 1 până la 10 aminoacizi au fost înlocuiți, inserați și/sau șterși în SECV ID NR: 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 sau 181. În unele cazuri, substituțiile, inserțiile sau delețiile apar în regiuni din afara CDR (adică în FR). Opțional, anticorpul anti-ICOS cuprinde secvența VL cu SECV ID NR: 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 sau 181, incluzând modificări posttranslaționale ale secvenței respective.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 15; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 16; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 17.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 25; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 26; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 27.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 35; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 36; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 37.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 45; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 46; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 47.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 55; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 56; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 57.

În invenție, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 65; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 66; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 67.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 75; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 76; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 77.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 85; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 86; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 87.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 95; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 96; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 97.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 105; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 106; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 107.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 115; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 116; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 117.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 125; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 126; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 127.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 135; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 136; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 137.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 145; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 146; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 147.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 155; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 156; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 157.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 165; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 166; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 167.

5 În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 175; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 176; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 177.

În unele cazuri, VL cuprinde: (a) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 185; (b) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 186; și (c) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 187.

10 În unele exemple de realizare, anticorpus anti-ICOS cuprinde o secvență de domeniu variabil al lanțului greu (VH) având cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate de secvență cu secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 60 și un domeniu variabil al lanțului ușor (VL) având cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate de secvență cu secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 61.
15 În unele cazuri, o secvență VH având o identitate de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% conține substituții (de exemplu substituții conservatoare), inserții sau deleții în relație cu secvența de referință și o secvență VL având o identitate de cel puțin 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% conține substituții (de exemplu substituții conservatoare), inserții sau deleții în relație cu secvența de referință, însă un anticorpus anti-ICOS cuprinzând acea secvență își păstrează abilitatea de a se lega de ICOS. În unele cazuri, un total de 1 până la 10 aminoacizi au fost înlocuiți, înserați și/sau șterși în SECV ID NR: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 sau 180. În unele cazuri, un total de 1 până la 10 aminoacizi au fost înlocuiți, înserați și/sau șterși în SECV ID NR: 11,21,31,41,51,61,71,81,91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 sau 181. În unele cazuri, substituțiile, inserțiile sau delețiile apar în regiuni din afara CDR (adică în FR). Opțional, anticorpus anti-ICOS cuprinde secvența VH în SECV ID NR: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 sau 180 și secvența VL cu SECV ID NR: 11,21,31,41,51,61,71,81,91,101,111,121,131,141,151, 161, 171 sau 181 care include modificări posttranslaționale a uneia sau a ambelor secvențe.

30 În unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzând: (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 12; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 13; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 14; și (II) un domeniu VL cuprinzând: (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 15; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 16; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 17.

În unele exemple de realizare, anticorpus anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzând: (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 22; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 23; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 24; și (II) un domeniu VL cuprinzând: (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 25; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 26; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 27.

În unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzând: (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 32; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 33; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 34; și (II) un domeniu VL cuprinzând: (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 35; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 36; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 37.

În unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzând: (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 42; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 43; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 44; și (II) un domeniu VL cuprinzând: (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 45; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 46; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 47.

În unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzând: (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 52; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 53; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 54; și (II) un domeniu VL cuprinzând: (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 55; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 56; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 57.

60 În invenție, anticorpus anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzând: (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 62; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de

In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzand: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 72; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 73; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 74; și (II) un domeniu VL cuprinzand: (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 75; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 76; și (f) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 77.

In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzand: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 92; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 93; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 94; și (II) un domeniu VL cuprinzand: (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 95; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 96; și (f) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 97.

30 In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzând: (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 112; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 113; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 114; și (II) un domeniu VL cuprinzând: (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 115; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 116; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 117.

In unele cazuri, anticorpus anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzand: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 132; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 133; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 134; și (II) un domeniu VL cuprinzand: (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 135; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 136; și (f) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 137.

In unele cazuri, anticorpii anti-ICOS cuprind (I) un domeniu VH cuprinzand: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 152; (b) HCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 153; și (c) HCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 154; și (II) un domeniu VL cuprinzand: (d) LCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 155; (e) LCDR2 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 156; și (f) LCDR3 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 157.

In unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzand: (a) HCDR1 cuprinzand secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 162; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 163; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi

cu SECV ID NR: 164; și (II) un domeniu VL cuprinzând: (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 165; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 166; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 167.

5 În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzând: (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 172; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 173; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 174; și (II) un domeniu VL cuprinzând: (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 175; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 176; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 177.

10 În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS cuprinde (I) un domeniu VH cuprinzând: (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 182; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 183; și (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 184; și (II) un domeniu VL cuprinzând: (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 185; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 186; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 187.

15 În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS cuprinde un VH ca în oricare din exemplele de realizare prevăzute aici și un VL ca în oricare din exemplele de realizare prevăzute aici. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 10 și SECV ID NR: 11, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 20 și SECV ID NR: 21, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 30 și SECV ID NR: 31, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 40 și SECV ID NR: 41, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 50 și SECV ID NR: 51, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În invenție, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 60 și SECV ID NR: 61, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 70 și SECV ID NR: 71, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 80 și SECV ID NR: 81, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 90 și SECV ID NR: 91, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 100 și SECV ID NR: 101, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 110 și SECV ID NR: 111, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 120 și SECV ID NR: 121, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 130 și SECV ID NR: 131, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 140 și SECV ID NR: 141, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 150 și SECV ID NR: 151, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 160 și SECV ID NR: 161, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 170 și SECV ID NR: 171, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe. În unele cazuri, anticorpul cuprinde secvențele VH și VL cu SECV ID NR: 180 și SECV ID NR: 181, respectiv, inclusiv modificări post-translație ale acelor secvențe.

50 În unele cazuri, sunt prevăzuți anticorpi care concurează cu anticorpul anti-ICOS prevăzută în prezentul document pentru legarea la ICOS. În unele cazuri, anticorpul concurează cu anticorpul anti-ICOS prevăzută în prezentul document pentru legarea la un epitop pe ICOS.

55 În unele cazuri, analizele de concurență pot fi utilizate pentru a identifica un anticorp monoclonal care concurează cu un anticorp anti-ICOS descris aici (precum 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 sau 35A9S89) pentru a se lega de ICOS. Analizele de concurență pot fi utilizate pentru a determina dacă doi anticorpi leagă același epitop prin recunoașterea epitopilor identici sau care se suprapun steric sau un anticorp inhibă concurențial legarea unui alt anticorp la antigen. În unele cazuri, un astfel de anticorp concurent se leagă de același epitop care este legat de un anticorp descris în prezentul. Exemple de analiză de concurență includ, dar nu se limitează la, analize de rutină, cum ar fi cele prevăzute în

Harlow și Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Metode exemplificative detaliate pentru maparea unui epitop la care se leagă anticorpul sunt prevăzute în Morris (1996) „Epitope Mapping Protocols” în Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, N.J.). În unele cazuri, se afirmă că doi anticorpi se leagă de același epitop dacă fiecare blochează legarea celuilalt cu 50% sau mai mult. În unele cazuri, anticorpul care concurează cu un anticorp anti-ICOS descris aici este un anticorp himeric, umanizat sau uman. În unele cazuri, este prevăzut un anticorp care concurează cu un anticorp anti-ICOS himeric, umanizat sau uman așa cum este descris aici.

În unele cazuri, sunt prevăzuți anticorpi care se leagă de oricare unul sau mai mulți epitopi de care se leagă anticorpul prevăzută în prezentul. În unele cazuri, sunt prevăzuți anticorpi care se leagă și se suprapun unui epitop de care se leagă anticorpul prezenți. În unele cazuri, este prevăzut un anticorp care concurează cu cel puțin unul dintre anticorpul prevăzuți în prezentul. În unele cazuri, este prevăzut un anticorp care concurează cu cel puțin doi dintre anticorpul prevăzuți în prezentul. În unele cazuri, este prevăzut un anticorp care concurează cu cel puțin trei dintre anticorpul prevăzuți în prezentul. În unele cazuri, anticorpul se leagă de un epitop suprapus, ca un anticorp descris în exemplele de aici. În unele cazuri, întregul epitop este legat și/sau obstrucționat de anticorpul concurent. În unele cazuri, o parte a epitopului este legat și/sau obstrucționat de anticorpul concurent. În unele cazuri, paratopul anticorpului concurent se leagă de cel puțin o parte a epitopului unui anticorp prevăzut aici. În unele cazuri, paratopul anticorpului concurent leagă ținta și o secțiune diferită a structurii anticorpului concurent blochează cel puțin o parte a epitopului unui anticorp prevăzut aici.

Exemple de anticorpi himerici

În unele exemple de realizare, un anticorp prevăzut în prezentul este un anticorp himeric. Anumiți anticorpi himerici sunt descriși, de exemplu, în Brevetul US nr. 4.816,567; și în Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. SUA, 81 :6851-6855 (1984)). Într-un exemplu, un anticorp himeric cuprinde o regiune variabilă non-umană (de exemplu, o regiune variabilă derivată dintr-un șoarece, șobolan, hamster, iepure sau primată non-umană, cum ar fi o maimuță) și o regiune constantă umană. Într-un alt exemplu, un anticorp himeric este un anticorp „cu clasă schimbată” în care clasa sau subclasa a fost modificată din cea a anticorpului mamă. Anticorpul chimeric include fragmente de legare a antigenului ale acestora.

Exemple nelimitative de anticorpi himerici includ anticorpul care cuprind regiunile variabile ale lanțului greu și/sau lanțului ușor ale unui anticorp selectat dintre 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710, or 35A9S89. Exemple nelimitative de anticorpi himerici includ anticorpul himeric care cuprind CDR1, CDR2 și CDR3 ale lanțului greu și/sau CDR1, CDR2 și CDR3 ale lanțului ușor ale unui anticorp selectat dintre 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 sau 35A9S89. Alte exemple nelimitative de anticorpi himerici includ anticorpul care cuprind CDR1, CDR2 și CDR3 ale lanțului greu și/sau CDR1, CDR2 și CDR3 ale lanțului ușor ale unui anticorp selectat dintre 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 sau 35A9S89. În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS himeric cuprinde regiunile variabile descrise mai sus și se leagă de ICOS. În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS himeric cuprinde regiunile variabile descrise mai sus, se leagă de ICOS și crește numărul de celule Teff și/sau activează celulele Teff și/sau scade numărul celulelor Treg și/sau crește raportul dintre celulele Teff și celulele Treg. În unele cazuri, celulele Treg sunt celule T CD4+ FoxP3+. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD4+ FoxP3-. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD8+. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD4+ FoxP3- și celule T CD8+.

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS himeric, cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență de regiune variabilă care este cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică secvenței selectate dintre SECV ID NR: 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 sau 180, unde anticorpul leagă ICOS. În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS himeric, cuprinde un lanț ușor cuprinzând o secvență de regiune variabilă care este cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică secvenței selectate dintre SECV ID NR: 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 sau 181, unde anticorpul leagă ICOS. În unele exemple de realizare, un anticorp anti-ICOS himeric cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență

de regiune variabilă care este cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică secvenței selectate dintre SECV ID NR: 60; și un lanț ușor cuprinzând o secvență de regiune variabilă care este cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică secvenței selectate dintre SECV ID NR: 61; unde anticorpul leagă ICOS.

Exemple de anticorpi anti-ICOS himerici includ, de asemenea, anticorpi himerici care concurează pentru legarea la ICOS cu un anticorp sau fragment al acestuia descris aici. Astfel, în unele cazuri este prevăzut un anticorp anti-ICOS himeric care concurează pentru legarea la ICOS cu un anticorp selectat dintre 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 și 35A9S89 și fragment al acestuia. În unele cazuri, anticorpul concurează pentru legarea la ICOS și crește numărul de celule Teff și/sau activează celulele Teff și/sau scade numărul de celule Treg și/sau crește raportul celulelor Teff la celulele Treg. În unele cazuri, celulele Treg sunt celule T CD4+ FoxP3+. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD8+. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD4+ FoxP3- și celule T CD8+.

În unele cazuri, un anticorp himeric descris aici cuprinde una sau mai multe regiuni constante umane. În unele cazuri, regiunea constantă umană a lanțului greu este un izotip selectat dintre IgA, IgG și IgD. În unele cazuri, regiunea constantă umană a lanțului ușor este un izotip selectat dintre κ și λ . În unele exemple de realizare, un anticorp himeric descris aici cuprinde o regiune constantă a IgG1 umane. În unele cazuri, un anticorp himeric descris aici cuprinde o regiune constantă a lanțului greu al IgG4 umane. În unele cazuri, un anticorp himeric descris aici cuprinde o regiune constantă a IgG4 umane și un lanț ușor al κ umane.

Așa cum s-a menționat mai sus, dacă este de dorit sau nu funcția efectorie poate depinde de metoda particulară de tratament destinată pentru un anticorp. Astfel, în unele cazuri, când este de dorit funcția efectorie, este selectat un anticorp anti-ICOS himeric care cuprinde o regiune constantă a lanțului greu al IgG1 umane sau o regiune constantă a lanțului greu al IgG3 umane. În unele exemple de realizare, când funcția efectorie nu este de dorit, este selectat un anticorp anti-ICOS himeric care cuprinde o regiune constantă a lanțului greu al IgG4 sau IgG2 umane.

Exemple de anticorpi umanizați

În unele exemple de realizare, sunt prevăzuți anticorpi umanizați care leagă ICOS. Anticorpul umanizat este util ca molecule terapeutice deoarece anticorpul umanizat reduce sau elimină răspunsul imunitar uman comparativ cu anticorpul non-uman, ceea ce poate duce la un răspuns imunitar la o terapie cu anticorpi (cum ar fi răspunsul la anticorpul uman anti-șoarece (HAMA)) și scăderea eficienței terapiei.

În unele exemple de realizare, un anticorp himeric este un anticorp umanizat. În mod tipic, un anticorp non-uman este umanizat pentru a reduce imunogenicitatea la oameni, păstrând în același timp specificitatea și afinitatea anticorpilor mamă non-umani. În general, un anticorp umanizat cuprinde unul sau mai multe domenii variabile în care CDR (sau porțiuni ale acestora) sunt derivate dintr-un anticorp non-uman, iar FR (sau porțiuni ale acestora) sunt derivate din secvențe de anticorp uman. Un anticorp umanizat va cuprinde, opțional, cel puțin o porțiune dintr-o regiune constantă umană. În unele exemple de realizare, unele reziduuri FR dintr-un anticorp umanizat sunt înlocuite cu reziduurile corespunzătoare de la un anticorp non-uman (de exemplu, anticorpul din care sunt derivate reziduurile CDR), de exemplu, pentru a restabili sau îmbunătăți specificitatea sau afinitatea anticorpilor.

Anticorpul umanizat și metodele de a-i produce sunt trecute în revistă, de exemplu, în Almagro și Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13: 1619-1633 și sunt descrise în continuare, de exemplu, în Riechmann et al., (1988). *Nature* 332:323-329; Queen et al., (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033; Brevetul US nr. 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321 și 7,087,409; Kashmiri et al., (2005) *Methods* 36:25-34; Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498 (ce descrie „reieșirea la suprafață”); Dall’Acqua et al., (2005) *Methods* 36:43-60 (ce descrie „amestecarea FR”); și Osbourn et al., (2005) *Methods* 36:61-68 și Klimka et al., (2000) *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (descriind abordarea de „selecție ghidată” în cazul amestecării FR).

Regiunile cadru uman care pot fi utilizate pentru umanizare includ, dar nu se limitează la: regiuni cadru selectate utilizând metoda „cea mai bună potrivire” (a se vedea, de exemplu, Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151 :2296); regiunile cadru derivate din secvența consens a anticorpilor umani dintr-o subgrupă particulară de regiuni variabile ale lanțului ușor sau greu (a se vedea, de exemplu, Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; și Presta et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2623); regiuni cadru mature umane (cu mutație somatică) sau regiuni cadru de linie

germinală umană (a se vedea, de exemplu, Almagro și Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633); și regiuni cadru derivate din selecția bibliotecilor FR (a se vedea, de exemplu, Baca et al., (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684 și Rosok et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271 :22611-22618).

Exemple nelimitative de anticorpi umanizați includ 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 și 35A9S89 descriși aici. Exemple nelimitative de anticorpi umanizați includ, de asemenea, anticorpi care cuprind o regiune variabilă a lanțului greu a unui anticorp selectat dintre 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 și 35A9S89 și/sau o regiune variabilă a lanțului ușor al unui anticorp selectat dintre 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 și 35A9S89. Exemple nelimitative de anticorpi umanizați includ anticorpi care cuprind o regiune variabilă a lanțului greu selectată dintre SECV ID NR: 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, și 180 și/sau o regiune variabilă a lanțului ușor selectată dintre SECV ID NR: 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 și 181. Exemple de anticorpi umanizați includ, însă nu sunt limitate la, anticorpi umanizați care cuprind CDR1, CDR2 și CDR3 ale lanțului greu și/sau CDR1, CDR2 și CDR3 ale lanțului ușor ale unui anticorp selectat dintre 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 și 35A9S89. În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS umanizat cuprinde CDR așa cum este descris mai sus și se leagă de ICOS. În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS umanizat cuprinde CDR descrise mai sus, se leagă de ICOS și crește numărul de celule Teff și/sau activează celulele Teff și/sau scade numărul celulelor Treg și/sau crește raportul dintre celulele Teff și celulele Treg. În unele cazuri, celulele Treg sunt celule T CD4⁺ FoxP3⁺. În unele exemple de realizare, celulele Teff sunt celule T CD8⁺. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD4⁺ FoxP3⁻ și celule T CD8⁺.

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS umanizat cuprinde CDR1, CDR2 și CDR3 ale unui lanț greu și/sau CDR1, CDR2 și CDR3 ale unui lanț ușor ale unui anticorp selectat dintre 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 și 35A9S89.

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS umanizat, cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență de regiune variabilă care este cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică secvenței selectate dintre SECV ID NR: 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 și 180 și unde anticorpul leagă ICOS. În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS umanizat, cuprinde un lanț ușor cuprinzând o secvență de regiune variabilă care este cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică secvenței selectate dintre SECV ID NR: 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, și 181, unde anticorpul leagă ICOS. În unele exemple de realizare, un anticorp anti-ICOS umanizat cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență de regiune variabilă care este cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică secvenței selectate dintre SECV ID NR: 60; și un lanț ușor cuprinzând o secvență de regiune variabilă care este cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică secvenței selectate dintre SECV ID NR: 61; unde anticorpul leagă ICOS.

În unele cazuri, oricare una sau mai multe dintre secvențele CDR prevăzute aici sunt menținute, în timp ce regiunea de lanț greu, de lanț ușor sau de lanț greu și ușor rămasă (adică FR1, FR2, FR3 și FR4) este cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică unei secvențe selectate dintre SECV ID NR: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 și 181.

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS umanizat cuprinde cel puțin una dintre CDR discutate aici. Adică, în unele cazuri, un anticorp anti-ICOS umanizat cuprinde cel puțin o CDR selectată dintre o CDR1 a lanțului greu discutată aici, o CDR2 a lanțului greu discutată aici, o CDR3 a lanțului greu discutată aici, o CDR1 a lanțului ușor discutată aici, o CDR2 a lanțului ușor discutată aici și o CDR3 a lanțului ușor discutată aici. În plus, în unele cazuri, un anticorp anti-ICOS umanizat cuprinde cel puțin o CDR cu mutație bazată pe o CDR discutată aici, unde CDR cu mutație cuprinde 1, 2, 3 sau 4 substituții de aminoacizi în raport cu CDR discutată aici. În unele cazuri, una sau mai multe dintre substituțiile de aminoacizi sunt substituții de aminoacizi conservatoare. O persoană de specialitate în domeniu poate selecta una sau mai multe substituții de

aminoacizi conservatoare adecvate pentru o anumită secvență CDR, unde substituțiile de aminoacizi conservatoare adecvate nu sunt prevăzute a modifica semnificativ proprietățile de legare ale anticorpului care cuprinde CDR cu mutație.

Exemple de anticorpi anti-ICOS umanizați includ, de asemenea, anticorpi umanizați care concurează pentru legarea la ICOS cu un anticorp sau fragment al acestuia descris aici. Astfel, în unele cazuri este prevăzut un anticorp anti-ICOS umanizat care concurează pentru legarea la ICOS cu un anticorp sau fragment al acestuia selectat dintre 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 și 35A9S89. În unele cazuri este prevăzut un anticorp anti-ICOS umanizat care concurează pentru legarea la ICOS cu un anticorp sau fragment al acestuia selectat dintre 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 și 35A9S89 și crește numărul de celule Teff și/sau activează celulele Teff și/sau scade numărul de celule Treg și/sau crește raportul de celule Teff la celulele Treg. În unele cazuri, celulele Treg sunt celule T CD4+ FoxP3+. În unele exemple de realizare, celulele Teff sunt celule T CD8+. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD4+ FoxP3- și celule T CD8+.

În unele exemple de realizare, un anticorp anti-ICOS umanizat cuprinde un lanț greu cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 188 și un lanț ușor cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 189.

Exemplare de anticorpi umani

În unele exemple de realizare, un anticorp anti-ICOS prevăzut în prezentul este un anticorp uman. Anticorpii umani pot fi produși folosind diverse tehnici cunoscute în stadiul tehnicii. Anticorpii umani sunt descriși în general în van Dijk și van de Winkel (2001) Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-374 și Lonberg, (2008) Curr. Opin. Immunol. 20:450-459. În unele exemple de realizare, anticorpul uman nu este un anticorp în stare naturală. În unele exemple de realizare, anticorpul uman este un anticorp monoclonal; astfel, în unele exemple de realizare, fiecare dintre anticorpii umani dintr-un set se pot lega de același epitop pe antigen.

Anticorpii umani pot fi preparați prin administrarea unui imunogen la un animal transgenic care a fost modificat pentru a produce anticorpi umani intacti sau anticorpi intacti cu regiuni variabile umane ca răspuns la provocarea antigenică. Aceste animale conțin în mod obișnuit toate sau o parte din locii umani ai imunoglobulinei, care înlocuiesc locii endogeni ai imunoglobulinei sau care sunt prezenți extracromozomial sau integrați aleatoriu în cromozomii animalului. La acești șoareci transgenici, locii endogeni ai imunoglobulinei au fost în general inactivați. Pentru trecerea în revistă a metodelor de obținere a anticorpilor umani de la animale transgenice, a se vedea Lonberg, (2005) Nat. Biotech. 23: 1117-1125. A se vedea de asemenea, de exemplu, Brevetul US Nr. 6,075,181 și 6,150,584 care descriu tehnologia XENOMOUSE™; Brevetul US Nr. 5,770,429 care descrie tehnologia HUMAB®; Brevetul US Nr. 7,041,870 care descrie tehnologia K-M MOUSE® și Cererea de publicare a brevetului US nr. US 2007/0061900, care descrie tehnologia VELOCIMOUSE®). Regiunile variabile umane de la anticorpi intacti generați de astfel de animale pot fi modificate suplimentar, de exemplu, prin combinarea cu o regiune constantă umană diferită.

Anticorpii umani pot fi, de asemenea, produși prin metode bazate pe hibridom. Au fost descrise linii celulare de mielom uman și heteromielom șoarece-om pentru producerea anticorpilor monoclonali umani. (A se vedea, de exemplu, Kozbor (1984) J. Immunol., 133: 3001; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); și Boerner et al, (1991) J. Immunol., 147:86). Anticorpii umani generați prin tehnologia hibridomului cu celule B umane sunt descriși și în Li et al., (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562. Metode suplimentare includ cele descrise, de exemplu, în brevetul US nr. 7.189.826 (care descrie producția de anticorpi IgM umani monoclonali din liniile celulare de hibridom) și Ni, (2006) Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (care descrie hibridoamele om-om). Tehnologia hibridomului uman (tehnologia Trioma) este descrisă și în Vollmers și Brandlein, (2005) Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) și Vollmers și Brandlein, (2005) Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3): 185-191.

Anticorpii umani pot fi, de asemenea, generați prin izolarea secvențelor de domeniu variabil al clonei Fv selectate din biblioteci de afișare a fagelor derivate de la om. Astfel de secvențe ale domeniului variabil pot fi apoi combinate cu un domeniu constant uman dorit. Tehnicile pentru selectarea anticorpilor umani din biblioteci de anticorpi sunt descrise mai jos.

Anticorpul pot fi izolați prin intermediul filtrării bibliotecilor combinatoriale pentru găsirea anticorpilor cu activitatea sau activitățile dorite. De exemplu, o varietate de metode sunt cunoscute în stadiul tehnicii pentru generarea bibliotecilor de afișare a fagelor și pentru filtrarea acestor biblioteci pentru găsirea anticorpilor care posedă caracteristicile de legare dorite. Aceste metode sunt trecute în revistă, de exemplu, în Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) și descrise suplimentar, de exemplu, în McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554; Clackson et al. (1991) *Nature* 352: 624-628; Marks et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597; Marks și Bradbury, în *Methods in Molecular Biology* 248: 161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310; Lee et al., (2004) *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093; Fellouse, (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472; și Lee et al. (2004) *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 și publicația PCT WO 99/10494.

În anumite metode de afișare a fagelor, repertoriile ale genelor VH și VL sunt clonate separat de reacția în lanț polimerază (PCR) și sunt recombinate aleatoriu în biblioteci de fage, care pot fi apoi filtrate pentru găsirea fagelor cu legare de antigen, după cum se descrie în Winter et al., (1994) *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455. De obicei, fagele prezintă fragmente de anticorp, fie ca fragmente Fv cu lanț unic (scFv), fie ca fragmente Fab. Bibliotecile de la surse imunizate furnizează anticorpi cu afinitate ridicată la imunogen fără cerința de construire a hibridoamelor. Alternativ, repertoriul netratat anterior poate fi clonat (de exemplu, de la om) pentru a furniza o singură sursă de anticorpi unei game largi de non-auto-antigeni și, de asemenea, auto-antigeni fără imunizare, conform descrierii din Griffiths et al., (1993) *EMBO J* 12:725-734. În final, bibliotecile netratate anterior pot fi realizate și sintetic, clonând segmentele de gene V nerearanjate din celulele stem și folosind primeri PCR care conțin secvențe aleatorii pentru a codifica regiunile CDR3 extrem de variabile și pentru a realiza rearanjarea in vitro, așa cum este descris de Hoogenboom și Winter (1992), *J. Mol. Biol.* 227:381-388. Publicațiile de brevet care descriu bibliotecile de fage de anticorpi umani includ, de exemplu: Brevetul US nr. 5,750,373, și Publicațiile de brevet US nr. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 și 2009/0002360.

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS uman se leagă de o polipeptidă având secvența cu SECV ID NR: 1 sau 2. În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS uman se leagă de ICOS și crește numărul de celule Teff și/sau activează celulele Teff și/sau scade numărul celulelor Treg și/sau crește raportul dintre celulele Teff și celulele Treg. În unele cazuri, celulele Treg sunt celule T CD4+ FoxP3+. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD8+. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD4+ FoxP3- și celule T CD8+.

Exemple de anticorpi anti-ICOS umani includ, de asemenea, anticorpi care concurează pentru legarea la ICOS cu un anticorp uman sau fragment al acestuia descris aici. Astfel, în unele cazuri este prevăzut un anticorp anti-ICOS uman care concurează pentru legarea la ICOS cu un anticorp sau fragment al acestuia selectat dintre 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 și 35A9S89. În unele cazuri este prevăzut un anticorp anti-ICOS uman care concurează pentru legarea la ICOS cu un anticorp sau fragment al acestuia selectat dintre 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 și 35A9S89 și crește numărul de celule Teff și/sau activează celulele Teff și/sau scade numărul de celule Treg și/sau crește raportul de celule Teff la celulele Treg. În unele cazuri, celulele Treg sunt celule T CD4+ FoxP3+. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD8+. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD4+ FoxP3- și celule T CD8+.

În unele cazuri, este prevăzut un anticorp anti-ICOS uman himeric, în care anticorpul cuprinde regiunea variabilă de la un anticorp uman care leagă ICOS și regiunea constantă de la un anticorp uman diferit. În unele cazuri, este prevăzut un anticorp anti-ICOS uman himeric, în care anticorpul cuprinde CDR de la un anticorp uman care leagă ICOS și un cadru de la un anticorp uman diferit. În unele cazuri, anticorpul nu este un anticorp uman în stare naturală.

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS uman cuprinde una sau mai multe regiuni constante umane. În unele cazuri, regiunea constantă umană a lanțului greu este un izotip selectat dintre IgA, IgG și IgD. În unele cazuri, regiunea constantă umană a lanțului ușor este un izotip selectat dintre κ și λ. În unele exemple de realizare, un anticorp uman descris aici cuprinde o regiune constantă a IgG1 umane. În unele cazuri, un anticorp uman descris aici cuprinde o regiune constantă a lanțului greu al IgG4 umane. În unele cazuri, un anticorp uman descris aici cuprinde o regiune constantă a IgG4 umane și un lanț ușor al κ umane.

În unele cazuri, când este de dorit funcția efectoare, este selectat un anticorp anti-ICOS uman care cuprinde o regiune constantă a lanțului greu al IgG1 umane sau o regiune constantă a

lanțului greu al IgG3 umane. În unele cazuri, când funcția efectoare nu este de dorit, este selectat un anticorp anti-ICOS uman care cuprinde o regiune constantă a lanțului greu al IgG4 sau IgG2 umană.

5 După cum se menționează aici, termenul „anticorp uman” denotă genul de secvențe posibile pentru constructul anticorpilor, nu o sursă de anticorpi.

Exemple de regiuni constante de anticorpi

10 În unele cazuri, un anticorp descris aici cuprinde una sau mai multe regiuni constante umane. În unele cazuri, regiunea constantă umană a lanțului greu este un izotip selectat dintre IgA, IgG și IgD. În unele cazuri, regiunea constantă umană a lanțului ușor este un izotip selectat dintre κ și λ . În unele exemple de realizare, un anticorp descris aici cuprinde o regiune constantă a IgG1 umane. În unele cazuri, un anticorp descris aici cuprinde o regiune constantă a lanțului greu al IgG4 umane. În unele cazuri, un anticorp descris aici cuprinde o regiune constantă a IgG4 umane și un lanț ușor al κ umane.

15 Pe parcursul întregii descrieri și al revendicărilor, cu excepția cazului în care se specifică explicit sau se cunoaște de o persoană de specialitate în domeniu, numerotarea reziduurilor într-un lanț greu al imunoglobulinei este cea a indexului UE conform Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), incorporate în mod expres aici prin referință. „Indexul UE conform Kabat” se referă la numerotarea reziduurilor din anticorpii UE al IgG1 umane.

20 Așa cum s-a menționat mai sus, dacă este de dorit sau nu funcția efectoare poate depinde de metoda particulară de tratament destinată pentru un anticorp. Astfel, în unele exemple de realizare, când este de dorit funcția efectoare, este selectat un anticorp anti-ICOS care cuprinde o regiune constantă a lanțului greu al IgG1 umane sau o regiune constantă a lanțului greu al IgG3 umane. În unele cazuri, când funcția efectoare nu este de dorit, este selectat un anticorp anti-ICOS care cuprinde o regiune constantă a lanțului greu al IgG4 sau IgG2 umană.

25 În unele cazuri, un anticorp cuprinde o regiune Fc variantă, cu cel puțin o substituție de aminoacizi în comparație cu regiunea Fc a unei IgG de tip sălbatic sau a unui anticorp de tip sălbatic. În unele cazuri, regiunea Fc variantă are două sau mai multe substituții de aminoacizi în regiunea Fc a anticorpului de tip sălbatic. În unele cazuri, regiunea Fc variantă are trei sau mai multe substituții de aminoacizi în regiunea Fc a anticorpului de tip sălbatic. În unele cazuri, regiunea Fc variantă are cel puțin una, două sau trei sau mai multe substituții ale aminoacizilor în regiunea Fc descrise aici. În unele cazuri, regiunea Fc variantă din prezentul va avea cel puțin 30 aproximativ 80% omologie cu o regiune Fc a unei secvențe native și/sau cu o regiune Fc a unei polipeptide mamă. În unele cazuri, regiunea Fc variantă din prezentul va avea cel puțin aproximativ 90% omologie cu o regiune Fc a unei secvențe native și/sau cu o regiune Fc a unei polipeptide mamă. În unele cazuri, regiunea Fc variantă din prezentul va avea cel puțin 35 aproximativ 95% omologie cu o regiune Fc a unei secvențe native și/sau cu o regiune Fc a unei polipeptide mamă.

40 În unele cazuri, un anticorp prevăzut în prezentul este modificat pentru a crește sau scădea măsura în care anticorpii sunt glicozilați. Adăugarea sau deleția situsurilor de glicozilare la un anticorp poate fi realizată convenabil prin modificarea secvenței de aminoacid, astfel încât să fie creat sau îndepărtat unul sau mai multe situsuri de glicozilare.

45 Acolo unde anticorpii cuprinde o regiune Fc, carbohidratul atașat la acesta poate fi modificat. Anticorpii nativi produși de celulele de la mamifer cuprind în mod tipic o oligozaharidă biantenară ramificată, care este în general atașată printr-o legătură N la Asn297 din domeniul CH2 al regiunii Fc. A se vedea, de exemplu Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997). Oligozaharida poate include diverși carbohidrați, de exemplu, manoză, N-acetil glucozamină (GlcNAc), 50 galactoză și acid sialic, precum și o fucoză atașată la o GlcNAc în „tija” structurii oligozaharidei biantenară. În unele cazuri, se pot face modificări ale oligozaharidei într-un anticorp pentru a crea variante de anticorpi cu anumite proprietăți îmbunătățite.

55 În unele cazuri, variante de anticorpi sunt prevăzute, având o structură de carbohidrați căreia îi lipsește fucoza atașată (direct sau indirect) la o regiune Fc. De exemplu, cantitatea de fucoză dintr-un asemenea anticorp poate fi de la 1% la 80%, de la 1% la 65%, de la 5% la 65% sau de la 20% la 40%. Cantitatea de fucoză este determinată prin calcularea cantității medii de fucoză în cadrul lanțului de zahăr la Asn297, raportat la suma tuturor glicosecturilor atașate la Asn 297 (de exemplu structuri complexe, hibride și cu conținut ridicat de manoză), așa cum este măsurat prin spectrometria de masă MALDI-TOF, așa cum se descrie în WO 2008/077546, de exemplu. 60 Asn297 se referă la reziduurile de asparagină situate la aproximativ poziția 297 din regiunea Fc (numerotarea UE a reziduurilor din regiunea Fc); cu toate acestea, Asn297 se poate localiza la

aproximativ ± 3 aminoacizi în amonte sau în aval de poziția 297, adică între pozițiile 294 și 300, din cauza variațiilor minore de secvență în anticorpi. Astfel de variante de fucozilare pot avea funcție ADCC îmbunătățită. A se vedea, de exemplu, Publicația brevetului US Nr. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Exemple de publicații legate de variantele de anticorpi „defucozilate” sau „fucoză-deficitare” includ: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Exemple de linii celulare capabile să producă anticorpi defucozilați includ celule CHO Lec13 cu deficiență de fucozilare proteică (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); Cererea de brevet US nr. US 2003/0157108 A1, Presta, L; și WO 2004/056312 A1, Adams et al., în special la Exemplul 11), și linii celulare knockout, precum gena α -1,6-fucoziltransferază, FUT8, celule CHO knockout (a se vedea, de exemplu, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); și WO2003/085107).

Variante de anticorpi sunt prevăzute în continuare cu oligozaharide bisectate, de exemplu, în care o oligozaharidă biantenară atașată la regiunea Fc a anticorpului este bisectată de GlcNAc. Astfel de variante de anticorpi pot avea fucozilare redusă și/sau funcție ADCC îmbunătățită. Exemple de asemenea variante de anticorpi sunt descrise, de exemplu, în WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); Brevetul US nr. 6,602,684 (Umana et al.); și US 2005/0123546 (Umana et al.). Sunt prevăzute, de asemenea, variante de anticorpi cu cel puțin un reziduu de galactoză în oligozaharida atașată la regiunea Fc. Astfel de variante de anticorpi pot avea funcție CDC îmbunătățită. Asemenea variante de anticorpi sunt descrise, de exemplu, în WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); și WO 1999/22764 (Raju, S.).

Sunt prevăzute, de asemenea, variante de anticorpi cu prelungiri ale secvențelor lider amino-terminale. De exemplu, unul sau mai multe reziduuri de aminoacizi ale secvenței lider amino-terminale sunt prezente la amino-terminalul oricărui unu sau mai multe lanțuri grele sau ușoare ale unui anticorp. Un exemplu de prelungire a secvenței lider amino-terminale cuprinde sau constă din trei reziduuri de aminoacizi, VHS, prezentă pe unul sau pe ambele lanțuri ușoare ale unei variante de anticorp.

Timpul de înjumătățire in vivo sau seric al polipeptidelor de legare cu afinitate ridicată pentru FcRn umană poate fi analizat, de exemplu, la șoareci transgenici, la oameni sau la primat non-umane la care se administrează polipeptidele cu o regiune Fc variantă. De asemenea, a se vedea, de exemplu, Petkova et al. International Immunology 18(12):1759-1769 (2006).

În unele cazuri, varianta de anticorp mediază ADCC în prezența celulelor efectoare umane mai eficient decât un anticorp părinte. În unele cazuri, varianta de anticorpi este substanțial mai eficientă la medierea ADCC in vitro, atunci când cantitățile de variantă de polipeptidă și anticorp mamă utilizate în analiză sunt în esență la fel. În unele cazuri, varianta de anticorpi este substanțial mai eficientă la medierea ADCC in vivo, atunci când cantitățile de variantă de polipeptidă și anticorp mamă utilizate în analiză sunt în esență la fel. În general, astfel de variante vor fi identificate utilizând analiza in vitro ADCC conform celor dezvăluite aici, dar alte analize sau metode pentru determinarea activității ADCC, de exemplu, într-un model animal *etc.*, sunt avute în vedere.

Exemple de conjugări ai anticorpilor

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS este conjugat cu o altă moleculă. În unele cazuri, molecula suplimentară poate fi un marker detectabil, cum ar fi o etichetă. În unele cazuri, molecula suplimentară poate fi o moleculă terapeutică, cum ar fi un agent citotoxic. În unele cazuri, o etichetă și/sau un agent citotoxic pot fi conjugate cu anticorpul. Așa cum este utilizat aici, o etichetă este o fracțiune care facilitează detectarea anticorpilor și/sau facilitează detectarea unei molecule la care se leagă anticorpul. Exemple nelimitative de etichete includ, dar nu sunt limitate la radioizotopi, grupuri fluorescente, grupuri enzimatic, grupuri chimioluminiscente, biotină, etichete epitop, etichete cu legare metal *etc.* O persoană de specialitate în domeniu poate selecta o etichetă adecvată conform aplicației specifice.

Așa cum este utilizat aici, un agent citotoxic este o fracțiune care reduce capacitatea proliferativă a uneia sau mai multor celule. O celulă are o capacitate proliferativă redusă atunci când celula devine mai puțin capabilă să se prolifereze, de exemplu, deoarece celula este supusă apoptozei sau moare în alt mod, celula nu mai trece prin ciclul celular și/sau nu se divizează, celula se diferențiază *etc.* Exemple nelimitative de agenți citotoxici includ, dar nu sunt limitate la, radioizotopi, toxine și agenți chimioterapeutici. O persoană de specialitate în domeniu poate selecta un agent citotoxic adecvat conform aplicației intenționate. În unele cazuri, agentul citotoxic

este cel puțin unul dintre un anti-metabolit, un agent de alchilare, un antibiotic, un factor de creștere, o citokină, un agent anti-angiogenic, un agent anti-mitotic, o antraciclina, o toxină sau un agent apoptotic.

În unele cazuri, o etichetă și/sau un agent citotoxic este conjugat cu un anticorp, folosind metode chimice in vitro. Exemple nelimitative de metode chimice de conjugare sunt cunoscute în stadiul tehnicii și includ servicii, metode și/sau reactivi disponibili pe piață de la, de exemplu, Thermo Scientific Life Science Research Produces (anterior Pierce; Rockford, 111.), Prozyme (Hayward, Calif.), SACRI Antibody Services (Calgary, Canada), AbD Serotec (Raleigh, N.C.), etc. În unele cazuri, atunci când o etichetă și/sau un agent citotoxic este o polipeptidă, eticheta și/sau agentul citotoxic pot fi exprimate din același vector de exprimare cu cel puțin un lanț de anticorp pentru a produce o polipeptidă care cuprinde eticheta și/sau agentul citotoxic fuzionat pe un lanț de anticorp. O persoană de specialitate în domeniu poate selecta o metodă adecvată pentru conjugarea unei etichete și/sau a unui agent citotoxic la un anticorp conform aplicației intenționate.

În unele cazuri, conjugarea poate fi covalentă. În unele cazuri, conjugarea poate fi necovalentă. În unele cazuri, conjugarea se poate realiza printr-o interacțiune de legare specifică, de exemplu, prin legarea unui anticorp secundar.

Exemple de secvențe lider

Pentru ca unele proteine secretate să exprime și să fie secretate în cantități mari, poate fi dorit o secvență lider de la o proteină heterologă. În unele cazuri, utilizarea de secvențe lider heteroloage poate fi avantajoasă prin faptul că o polipeptidă matură rezultată poate rămâne neschimbată atunci când secvența lider este eliminată în ER în timpul procesului de secreție. Adăugarea unei secvențe lider heteroloage poate fi utilă pentru a exprima și secreta unele proteine.

Anumite exemple de secvențe lider sunt descrise, de exemplu, în Baza de date online a secvențelor lider, păstrată de Departamentul de Biochimie, Universitatea Națională din Singapore. A se vedea Choo et al., BMC Bioinformatics, 6: 249 (2005); și Publicația PCT nr. WO 2006/081430.

IV. Exprimarea și producția anticorpilor

Molecule de acid nucleic care codifică anticorpi anti-ICOS

Sunt prevăzute aici molecule de acid nucleic care cuprind polinucleotide care codifică unul sau mai multe lanțuri ale unui anticorp anti-ICOS. În unele cazuri, o moleculă de acid nucleic cuprinde o polinucleotidă care codifică un lanț greu sau un lanț ușor al unui anticorp anti-ICOS. În unele exemple de realizare, o moleculă de acid nucleic cuprinde atât o polinucleotidă care codifică un lanț greu cât și o polinucleotidă care codifică un lanț ușor ale unui anticorp anti-ICOS. În unele exemple de realizare, o primă moleculă de acid nucleic cuprinde o primă polinucleotidă care codifică un lanț greu și o a doua moleculă de acid nucleic cuprinde o a doua polinucleotidă care codifică un lanț ușor.

În unele exemple de realizare, lanțul greu și lanțul ușor sunt exprimate dintr-o moleculă de acid nucleic sau din două molecule de acid nucleic separate, ca două polipeptide separate. În unele exemple de realizare, cum ar fi atunci când un anticorp este un scFv, o singură polinucleotidă codifică o singură polipeptidă, cuprinzând atât un lanț greu, cât și un lanț ușor legate între ele.

În unele cazuri, o polinucleotidă care codifică un lanț greu sau un lanț ușor al unui anticorp anti-ICOS cuprinde o secvență de nucleotide care codifică cel puțin una dintre CDR prevăzute aici. În unele cazuri, o polinucleotidă care codifică un lanț greu sau un lanț ușor al unui anticorp anti-ICOS cuprinde o secvență de nucleotide care codifică cel puțin 3 dintre CDR prevăzute aici. În unele exemple de realizare, o polinucleotidă care codifică un lanț greu sau un lanț ușor al unui anticorp anti-ICOS cuprinde o secvență de nucleotide care codifică cel puțin 6 dintre CDR prevăzute aici. În unele cazuri, o polinucleotidă care codifică un lanț greu sau un lanț ușor ale unui anticorp anti-ICOS cuprinde o secvență de nucleotide care codifică o secvență lider care, atunci când este translatată, se află la terminalul N al lanțului greu sau al lanțului ușor. După cum s-a discutat mai sus, secvența lider poate fi secvența lider nativă cu lanț greu sau ușor sau poate fi o altă secvență lider heterologă.

În unele cazuri, acidul nucleic este unul care codifică oricare dintre secvențele de aminoacizi pentru anticorpii din Tabelul cu secvențe de aici. În unele cazuri, acidul nucleic este unul care este cel puțin 80% identic cu un acid nucleic care codifică oricare dintre secvențele de aminoacide pentru anticorpii din Tabelul cu secvențe de aici, de exemplu, cel puțin 80, 85, 90, 91,

92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 sau 99% identică. În unele cazuri, acidul nucleic este unul care se hibridizează la oricare una sau mai multe secvențe de acid nucleic prevăzute aici. În unele cazuri, hibridizarea este în condiții moderate. În unele cazuri, hibridizarea se află în condiții extrem de stringente, cum ar fi: cel puțin aproximativ 6X SSC și 1% SDS la 65°C, cu o primă spălare timp de 10 minute la aproximativ 42°C, cu aproximativ 20% (v/v) formamidă în 0,1X SSC, și cu o spălare ulterioară cu 0,2 X SSC și 0,1% SDS la 65°C.

Moleculele de acid nucleic pot fi construite folosind tehnici de ADN recombinant, convenționale în stadiul tehnicii. În unele exemple de realizare, o moleculă de acid nucleic este un vector de exprimare care este adecvat pentru exprimarea într-o celulă gazdă selectată.

Sunt prevăzuți vectori care cuprind polinucleotide care codifică lanțuri grele anti-ICOS și/sau lanțuri ușoare anti-ICOS. Sunt de asemenea prevăzuți vectori care cuprind polinucleotide care codifică lanțuri grele anti-ICOS și/sau lanțuri ușoare anti-ICOS. Acești vectori includ, dar nu sunt limitați la vectori ADN, vectori de fage, vectori virali, vectori retrovirali *etc.* În unele exemple de realizare, un vector cuprinde o primă secvență de polinucleotide care codifică un lanț greu și o a doua secvență de polinucleotide care codifică un lanț ușor. În unele cazuri, lanțul greu și lanțul ușor sunt exprimate dintr-un vector ca două polipeptide separate. În unele cazuri, lanțul greu și lanțul ușor sunt exprimate ca parte a unei singure polipeptide, precum, de exemplu, atunci când anticorpul este un scFv.

În unele cazuri, un prim vector cuprinde o polinucleotidă care codifică un lanț greu și un al doilea vector cuprinde o polinucleotidă care codifică un lanț ușor. În unele cazuri, primul vector și al doilea vector sunt transfectate în celulele gazdă în cantități similare (precum cantități molare similare sau cantități masice similare). În unele cazuri, un raport molar sau masic între 5:1 și 1:5 al primului vector și al celui de-al doilea vector este transfectat la celulele gazdă. În unele cazuri, este utilizat un raport masic între 1:1 și 1:5 pentru vectorul care codifică lanțul greu și vectorul care codifică lanțul ușor. În unele cazuri, este utilizat un raport masic de 1:2 pentru vectorul care codifică lanțul greu și vectorul care codifică lanțul ușor.

În unele cazuri, este selectat un vector optimizat pentru exprimarea polipeptidelor în celulele CHO sau derivate din CHO sau în celulele NSO. Exemple de astfel de vectori sunt descrise, de exemplu, în Running Deer et al., *Biotechnol. Prog.* 20:880-889 (2004).

Celule gazdă

În unele cazuri, lanțurile grele ale anticorpului anti-ICOS și/sau lanțurile ușoare ale anticorpului anti-ICOS pot fi exprimate în celule procariote, cum ar fi celulele bacteriene; sau în celulele eucariote, cum ar fi celulele fungice (cum ar fi levura), celulele vegetale, celule de la insecte și celule de la mamifere. Astfel de exprimare poate fi realizată, de exemplu, în conformitate cu procedurile cunoscute în stadiul tehnicii. Exemple de celule eucariote care pot fi utilizate pentru a exprima polipeptide includ, dar nu se limitează la, celulele COS, inclusiv celulele COS 7; celule 293, inclusiv celulele 293-6E; celule CHO, inclusiv CHO-S, DG44. Celule Lec13 CHO și celule FUT8 CHO; celule PER.C6® (Crucell); și celule NSO. În unele cazuri, lanțurile grele ale anticorpului anti-ICOS și/sau lanțurile ușoare ale anticorpului anti-ICOS pot fi exprimate în levuri. A se vedea, de exemplu, Publicația brevetului US nr. 2006/0270045 A1. În unele cazuri, o celulă gazdă eucariotă particulară este selectată pe baza capacității sale de a realiza modificările post-translaționale dorite la lanțurile grele ale anticorpului anti-ICOS și/sau la lanțurile ușoare ale anticorpului anti-ICOS. De exemplu, în unele cazuri, celulele CHO produc polipeptide care au un nivel mai ridicat de sialilare decât aceeași polipeptidă produsă în celulele 293.

Introducerea unuia sau mai multor acizi nucleici într-o celulă gazdă dorită poate fi realizată prin orice metodă, inclusiv, dar fără a se limita la, transfectarea fosfatului de calciu, transfectarea mediată de DEAE-dextran, transfectarea mediată de lipide cationice, electroporare, transducție, infecție *etc.* Exemple nelimitative de metode sunt descrise, de exemplu, în Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, ed. a 3-a Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Acizii nucleici pot fi transfectați tranzitoriu sau stabil în celulele gazdă dorite, conform oricărei metode adecvate.

Sunt prevăzute, de asemenea, celule gazdă cuprinzând oricare din polinucleotidele sau vectorii descriși în prezentul. În unele exemple de realizare, este prevăzută o celulă gazdă care cuprinde un anticorp anti-ICOS. Orice celulă gazdă capabilă de supra-exprimarea ADN-urilor heteroloage pot fi utilizate în scopul izolării genelor care codifică anticorpul, polipeptida sau proteina de interes. Exemple nelimitative de celule gazdă de la mamifere includ, fără limitare, celule COS, HeLa și CHO. A se vedea, de asemenea, Publicația PCT Nr. WO 87/04462. Celule gazdă de la non-mamifere adecvate sunt procariotele (cum ar fi *E. coli* sau *B. subtilis*) și levuri (cum ar fi *S. cerevisiae*, *S. pombe*; sau *K. lactis*).

Purificarea anticorpilor

Anticorpul anti-ICOS pot fi purificați prin orice metodă adecvată. Astfel de metode includ, fără limitare, utilizarea matricelor de afinitate sau cromatografia de interacțiune hidrofobă. Liganzi de afinitate adecvați includ ROR1 ECD și liganzi care leagă regiunile constante ale anticorpilor. De exemplu, o Proteină A, Proteină G, Proteină A/G sau o coloană de afinitate a anticorpilor poate fi utilizată pentru a lega regiunea constantă și pentru a purifica un anticorp anti-ICOS. Cromatografia interactivă hidrofobă, de exemplu, o coloană de butil sau fenil, poate fi de asemenea adecvată pentru purificarea unor polipeptide, cum ar fi anticorpul. Cromatografia cu schimb de ioni (de exemplu cromatografie cu schimb de anioni și/sau cromatografie cu schimb de cationi) poate fi, de asemenea, adecvată pentru purificarea anumitor polipeptide, cum ar fi anticorpul. Cromatografia în mod mixt (de exemplu, fază inversă/schimb de anioni, fază inversă/schimb de cationi, interacțiune hidrofilă/schimb de anioni, interacțiune hidrofilă/schimburi de cationi *etc.*) poate fi, de asemenea, adecvată pentru purificarea unor polipeptide, cum ar fi anticorpul. Multe metode de purificare a polipeptidelor sunt cunoscute în stadiul tehnicii.

Producția de anticorpi fără celule

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS este produs într-un sistem fără celule. Sunt descrise exemple nelimitative de sisteme fără celule, de exemplu, în Sitaraman et al., *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004); Endo et al., *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003).

Compoziții

În unele cazuri, sunt descriși anticorpi preparați prin metodele descrise mai sus. În unele cazuri, anticorpul este preparat într-o celulă gazdă. În unele cazuri, anticorpul este preparat într-un sistem fără celule. În unele cazuri, anticorpul este purificat. În unele cazuri, anticorpul preparat într-o celulă gazdă sau un sistem fără celule este un anticorp himeric. În unele cazuri, anticorpul preparat într-o celulă gazdă sau un sistem fără celule este un anticorp umanizat. În unele cazuri, anticorpul preparat într-o celulă gazdă sau un sistem fără celule este un anticorp uman. În unele cazuri, este prevăzut un mediu de cultură a celulelor care cuprinde un anticorp anti-ICOS. În unele cazuri, este prevăzut un fluid de cultură a celulelor gazdă care cuprinde un anticorp anti-ICOS.

În unele cazuri, sunt descrise compozițiile care cuprind anticorpi preparați prin metodele descrise mai sus. În unele cazuri, compoziția cuprinde un anticorp preparat într-o celulă gazdă. În unele cazuri, compoziția cuprinde un anticorp preparat într-un sistem fără celule. În unele cazuri, compoziția cuprinde un anticorp purificat. În unele cazuri, compoziția cuprinde un anticorp himeric preparat într-o celulă gazdă sau un sistem fără celule. În unele cazuri, compoziția cuprinde un anticorp umanizat preparat într-o celulă gazdă sau un sistem fără celule. În unele cazuri, compoziția cuprinde un anticorp uman preparat într-o celulă gazdă sau un sistem fără celule.

În unele cazuri, este prevăzută o compoziție cuprinzând anticorpi anti-ICOS la o concentrație mai mare decât aproximativ oricare dintre 10 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, 125 mg/mL, 150 mg/mL, 175 mg/mL, 200 mg/mL, 225 mg/mL sau 250 mg/mL. În unele cazuri, compoziția cuprinde un anticorp himeric preparat într-o celulă gazdă sau un sistem fără celule. În unele cazuri, compoziția cuprinde un anticorp umanizat preparat într-o celulă gazdă sau un sistem fără celule. În unele cazuri, compoziția cuprinde un anticorp uman preparat într-o celulă gazdă sau un sistem fără celule.

V. Compoziții terapeutice și metode

Metode de tratare a bolilor utilizând anticorpi anti-ICOS

Anticorpul și compozițiile care cuprind anticorpi sunt prevăzuți pentru utilizarea în metode de tratament pentru oameni sau animale. Sunt descrise, de asemenea, metode de tratare a bolii care cuprind administrarea anticorpilor anti-ICOS. Exemple nelimitative de boli care pot fi tratate cu anticorpi anti-ICOS includ, dar nu se limitează la cancer.

În unele cazuri, este prevăzută o metodă de tratare a tumorii, în care celulele dintr-o probă din tumoare exprimă ICOS. În unele astfel de cazuri, tumoarea poate fi considerată ca fiind ICOS-pozitivă sau ca exprimând ICOS. Exprimarea ICOS poate fi determinată prin IHC, de ex., așa cum

este discutat aici. În unele exemple de realizare, se consideră că o tumoare exprimă ICOS atunci când o probă din tumoare indică o colorație de 1+, 2+ sau 3+ a ICOS prin IHC. În unele exemple de realizare, proba din tumoare prezintă colorație 2+ sau 3+ a ICOS prin IHC. În unele cazuri, o probă de tumoare de la un subiect este analizată pentru exprimarea ICOS și subiectul este selectat pentru tratamentul cu un anticorp descris aici, dacă proba de tumoare prezintă exprimare ICOS. În unele cazuri, subiectul este selectat dacă proba tumorală prezintă o exprimare crescută a ICOS.

În unele cazuri, un subiect este selectat pentru tratamentul cu un anticorp anti-ICOS prevăzut aici, dacă tumoarea subiectului este PD-L1^{SCĂZUT}. În unele cazuri, un subiect este selectat pentru tratamentul cu un anticorp anti-ICOS prevăzut aici, dacă tumoarea subiectului este ICOS^{RIDICAT}PD-L1^{SCĂZUT}. În unele cazuri, un subiect este selectat pentru tratamentul cu un anticorp anti-ICOS prevăzut aici, dacă tumoarea subiectului este ICOS^{RIDICAT}PD-L1^{RIDICAT}.

Anticorpul anti-ICOS poate fi administrat subiecților după cum este nevoie. Determinarea frecvenței de administrare poate fi făcută de persoane de specialitate în domeniu, cum ar fi un medic curant, pe baza considerațiilor privind afecțiunea tratată, vârsta subiectului tratat, gravitatea afecțiunii tratate, starea generală a de sănătate a pacientului tratat și alte asemenea. În unele exemple de realizare, o doză eficientă dintr-un anticorp anti-ICOS este administrată unui subiect o dată sau de mai multe ori. În unele cazuri, o doză eficientă dintr-un anticorp anti-ICOS este administrată subiectului o dată pe lună, mai puțin de o dată pe lună, precum, de exemplu, o dată la două luni sau o dată la trei luni. În unele cazuri, o doză eficientă dintr-un anticorp anti-ICOS este administrată subiectului mai puțin de o dată pe lună, precum, de exemplu, o dată la trei săptămâni, o dată la două săptămâni sau o dată pe săptămână. O doză eficientă dintr-un anticorp anti-ICOS este administrată unui subiect cel puțin o dată. În unele cazuri, doza eficientă dintr-un anticorp anti-ICOS poate fi administrată de mai multe ori, inclusiv pe perioade de cel puțin o lună, cel puțin șase luni sau cel puțin un an.

În unele cazuri, compozițiile farmaceutice sunt administrate într-o cantitate eficientă pentru tratamentul (inclusiv profilaxia) cancerului. Cantitatea eficientă terapeutic depinde în mod tipic de greutatea subiectului tratat, de starea fizică sau de sănătate a acestuia, de întinderea afecțiunii care urmează să fie tratată sau de vârsta subiectului tratat. În general, anticorpul anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 10 mg/kg greutate corporală la aproximativ 100 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 5 mg/kg greutate corporală la aproximativ 100 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 10 mg/kg greutate corporală la aproximativ 100 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 100 mg/kg greutate corporală la aproximativ 20 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 0,5 mg/kg greutate corporală la aproximativ 20 mg/kg greutate corporală per doză.

Compozițiile farmaceutice sunt administrate într-o cantitate eficientă pentru creșterea numărului de celule Teff; activarea celulelor Teff; epuizarea celulelor Treg; și/sau creșterea raportului dintre celulele Teff și celulele Treg. În unele cazuri, celulele Treg sunt celule T CD4+ FoxP3+. În unele exemple de realizare, celulele Teff sunt celule T CD8+. În unele cazuri, celulele Teff sunt celule T CD4+ FoxP3- și celule T CD8+.

În unele cazuri, tratamentul cu anticorp anti-ICOS are ca rezultat date privind farmacodinamica, cum ar fi reglarea în sens ascendent a ligandului ICOS (ICOSL). În unele cazuri, se observă reglarea în sens ascendent a ICOSL pe suprafața celulelor B. În unele cazuri, se observă reglarea în sens ascendent a ICOSL pe suprafața granulocitelor. În unele cazuri, se observă reglarea în sens ascendent a ICOSL pe suprafața neutrofilelor. Reglarea în sens ascendent a ICOSL poate fi observată pe celule din tumoare; pe celule din splină; pe celule din sângele periferic. Reglarea în sens ascendent a ICOSL pe suprafața celulei poate fi detectată, de exemplu, prin citometrie în flux. În unele cazuri, ICOSL solubil este crescut în limfă după tratamentul cu anticorp anti-ICOS. ICOSL solubil poate fi detectat prin metode care includ, dar fără a se limita la, ELISA, MSD și spectrometrie de masă. În unele cazuri, implicarea țintei ICOS, măsurată prin disponibilitatea receptorului liber, de anticorpul anti-ICOS, poate fi utilizată și date privind farmacodinamica. În unele astfel de cazuri, în urma tratamentului cu un anticorp anti-ICOS, poate fi cuantificat numărul de receptori ICOS de la suprafața limfocitelor T care sunt liberi să lege anticorpi suplimentari. Scăderea receptorilor disponibili observați poate servi drept indicație că anticorpii anti-ICOS leagă molecula lor țintă.

Cantitatea eficientă terapeutic depinde în mod tipic de greutatea subiectului tratat, de starea fizică sau de sănătate a acestuia, de întinderea afecțiunii care urmează să fie tratată sau de vârsta subiectului tratat. În general, anticorpul anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în

intervalul de la aproximativ 10 mg/kg greutate corporală la aproximativ 100 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpii anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 50 mg/kg greutate corporală la aproximativ 5 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpii anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 100 mg/kg greutate corporală la aproximativ 10 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpii anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 100 mg/kg greutate corporală la aproximativ 20 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpii anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 0,5 mg/kg greutate corporală la aproximativ 20 mg/kg greutate corporală per doză.

Compoziții farmaceutice

În unele cazuri, compozițiile care cuprind anticorpi anti-ICOS sunt furnizate în preparate cu o varietate largă de agenți purtători acceptabili din punct de vedere farmaceutic (de exemplu, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, ed. a 20-a (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, ed. a 7-a, Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, ed. a 3-a, Pharmaceutical Press (2000)). Sunt disponibili diverși agenți purtători acceptabili din punct de vedere farmaceutic, care includ vehicule, adjuvanți și diluanți. Mai mult, sunt disponibile și diverse substanțe auxiliare acceptabile din punct de vedere farmaceutic, cum ar fi agenți de ajustare a pH-ului și agenți tampon, agenți de reglare a tonicității, stabilizatori, umectanți și asemenea. Exemple nelimitative de agenți purtători includ soluțiile saline, soluțiile saline tamponate, dextroză, apă, glicerol, etanol și combinații ale acestora.

În unele cazuri, este furnizată o compoziție farmaceutică care cuprinde un anticorp anti-ICOS. În unele cazuri, compoziția farmaceutică cuprinde un anticorp himeric. În unele cazuri, compoziția farmaceutică cuprinde un anticorp umanizat. În unele cazuri, compoziția farmaceutică cuprinde un anticorp preparat într-o celulă gazdă sau un sistem fără celule, așa cum este descris aici. În unele cazuri, compoziția farmaceutică cuprinde un agent purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

În unele cazuri, compozițiile farmaceutice sunt administrate într-o cantitate eficientă pentru tratamentul (inclusiv profilaxia) cancerului. Cantitatea eficientă terapeutic depinde în mod tipic de greutatea subiectului tratat, de starea fizică sau de sănătate a acestuia, de întinderea afecțiunii care urmează să fie tratată sau de vârsta subiectului tratat. În general, anticorpii anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 0,05 mg/kg greutate corporală la aproximativ 100 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpii anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 10 mg/kg greutate corporală la aproximativ 100 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpii anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 50 mg/kg greutate corporală la aproximativ 5 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpii anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 100 mg/kg greutate corporală la aproximativ 10 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpii anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 100 mg/kg greutate corporală la aproximativ 20 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpii anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 0,5 mg/kg greutate corporală la aproximativ 20 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpii anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 0,5 mg/kg greutate corporală la aproximativ 10 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpii anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 0,05 mg/kg greutate corporală la aproximativ 20 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpii anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 0,05 mg/kg greutate corporală la aproximativ 10 mg/kg greutate corporală per doză. În unele cazuri, anticorpii anti-ICOS pot fi administrați într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 5 mg/kg greutate corporală sau mai puțin, de exemplu mai puțin de 4, mai puțin de 3, mai puțin de 2 sau mai puțin de 1 mg/kg de anticorp.

În unele cazuri, anticorpii anti-ICOS pot fi prezenți într-o cantitate în intervalul de la aproximativ 50 mg/kg greutate corporală la aproximativ 5 mg/kg greutate corporală per doză. De exemplu, în unele cazuri, o doză pentru o persoană de 20 kg poate fi cuprinsă într-un interval de la aproximativ 1 mg la aproximativ 100 mg. În unele cazuri, doza poate fi cuprinsă într-un interval de la 2 mg la 200 mg de anticorp anti-ICOS. În unele cazuri, doza poate fi cuprinsă într-un interval de la 10 mg la 400 mg de anticorp anti-ICOS.

Căi de administrare

5 In unele cazuri, pot fi administrați anticorpi anti-ICOS *in vivo* prin diverse căi, inclusiv, dar fără a se limita la, intravenos, intra-arterial, parenteral, intratumoral, intraperitoneal sau subcutanat. Preparatul și calea de administrare adecvate pot fi selectate în conformitate cu aplicația vizată.

Terapia combinată

10

Anticorpii anti-ICOS pot fi administrați singuri sau împreună cu alte moduri de tratament. Acestea pot fi prevăzute înainte, în mod substanțial contemporan cu și/sau după alte moduri de tratament, de exemplu intervenție chirurgicală, chimioterapie, radioterapie sau administrarea unui medicament biologic, cum ar fi un alt anticorp terapeutic. În unele exemple de realizare, un anticorp anti-ICOS este administrat în conjuncție cu un alt agent anti-cancer.

15

În unele cazuri, anticorpusul anti-ICOS este administrat concomitent cu un al doilea agent terapeutic. De exemplu, cei doi sau mai mulți agenți terapeutici sunt administrați cu o separare de timp de cel mult aproximativ 60 minute, precum nu mai mult de aproximativ oricare dintre 30, 15, 10, 5 sau 1 minut. În unele cazuri, anticorpusul anti-ICOS este administrat în secvență cu un al doilea agent terapeutic. De exemplu, cei doi sau mai mulți agenți terapeutici sunt administrați cu o separare de timp mai mare de aproximativ 15 minute, precum aproximativ oricare dintre 20, 30, 40, 50 sau 60 minute, 1 zi, 2 zile, 3 zile, 1 săptămână, 2 săptămâni sau 1 lună sau mai mult.

20

În unele exemple de realizare, anticorpusul anti-ICOS este administrat cu o a doua metodă terapeutică de tratament. Astfel, administrarea unui anticorp prevăzut în prezentul document poate fi în combinație cu un alt sistem de tratament.

25

În unele exemple de realizare, un anticorp anti-ICOS prevăzut aici este administrat cu o terapie PD-1. Exemple de terapii PD-1 includ, dar nu sunt limitate la, nivolumab (OPDIVO®; BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538); pidilizumab, lambrolizumab/pembrolizumab (KEYTRUDA, MK-3475.); durvalumab (anticorp anti-PD-L1, MEDI-4736; AstraZeneca/MedImmune); RG-7446; avelumab (anticorp anti-PD-L1; MSB-0010718C; Pfizer) AMP-224; BMS-936559 (anticorp anti-PD-L1); AMP-514; MDX-1105; ANB-011; anti-LAG-3/PD-1; Anticorp anti-PD-1 (CoStim); anticorp anti-PD-1 (Kadmon Pharm.); anticorp anti-PD-1 (Immunovo); anticorp anti-TIM-3/PD-1 (AnaptysBio); anticorp anti-PD-L1 (CoStim/Novartis); RG7446/MPDL3280A (anticorp anti-PD-L1, Genentech/Roche); KD-033, antagonist PD-1 (Agenus); STI-A1010; STI-A1110; TSR-042; și alți anticorpi care sunt îndreptați împotriva morții celulare programate-1 (PD-1) sau morții celulare programate ligand 1 (PD-L1).

35

În unele exemple de realizare, un subiect este selectat pentru tratamentul cu un anticorp anti-ICOS prevăzut aici și o terapie PD-1, dacă tumoarea subiectului exprimă PD-L1. În unele exemple de realizare, un subiect este selectat pentru tratamentul cu un anticorp anti-ICOS prevăzut aici și o terapie PD-1, dacă tumoarea subiectului este cu PD-L1^{RIDICAT}. În unele exemple de realizare, un subiect este selectat pentru tratamentul cu un anticorp anti-ICOS prevăzut aici și o terapie PD-1, dacă tumoarea subiectului exprimă ICOS și PD-L1. În unele exemple de realizare, un subiect este selectat pentru tratamentul cu un anticorp anti-ICOS prevăzut aici și o terapie PD-1, dacă tumoarea subiectului este cu ICOS^{RIDICAT}/PD-L1^{RIDICAT}. Determinarea nivelului PD-L1 și/sau ICOS se poate face, de exemplu, utilizând IHC. Se consideră ca o tumoare a unui pacient exprimă PD-L1 în unele cazuri, când 1% sau mai mult, sau 5% sau mai mult, din celulele tumorale dintr-o probă prezintă colorație membranară cu PD-L1 prin IHC. În unele cazuri, mai mult de 50% din celulele tumorale dintr-o probă prezintă colorație membranară cu PD-L1 prin IHC. În unele astfel de cazuri, tumoarea subiectului este considerată a fi cu PD-L1^{RIDICAT}. Se consideră ca o tumoare a unui pacient exprimă ICOS, în unele cazuri, când 1% sau mai mult din celulele dintr-o probă de tumoare prezintă colorație membranară cu ICOS prin IHC. În unele cazuri, un subiect este tratat mai întâi cu o terapie PD-1 și este tratat ulterior cu un anticorp anti-ICOS prevăzut în prezentul document, cu sau fără continuarea terapiei PD-1. Astfel, metodele prevăzute aici includ tratamentul unui subiect cu un anticorp anti-ICOS, unde subiectul a fost tratat anterior cu o terapie PD-1.

55

În unele cazuri, anticorpusul anti-ICOS prevăzut în prezentul este administrat împreună cu un anticorp agonist anti-OX40 (precum Medi6469, MedImmune; MOXR0916/RG7888, Roche). În unele exemple de realizare, anticorpusul anti-ICOS prevăzut în prezentul este administrat cu un anticorp anti-CTLA4 (precum ipilimumab, YERVOY®, BMS).

60

În unele exemple de realizare, un agent terapeutic suplimentar este un agent de chimioterapie. Exemple de agenți chimioterapeutici care pot fi combinați cu anticorpii anti-ICOS

prevăzuți aici includ, însă nu sunt limitate la, capectiabină, ciclofosamidă, dacarbazină, temozolomidă, ciclofosamidă, docetaxel, doxorubicină, daunorubicină, cisplatină, carboplatină, epirubicină, eribulină, 5-FU, gemcitabină, irinotecan, ixabepilonă, metotrexat, mitoxantronă, oxaliplatină, paclitaxel, nab-paclitaxel, ABRAXANE® (paclitaxel legat de proteină), pemetrexed, vinorelbina și vincristină. În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS prevăzut aici este administrat cu cel puțin un inhibitor de kinază. Exemple nelimitative de inhibitori de kinază includ erlotinib, afatinib, gefitinib, crizotinib, dabrafenib, trametinib, vemurafenib și cobimetanib.

În unele cazuri, agentul terapeutic suplimentar este un inhibitor IDO. Sunt descrise exemple nelimitative de inhibitori IDO, de exemplu, în US 2016/0060237; și US 2015/0352206. Exemple nelimitative de inhibitori IDO includ Indoximod (Nou Link Genetics), INCB024360 (Incyte Corp), 1-metil-D-triptofan (New Link Genetics) și GDC-0919 (Genentech).

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS prevăzut în prezentul document este administrat în combinație cu un medicament de modificare a imunității (IMiD). Exemple nelimitative de IMiD includ talidomida, lenalidomida și pomalidomida.

În unele exemple de realizare, un agent terapeutic suplimentar este un vaccin anti-cancer. Vaccinurile anti-cancer au fost investigate ca o potențială abordare a transferului de antigeni și activarea celulelor dendritice. În particular, vaccinarea în combinație cu molecule checkpoint imunologice sau agonști pentru căi costimulatoare au arătat dovezi de toleranță copleșitoare și generează răspuns anti-tumoral crescut. S-a testat o gamă de vaccinuri anti-cancer care utilizează abordări diferite pentru promovarea unui răspuns imunitar împotriva tumorii (*a se vedea, de exemplu*, Emens LA, Expert Opin Emerg Drugs 13(2): 295-308 (2008)). Au fost concepute abordări pentru a îmbunătăți răspunsul celulelor B, celulelor T sau antigenului profesional care prezintă celule împotriva tumorilor. Exemple de tipuri de vaccinuri anti-cancer includ, dar nu se limitează la, vaccinuri pe bază de peptide care utilizează țintirea antigenilor tumorali distincți, care pot fi administrate sub formă de peptide/proteine sau ca vectori ADN proiectați genetic, virusuri, bacterii sau alte asemenea; și abordări biologice celulare, de exemplu, pentru dezvoltarea vaccinului anti-cancer împotriva unor ținte mai puțin bine definite, inclusiv, fără a se limita la, vaccinuri dezvoltate din celule dendritice derivate de la pacient, celule tumorale autologe sau lizate celulare tumorale, celule tumorale alogene și alte asemenea.

Astfel, în anumite exemple de realizare, anticorpul anti-ICOS prevăzut aici pot fi utilizați în asociere cu un vaccin anti-cancer. Exemple de vaccinuri anti-cancer includ, dar nu sunt limitate la, vaccinuri cu celule dendritice, virusuri oncolitice, vaccinuri cu celule tumorale etc. În unele cazuri, astfel de vaccinuri cresc răspunsul anti-tumoral. Exemple de vaccinuri anti-cancer care pot fi utilizate în asociere cu anticorpul anti-ICOS prevăzut în prezentul document includ, fără limitare, vaccinul MAGE3 (de ex., pentru melanom și cancer de vezică urinară), vaccinul MUC1 (de exemplu, pentru cancer de san), EGFRv3 (precum Rindopepimut, de exemplu, pentru cancer cerebral, inclusiv glioblastom multiforme) sau ALVAC-CEA (de exemplu, pentru cancer CEA+).

Exemple nelimitative de vaccinuri anti-cancer includ, de asemenea, Sipuleucel-T, derivat din celule mononucleare din sangele periferic autologe (PBMC) care includ celule care prezintă antigen (*a se vedea, de ex.*, Kantoff PW et al., N Engl J Med 363:411-22 (2010)). În generarea Sipuleucel-T, PBMC ale pacientului sunt activate *ex vivo* cu PA2024, o proteină recombinantă de fuziune a fosfatazei acide prostatice (un antigen prostatal) și factor de stimulare a coloniilor granulocitare-macrofage (un activator de celule imunitare). O altă abordare pentru un vaccin anti-cancer candidat este de a genera un răspuns imunitar împotriva peptidelor specifice care au suferit mutație în țesutul tumoral, cum ar fi melanom (*a se vedea, de ex.*, Carreno BM et al., Science 348:6236 (2015)). Astfel de peptide ce au suferit mutație pot fi denumite, în unele cazuri, neoantigeni. Ca un exemplu nelimitativ de utilizare a neoantigenilor în vaccinurile tumorale, neoantigenii din tumoare prevăzuți a lega proteina complexă de histocompatibilitate majoră HLA-A*02:01 sunt identificați pentru pacienții individuali cu cancer, precum melanom. Celulele dendritice de la pacient sunt maturate *ex vivo*, apoi incubate cu neoantigeni. Celulele dendritice activate sunt apoi administrate pacientului. În unele cazuri, în urma administrării vaccinului anti-cancer, imunitatea celulelor T robuste împotriva neoantigenului este detectabilă.

În unele astfel de exemple de realizare, vaccinul anti-cancer este dezvoltat folosind un neoantigen. În unele exemple de realizare, vaccinul anticancer este un vaccin ADN. În unele exemple de realizare, vaccinul anticancer este un virus proiectat în laborator care cuprinde un antigen de cancer, cum ar fi PROSTVAC (rilimogene galvacirepvec/rilimogene glafolivec). În unele exemple de realizare, vaccinul anticancer cuprinde celule tumorale proiectate în laborator, cum ar fi GVAX, care este un vaccin cu celule tumorale transfectate cu gene de factor de stimulare a coloniilor de granulocite-macrofage (GM-CSF) (*a se vedea, de exemplu*, Nemunaitis, 2005, Expert Rev Vaccines, 4: 259-74).

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS descris în prezentul document este administrat înainte, concomitent și/sau după un vaccin anti-cancer. În unele exemple de realizare, vaccinurile anti-cancer dezvoltate folosind neoantigenii sunt utilizate în combinație cu anticorpii anti-ICOS descriși în prezentul. În unele astfel de cazuri, combinația este utilizată pentru tratarea unui cancer cu o încărcătură mutațională ridicată, cum ar fi melanom, cancer de plămân, de vezica urinară sau colorectal.

În unele cazuri, un anticorp anti-ICOS prevăzut aici este administrat în combinație cu o terapie T cu celule T receptoare de antigen himerice (terapie cu CAR-T).

10 Utilizări pentru diagnosticare

Describe aici sunt metode de utilizare a anticorpilor anti-ICOS, polipeptidelor și polinucleotidelor pentru detectarea, diagnosticarea și monitorizarea unei boli, tulburări sau afecțiuni asociate cu exprimarea epitopului anticorpului anti-ICOS (fie crescută sau scăzută în raport cu o probă normală și/sau o exprimare necorespunzătoare, precum prezența unei exprimări în țesutul(rile) și/sau celulei(lor) cărora le lipsește în mod normal exprimarea epitopului). Describe aici sunt metode de determinare a faptului dacă un pacient va răspunde la terapia cu anticorpi anti-ICOS.

În unele cazuri, metoda cuprinde detectarea dacă pacientul are celule care exprimă ICOS folosind un anticorp anti-ICOS. În unele cazuri, metoda de detectare cuprinde contactarea probei cu un anticorp, polipeptidă sau polinucleotidă și determinarea dacă nivelul de legare diferă de cel al unei probe de referință sau de comparație (cum ar fi un control). În unele cazuri, metoda poate fi utilă pentru a determina dacă anticorpii sau polipeptidele descrise aici sunt un tratament adecvat pentru subiect.

În unele cazuri, celulele sau lizatul celular/tisular sunt puse în contact cu un anticorp anti-ICOS și se determină legătura dintre anticorp și celulă. Atunci când celulele testate prezintă activitate de legare în comparație cu o celulă de referință din același tip de țesut, acest lucru poate indica faptul că subiectul ar beneficia de pe urma tratamentului cu un anticorp anti-ICOS. În unele cazuri, celulele testate provin din țesuturi umane.

Pot fi utilizate diverse metode cunoscute în stadiu tehnicii pentru detectarea legării specifice anticorp-antigen. Exemple de imunoanalize care pot fi efectuate includ imunoanaliza prin fluorescență de polarizare (FPIA), imunoanaliza prin fluorescență (FIA), imunoanaliza enzimatică (EIA), imunoanaliza cu inhibare nefelometrică (NIA), test de imunosorbție legat cu enzimă (ELISA) și radioimunoanaliza (RIA). O fracțiune indicatoare sau un grup de etichetare poate fi atașat anticorpilor subiectului și este selectat pentru a satisface nevoile diverselor utilizări ale metodei, care sunt adesea dictate de disponibilitatea echipamentelor de analiză și de procedurile de imunoanaliză compatibile. Etichetele corespunzătoare includ, fără limitare, radionuclide (de exemplu ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H , or ^{32}P), enzime (de exemplu fosfatază alcalină, peroxidază din hrean, luciferază sau β -glactozidază), fracțiuni sau proteine fluorescente (de exemplu, fluoresceină, rodamină, ficoeritrină, GFP sau BFP) sau fracțiuni luminiscente (de exemplu, nanoparticule QdotTM furnizate de Quantum Dot Corporation, Palo Alto, Calif.). Tehnicile generale care trebuie utilizate în efectuarea diferitelor imunoanalize notate mai sus sunt cunoscute persoanelor de specialitate în domeniu.

În scopul diagnosticării, polipeptida care include anticorpi poate fi etichetată cu o fracțiune detectabilă, ce include, fără a se limita la, radioizotopi, etichete fluorescente și diverse etichete ale substratului enzimatic cunoscute în stadiul tehnicii. Metodele de conjugare a etichetelor la un anticorp sunt cunoscute în stadiul tehnicii.

În unele cazuri, anticorpii anti-ICOS nu trebuie etichetați și prezența acestora poate fi detectată utilizând un al doilea anticorp etichetat care se leagă de primul anticorp anti-ICOS.

În unele cazuri, anticorpul anti-ICOS poate fi folosit în orice metodă de analiză cunoscută, cum ar fi analize de legare competitivă, analize sandwich directe și indirecte și analize de imunoprecipitare. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Anticorpii anti-ICOS și polipeptidele pot fi utilizați și pentru testele de diagnosticare in vivo, cum ar fi imagistica in vivo. În general, anticorpul sau polipeptida este etichetată cu o radionuclidă (cum ar fi ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , sau orice altă etichetă de radionuclidă, inclusiv cele subliniate aici), astfel încât celulele sau țesutul de interes să poată fi localizate utilizând imunoscintigrafie.

Anticorpul poate fi utilizat și ca reactiv de colorație în patologie, utilizând tehnici bine cunoscute în stadiul tehnicii.

În unele cazuri, un prim anticorp este utilizat pentru o diagnosticare și un al doilea anticorp este utilizat ca terapie. În unele cazuri, primul și al doilea anticorp sunt diferiți. În unele cazuri, primul anticorp este de origine non-umană, în timp ce terapia este de origine umană. În unele cazuri, primul și al doilea anticorp pot ambele să se lege de un antigen în același timp, prin legarea de epitopi separați.

Kituri/Articole de producție

În prezentul sunt prevăzute și kituri, medicamente, compoziții și forme de dozare a unității pentru utilizare în oricare dintre metodele descrise aici.

Kiturile pot include unul sau mai multe recipiente care cuprind un anticorp anti-ICOS (sau forme de dozare unitară și/sau articole de producție). În unele cazuri, este prevăzută o doză unitară, în care doza unitară conține o cantitate predeterminată dintr-o compoziție care cuprinde un anticorp anti-ICOS, cu sau fără unul sau mai mulți agenți suplimentari. În unele cazuri, o astfel de doză unitară este furnizată într-o seringă preumplută de unică folosință pentru injectare. În unele cazuri, compoziția conținută în doza unitară poate cuprinde soluție salină, zaharoză sau alte asemenea; o soluție tampon, cum ar fi fosfat sau altele asemenea; și/sau poate fi formulată în cadrul unui interval de pH stabil și eficient. În unele cazuri, compoziția poate fi prevăzută ca o pulbere liofilizată care poate fi reconstituită la adăugarea unui lichid adecvat, de exemplu, apă sterilă. În unele cazuri, compoziția cuprinde una sau mai multe substanțe care inhibă agregarea proteinelor, incluzând, dar fără a se limita la, zaharoză și arginină. În unele cazuri, o compoziție cuprinde heparină și/sau un proteoglican.

În unele cazuri, cantitatea de anticorpi anti-ICOS utilizată în doza unitară poate fi oricare dintre cantitățile prevăzute aici pentru diferitele metode și/sau compoziții descrise.

În unele cazuri, kiturile cuprind suplimentar instrucțiuni pentru utilizarea în tratamentul cancerului în conformitate cu oricare dintre metodele descrise în prezentul. Kitul mai poate cuprinde o descriere a selecției unei persoane sau tratament adecvat. Instrucțiunile furnizate în kituri sunt în mod obișnuit instrucțiuni scrise pe o etichetă sau pe un prospect (de exemplu, o foaie de hârtie inclusă în kit), însă sunt acceptabile, de asemenea instrucțiunile care pot fi citite pe calculator (de exemplu, instrucțiunile stocate pe un disc de stocare magnetic sau optic). În unele cazuri, trusa mai cuprinde un alt agent terapeutic.

Kiturile se află în ambalaj adecvat. Ambalajul adecvat include, dar nu se limitează la, fiole, flacoane, borcane, ambalaje flexibile (de exemplu, pungi Mylar sau din plastic) și alte asemenea. Kiturile pot furniza opțional componente suplimentare, cum ar fi soluții tampon și informații interpretative. Prezenta cerere prevede, de asemenea, articole de producție, care includ fiole (precum fiole sigilate), flacoane, borcane, ambalaje flexibile și alte asemenea.

EXEMPLE

Exemplele discutate mai jos sunt destinate a fi doar exemplificative pentru invenție și nu trebuie considerate a limita în niciun fel invenția. Exemplele nu au scopul de a reprezenta faptul că experimentele de mai jos sunt toate sau singurele experimente efectuate. S-au depus eforturi pentru a asigura acuratețea cu privire la numerele folosite (de exemplu, cantitățile, temperatura *etc.*), dar unele erori experimentale și abateri trebuie avute în vedere. Dacă nu se indică altfel, părțile sunt părți din greutate, masa moleculară este masa moleculară medie ponderată, temperatura este exprimată în grade Celsius și presiunea este egală cu sau aproape de presiunea atmosferică.

Exemplul 1: Analiza bioinformatică a exprimării ICOS ARNm în tumorile umane.

Utilizarea datelor de secvențiere ARN colectate ca parte a TCGA, exprimarea ICOS în 7500 tumori au fost comparate în 24 de indicații diferite. Nivelurile ridicate de ICOS ARNm au fost găsite în subseturi de cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC), cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC). *A se vedea* Figura 1A.

A fost investigată asocierea dintre infiltrarea celulelor T și nivelurile de exprimare ICOS. Exprimarea unui set de 12 gene chimiokine a fost asociată cu niveluri ridicate de infiltrare cu celule T și formarea structurilor asemănătoare nodurilor limfatici (Messina et al., 2012, Sci Reports. 2:765-771). Scorul semnăturii chimiokinelor a fost calculat pentru fiecare probă pe baza exprimării medii a acestor gene de 12 gene chimiokine. Acest scor de semnătură a fost calculat în toate probele de cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC). Au fost corelate nivelurile semnăturii chimiokinelor sau un marker celular Treg (FoxP3) cu niveluri ICOS în tumorile HNSCC. *A se vedea* Figura 2. A existat o corelație puternică între semnătura chimiokinelor și

nivelurile ICOS ($R=0,83$; corelare Spearman) sau ICOS și FoxP3, un marker celular Treg ($R=0,88$; corelare Spearman). Aceste date demonstrează că exprimarea ICOS este asociată îndeaproape cu infiltrarea celulelor T și cu celulele Treg. Au fost observate date similare în NSCLC și TNBC.

- În tumorile HNSCC, exprimarea ICOS a fost corelată semnificativ ($R=0,93$ și respectiv 0,78) cu niveluri de exprimare a altor molecule checkpoint, cum ar fi CTLA-4 și PD-1. *A se vedea* Figura 3. Corelația ICOS cu PD-L1 a fost slabă ($R=0,62$). Au fost observate date similare în alte indicații, cum ar fi NSCLC. Aceste date sugerează că ICOS poate fi exprimat pe aceleași celule T care exprimă și alte molecule checkpoint, cum ar fi CTLA-4 și PD-1. Corelația mai slabă cu PD-L1 și ICOS sugerează că ar putea exista un subset de pacienți cu ICOS ridicat, care ar putea fi cu PD-L1 scăzut sau negativ. Aceste date susțin ICOS ca un singur agent la pacienții cu PD-L1 negativ și, de asemenea, o strategie combinată cu terapiile anti-PD-1 sau anti-CTLA-4.

Exemplul 2: Analiza IHC a tumorilor umane

- Nivelurile de exprimare a proteinei ICOS au fost determinate folosind o analiză de imunohistochimie (IHC). Această analiză, utilizând un anticorp monoclonal anti-ICOS de la iepure (SP98, Spring Biosciences, Draganton, CA), a fost validat pentru specificitatea analizei, precizia analizei (intra-rulare și inter-rulare, și reproductibilitate lot-lot) și sensibilitate. Studiile de validare au fost efectuate folosind secțiuni de țesut fixate în formol, încorporate în parafină (FFPE) și linii celulare de control (CHO, proiectate în laborator pentru a exprima ICOS uman (control pozitiv) sau linie celulară de control cu vector CHO care nu exprimă ICOS (control negativ)). Analiza a fost efectuată pe o platformă automată de colorare Leica-Bond Rx și o colorație specifică a ICOS a fost detectată în celulele CHO de control pozitiv și în subseturile de celule T în amigdală umană normală.

- Lamele au fost punctate de un patolog instruit utilizând următoarele criterii pentru colorație cromogenică:

Frecvența celulelor ICOS-pozitive	Punctaj
< 1% celule sunt ICOS pozitive	0
> 1% însă < 5% celule sunt ICOS pozitive	1+
> 5% însă < 15% celule sunt ICOS pozitive	2+
> 15% celule sunt ICOS pozitive	3+

- Micromatricele tisulare de la 11 tipuri diferite de tumori au fost colorate și clasificate utilizând acest sistem de punctare. *A se vedea* Figura 1B. Datele IHC au confirmat că datele pe bază de ARNm în acel HNSCC, NSCLC și TNBC conțineau cel mai ridicat procent de infiltrare cu celule imune cu ICOS+ ridicat (adică 3+). *A se vedea* Figura 1B. Pe lângă aceste tumori, subseturile de pacienți cu melanom, cancer colorectal și adenocarcinom gastric au prezentat niveluri moderate de infiltrație cu celule ICOS-pozitive. *A se vedea* Figura 1B.

- Pentru a evalua prevalența și natura celulelor T care exprimă ICOS, a fost dezvoltată o analiză IHC cu imuno-fluorescență multiplexă pentru detectarea ICOS, FOXP3 și CD8. A fost utilizat un marker ADN (DAPI) pentru numărarea numărului total de nuclee din secțiunile tumorale umane.

- Exprimarea ICOS a fost determinată folosind analiza imunohistochimie cu clona de anticorp monoclonal de la iepure care recunoaște ICOS uman (Spring Biosciences Inc. Plasanton, CA). Specificitatea și sensibilitatea analizei IHC ICOS a fost confirmată folosind amigdală umană și linii celulare care supra-exprimă constitutiv ICOS. Intensitatea colorației a fost punctată de un patolog instruit, utilizând următoarele criterii. Toate colorațiile pozitive au fost punctate pe baza exprimării membranare în cel puțin două treimi din celule.

- O imagine reprezentativă pentru schema de punctare este prezentată în Figura 4. Scorul a fost realizat pe baza următoarelor criterii pentru imunofluorescență:

- 0 (negativ) = Niciuna sau mai puțin de 0,1% din celule nu au prezentat colorație membrană
 1+ (ușoară) = 0,1 până la 5% din celule sunt pozitive
 2+ (moderată) = 5 până la 10% din celule sunt pozitive
 3+ (puternică) = > 10 până la 50% din celule sunt pozitive

- Prevalența exprimării ICOS la diferite subseturi de NSCLC sau la probele pulmonare normale adiacente sunt rezumate în Tabelul 2. Exprimarea puternică a ICOS nu a fost observată în țesutul pulmonar normal adiacent la pacienții cu cancer. Exprimarea puternică a ICOS a fost observată la toate subtipurile majore de cancer pulmonar. Aproximativ 29-31% din cele mai frecvente subtipuri NSCLC (adenocarcinom sau carcinom cu celule scuamoase) au avut o colorație puternică la ICOS.

Tabelul 2. Distribuirea colorației ICOS în diferite subseturi de probe NSCLC pe baza punctajului patologic.

Sub-tipul tumorii	N	Puternică (3+)	Moderată (2+)	Slabă (1+)	Negativă (0)
SCLC	2	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)
Scuamos	49	14 (29%)	14 (29%)	17 (35%)	4 (8%)
Adenocarcinom	16	5 (31%)	2 (13%)	8 (50%)	1 (6%)
Adenoscuamos	9	3 (11%)	2 (11%)	3 (11%)	1 (67%)
Carcinom bronhiolalveolar	9	2 (22%)	2 (22%)	5 (56%)	0 (0%)
Nediferențiat	5	1 (20%)	0 (0%)	3 (60%)	1 (20%)
Normal	3		1 (33%)	2 (67%)	0 (0%)

O metodologie automată pentru măsurarea celulelor ICOS pozitive a fost, de asemenea, utilizată, folosind software de analiză a imaginilor (Strataquest de la Tissuegnostics Inc., Tarzana, CA). Densitatea celulelor ICOS pozitive într-o zonă fixă a țesutului tumoral a fost determinată prin determinarea numărului de celule ICOS pozitive din regiunea viabilă a țesutului tumoral uman, așa cum este definit de regiunea de colorație DAPI. Densitatea celulelor ICOS a fost determinată dintr-un set separat de aproximativ 500 de pacienți individuali din 4 tipuri majore de tumori [NSCLC (N=100); HNSCC (N=102); cancer de san, toate subtipurile majore (N=94); subtipul triplu negativ de cancer de san, TNBC (N=95); cancer ovarian (N=94)]. Un sumar al rezultatelor analizei este prezentat în Figura 5. În conformitate cu analiza ICOS ARNm, tumorile HNSCC și NSCLC au avut o densitate semnificativ mai mare a tumorilor ICOS pozitive comparativ cu cancerul ovarian sau mamar. Deși exprimarea ICOS este scăzută la cancerul mamar, s-au observat niveluri ridicate de exprimare ICOS la subtipul TNBC, ceea ce constituie aproximativ 10% din cancerul mamar. A se vedea Figura 5. Acest subtip TNBC de cancer mamar este cel mai agresiv subtip cu opțiuni limitate de tratament și cea mai mare nevoie medicală nesatisfăcută.

Variabilitatea de la pacient la pacient în exprimarea ICOS în două cohorte diferite de tipuri de tumori ce exprimă ICOS ridicat (NSCLC) este ilustrată în Figurile 6A și 6B. O gamă de densitate celulară ICOS a fost observată în NSCLC de la 98 de probe de cancer pulmonar (Figura 6A), disponibile de la un furnizor comercial. Diversitatea similară în exprimarea ICOS a fost observată folosind o cohortă clinică independentă (Figura 6B) de NSCLC (N=204).

Un IHC multiplex cu ICOS, FoxP3 (un marker celular Treg) și CD8 din probele tumorale umane descrise mai sus a fost analizat și cuantificat utilizând software de analiză a imaginilor (Strataquest de la Tissuegnostics Inc., Tarzana, CA). O imagine reprezentativă a colorației ICOS multiplexe cu acești markeri celulari T este ilustrată în Figura 7A. Celulele ICOS pozitive care sunt, de asemenea, FOXP3 pozitive, sunt denumite celule Treg ICOS+ CD4. Celulele ICOS pozitive și CD8 pozitive sunt denumite celule ICOS+ CD8. Celulele ICOS pozitive, dar negativ pentru CD8 și FoxP3 se numesc Teff ICOS+ CD4. Densitatea diferitelor subseturi de celule T ICOS pozitive au fost cuantificate utilizând software-ul de analiză a imaginii, conform descrierii de mai sus. În cazul probelor pulmonare (N=100) și TNBC (n=95), a existat un număr mare atât de celule efectoare CD4 cât și de Treg CD4 care au fost ICOS pozitive (Figura 7B). În contrast, nu s-au observat multe celule ICOS pozitive în cancerul ovarian (n=94). Tumorile HNSCC (N=102) au avut o populație mare de celule Treg CD4 ICOS pozitive. S-a observat doar o populație mică de celule T CD8 ICOS pozitive în toate tipurile de tumori examinate. Aceste date sugerează că ICOS este exprimat în mod predominant în compartimentul CD4 comparativ cu celulele T CD8, iar variația proporțiilor relative ale Treg vs. Teff poate fi văzută la indicații.

Pentru a înțelege dacă exprimarea ICOS este asociată direct cu statusul PD-L1, a fost evaluată corelația dintre nivelurile PDL1 și exprimarea ICOS. Analiza bio-informatică a sugerat că exprimarea PD-L1 și nivelurile ICOS au fost corelate slab ($R=0,62$). Nivelurile PD-L1, ICOS și PD-1 au fost evaluate printr-o IHC multiplexă. Este prezentată o imagine reprezentativă a IHC multiplex de la o tumoare pulmonară cu PD-L1 ridicat și scăzut. A se vedea Figura 8. Au fost evaluate PD-L1 și ICOS în 154 din subtipul adenocarcinom al tumorilor NSCLC. Tumorile au fost subdivizate în tumori cu PD-L1 ridicat sau scăzut, pe baza a 5% din celulele care sunt PD-L1 pozitive. Rezultatele indică faptul că tumorile PD-L1 pozitive au avut o densitate mai mare a exprimării ICOS.

Exemplul 3: Analiza prin citometrie in flux

Pentru a confirma datele privind exprimarea ICOS obținute prin IHC și pentru a compara intensitățile relative ale ICOS exprimate în diferite populații de celule T, exprimarea ICOS în limfocitele de infiltrare tumorală a fost evaluată folosind citometrie în flux multicolor. Au fost analizate probe de la patru pacienți cu HNSCC, trei cu cancer pulmonar și patru pacienți cu cancer ovarian. În conformitate cu datele IHC, exprimarea ICOS a fost observată predominant pe celulele T CD4. *A se vedea* Figura 9 (HNSCC). Frecvența celulelor ICOS pozitive la populația CD8 este foarte scăzută la o majoritate a acestor tumori. Am observat, de asemenea, că majoritatea celulelor efectoare CD4 coexprimă ICOS și PD-1. Aceste date sprijină dezvoltarea unei terapii ICOS în formă clinică doar sau în asociere cu terapiile anti-PD-1. Intensitatea fluorescenței medii (MFI) a colorației ICOS oferă o măsurare a exprimării ICOS la diferitele populații de celule T. MFI al celulelor ICOS pozitive din celulele Treg a fost de 2-3 ori mai mare decât efectori CD4. *A se vedea* Figura 9C. Trebuie să se observe că există populații mici de efectori CD4 care au un nivel ridicat al MFI ICOS. Confirmarea diferenței dintre densitățile receptorului ICOS în Teff față de Treg, cuplată cu datele din analizele ADCC în curs de desfășurare pentru a evalua sensibilitatea diferențială a Teff și Treg la epuizare, ar susține dezvoltarea anticorpului agonist cu un Fc activ care ar putea epuiza potențial celulele Treg.

Studiile translaționale indică niveluri ridicate de celule T ICOS pozitive infiltrate tumoral la un subset de tumori umane (cum ar fi HNSCC, NSCLC etc.). Exprimarea ICOS este corelată cu exprimarea altor regulatori checkpoint, cum ar fi CTLA-4 și PD-1. Analiza subseturilor de celule T a arătat că exprimarea ICOS este limitată predominant la compartimentul celulelor T CD4. ICOS este exprimat atât în celulele Treg FoxP3 pozitive, precum și în celulele Teff CD4. Studiile arată, în concordanță cu literatura, că nivelul de exprimare ICOS este mai mare în celulele Treg comparativ cu celulele Teff CD4.

Exemplul 4: Generarea anticorpilor*Reactivi*

Proteinele ICOS reprezentând speciile umană, șoarece, șobolan și macac cu coadă lungă (*cynomolgus*) au fost produse ca fuziuni Fc homodimerice (schelet IgG1), iar ICOS-hFc uman și de la șoarece au fost folosite ca antigeni pentru imunizări la rozătoare. ICOS-hFc uman a inclus aminoacizii ICOS umani de 1 la 141 (21 până la 141 în construct matur); ICOS-hFc de la șoarece a inclus aminoacizii ICOS de la șoarece de la 1 la 142 (21 până la 142 în construct matur).

ICOS-Fc a fost generat ca molecule de fuziune Fc atât bivalente cât și monovalente pentru a evalua legarea avidă și monovalentă a anticorpilor la ICOS, respectiv.

În scopul selecției, liniile celulare stabile CHO care supra-exprimă ICOS uman sau de șoarece cu lungime completă (celule CHO ICOS+ sau „celule CHO-ICOS”) au fost generate, precum și constructe care codifică ICOS cu lungime completă de macac cu coadă lungă sau șobolan pentru a permite selecția ca urmare a transfecției tranzitorii.

Campania pentru anticorpi de la rozător

S-au efectuat campanii la rozătoare la Precision Antibody. Șoareci (10), șobolani (6), hamsteri sirieni (6) și hamsteri armenieni (6) au fost imunizați cu hICOS-hFc sau mICOS-hFc. Au fost generate hibridoame și supernatanți selectați prin ELISA pentru legarea la hICOS și mICOS, precum și prin screening multiplex prin FACS pentru legarea la celulele CHO-hICOS și CHO-mICOS. Hibridoamele au fost evaluate suplimentar pentru capacitatea de a bloca legarea ICOS la celulele CHO-ICOS. Clonele care au obținut un punctaj pozitiv pentru legarea la ICOS de la șoarece și uman au fost selectate pentru purificarea proteinelor. Anticorpii purificați au fost reselectați ulterior în analizele de legare și blocare, iar anticorpii care au obținut scor pozitiv au trecut la evaluarea *in vitro* după cum este descris mai jos. Toți anticorpii selectați pentru investigații suplimentare din cadrul abordării de imunizare provin din fuziuni de la hamster armenian.

Caracterizarea biochimică a anticorpilor

Măsurătorile de afinitate au fost efectuate folosind tehnologia interferometriei în biostrat (BLI) (ForteBio Octet® RED96). Afinitățile monovalente au fost generate cu versiuni IgG ale anticorpilor cu forme monovalente, heterodimerice ale receptorului ICOS. Afinitățile avide au fost

generate folosind IgG cu lungime completă împotriva formelor homodimerice ale receptorului ICOS. Afinitățile hICOS monomerice și bivalente ale anticorpilor de hamster selectați sunt prezentate în Tabelul 3.

Tabelul 3. Afinitatea anticorpilor derivați de la hamster.

mAb	Afinitate hICOS monomerică			Afinitate hICOS bivalentă		
	K _D	K _{on} (1/Ms)	K _{dis} (1/s)	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	K _{dis} (1/s)
7F12	1,32E-08	1,33E+05	1,75E-03	3,42E-11	6,74E+05	2,30E-05
35A9	2,45E-09	1,78E+05	4,38E-04	<1,0E-12	6,25E+05	<1,0E-07
36E10	1,59E-09	1,43E-05	2,28E-04	<1,0E-12	6,26E+05	<1,0E-07
37A10	3,18E-09	1,51E+05	4,79E-04	3,42E-11	6,74E+05	2,30E-05
16G10	4,37E-09	1,63E+05	7,12E-04	<1,0E-12	1,01E+06	<1,0E-07

- 5 Afinitatea de legare a anticorpilor pentru ICOS de la macac cu coada lungă, șoarece și șobolan a fost, de asemenea, determinată, iar anticorpul au fost identificați a lega toate speciile cu afinitate comparabilă. Măsurătorile reactivității încrucișate au fost efectuate folosind tehnologia BLI cu panouri de anticorpi care sunt supuse selecției pentru legarea la fuziuni de ICOS-Fc uman, de la șoarece și macaci cu coadă lungă (forme bivalente, homodimerice). Tabelul 4 prezintă date reprezentative privind legarea pentru mai mulți anticorpi de la hamster pentru ICOS uman și de la macac cu coada lungă.
- 10

Tabelul 4. Afinități de legare bivalentă a câtorva anticorpi de la hamster la ICOS-Fc uman și cyno (macac cu coada lungă).

ligand/mAb	hICOS-Fc			cynoICOS-Fc		
	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	K _{dis} (1/s)	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	K _{dis} (1/s)
hICOSL-mG2a	3,62E-10	9,41E+05	3,41E-04			
7F12	3,42E-11	6,74E+05	2,30E-05	<1,0E-12	5,85E+05	<1,0E-07
35A9	<1,0E-12	1,01E+06	<1,0E-07	<1,0E-12	7,40E+05	<1,0E-07
36E10	<1,0E-12	6,17E+05	<1,0E-07	<1,0E-12	6,97E+05	<1,0E-07
37A10	<1,0E-12	6,25E+05	<1,0E-07	<1,0E-12	7,12E+05	<1,0E-07
16G10	<1,0E-12	6,26E+05	<1,0E-07	<1,0E-12	6,47E+05	<1,0E-07

- 15 Pentru a evalua specificitatea, legarea la celulele CHO ICOS+ umane și celulele CHO ICOS+ de șoarece a fost analizată individual prin citometrie în flux. Ca un control pentru elimina anticorpul pan-reactivi, colorația pe celulele CHO cărora le lipsește exprimarea receptorului ICOS a fost, de asemenea, examinată. Toți anticorpul selectați s-au legat de celulele CHO ICOS+ umane și de la șoarece ICOS+ și nu de celulele CHO care nu prezintă exprimare ICOS.

- 20 Pentru a evalua suplimentar specificitatea anticorpilor anti-ICOS, anticorpul au fost selectați pentru a se lega la membrii suplimentari ai familiei proteinei CD28 (CD28, BTLA, PD-1 și CTLA-4). Nu s-a observat nicio reactivitate încrucișată pentru anticorpul selectați la CD28, BTLA, PD-1 sau CTLA4 uman sau de la șoarece. Mai precis, a fost evaluată legarea la fuziunile Fc (a CD28, BTLA, PD-1 și CTLA-4) în formele dimerice și nu s-a observat nicio legare.
- 25 un subset de membri ai familiei CD28, proteina de șoarece sau umană a fost supra-exprimată pe suprafața celulelor HEK293 și CHOK1. Nu s-a observat nicio legare peste stadiul tehnicii cu referire la celulele mamă fără transducție.

S-a descoperit că anticorpul nu se leagă de proteinele serice abundente, nici de trombocite sau globule roșii.

- 30 Gruparea epitopilor a fost efectuată folosind BLI. Anticorpul au fost, de asemenea, grupați pe baza unei fuziuni ICOSL-Fc (formă homodimerică, bivalentă). Toți anticorpul selectați au fost găsiți în același grup de epitopi și toși au blocat legarea ICOS la ligandul ICOS.

Umanizare

- 35 Anticorpul selectați au fost umanizați prin efectuarea unor studii de omologie între regiunile cadru variabile ale anticorpului de origine umană sau de la hamster. S-a furnizat un

panou de modele primare pentru analiză și anticorpii au fost produși apoi pentru comparație cu anticorpi sălbatici (formă de la hamster sau himerică). Odată ce panourile umanizate au fost produse, secvențele leader au fost caracterizate și clasificate pe baza afinității și activității *in vitro*. Au fost executate modele suplimentare de umanizare pentru a reduce răspunderile de secvență și

5 situsurile imunogenice cu punctaj redus, ce rezultă în variații minore ale secvenței. Răspunderile secvenței considerate a include prezența cisteinelor libere și situsuri potențiale pentru degradarea chimică (deamidarea asparaginei, izomerizarea aspartatului, metionină/triptofan și glicare a lizinei non-enzimatic).

Afinitatea unui anticorp umanizat având regiunile variabile de 37A10S713 pentru formele monomerice de ICOS de la om, macac cu coadă lungă și șobolan a fost măsurată prin tehnologia interferometrie în biostrat (BLI) (ForteBio Octet® RED96) și K_D sunt prezentate în Tabelul 5. K_D s-au considerat comparabile între specii, deoarece au fost în intervalul de 2 până la 5 ori. Funcționalitatea de legare a fost confirmată prin evaluarea potențialului de inducere a proliferării celulelor T CD4+ primare izolate din fiecare specie.

15 **Tabelul 5.** Afinitate de legare monovalentă a 37A10S713 la ICOS uman, de la macac cu coada lungă și de la șobolan.

	Uman	Macac cu coada lungă	Șobolan
Afinitate de legare (K_D nM) ^A	1,50±0,39	0,66±0,16	7,20±2,55
Potență în proliferarea celulelor T CD4+ primare (EC50 nM) ^B	4,27-49,75	8,25 - 13,14	10,7-30,0
^A afinități ilustrate ca medie ± SEM din 6 experimente; ^B este prezentat interval de 4 donatori			

Exemplul 5: Caracterizarea funcțională *in vitro* a anticorpilor anti-ICOS

20 O serie de analize *in vitro* pe bază de celule au fost utilizate pentru a evalua activitatea mAb anti-ICOS. Scopul principal a fost de a fi selectați anticorpii cu proprietăți agoniste/co-stimulatoare. Deoarece sistemul celular (celulă primară versus linie celulară transfectată) și metoda de prezentare a anticorpilor (solubilă versus legată de plăci sau cross-lincată) pot influența

25 activitatea agonistă, au fost utilizate mai multe formate de analiză diferite. În plus, o analiză pentru detectarea activității superagoniste nedorite (*a se vedea* Suntharalingam et al., 2006, N. Eng. J. Med., 355: 1018-28) a fost, de asemenea, utilizată.

Analizele concepute pentru a căuta activitatea agonistă/co-stimulatoare a mAb anti-ICOS au fost efectuate pe tipurile de celule prezentate mai jos, cu primul semnal către celulele T

30 (semnalul 1) furnizat utilizând fie concentrații sub-optime de anti-CD3 sau PMA sau în analiza PBMC cu stimularea cu super-antigen (SEB):

1. Analiza celulelor T CD4+ umane primare
 - a. Format de anticorp legat de placă/cross-lincat co-stimulat cu anti-CD3
 - b. Format de anticorp solubil co-stimulat cu PMA
- 35 2. Analiza Jurkat (linie celulară raportoare cu constructe ICOS umane sau de la șoarece transfectate)
 - a. Format legat de placă/cross-lincat anti-CD3 sau PMA
 - b. Format de anticorp solubil co-stimulat cu PMA
- 40 3. Analiza PBMC uman
 - a. Format de anticorp solubil cu super-antigen (SEB)

Panouri de mAb anti-ICOS de la hamster au fost selecționate în analizele de mai sus pentru a identifica anticorpii cu proprietăți agoniste. Un exemplu de activitate agonistă observată într-o analiză utilizând celulele T CD4+ umane primare co-stimulate cu anti-CD3 suboptim, cu adăugarea anticorpului anti-ICOS legat de placă este ilustrat în Figura 10A pentru o selecție de anticorpi anti-ICOS de la hamster. În această analiză, celula T CD4+ umană izolată din PBMC este activată cu anti-CD3 legat de placă suboptim, în prezența anticorpilor anti-ICOS legat de placă de la hamster, (7F12, 37A10 și 16G10) la patru concentrații (mg/ml). hICOSL legat de placă și anti-CD28 solubil în prezența anti-CD3 sunt utilizate drept controale pozitive. % celule divizate este reprezentat grafic. Anticorpi anti-ICOS multipli prezintă activitate în această analiză. Figura 10B prezintă rezultatele analizei utilizând anticorp solubil și costimulare cu PMA sub-optim. Celulele T CD4+ umane au fost izolate de la PBMC prin selecție negativă și etichetate cu CFSE. Celulele au fost activate în plăci cu 96 de godeuri numai cu PMA suboptim (0,25 ng/ml) sau în

prezența diferitelor versiuni Fc (hamster, mG1, mG2a, mG1Agly sau hG1) ale anticorpului anti-ICOS 37A10 la concentrațiile indicate (mg/ml). Anticorpul anti-CD28 solubil a fost utilizat drept un control. Proliferarea a fost analizată în ziua 3 prin citometrie în flux. Versiunile IgG1 și IgG1-agly de la șoarece au prezentat activitate în cadrul analizei, împreună cu anticorpul mamă complet de la hamster. Cel puțin anticorpul 37A10 a prezentat activitate de agonist atât în format solubil, cat și legat de placă. *A se vedea* Figurile 10A și 10B.

Figura 10C ilustrează activitatea de agonist a rezultatelor anticorpului 37A10S713 cu un IgG1 uman în analiza celulelor T CD4+ umane primare. Celulele T CD4+ au fost izolate din PBMC de la 4 donatori sănătoși, etichetate cu colorant CFSE și apoi incubate în plăci acoperite cu o concentrație suboptimă de anti-CD3 și diferite concentrații de fie 37A10S713-hIgG1 fie un anticorp IgG1 uman de control negativ (virusul sincitial anti-respirator (RSV)). După 3 zile, procentul de celule divizate a fost determinat folosind citometria în flux. Valorile EC50 au variat între 4,27- 49,75nM pentru cei 4 donatori testați. Proliferarea este reprezentată grafic ca procent din celulele divizate (măsurate prin diluția CFSE folosind citometria în flux) și reprezintă mijloc pentru duplicate. Figura 10C prezintă date de la un donator reprezentativ.

Un alt exemplu de analiză în care anticorpii de la hamster au demonstrat activitate de agonist este analiza de raportor Jurkat. O analiză de raportor Jurkat a fost dezvoltată pe plan intern prin transducția unui construct de exprimare himeric hICOS-hCD28” într-o linie celulară raportor NFkB Jurkat. Celulele raportoare Jurkat-hICOS-hCD28 au fost activate timp de 5 ore cu PMA și anticorpi anti-ICOS 37A10 solubili de la hamster cu capete Fc diferite la 11 concentrații (mg/ml). Anti-CD28 și hICOSL-Fc solubile sunt utilizate drept controale. % din celulele GFP+ este reprezentat grafic. Datele reprezentative din analiza de raportor Jurkat, utilizând anticorpi anti-ICOS de la hamster ICOS, sunt prezentate în Figura 11. Figura 11A prezintă rezultatele pentru diferite versiuni Fc ale anticorpului anti-ICOS 37A10 (hG1, mG1, mG2a, mG1Agly) în concentrațiile indicate (mg/ml). Toate versiunile Fc ale anticorpului anti-ICOS, inclusiv versiunea mG1-agly (adică, funcția efectoare Fc minimă) prezintă activitate în această analiză. Figura 11B prezintă rezultatele pentru anticorpii umanizați 37A10S713, 37A10S715, 37A10S716 și 37A10S718 la concentrațiile indicate (mg/ml). Toți cei patru anticorpi umanizați au demonstrat activitate de agonist în cadrul analizei.

Un alt format de analiză care prezintă activitate de agonist este analiza PBMC cu enterotoxina B stafilococă superantigenă (SEB) utilizând producția de citokine (de ex., IFN γ) ca date citite. Această analiză are în mod tipic o mică fereastră a unui efect de la 1,5 - 3 ori asupra eliberării de citokine. În conformitate cu datele publicate anti-PD-1, inducerea citokinei cu anticorpii anti-ICOS este de ~2 ori, dar este observată reproductibil în această analiză la mai mulți donatori. *A se vedea, de exemplu*, Korman et al., 2014, Cancer Res., 2: 846-856. O analiză reprezentativă este prezentată în Figura 12. PBMC înghețate de la donatori sănătoși au fost stimulate cu SEB și anticorp anti-ICOS 37A10 solubil (cu mG1, mG1-agly sau hG1 Fc) la concentrațiile indicate (mg/ml) timp de 3 zile. Au fost colectați supernatanți și nivelurile IFN γ au fost măsurate cu ajutorul matricei de granule de citokine, utilizând citometria în flux. Anticorpii anti-CD28 și izotipului IgG1 de la șoarece au fost utilizați drept controale. IFN γ este indusă de PBMC în urma stimulării cu SEB în prezența anticorpilor anti-ICOS solubili. În acest format de analiză, o versiune mG1-agly a 37A10 a prezentat activitate redusă.

Pentru a selecționa orice potențiali super-agoniști, a fost utilizată o analiză în care celule T CD4+ primare umane au fost incubate cu anticorpi anti-ICOS solubili sau legați de placă în absența unui semnal 1, folosind un anticorp super-agonist anti-CD28 cunoscut drept control pozitiv. Celulele T CD4 umane activate în absența anti-CD3 se vor prolifera numai atunci când sunt tratate cu un anticorp super-agonist anti-CD28 (clona CD28.2/5D10) în formă solubilă, dar nu atunci când sunt tratate cu anticorp ICOSL-Fc sau anti-ICOS 37A10 (versiunile de la hamster și hG1 Fc), sau un anticorp non-superagonist anti-CD28 (CD28.2). Niciunul dintre anti-ICOS mAb testați nu a prezentat activitate super-agonistică în această analiză. Datele reprezentative sunt ilustrate în Figura 13.

Este bine stabilit că ICOS poate semnaliza prin calea de semnalizare AKT (trecută în revistă în Simpson et al., 2010, Curr. Opin. Immunol., 22: 326-332). Capacitatea anticorpului anti-ICOS de a induce semnalizarea prin AKT a fost evaluată drept un mijloc suplimentar de a demonstra activitatea agonistă a anticorpului.

Celulele T CD4 izolate din PBMC umane au fost stimulate timp de 24 de ore cu anti-CD3/anti-CD28 și apoi au lăsat în repaus timp de 24 de ore în mediu de cultură. Celulele au fost apoi incubate cu anti-ICOS 37A10-mG2a, hICOSL-mG2a Fc sau PBS timp de 2, 5, 15 sau 30 minute cu sau fără anticorp de cross-lincare IgG de la șoarece. După incubare, celulele au fost fixate, permeabilizate și apoi colorate cu un anticorp anti-fosfo-AKT. Procentajul de celule pAKT-pozitive a fost analizat prin citometrie în flux.

Așa cum se arată în Figurile 14A-B, pAKT a fost indus pe celulele T CD4 în urma tratamentului cu 37A10-mG2a cu o cinetică similară comparativ cu tratamentul cu hICOSL-MG2a. Inducerea semnalizării pAKT a fost observată numai în prezența agentului de cross-lincare secundar.

5

Exemplul 6: Caracterizarea funcțională *In vivo* a anticorpilor anti-ICOS

Anticorpi selectați din analizele de selecție descrise mai sus au fost evaluați *in vivo* utilizând modelele tumorale singeice.

10 Modelul de fibrosarcom Sa1N (Ostrand-Rosenberg, 2001, Curr. Protoc. Immunol., Capitolul 20) poate fi utilizat pentru evaluarea anticorpilor anti-ICOS *in vivo*. Profilarea imunitară a modelului Sa1N de la șoarece arată că este foarte infiltrat cu celulele T CD4 și că celulele T CD4 exprimă niveluri ridicate de ICOS. Acest profil imunitar este similar profilurilor imunitare ale probelor de la pacienții cu NSCLC în care am observat niveluri ridicate de infiltrare CD4, cu

15 exprimarea ICOS, în mare parte restricționată la compartimentul CD4.
Un al doilea model utilizat pentru evaluarea eficienței anticorpilor anti-ICOS este modelul de carcinom de colon CT26 (Wang et al., 1995, J. Immunol., 9: 4685-4692). Profilarea imunitară a modelului CT26 de la șoarece a indicat niveluri ridicate de infiltrare CD8. Exprimarea ICOS a fost observată la subsetul de celule T CD8 din acest model. O mică proporție din probele

20 NSCLC umane prezintă în mod similar exprimarea ICOS în celulele T CD8.

Formate de anticorpi pentru evaluarea *in vivo*

25 IgG1 uman (hIgG1) se poate lega de receptori Fc multipli, inclusiv legare puternică la receptorii Fc ce se activează și care sunt capabili de cross-lincare a receptorilor și mediere ADCC și CDC. Având în vedere capacitatea de legare a receptorilor Fc care se activează, hIgG1 este de obicei capabilă să epuizeze celulele care exprimă un nivel ridicat de țintă. Cel mai apropiat echivalent de la șoarece al hIgG1 este IgG2a de șoarece (mIgG2a). Astfel, ca exemplu, experimentele *in vivo* pentru evaluarea unui anticorp agonist ICOS cu capacitatea de epuizare ar

30 utiliza mIgG2a pentru a mima proprietățile hIgG1.
IgG4 uman (hIgG4) este utilizată în situații terapeutice în care nu se dorește epuizarea, deși hIgG4 este capabil de un anumit nivel de depleție. Este aproximativ, deși nu este perfect, aliniat la IgG1 de la șoarece (mIgG1), care leagă aproape exclusiv receptorii FcγRII inhibitori și este astfel capabil de cross-lincare, însă nu în mod particular competent la epuizare.

35 În ceea ce privește anticorpilor anti-ICOS, au fost evaluați inițial anticorpi de la hamster *in vivo* ca Ab de la hamster compleți. Ab de la hamster prezintă un IgG1 de la hamster, care are caracteristici de legare FcR similare cu mIgG1. Anticorpilor de la hamster de interes au fost clonați ca himere cu regiuni Fc de la șoarece, fie ca mIgG2a, fie mIgG1.

40 Model de fibrosarcom Sa1N

Modelul *in vivo* primar utilizat pentru selecția candidaților de anticorp anti-ICOS pentru eficiență este modelul de fibrosarcom Sa1N. Astfel, anticorpilor selectați din analizele de selecție descrise mai sus au fost evaluați în modelul Sa1N. În studiile inițiale, mai mulți anticorpi de la

45 hamster (clonele 7F12, 36E10, 37A10, 16G10 și 35A9) au demonstrat activitate antitumorală robustă, atunci când s-au administrat ca agenți unici într-o doză de 8 mg/kg la modelul Sa1N. *A se vedea* Figura 15. Celulele de fibrosarcom Sa1N (1×10^6) au fost injectate s.c. pe flancul drept al șoarecilor netratați anterior A/J (vârsta de 6-8 săptămâni, femele). Când volumele tumorale au atins 50-100 mm³ în ziua 7, șoarecii au fost randomizați. Șoarecii au primit doze de anti-ICOS de la hamster (7F12, 36E10, 37A10, 16G10 și 35A9) sau anticorp izotip IgG de la hamster i.p. în ziua

50 7, 10, 14 și 17. Creșterea tumorală a fost monitorizată de două ori pe săptămână. N=10.
O caracteristică potențial benefică a imunoterapiei anti-cancer este capacitatea de a dezvolta un răspuns imunitar susținut și durabil împotriva tumorii. S-a determinat posibilitatea unui șoarece tratat anterior cu un anticorp anti-ICOS de a respinge ulterior o tumoră. Șoarecii au

55 fost tratați cu anticorp în doză de 8 mg/kg în ziua 7, 10, 14 și 17. Ulterior, șoarecii care nu prezentau tumori au fost reimplantați cu o tumoră în ziua 60. Toți șoarecii tratați anterior cu anticorpi anti-ICOS 7F12 (n=7) au respins tumoră nou implantată, în comparație cu șoarecii netratați anterior (n=10) în care tumorile au crescut la toți șoarecii. *A se vedea* Figura 16.

60 Anticorpilor de la hamster au fost clonați drept anticorpi himerici cu regiuni Fc de la șoarece (mG1 sau mG2a) pentru a permite evaluarea contribuției funcției efectoare a Fc la activitatea *in vivo*. Șoarecii au primit un total de 4 doze de două ori pe săptămână de câte 4 mg/kg

de anticorp incepand din ziua 11. Anticorpul anti-CTLA-4 a fost inclus ca un control pozitiv. Experimentul inițial de selecție a fost efectuat la o doză de 4 mg/kg, iar eficacitatea a fost observată atât în format mG1, cât și în format mG2. Datele reprezentative pentru unul dintre anticorpii de la hamster, 37A10, sunt prezentate în Figura 17.

Model tumoral singenic de colon CT26

Modelul tumoral singenic de colon CT26 a fost utilizat atât pentru evaluarea activității ca agent unic, cât și ca terapie combinată cu anticorpul anti-PD-1.

În modelul CT26, mai mulți dintre anticorpii anti-ICOS de la hamster (de ex., 7F12, 35A9, 36E10, 37A10) au prezentat activitate ca agent unic. *A se vedea* Figura 18. Modelul CT26 a fost folosit și pentru a evalua posibila activitate combinată cu anti-PD-1. Atunci când anticorpii anti-ICOS au fost combinați cu un anticorp anti-PD-1, eficacitatea antitumorală a fost îmbunătățită semnificativ. Șoarecii cu tumoare CT26 au fost tratați de două ori pe săptămână (4 doze începând cu ziua 3) doar cu anticorpi anti-ICOS de la hamster (8 mg/kg) sau în combinație cu anticorp anti-PD-1 (8 mg/kg). În mod notabil, combinația dintre anticorpul anti-PD-1 cu anti-ICOS 37A10 a avut ca rezultat 9/10 șoareci fără tumori. *A se vedea* Figura 18.

Exemplul 7: Epuizarea Treg selectivă contribuie la eficiența anticorpului anti-ICOS

Studii *ex vivo* au fost efectuate pentru a caracteriza starea infiltratelor celulelor imunitare în urma dozării cu anticorpi anti-ICOS. Studiile din modelul Sa1N au prezentat o scădere a populației Treg după tratamentul cu 7F12. Șoarecii au primit două doze de anti-ICOS de la hamster 7F12, 7F12-mG1 sau 7F12-mG2a la 8 mg/kg în zilele 7 și 10. Tumorile și splinele au fost recoltate și analizate în ziua 12. A existat o reducere marcată a celulelor Treg, dar nu și a Teff, însă un impact redus asupra populațiilor de celule T din organe limfoide cum ar fi splina sau ganglion limfatic. *A se vedea* Figura 19.

De asemenea, au fost observate rezultate similare cu alți anticorpi anti-ICOS, precum 37A10. *A se vedea* Figura 20. Șoarecii au primit două doze de anticorpi anti-ICOS la 8 mg/kg în zilele 7 și 10. Tumorile au fost recoltate și analizate în ziua 12. O reducere similară a populației Treg a fost observată și în modelul CT26 după dozarea cu anticorpul anti-ICOS.

Luate împreună, studiile TIL (limfocite cu infiltrație tumorală) susțin ipoteza că celulele Treg sunt epuizate selectiv de anticorpii anti-ICOS descriși în prezentul, fără epuizarea corespunzătoare a populațiilor de celule Teff și în mod specific în tumori, dar nu și la nivelul altor organe sau la periferie.

Pentru a demonstra oficial contribuția sistemului imunitar la eficiența anticorpului anti-ICOS, au fost efectuate experimente privind epuizarea celulară în contextul modelului tumoral Sa1N. Mai precis, s-au epuizat de la șoarece celulele T CD8, celulele T CD4 sau o combinație de celule T CD4 + CD8. În zilele 6 și 13 de implantare post-tumorală, șoarecii au fost tratați cu anti-CD8, anti-CD4, anti-CD4 + anti-CD8 sau anticorp Ig de control (n=10 per grup). Anticorpul anti-ICOS 7F12 a fost administrat la un 8 mg/kg anticorp în ziua 7, 10, 14 și 17. Creșterea tumorală a fost monitorizată de două ori pe săptămână.

S-a observat o reducere semnificativă a eficacității antitumorale a 7F12 la epuizarea de CD4, CD8 sau CD4 + CD8 T la șoareci. *A se vedea* Figura 21.

Exemplul 8: Reducerea Treg selectivă de anticorpul anti-ICOS umanizat

PBMC umane au fost incubate la 37°C cu 100 ng/ml IL-2 umană recombinantă timp de 48 de ore într-un incubator umidificat cu 5% CO₂. După 48 de ore, s-a adăugat anticorp 37A10S713 la concentrațiile indicate. Anticorpul a fost preparat ca diluții serice de 10 ori în medii de cultură ce conțin IL-2. Amestecul de anticorp/celulă a fost lăsat la incubat încă 72 de ore. După incubare, celulele au fost colorate pentru CD3, CD4, CD8, CD25 și FoxP3 conform metodelor standard și analizate prin citometrie în flux. A fost efectuată cuantificarea celulelor Treg (CD4+ CD25+ FoxP3+) și Teff (CD4+ CD25- FoxP3-) pentru fiecare concentrație și tratament. Datele au fost normalizate la procentul fiecărui subset într-un grup tratat cu trastuzumab pentru fiecare concentrație.

Rezultatele experimentului respectiv sunt prezentate în Figura 22A. Anticorpul 37A10S713 a cauzat o reducere dependentă de doză a celulelor Treg. Așa cum se arată în Figura 22B, celulele Teff și Treg au exprimat niveluri similare ale ICOS după cinci zile de tratament IL-2.

Exemplul 9: Reprovocare tumorală după tratamentul cu anticorpi anti-ICOS

Șoareci A/J de sex feminin cu vârsta cuprinsă între șase și opt săptămâni au fost inoculați subcutanat pe flancul drept cu 1×10^6 celule Sa1/N în 100 ml PBS folosind seringi pentru tuberculină cu ace de calibrul 27. Creșterea tumorală a fost monitorizată și în ziua 7, animalele au fost redistribuite în cuști noi după normalizarea volumului tumoral mediu la 100-150 mm³ pentru fiecare grup de tratament. Zece șoareci au fost incluși în fiecare grup de tratament. Animalele au fost tratate cu anticorpi prin intermediul injecțiilor intraperitoneale cu 0,25 mg/kg anticorp anti-ICOS (37A10S713 VH și VL (SECV ID NR: 60 și 61) cu un IgG2a de la șoarece) sau un control izotipic. Dozarea a fost efectuată în ziua 7 pentru doza unică sau în zilele 7 și 14 pentru 2 doze. Creșterea tumorală și greutatea corporală a animalelor au fost monitorizate de două ori pe săptămână. Șoarecii au fost sacrificați când volumele tumorale au atins ≥ 2000 mm³ sau dacă au existat semne de suferință clinică, precum ulceratii severe, conform protocolului IACUC.

Figura 23, panoul din stânga, prezintă volumul tumorii la șoareci cărora li s-a administrat o doză unică de anticorp anti-ICOS (n=10) sau două doze de anticorp anti-ICOS (n=10).

S-a efectuat un experiment de reprovocare tumorală pentru a evalua durabilitatea răspunsului. Cei 7 șoareci ce au fost provocați anterior cu celule Sa1/N ale căror tumori au fost eradicate cu o doză unică sau două doze de 0,25 mg/kg anticorp mIgG2A 37A10S713- au fost reprovocați pe flancul contralateral cu celule Sa1/N la 10 săptămâni după provocarea cu tumoarea inițială. Ca un control, șoarecii netratați anterior au fost, de asemenea, provocați cu celule Sa1/N (N=10). Animalele au fost evaluate privitor la creșterea tumorală de două ori pe săptămână.

Așa cum se arată în Figura 23, panoul din dreapta, niciunul dintre șoarecii de la care tumoarea a fost eradicată anterior cu tratamentul cu anticorp anti-ICOS, au prezentat creștere tumorală în experimentul de reprovocare.

25 **Exemplul 10: Exprimarea ligandului ICOS (ICOSL) la șoareci purtători de tumori Sa1/N (A) și la macaci cu coadă lungă cărora li s-a administrat anticorpului anti-ICOS**

Șoareci A/J de sex feminin cu vârsta de opt săptămâni au fost inoculați cu celule tumorale Sa1/N în ziua zero. În ziua 7, când tumorile au atins ≈ 100 mm³, șoarecii au primit o doză unică de 5 sau 100 mg i.p. de anticorp 37A10 cu fie IgG1 fie IgG2a de la șoarece sau anticorp de control izotipic. Șoarecilor li s-a administrat o doză ulterioară de anticorp în ziua 10, iar țesutul (sânge, splină și tumoare) a fost recoltat în ziua 12. După procesarea țesutului, celulele au fost incubate cu 5% bloc Fc (5% ser reconstituit de la șobolan normal, șoarece și om, 5% ser fetal de vițel, 0,1 mg/mL Ab de blocare Fc 2.4G2, 0,01% azidă de sodiu) timp de 15 min pe gheață în soluție tampon de colorație în flux (FSB: 5% FBS, 0,01% azidă de sodiu în 1xPBS). După blocarea Fc, celulele au fost colorate cu un cocktail de colorație extracelular (anti-CD45-BV510, anti-CD19-BV605, anti-ICOSLPE, Fixable Viability Dye eFluor 780) în FSB timp de 1 oră pe gheață. Celulele au fost spălate de două ori cu FSB. Celulele au fost fixate cu soluție de fixare/permeabilizare timp de 30 min. pe gheață. Celulele au fost spălate de două ori cu 1x soluție tampon de permeabilizare, apoi colorate cu un cocktail de colorare intracelulară (anti-CD3-BUV496, în soluție tampon de permeabilizare timp de 1 oră pe gheață. Celulele au fost spălate de două ori cu soluție tampon de permeabilizare, apoi resuspendate în 1,5% soluție PFA FSB. Celulele au fost trecute pe BD Fortessa și datele au fost analizate folosind software-ul FlowJo.

Probele au fost analizate pe un citometru de flux BD Fortessa. Pentru analiza exprimării ICOSL, colorarea ICOSL a fost analizată pe celulele B viabile CD45+ CD3- CD19+. Sunt raportate intensitățile medii ale fluorescenței ICOSL (MFI).

Anticorpul 37A10S713 cu IgG1 umană a fost administrat prin perfuzie intravenoasă cu durată de 1 oră la trei macaci cu coadă lungă per grup de dozare (0,5 mg/kg, 5 mg/kg, 75 mg/kg și numai vehicul). Sângele a fost obținut înainte de prima doză (ziua 1), la 48 ore după prima doză (ziua 3), la 7 zile după prima doză (înainte de a doua doză; ziua 8) și la 48 ore după a doua doză (ziua 10). 95% probe de sânge integral au fost mai întâi Fc blocate cu 5mE Human TruStain timp de 15 min pe gheață. După blocarea Fc, s-au adăugat 100 mL dintr-un amestec de anticorpi care conține anti-CD3 FITC, anti-CD20 PE, anti-CD14 PE/Cy7, colorant de viabilitate e780 și cynoICOSFc DyLight 650. Amestecul de sânge și de anticorpi a fost incubat pe gheață timp de 60 min. După incubare, probele au fost centrifugate la 500 x g timp de 5 min. Supernatantul a fost decantat și probele au fost resuspendate în 200% L de tampon de colorație FACS. Etapele de spălare au fost repetate de trei ori, cu resuspendarea finală 200 mL de soluție tampon de colorare + 0,1% paraformaldehidă.

Probele au fost analizate pe un citometru de flux BD Fortessa. Pentru analiza exprimării ICOSL, colorarea ICOSL a fost analizată prin DyLight 650 etichetat cynoICOS-Fc pe celulele B viabile CD3- CD20+. MFI ICOSL au fost normalizate la vehicul la fiecare moment.

Rezultatele acelor experimente sunt prezentate în Figurile 24A și 24B. S-a observat o creștere dependentă de doză a exprimării ICOS-L la toate tratamentele și dozele de anticorpi și în toate țesuturile asociate cu șoarecii tratați cu control izotip. *A se vedea* Figura 24A. În mod similar, a fost observată o creștere dependentă de doză a exprimării ICOS-L în toate momentele de timp pentru grupurile de doze de 0,5 și 5 mg/kg la macaci cu coada lungă raportat la vehicul și la probele pre-studiu. *A se vedea* Figura 24B. Inducerea ICOSL a fost observată și în grupul 75 mg/kg, însă exprimarea observată poate fi o subreprezentare din cauza posibilelor interferențe cu medicamentul, deoarece anticorpii anti-ICOS poate lega reactivul de colorare (cynoICOS-Fc).

Implicarea țintei ICOS poate fi evaluată, de asemenea, conform măsurătorilor prin analiza disponibilității receptorului, de exemplu, după cum urmează. Șoarecii netratați anterior au fost injectați i.p. die cu controlul izotip mIgG2a, la 2,5 mg/kg, fie 37A10S713 cu IgG2a de la șoarece la 2,5 mg/kg. În diferite momente după injectare, sângele a fost recoltat în microtuburi cu înveliș EDTA prin extragere submandibulară.

Sângele integral a fost blocat Fc folosind TruStain de la șoarece (BioLegend) timp de 5 minute pe gheață. După incubare, 100 μ l de amestec de anticorp de colorare extracelular cu concentrație 2x au fost adăugați la fiecare probă timp de 30 de minute la 4°C. Probele au fost centrifugate și fixate și permeabilizate în soluție tampon de colorare Foxp3 (eBioSciences) timp de 30 de minute la 4°C. Probele au fost apoi centrifugate și resuspendate în colorant de anticorp intracelular timp de 30 minute la 4°C. Probele au fost centrifugate și resuspendate în 0,1% PFA. Probele au fost analizate pe un BD LSRII Fortessa. Treg au fost identificate ca CD45+ CD3+ CD4+ Foxp3+ vii. Teff au fost identificate ca CD45+ CD3+ CD4+ Foxp3+ vii. Celulele CD8+ au fost identificate ca CD45+ CD3+ CD8+ vii. 37A10S713-Mg2a etichetat fluorescent (DyLight 650 conjugat) a fost utilizat ca reactiv de colorare pentru ICOS. Disponibilitatea receptorului la fiecare moment de timp a fost determinată utilizând următoarea formulă:

$$\% \text{ Receptor disponibil la timpul } t = ((\text{MFI a } 37\text{A10S713-Mg2aDy650 la timpul } t - \text{MFI a izotipului Dy650 la timpul } t)) / ((\text{MFI a } 37\text{A10S713-Mg2aDy650 pre-studiu} - \text{MFI a izotipului Dy650 prestudiu})) \times 100$$

Rezultatele au indicat că în urma administrării anticorpilor anti-ICOS, nivelurile receptorului liber sunt nedetectabile, sugerând că anticorpii saturează toate moleculele ICOS țintă disponibile.

Exemplul 11: Inducerea chimiokinelor și citokinelor Th-1 în urma tratamentului anti-ICOS

Tumori pulmonare proaspete de la pacient au fost obținute la 24 ore după intervenția chirurgicală. Țesutul moale a fost îndepărtat manual din tumoare, iar tumoarea solidă rămasă a fost integrată în 4% agar cu punct scăzut de topire într-un recipient turnat și este lăsat să se solidifice pe gheață. Tumoarea integrată în gel a fost tăiată prin vibratom (Leica) (viteză: 2, frecvență: 9) pentru a genera felii cu grosimea de 300 μ m. Dacă tumoarea a fost prea moale și nu poate fi feliată de vibratom, țesutul a fost tăiat manual cu o lamă.

Feliile de tumoare au fost plasate într-un filtru transgodeuri de 40 mm (Millipore) ($\square$ 1 felie/godeu), iar unitatea a fost mutată în godeurile unei plăci cu 6 godeuri, care a conținut 1,5 mL de mediu de histocultură (RPMI complet 1640/AIM-V). Tratamentul corespunzător a fost adăugat apoi în mediul din godeul corespunzător. Tratamentele au inclus 10 mg/mL anti-RSV hIgG1 (Lake Pharma, lot# 3086-849598) ca un control izotipic, 10 mg/mL anticorp 37A10S713 cu IgG1 umană (SECV ID NR: 188 și 189) sau 10 mg/mL de anticorp anti-PD-1 (IgG4). Plăci replicate au fost pregătite pentru diferite momente de timp, variind între 6-72 de ore. Plăcile au fost introduse într-un incubator la 37°C, 5% CO₂.

La momentele de timp dorite, feliile tumorale au fost colectate și scufundate în RNALater (Ambion). ARN a fost extras folosind o kitul mini RNeasy (Qiagen, cat#74106) conform instrucțiunilor producătorului. După extragerea ARN, 1 mg de ARN a fost utilizat pentru transcrierea inversă folosind un kit de sinteză AND c Bio-Rad iScript (cat#170-8891). Produsul RT a fost diluat în proporție de 1 la 7 și 3 mL s-au utilizat pentru fiecare reacție qPCR. qPCR a fost efectuat folosind TaqMan Gene Expression Master Mix de la Thermo Fisher Scientific (cat#4369016) folosind un sistem Bio-Rad Real-Time. Analizele TaqMan utilizate sunt enumerate în Tabelul 6.

Exprimarea a fost normalizată la CD45, cu modificarea numărului de ori calculată ca:

$$modificarea = \frac{1/2^{(exp\ tint\ t\ Ct - exp\ CD45\ Ct)}}{1/2^{(iso\ tint\ t\ Ct - iso\ CD45\ Ct)}}$$

Tabelul 6. Analize TaqMan ale chemokinelor și citokinelor

Țintă	ID analiză	Sursă
CD8B	Hs00174762 ml	ThermoFisher Scientific
CSF2	Hs00929873 ml	ThermoFisher Scientific
PRF1	Hs00169473 ml	ThermoFisher Scientific
GZMA	Hs00989184 ml	ThermoFisher Scientific
GZMB	Hs00188051 ml	ThermoFisher Scientific
IL2	Hs00174114 ml	ThermoFisher Scientific
CXCL9	Hs00171065 ml	ThermoFisher Scientific
CXCL10	Hs01124251 g1	ThermoFisher Scientific
CXCL11	Hs04187682 gl	ThermoFisher Scientific
FOXP3	Hs01085834 ml	ThermoFisher Scientific
CTLA4	Hs00175480 ml	ThermoFisher Scientific
CD45	Hs04189704_ml	ThermoFisher Scientific
CXCL13	Hs00757930 ml	ThermoFisher Scientific

- 5 Rezultatele acelui experimentului sunt prezentate în Figura 25. La momentul în timp de 6 ore cu tumoare pulmonară 1, anticorpul anti-ICOS a avut ca rezultat creșterea exprimării GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 și CXCL13. Anticorpul anti-PD-1, de asemenea, a crescut exprimarea GZMa, GZMb, CSF2, CXCL9 și CXCL10, cu toate că într-o mai mică măsură a prezentat și o creștere similară a CXCL11. Pentru tumoarea pulmonară 2 la momentul de 24 de ore, tratamentul cu anticorp anti-ICOS a indicat o creștere susținută a CXCL11 și o oarecare urcare continuă a IL2, CXCL9 și CXCL10. Anticorpul anti-PD-1 a indicat o urcare ușoară a CXCL11 la 24 de ore.

15 Exemplul 12: Inducerea ligandului NKp46 pe celulele Treg, după tratamentul cu anticorp anti-ICOS agonist

- 20 Celulele mononucleare din sange periferic au fost izolate de la donatori umani sănătoși (Research Blood Components) folosind centrifugare Ficoll (GE Life Sciences), congelate în BamBanker (Wako-Chem) și depozitate la -150°C până la utilizare. PMBC au fost incubate cu anticorp anti-ICOS solubil și cu CD3 anti-uman legat de placă (strat de acoperire 1 mg/ml, Biolegend, OKT3) la 37°C în RPMI (Gibco) suplimentat cu 10% ser fetal bovin (Sigma-Aldrich) și 1% penicilină/streptomycină (Gibco). Trei anticorpi au fost testați în cadrul analizei: anticorpul puternic agonist 37A10S713, un anticorp slab agonist și un anticorp slab antagonist. După patru zile, FBMC au fost desprinse ușor de pe plăci și spălate cu DPBS (Gibco) conținând 1% ser fetal bovin, 0,05% azidă de sodiu (Ricco) și 2 mM EDTA (Ambion). Celulele au fost apoi blocate cu Human TruStain FcX (Biolegend). Pentru a detecta ligandul NKp46, celulele au fost incubate cu 2 mg/mL NKp46-hIgG1 Fc (R&D Systems, 1850-NK). S-a detectat Fc NKp46-hIgG1 legat de celule utilizând un IgG anti-uman conjugat (Biolegend, policlonal). Celulele au fost din nou blocate cu Human TruStain FcX și apoi colorate cu CD56 anti-uman (Biolegend, Brilliant Violet 711, HCD56), CD16 anti-uman (Biolegend, Brilliant Violet 785, 3G8) CD4 anti-uman (Biolegend, Brilliant Violet 510, OKT4), CD8 anti-uman (BD Biosciences, BUV395, RPA-T8), CD25 anti-uman (Biolegend, Brilliant Violet 605, BC96) și colorant de viabilitate fixabil (eBioscience, eFluor 780). După colorare, celulele au fost fixate și permeabilizate cu setul de soluție tampon de colorare Foxp3 / factor de transcripție (eBioscience). După permeabilizare, celulele au fost colorate intracelular cu CD3 anti-uman (BD Biosciences, EP-CF594, UCHT1) și Foxp3 anti-uman (eBioscience, APC, PCH101). Celulele au fost apoi fixate în paraformaldehidă (Alfa Aesar). Datele au fost obținute pe un BD LSRII Fortessa și analizate pe software-ul FlowJo v10.1.

Rezultatele experimentului respectiv sunt prezentate în Figura 26 și Figura 27. Tratatamentul cu anticorp anti-ICOS agonist 37A10S713 a avut ca rezultat inducerea puternică a ligandului NKp46 pe celulele Treg de la trei donatori diferiți. *A se vedea* Figurile 26A-F (Figurile 26A-B ilustrează datele de la donatorul 1, Figurile 26C-D prezintă date de la donatorul 2 și

5 Figurile 26E-F prezintă date de la donatorul 3). Inducerea ligandului NKp46 la celulele Teff nu a fost la fel de puternică ca pe celulele Treg. *A se vedea* Figurile 26A-F. În plus, tratamentul cu anticorp anti-ICOS agonist 37A10S713 duce la pierderea CD16 (CD16 shedding) pe celulele NK, sugerând activarea celulelor NK. *A se vedea* Figura 27.

10 Fără a intenționa să fim legați de o teorie în particular, se pretinde că anticorpul anti-ICOS agonist 37A10S713 crește semnificativ nivelurile ligandului NKp46 pe celulele Treg și, de asemenea, activează celulele NK, ducând la epuizarea Treg selectivă.

LISTA DE SECVENȚE

- <110> JOUNCE THERAPEUTICS, INC.
- 15 <120> ANTICORPI PENTRU ICOS
 <130> 01140-0001-00PCT
 <140> PCT/US16/23524
 <141> 2016-03-22
 <150> US 62/137.034
- 20 <151> 2015-03-23
 <150> US 62/147.484
 <151> 2015-04-14
 <150> US 62/156.588
 <151> 2015-05-04
- 25 <150> US 62/242.489
 <151> 2015-10-16
 <150> US 62/255.635
 <151> 2015-11-16
 <160> 191
- 30 <170> Patent In versiunea 3.5
 <210> 1
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 35 <400> 1


```

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
1          5          10          15

Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile
          20          25          30

Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val
          35          40          45

Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp
          50          55          60

Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu
65          70          75          80

Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
          85          90          95

Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser
          100          105          110

Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu
          115          120          125

His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro
          130          135          140

Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu
145          150          155          160

Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro
          165          170          175

Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser
          180          185          190

Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu
          195

```

<210> 2

<211> 179

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile Phe His Asn Gly
 1 5 10 15

Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val Gln Gln Phe Lys
 20 25 30

Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr
 35 40 45

Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu Lys Phe Cys His
 50 55 60

Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp
 65 70 75 80

His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser Ile Phe Asp Pro
 85 90 95

Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu His Ile Tyr Glu
 100 105 110

Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala
 115 120 125

Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu Ile Cys Trp Leu
 130 135 140

Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr
 145 150 155 160

Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp
 165 170 175

Val Thr Leu

<210> 3

<211> 200

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 3

```

Met Lys Pro Tyr Phe Cys Arg Val Phe Val Phe Cys Phe Leu Ile Arg
1      5      10      15

Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met Phe Ser
      20      25      30

Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Ser Cys Lys Tyr Pro Glu Thr Val
      35      40      45

Gln Gln Leu Lys Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu Val Leu Cys Glu
      50      55      60

Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Ala Val Ser Ile Lys Asn Pro
65      70      75      80

Met Leu Cys Leu Tyr His Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
      85      90      95

Asn Asn Pro Asp Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser Leu Ser
      100      105      110

Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Gln Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr
      115      120      125

Leu His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu
      130      135      140

Pro Val Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Leu Leu Phe Gly Cys Ile
145      150      155      160

Leu Ile Ile Trp Phe Ser Lys Lys Lys Tyr Gly Ser Ser Val His Asp
      165      170      175

Pro Asn Ser Glu Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn Lys Lys
      180      185      190

Ser Arg Leu Ala Gly Val Thr Ser
      195      200

```

<210> 4

<211> 180

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 4

72

Gly Val Thr Ser
180

5 <210> 5
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> *Macaca fascicularis*
 <400> 5

```

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu His Met Lys
1      5      10      15

Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile
      20      25      30

Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val
      35      40      45

Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp
      50      55      60

Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Lys Val Ser Ile Lys Ser Leu
65      70      75      80

Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
      85      90      95

Tyr Asn Leu Asp Arg Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser
      100      105      110

Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu
      115      120      125

His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro
      130      135      140

Ile Gly Cys Ala Thr Phe Val Val Val Cys Ile Phe Gly Cys Ile Leu
145      150      155      160

Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Thr Val His Asp Pro
      165      170      175

Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser
      180      185      190

Arg Leu Thr Gly Thr Thr Pro
      195

```

<210> 6

<211> 179

<212> PRT

5 <213> Macaca fascicularis

<400> 6

Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile Phe His Asn Gly
1 5 10 15

Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val Gln Gln Phe Lys
20 25 30

Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr
35 40 45

Lys Gly Ser Gly Asn Lys Val Ser Ile Lys Ser Leu Lys Phe Cys His
50 55 60

Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp
65 70 75 80

Arg Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser Ile Phe Asp Pro
85 90 95

Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu His Ile Tyr Glu
100 105 110

Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala
115 120 125

Thr Phe Val Val Val Cys Ile Phe Gly Cys Ile Leu Ile Cys Trp Leu
130 135 140

Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Thr Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr
145 150 155 160

Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Gly
165 170 175

Thr Thr Pro

<210> 7
<400> 7
000
5 <210> 8
<400> 8
000
<210> 9
<400> 9
10 000
<210> 10
<211> 117
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus
15 <400> 10

```

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

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
          20           25           30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

Gly Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Pro Phe Val
          50           55           60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Thr Leu Tyr
65           70           75           80

Leu Gln Met Asn Ser Val Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
          85           90           95

Thr Arg Trp Gly Arg Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
          100          105          110

Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 11

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Mesocricetus auratus

<400> 11

```

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

Asp Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly
          20           25           30

Asn Tyr Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ala Pro
          35           40           45

```

76

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Met Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

Ser Phe Gln Thr Glu Asp Leu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr
85 90 95

Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
5 <213> Mesocricetus auratus
<400> 12

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp
1 5 10

<210> 13
<211> 17
10 <212> PRT
<213> Mesocricetus auratus
<400> 13

Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Pro Phe Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 14
15 <211> 8
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus
<400> 14

Trp Gly Arg Tyr Ala Phe Asp Ser
1 5

<210> 15
20 <211> 15
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus
<400> 15

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Ala
1 5 10 15

<210> 16
25 <211> 7
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus
30 <400> 16

Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Mesocricetus auratus
<400> 17

Gln His His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 18
<400> 18
10 000
<210> 19
<400> 19
000
<210> 20
15 <211> 117
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus
<400> 20

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Val Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

20 <210> 21
<211> 111
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus
25 <400> 21

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

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

Ser Phe Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Met Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

Ser Phe Gln Thr Glu Asp Leu Gly Asp Tyr Tyr Cys His His His Tyr
85 90 95

Asn Ala Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg
100 105 110

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Mesocricetus auratus

<400> 22

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp
1 5 10

<210> 23

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 23

Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 24

15 <211> 8

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 24

Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser
1 5

20 <210> 25

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Mesocricetus auratus
 <400> 25

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly Ser Phe Asn Tyr Leu Thr
 1 5 10 15

5

<210> 26
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mesocricetus auratus
 <400> 26

10

Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
 1 5

<210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mesocricetus auratus
 <400> 27

15

His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
 1 5

<210> 28
 <400> 28
 000
 <210> 29
 <400> 29
 000
 <210> 30
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mesocricetus auratus
 <400> 30

20

25

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Val Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ser Arg Trp Gly Arg Phe Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 31

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Mesocricetus auratus

<400> 31

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

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

Ser Phe Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Met Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

Ser Phe Gln Thr Glu Asp Leu Gly Asp Tyr Tyr Cys His His His Tyr
85 90 95

Asn Ala Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg
100 105 110

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Mesocricetus auratus

<400> 32

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp
1 5 10

<210> 33

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 33

Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 34

15 <211> 8

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 34

Trp Gly Arg Phe Ala Phe Asp Ser
1 5

20 <210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

```

<400> 35
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly Ser Phe Asn Tyr Leu Thr
1          5          10          15
<210> 36
<211> 7
5 <212> PRT
<213> Mesocricetus auratus
<400> 36
Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
1          5
<210> 37
10 <211> 9
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus
<400> 37
His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
1          5
15 <210> 38
<400> 38
000
<210> 39
<400> 39
20 000
<210> 40
<211> 117
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus
25 <400> 40
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
          20          25          30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

Gly Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Ile Leu Tyr
65          70          75          80

Leu Gln Met Asn Ser Val Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Thr Arg Trp Gly Arg Phe Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
          100          105          110

Val Thr Val Ser Ser
          115
<210> 41
<211> 111
<212> PRT

```

<213> Mesocricetus auratus

<400> 41

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

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

Ser Phe His Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Met Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80

Ser Phe Gln Thr Glu Asp Leu Gly Asp Tyr Tyr Cys His His His Tyr
 85 90 95

Asn Ala Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg
 100 105 110

<210> 42

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 42

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp
 1 5 10

10 <210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 43

Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val Lys
 1 5 10 15

15 Gly

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

20 <400> 44

Trp Gly Arg Phe Ala Phe Asp Ser
 1 5

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

25 <213> Mesocricetus auratus

<400> 45

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly Ser Phe His Tyr Leu Thr
 1 5 10 15

<210> 46

<211> 7

30 <212> PRT

```

<213> Mesocricetus auratus
<400> 46
Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5
5 <210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus
<400> 47
His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
1 5
10 <210> 48
<400> 48
000
<210> 49
<400> 49
15 000
<210> 50
<211> 117
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus
20 <400> 50
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Asn Ile Asp His Asp Gly Asn Ile Ile Asn Phe Ala Pro Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Val Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Thr Val Ser Ser
115
25 <210> 51
<211> 111
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus
<400> 51

```


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

Asp Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr
65 70 75 80

Ser Phe Gln Thr Glu Asp Leu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr
85 90 95

Ser Ser Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Mesocricetus auratus

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp
1 5 10

<210> 53

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 53

Asn Ile Asp His Asp Gly Asn Ile Ile Asn Phe Ala Pro Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15 <210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 54

Trp Gly His Tyr Ala Phe Asp Ser
1 5

20 <210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 55

25 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Tyr Asn Tyr Leu Ile
1 5 10 15

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 56
Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
 1 5
 <210> 57
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Mesocricetus auratus
 <400> 57
Gln His His Tyr Ser Ser Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 58
 10 <400> 58
 000
 <210> 59
 <400> 59
 000
 15 <210> 60
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 20 <223> Regiune variabilă a lanțului greu 37A10S713
 <400> 60
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 35 40 45

Ser Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 61
 <211> 111
 25 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Regiune variabilă a lanțului ușor 37A10S713
 <400> 61

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly
20 25 30

Ser Phe Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His His His Tyr
85 90 95

Asn Ala Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> VH CDR1 37A10S713

<400> 62

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp
1 5 10

10 <210> 63

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> VH CDR2 37A10S713

<400> 63

Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 64

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> VH CDR3 37A10S713
 <400> 64
 Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser
 1 5
 <210> 65
 5 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> VL CDR1 37A10S713
 10 <400> 65
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly Ser Phe Asn Tyr Leu Thr
 1 5 10 15
 <210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> VL CDR2 37A10S713
 <400> 66
 Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
 1 5
 20 <210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 25 <223> VL CDR3 37A10S713
 <400> 67
 His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 68
 <400> 68
 30 000
 <210> 69
 <400> 69
 000
 <210> 70
 35 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Regiune variabilă a lanțului greu 37A10S714
 40 <400> 70

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 35 40 45

Ser Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 71

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Regiune variabilă a lanțului ușor 37A10S714

<400> 71

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly
20 25 30

Ser Phe Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg Glu Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His His His Tyr
85 90 95

Asn Ala Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> VH CDR1 37A10S714

<400> 72

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp
1 5 10

10 <210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> VH CDR2 37A10S714

<400> 73

Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 74

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> VH CDR3 37A10S714

<400> 74

Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser
1 5

25 <210> 75

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>
 <223> CDR1 37A10S714
 <400> 75
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly Ser Phe Asn Tyr Leu Thr
1 5 10 15
 5 <210> 76
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <223> 37A10S714 CDR2
 <400> 76
Tyr Ala Ser Thr Arg Glu Thr
1 5
 <210> 77
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> 37A10S714 CDR3
 <400> 77
His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
 20 **1 5**
 <210> 78
 <400> 78
 000
 <210> 79
 25 <400> 79
 000
 <210> 80
 <211> 117
 <212> PRT
 30 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Regiune variabilă a lanțului greu 37A10S715
 <400> 80

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 81

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Regiune variabilă a lanțului ușor 37A10S715

<400> 81

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly
20 25 30

Ser Phe Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His His His Tyr
85 90 95

Asn Ala Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> 37A10S715 VH CDR1

<400> 82

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp

1 5 10

10 <210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> VH CDR2 37A10S715

<400> 83

Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 84

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> VH CDR3 37A10S715

<400> 84

Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser

25 1 5

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

30 <220>

<223> CDR1 37A10S715
 <400> 85
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly Ser Phe Asn Tyr Leu Thr
 1 5 10 15
 <210> 86
 5 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> CDR2 37A10S715
 10 <400> 86
 Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr
 1 5
 <210> 87
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> CDR3 37A10S715
 <400> 87
 His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
 1 5
 20 <210> 88
 <400> 88
 000
 <210> 89
 <400> 89
 25 000
 <210> 90
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 30 <220>
 <223> Regiune variabilă a lanțului greu 37A10S716
 <400> 90

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Asn Ile Asp Glu Ser Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

- <210> 91
 <211> 111
 <212> PRT
 5 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Regiune variabilă a lanțului ușor 37A10S716
 <400> 91

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly
20 25 30

Ser Phe Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His His His Tyr
85 90 95

Asn Ala Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 92

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> 37A10S716 VH CDR1

<400> 92

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp
1 5 10

10 <210> 93

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> 37A10S716 VH CDR2

<400> 93

Asn Ile Asp Glu Ser Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 94

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> VH CDR3 37A10S716

<400> 94

Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser
1 5

<210> 95
<211> 15
<212> PRT
5 <213> Secvență artificială
<220>
<223> VL CDR1 37A10S716
<400> 95

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly Ser Phe Asn Tyr Leu Thr
1 5 10 15

10 <210> 96
<211> 7
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
15 <223> VL CDR2 37A10S716
<400> 96

Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 97
<211> 9
20 <212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<223> VL CDR3 37A10S716
<400> 97

His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
1 5

25 <210> 98
<400> 98
000
30 <210> 99
<400> 99
000
<210> 100
<211> 117
<212> PRT
35 <213> Secvență artificială
<220>
<223> Regiune variabilă a lanțului greu 37A10S717
<400> 100

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 35 40 45

Ser Asn Ile Asp Glu Ser Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 101

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Regiune variabilă a lanțului ușor 37A10S717

<400> 101

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly
20 25 30

Ser Phe Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg Glu Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His His His Tyr
85 90 95

Asn Ala Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> 37A10S717 VH CDR1

<400> 102

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp

1 5 10

10 <210> 103

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> 37A10S717 VH CDR2

<400> 103

Asn Ile Asp Glu Ser Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 104

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> 37A10S717 VH CDR3

<400> 104

Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser

25

1

5

<210> 105
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 5 <220>
 <223> 37A10S717 VL CDR1
 <400> 105
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly Ser Phe Asn Tyr Leu Thr
1 5 10 15
 <210> 106
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> 37A10S717 VL CDR2
 15 <400> 106
Tyr Ala Ser Thr Arg Glu Thr
1 5
 <210> 107
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> 37A10S717 VL CDR3
 <400> 107
His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
1 5
 25 <210> 108
 <400> 108
 000
 <210> 109
 <400> 109
 30 000
 <210> 110
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 35 <220>
 <223> Regiune variabilă a lanțului greu 37A10S718
 <400> 110

101

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Asn Ile Asp Glu Ser Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 111

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Regiune variabilă a lanțului ușor 37A10S718

<400> 111

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly
20 25 30

Ser Phe Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His His His Tyr
85 90 95

Asn Ala Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

```

<210> 112
<211> 10
<212> PRT
<213> Secvență artificială
5 <220>
<223> 37A10S718 VH CDR1
<400> 112
  Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp
  1             5             10
<210> 113
10 <211> 17
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<223> 37A10S718 VH CDR2
15 <400> 113
  Asn Ile Asp Glu Ser Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val Lys
  1             5             10             15

  Gly
<210> 114
<211> 8
<212> PRT
20 <213> Secvență artificială
<220>
<223> 37A10S718 VH CDR3
<400> 114
  Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser
  1             5
25 <210> 115
<211> 15
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
30 <223> 37A10S718 VL CDR1
<400> 115
  Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly Ser Phe Asn Tyr Leu Thr
  1             5             10             15
<210> 116
<211> 7
35 <212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<223> 37A10S718 VL CDR2
<400> 116
  Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr
40 1             5
<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> Secvență artificială
45 <220>
<223> 37A10S718 VL CDR3
<400> 117
  His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
  1             5
50 <210> 118
<400> 118
000
<210> 119

```

<400> 119
 000
 <210> 120
 <211> 117
 5 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Regiune variabilă a lanțului greu 16G10S71
 <400> 120
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

 Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 35 40 45

 Ser Asn Ile Asp His Asp Gly Asn Ile Ile Asn Phe Ala Pro Ser Val
 50 55 60

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

 Val Thr Val Ser Ser
 10 115
 <210> 121
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 15 <220>
 <223> Regiune variabilă a lanțului ușor 16G10S71
 <400> 121

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr
85 90 95

Ser Ser Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 122

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> VH CDR1 16G10S71

<400> 122

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp

1 5 10

10 <210> 123

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> VH CDR2 16G10S71

<400> 123

Asn Ile Asp His Asp Gly Asn Ile Ile Asn Phe Ala Pro Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 124

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> 16G10S71 VH CDR3

<400> 124

Trp Gly His Tyr Ala Phe Asp Ser

25 1 5

<210> 125

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>
 <223> 16G10S71 VL CDR1
 <400> 125
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Tyr Asn Tyr Leu Ile
1 5 10 15
 5 <210> 126
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <223> 16G10S71 VL CDR2
 <400> 126
Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5
 <210> 127
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> 16G10S71 VL CDR3
 <400> 127
Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
 20 **1 5**
 <210> 128
 <400> 128
 000
 <210> 129
 25 <400> 129
 000
 <210> 130
 <211> 117
 <212> PRT
 30 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Regiune variabilă a lanțului greu 16G10S72
 <400> 130

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Asn Ile Asp His Asp Gly Asn Ile Ile Asn Phe Ala Pro Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 131

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Regiune variabilă a lanțului ușor 16G10S72

<400> 131

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg Glu Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr
85 90 95

Ser Ser Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 132

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> VH CDR1 16G10S72

<400> 132

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp
1 5 10

10 <210> 133

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> 16G10S72 VH CDR2

<400> 133

Asn Ile Asp His Asp Gly Asn Ile Ile Asn Phe Ala Pro Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 134

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> 16G10S72 VH CDR3

<400> 134

Trp Gly His Tyr Ala Phe Asp Ser
1 5

25 <210> 135

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>
 <223> 16G10S72 VL CDR1
 <400> 135
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Tyr Asn Tyr Leu Ile
1 5 10 15
 5 <210> 136
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <223> 16G10S72 VL CDR2
 <400> 136
Tyr Ala Ser Thr Arg Glu Thr
1 5
 <210> 137
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> 16G10S72 VL CDR3
 <400> 137
Gln His His Tyr Ser Ser Pro Pro Thr
 20 **1 5**
 <210> 138
 <400> 138
 000
 <210> 139
 25 <400> 139
 000
 <210> 140
 <211> 117
 <212> PRT
 30 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Regiune variabilă a lanțului greu 16G10S73
 <400> 140

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 35 40 45

Ser Asn Ile Asp His Asp Gly Asn Ile Ile Asn Phe Ala Pro Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 141

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Regiune variabilă a lanțului ușor 16G10S73

<400> 141

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr
85 90 95

Ser Ser Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 142

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> 16G10S73 VH CDR1

<400> 142

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp
1 5 10

10 <210> 143

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> 16G10S73 VH CDR2

<400> 143

Asn Ile Asp His Asp Gly Asn Ile Ile Asn Phe Ala Pro Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 144

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> VH CDR3 16G10S73

<400> 144

Trp Gly His Tyr Ala Phe Asp Ser
1 5

25 <210> 145

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

30 <220>

<223> 16G10S73 VL CDR1
 <400> 145
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Tyr Asn Tyr Leu Ile
1 5 10 15
 <210> 146
 5 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> 16G10S73 VL CDR2
 10 <400> 146
Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr
1 5
 <210> 147
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> 16G10S73 VL CDR3
 <400> 147
Gln His His Tyr Ser Ser Pro Pro Thr
1 5
 20 <210> 148
 <400> 148
 000
 <210> 149
 <400> 149
 25 000
 <210> 150
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 30 <220>
 <223> Regiune variabilă a lanțului greu 16G10S83
 <400> 150

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Asn Ile Asp His Asp Gly Asn Ile Ile Asn Phe Ala Pro Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 151

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Regiune variabilă a lanțului ușor 16G10S83

<400> 151

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

Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr
85 90 95

Ser Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 152

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> 16G10S83 VH CDR1

<400> 152

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp
1 5 10

10 <210> 153

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> 16G10S83 VH CDR2

<400> 153

Asn Ile Asp His Asp Gly Asn Ile Ile Asn Phe Ala Pro Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 154

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> 16G10S83 VH CDR3

```

<400> 154
  Trp Gly His Tyr Ala Phe Asp Ser
  1                               5
<210> 155
<211> 15
5  <212> PRT
    <213> Secvență artificială
    <220>
    <223> 16G10S83 VL CDR1
<400> 155
  Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Tyr Asn Tyr Leu Ile
10  1                               5                10                15
    <210> 156
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secvență artificială
15  <220>
    <223> 16G10S83 VL CDR2
<400> 156
  Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr
  1                               5
20  <210> 157
    <211> 9
    <212> PRT
    <213> Secvență artificială
    <220>
    <223> 16G10S83 VL CDR3
25  <400> 157
    Gln His His Tyr Ser Ser Pro Pro Thr
    1                               5
    <210> 158
    <400> 158
    000
30  <210> 159
    <400> 159
    000
    <210> 160
    <211> 117
35  <212> PRT
    <213> Secvență artificială
    <220>
    <223> Regiune variabilă a lanțului greu 35A9S79
    <400> 160

```

115

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Arg Phe Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 161

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Regiune variabilă a lanțului ușor 35A9S79

<400> 161

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly

<210> 166

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 5 <223> 35A9S79 VL CDR2
 <400> 166
Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr
1 5
 <210> 167
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> 35A9S79 VL CDR3
 <400> 167
His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
1 5
 <210> 168
 <400> 168
 000
 <210> 169
 20 <400> 169
 000
 <210> 170
 <211> 117
 <212> PRT
 25 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Regiune variabilă a lanțului greu 35A9S710
 <400> 170
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Asn Ile Asp Glu Ser Gly Ser Ile Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Arg Phe Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 171
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secvență Artificială
 5 <220>
 <223> Regiune variabilă a lanțului ușor 35A9S710
 <400> 171

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Ser	Gly
			20					25					30		

Ser	Phe	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			

Lys	Leu	Leu	Ile	Phe	Tyr	Ala	Ser	Thr	Arg	His	Thr	Gly	Val	Pro	Asp
50						55					60				

Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
65					70					75					80

Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	His	His	Tyr
				85					90					95	

Asn	Ala	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	
			100					105					110		

<210> 172
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> 35A9S710 VH CDR1
 15 <400> 172

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	Trp	Met	Asp
1				5					10

<210> 173
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> 35A9S710 VH CDR2
 <400> 173

Asn	Ile	Asp	Glu	Ser	Gly	Ser	Ile	Ala	Glu	Tyr	Ser	Pro	Phe	Val	Lys
1				5					10				15		

Gly
 25 <210> 174
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 30 <223> 35A9S710 VH CDR3

<400> 174
Trp Gly Arg Phe Ala Phe Asp Ser
 1 5
 <210> 175
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> 35A9S710 VL CDR1
 <400> 175
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly Ser Phe Asn Tyr Leu Thr
 10 1 5 10 15
 <210> 176
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 15 <220>
 <223> 35A9S710 VL CDR2
 <400> 176
Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
 1 5
 <210> 177
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> 35A9S710 VL CDR3
 25 <400> 177
His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 178
 <400> 178
 000
 30 <210> 179
 <400> 179
 000
 <210> 180
 <211> 117
 35 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Regiune variabilă a lanțului greu 35A9S89
 <400> 180

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Arg Phe Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 181

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Regiune variabilă a lanțului ușor 35A9S89

<400> 181

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

Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly
20 25 30

Ser Phe Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His His His Tyr
85 90 95

Asn Ala Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 182

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> 35A9S89 VH CDR1

<400> 182

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asp
1 5 10

10 <210> 183

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> 35A9S89 VH CDR2

<400> 183

Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 184

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> VH CDR3 35A9S89

<400> 184

Trp Gly Arg Phe Ala Phe Asp Ser
1 5

25 <210> 185

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

30 <220>

<223> 35A9S89 VL CDR1
 <400> 185
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly Ser Phe Asn Tyr Leu Thr
1 5 10 15
 <210> 186
 5 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> 35A9S89 VL CDR2
 10 <400> 186
Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr
1 5
 <210> 187
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> 35A9S89 VL CDR3
 <400> 187
His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
1 5
 20 <210> 188
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 25 <223> Lanț greu al IgG1 umane 37A10S713
 <400> 188
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Asn Ile Asp Glu Asp Gly Ser Ile Thr Glu Tyr Ser Pro Phe Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
130						135					140				
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
145					150					155					160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
				165					170					175	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
			180					185					190		
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
		195					200					205			
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
	210					215					220				
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
225					230					235					240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				245					250					255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
			260					265					270		
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
		275					280					285			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
	290					295					300				
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
305					310					315					320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				325					330					335	
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
			340					345					350		
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
		355					360					365			
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
	370					375					380				

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 189

<211> 218

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Lanț ușor kappa uman 37A10S713

<400> 189

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly
20 25 30

Ser Phe Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His His His Tyr
85 90 95

Asn Ala Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 190

<211> 200

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 190

Met Lys Pro Tyr Phe Ser Cys Val Phe Val Phe Cys Phe Leu Ile Lys
1 5 10 15

Leu Leu Thr Gly Glu Leu Asn Asp Leu Ala Asn His Arg Met Phe Ser
20 25 30

Phe His Asp Gly Gly Val Gln Ile Ser Cys Asn Tyr Pro Glu Thr Val
35 40 45

Gln Gln Leu Lys Met Gln Leu Phe Lys Asp Arg Glu Val Leu Cys Asp
50 55 60

Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Asn Pro
65 70 75 80

Met Ser Cys Pro Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
85 90 95

Asp Asn Ala Asp Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Phe Leu Cys Ser Leu Ser
100 105 110

Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Gln Glu Lys Asn Leu Ser Gly Gly Tyr
115 120 125

Leu Leu Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu
130 135 140

Pro Val Gly Cys Ala Ala Phe Val Ala Ala Leu Leu Phe Gly Cys Ile
 145 150 155 160

Phe Ile Val Trp Phe Ala Lys Lys Lys Tyr Arg Ser Ser Val His Asp
 165 170 175

Pro Asn Ser Glu Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn Lys Lys
 180 185 190

Ser Arg Leu Ala Gly Met Thr Ser
 195 200

<210> 191

<211> 180

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 191

Glu Leu Asn Asp Leu Ala Asn His Arg Met Phe Ser Phe His Asp Gly
 1 5 10 15

Gly Val Gln Ile Ser Cys Asn Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln Leu Lys
 20 25 30

Met Gln Leu Phe Lys Asp Arg Glu Val Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr
 35 40 45

Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Asn Pro Met Ser Cys Pro
 50 55 60

Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu Asp Asn Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Phe Leu Cys Ser Leu Ser Ile Phe Asp Pro
 85 90 95

Pro Pro Phe Gln Glu Lys Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu Leu Ile Tyr
 100 105 110

Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu Pro Val Gly Cys
 115 120 125

Ala Ala Phe Val Ala Ala Leu Leu Phe Gly Cys Ile Phe Ile Val Trp
 130 135 140

Phe Ala Lys Lys Lys Tyr Arg Ser Ser Val His Asp Pro Asn Ser Glu
 145 150 155 160

Tyr	Met	Phe	Met	Ala	Ala	Val	Asn	Thr	Asn	Lys	Lys	Ser	Arg	Leu	Ala
				165					170					175	
Gly	Met	Thr	Ser												
			180												

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- DENG ZHONG-BIN ET AL: "An agonist human ICOS monoclonal antibody that induces T cell activation and inhibits proliferation of a myeloma cell line", HYBRIDOMA AND HYBRIDOMICS, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 23, no. 3, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 176-182, XP002657735, ISSN: 1536-8599
- WO-A1-2017/070423
- WO-A2-2011/020024
- JULIEN FAGET ET AL: "ICOS is associated with poor prognosis in breast cancer as it promotes the amplification of immunosuppressive CD4 + T cells by plasmacytoid dendritic cells", ONCOIMMUNOLOGY, vol. 2, no. 3, 1 March 2013 (2013-03-01), page e23185, XP055328805, DOI: 10.4161/onci.23185
- 'PE anti-human/mouse/rat CD 278 (ICOS' BIOLEGEND, [Online] 07 February 2013, page 1 OF 1, XP055350349 Retrieved from the Internet: <URL:www.biolegend.com/pop-pdf.php?id=2482> [retrieved on 2016-11-18]
- US-A1- 2013 058 868
- WAHL ET AL.: 'Interaction of B7RP-1 with ICOS Negatively Regulates Antigen Presentation by B Cells' INFLAMMATION vol. 27, 04 August 2003, pages 191 - 200, XP002414710
- US-A1- 2013 071 409
- US-A1- 2013 142 783
- US-A1- 2014 086 923

(57) Revendicări:

1.Un anticorp monoclonal izolat care se leagă de ICOS, unde anticorpul cuprinde (a) HCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 62; (b) HCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 63; (c) HCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 64; (d) LCDR1 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 65; (e) LCDR2 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 66; și (f) LCDR3 cuprinzând secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 67 și unde anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului greu al IgG1 umane sau o regiune constantă a lanțului greu al IgG3 umane.

2.Anticorpul de la revendicarea 1, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (V_H) și o regiune variabilă a lanțului ușor (V_L), unde

V_H este cel puțin 90% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 60 și V_L este de cel puțin 90% identică secvenței de aminoacizi cu SECV ID NR: 61.

3.Anticorpul de la revendicarea 1, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (V_H) și o regiune variabilă a lanțului ușor (V_L), unde V_H cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 60 și V_L cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 61.

4.Anticorpul de la oricare din revendicările de mai sus, unde anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului greu al IgG1 umane.

5.Anticorpul de la oricare din revendicările de mai sus, unde anticorpul este un anticorp himeric sau un anticorp umanizat.

6.Anticorpul de la revendicarea 1, unde lanțul greu cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 188 sau o variantă activă biologic a acestuia, în care unul sau mai multe reziduuri de aminoacizi sunt adăugate sau șterse la terminalul N- sau C- al polipeptidei; și lanțul ușor cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 189 sau o variantă activă biologic a acestuia, în care unul sau mai multe reziduuri de aminoacizi sunt adăugate sau șterse, la terminalul N- sau C- al polipeptidei.

7.Anticorpul de la revendicarea 1, unde lanțul gros cuprinde secvența de aminoacizi de SECV ID NR: 188 și lanțul ușor cuprinde secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 189.

8.Anticorpul de la oricare din revendicările de mai sus, unde administrarea anticorpului la un mamifer are ca rezultat: (a) o creștere a celulelor T efectoare (Teff) la mamifer și/sau (b) activarea celulelor T efectoare (Teff) la mamifer și/sau (c) o scădere a celulelor T reglatoare (Treg) la mamifer; unde celulele Teff sunt opțional celule T CD4+ FoxP3- sau celule T CD4+ FoxP3- și celule T CD8+ sau celule T CD8+; și unde celulele Treg sunt opțional celule T CD4+ FoxP3+.

9.Un acid nucleic izolat codifică anticorpul de la oricare din revendicările de la 1 la 8, unde acidul nucleic este cuprins opțional într-un vector.

10. O celulă gazdă care cuprinde vectorul de la revendicarea 9 sau care produce anticorpul de la oricare din revendicările de la 1 la 8.

11. O metodă pentru realizarea unui anticorp anti-ICOS, care cuprinde cultivarea celulei gazdă de la revendicarea 10 în condiții adecvate pentru exprimarea anticorpului și recuperarea anticorpului produs de celula gazdă.

12. Un anticorp anti-ICOS care poate fi produs prin metoda de revendicarea 11.

13. Anticorpul anti-ICOS de la oricare din revendicările de la 1 la 8 și 12 pentru utilizarea într-o metodă de tratare a cancerului la un mamifer.

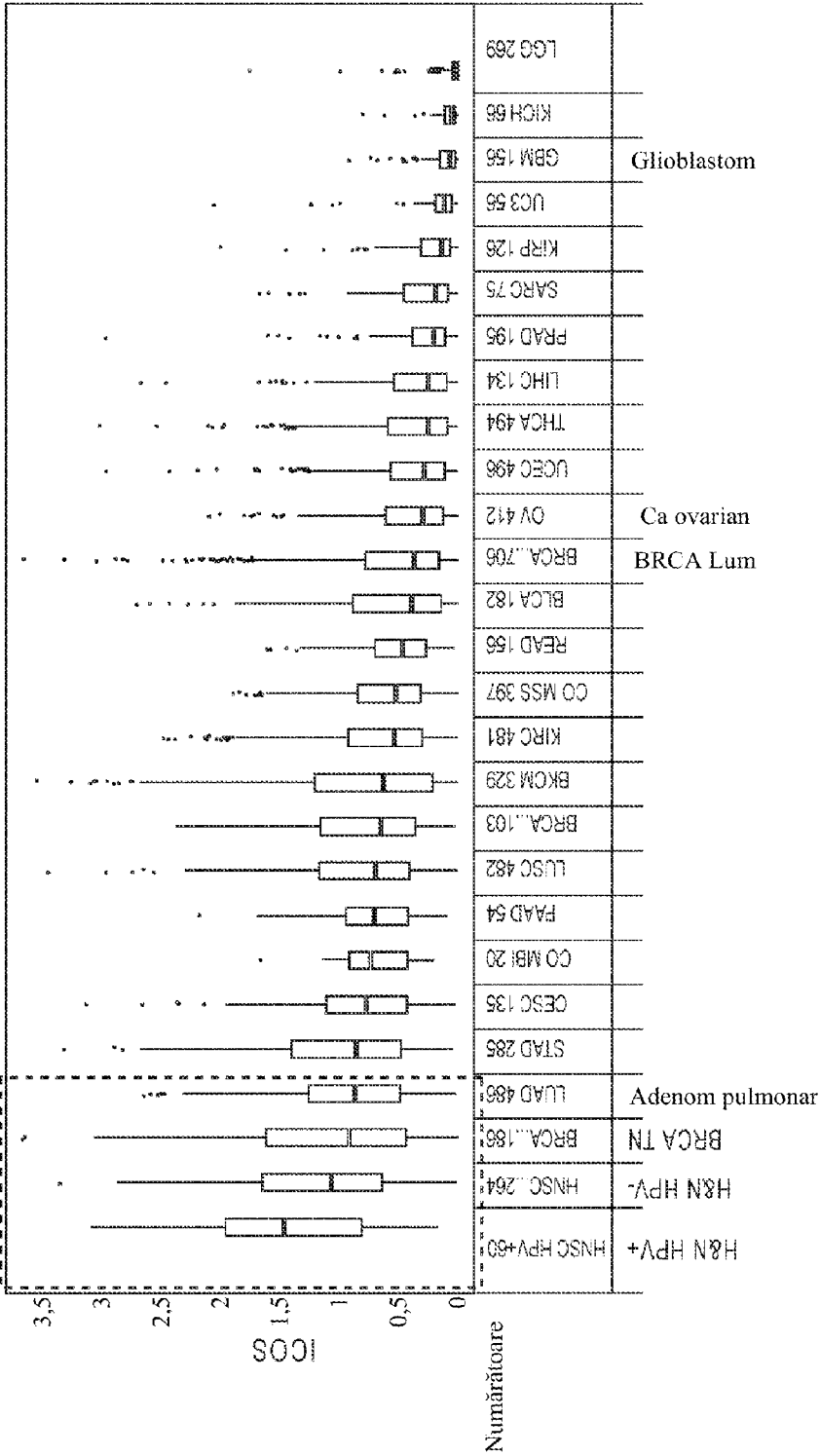
14. Anticorpul anti-ICOS pentru utilizarea de la revendicarea 13, unde cancerul este selectat dintre melanom, cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC), carcinom cu celule renale (RCC), cancer gastric, cancer de vezică urinară, limfom difuz cu celule B mari (DLBCL), limfom Hodgkin, cancer ovarian, cancer de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC) și cancer de sân triplu negativ (TNBC).

15. Anticorpul anti-ICOS pentru utilizarea de la revendicarea 13 sau revendicarea 14, care este destinat utilizării cu cel puțin un agent terapeutic suplimentar, unde agentul terapeutic suplimentar este selectat opțional dintre anticorp anti-PD-1 și un anticorp anti-PD-L1, sau este opțional un vaccin pentru cancer și unde vaccinul pentru cancer este selectat opțional dintre un vaccin ADN, un vaccin cu virus proiectat în laborator, un vaccin cu celule tumorale proiectat în laborator și un vaccin pentru cancer dezvoltat folosind neoantigeni.

16. Anticorpul anti-ICOS pentru utilizarea de la oricare dintre revendicările de la 13 la 15, unde mamiferul este un om.

17. Anticorpul anti-ICOS pentru utilizarea de la oricare din revendicările de la 13 la 16, unde o probă de cancer a fost determinată ca exprimând ICOS, unde proba prezintă opțional colorație 1+, 2+ sau 3+ la ICOS prin imunohistochimie (IHC).

18. Anticorpul anti-ICOS pentru utilizarea de la oricare din revendicările de la 13 la 17, unde proba a fost determinată ca având un nivel scăzut de PD-L1 sau de a fi PD-L1-negativă sau de a avea un nivel ridicat de PD-L1, unde nivelurile PD-L1 sunt determinate opțional folosind IHC.



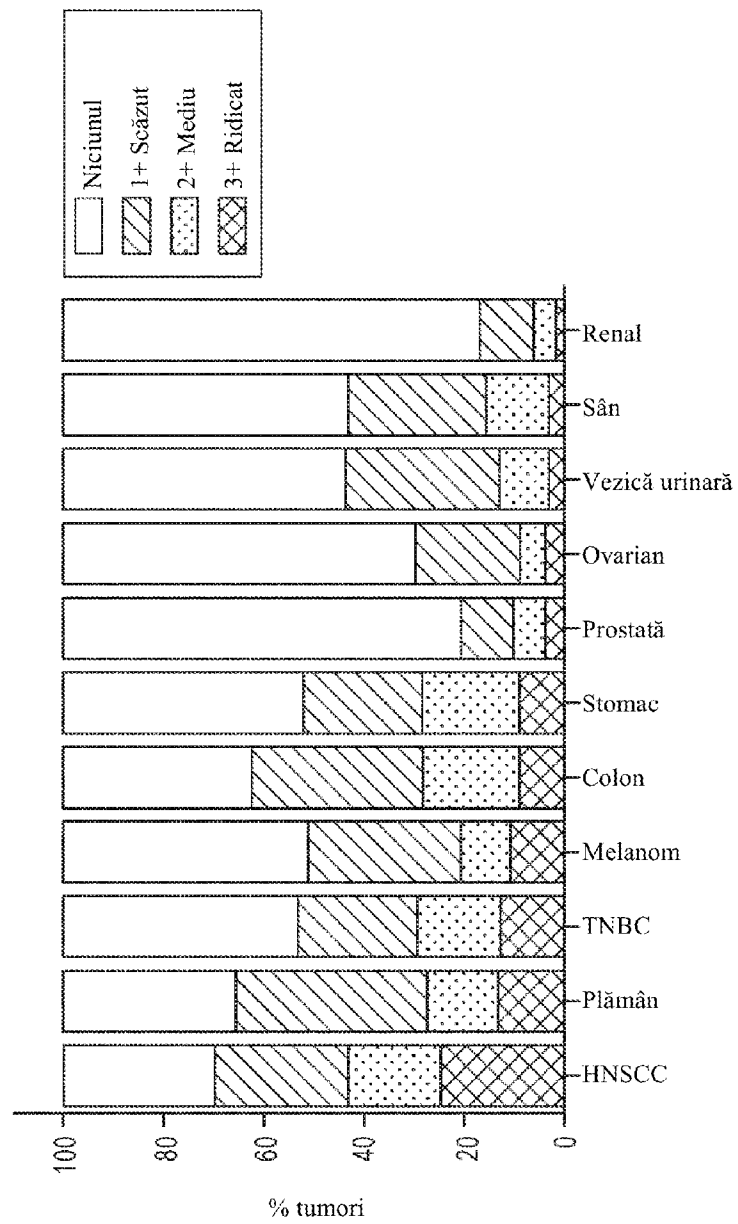


FIG. 1B

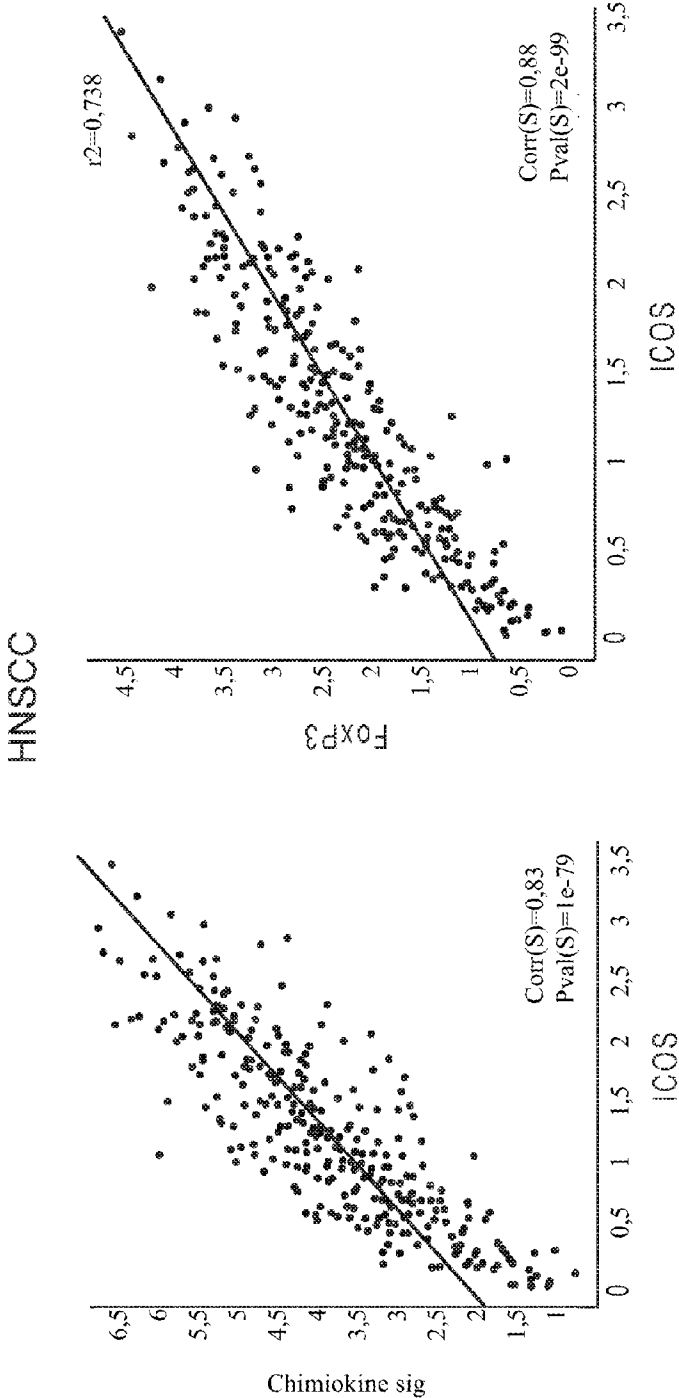


FIG. 2

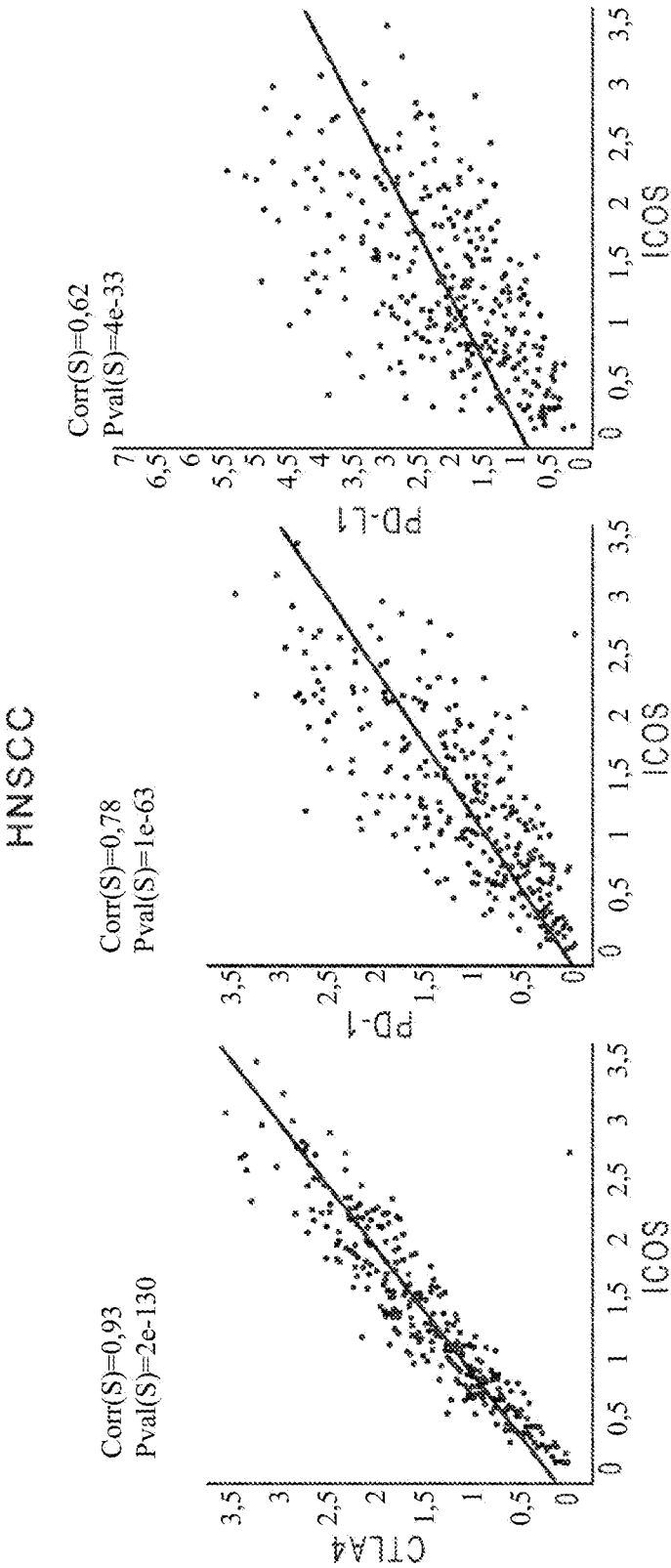
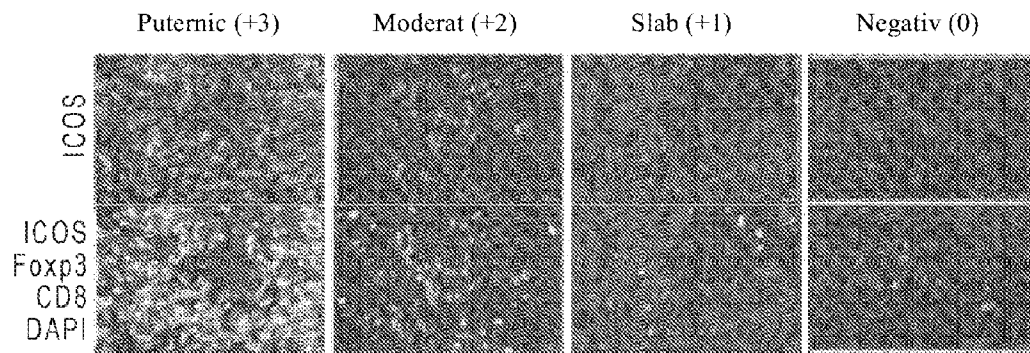
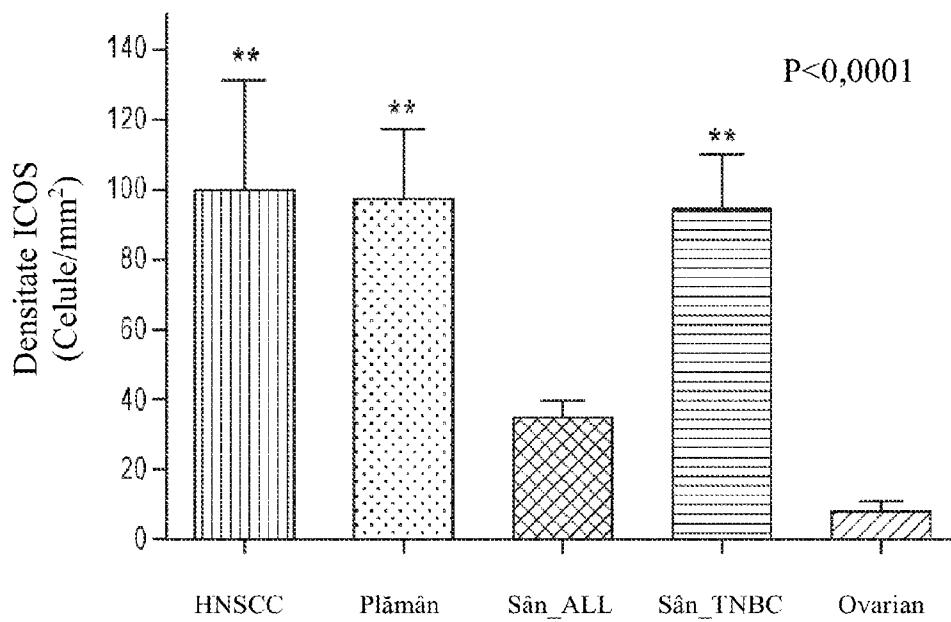
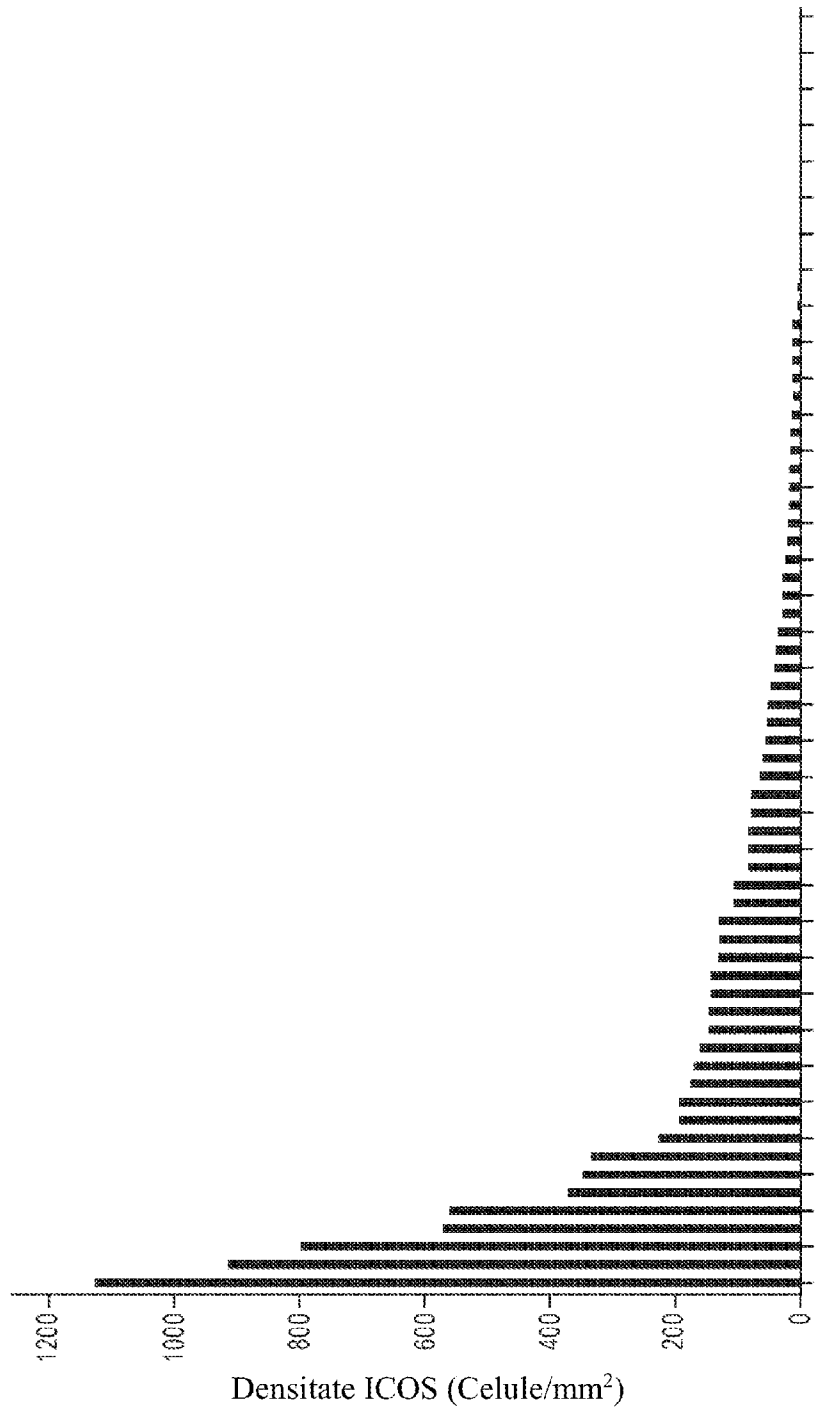
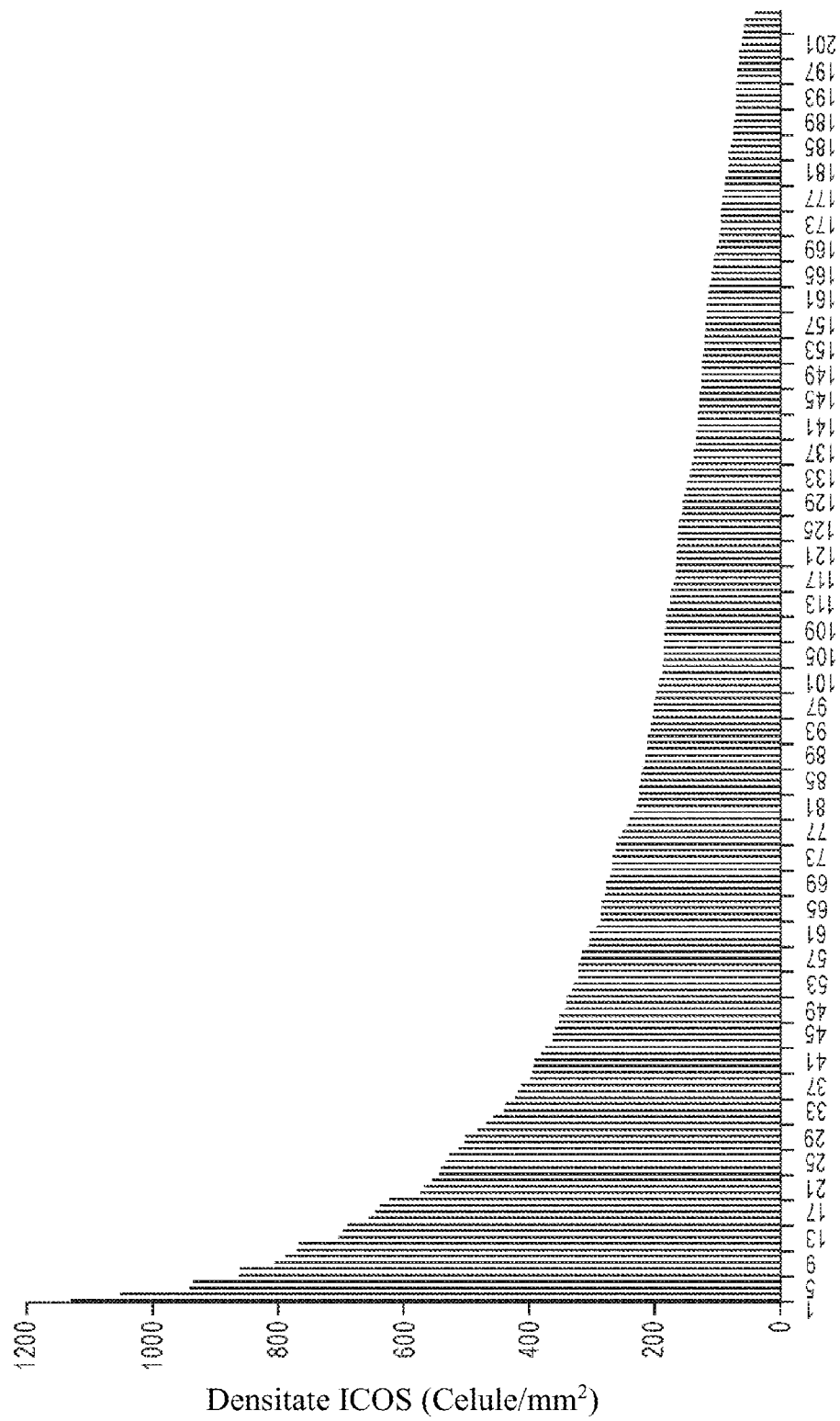


FIG. 3

**FIG. 4****FIG. 5**

*FIG. 6A*

**FIG. 6B**

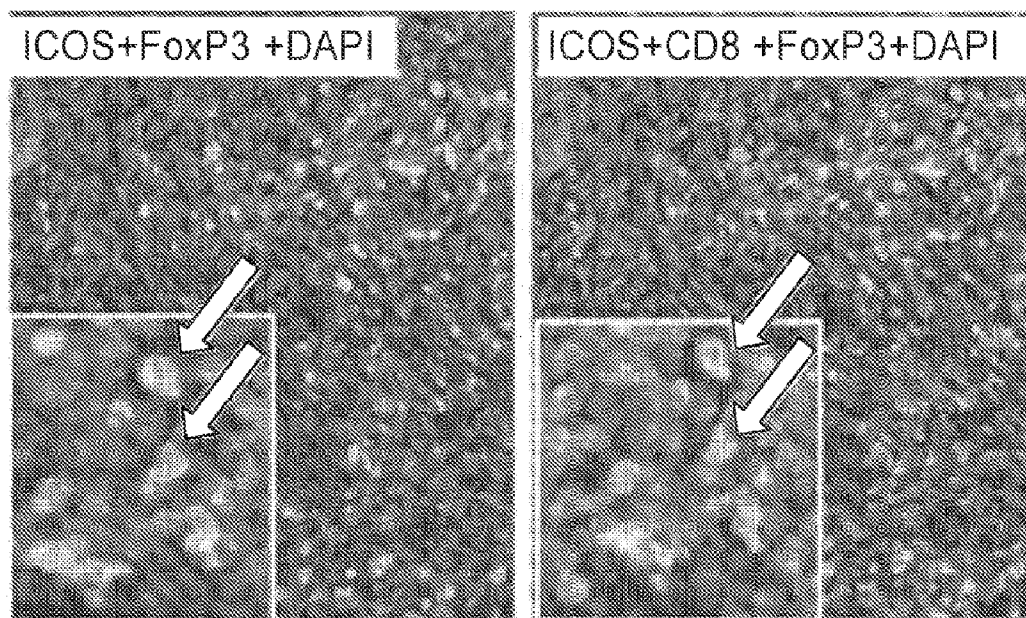


FIG. 7A

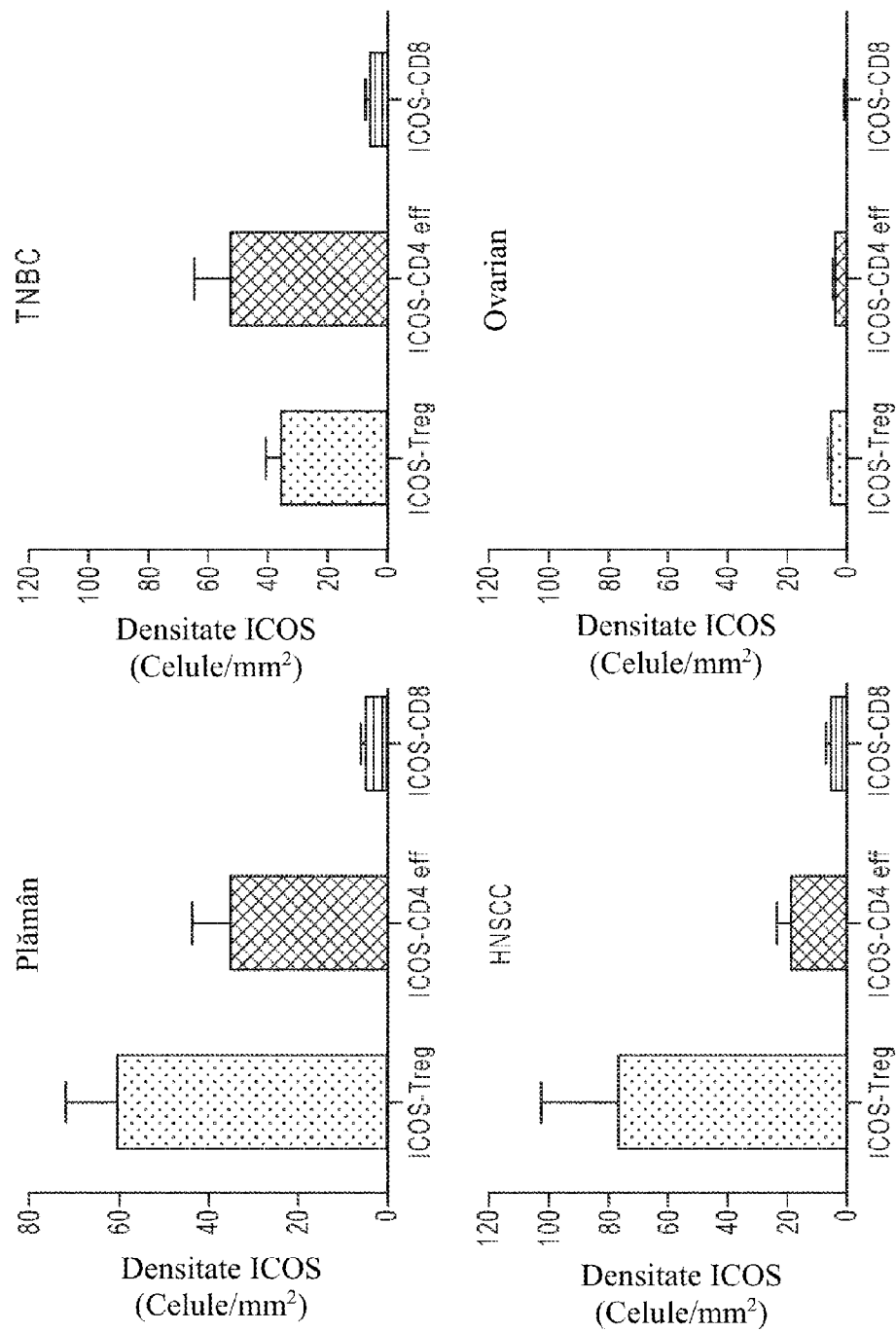
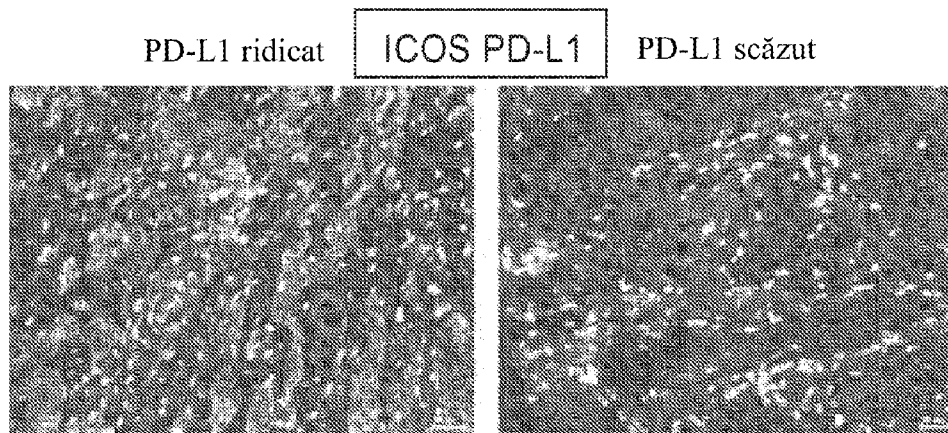
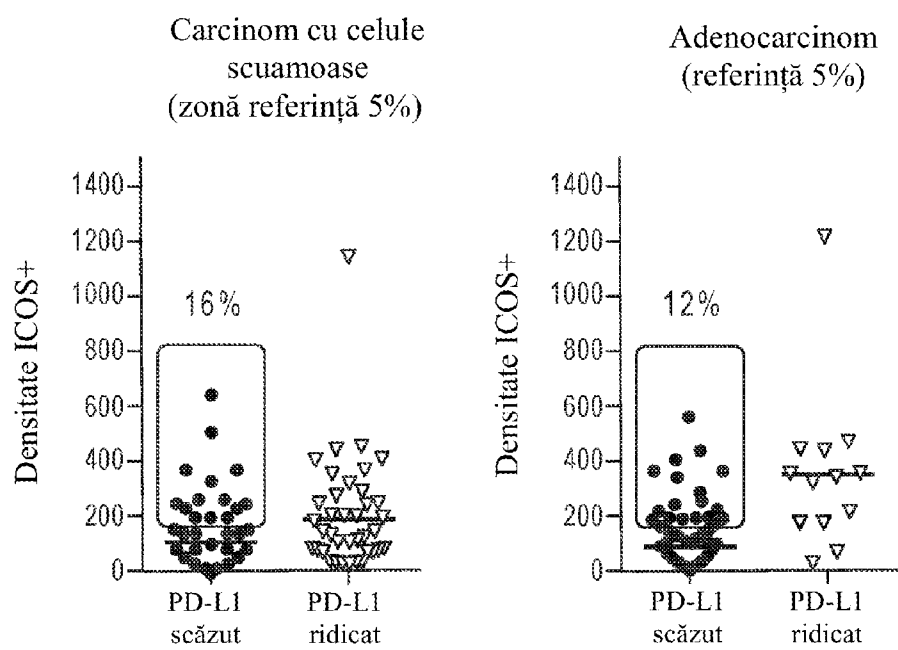


FIG. 7B

**FIG. 8A****FIG. 8B**

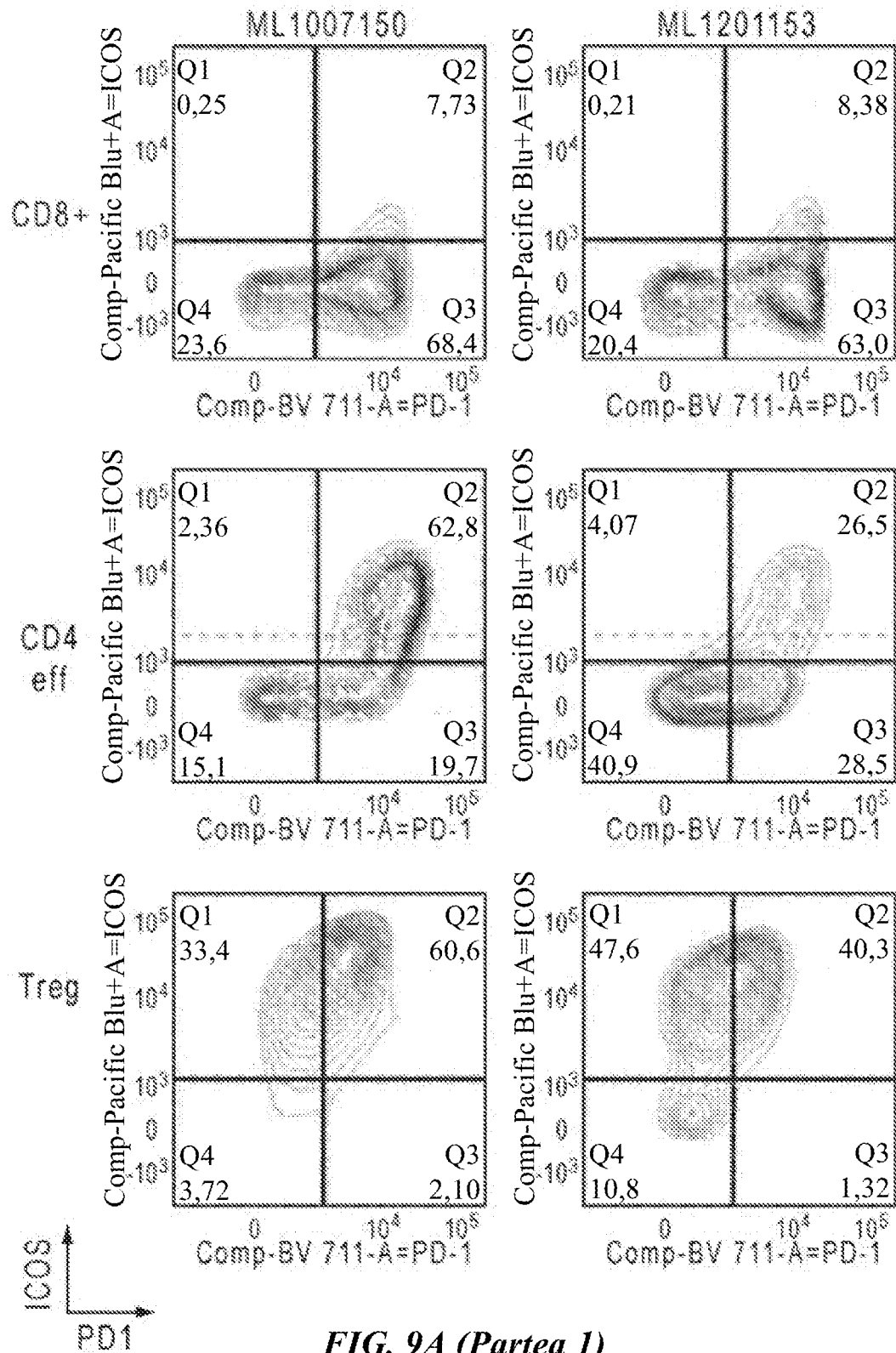


FIG. 9A (Partea 1)

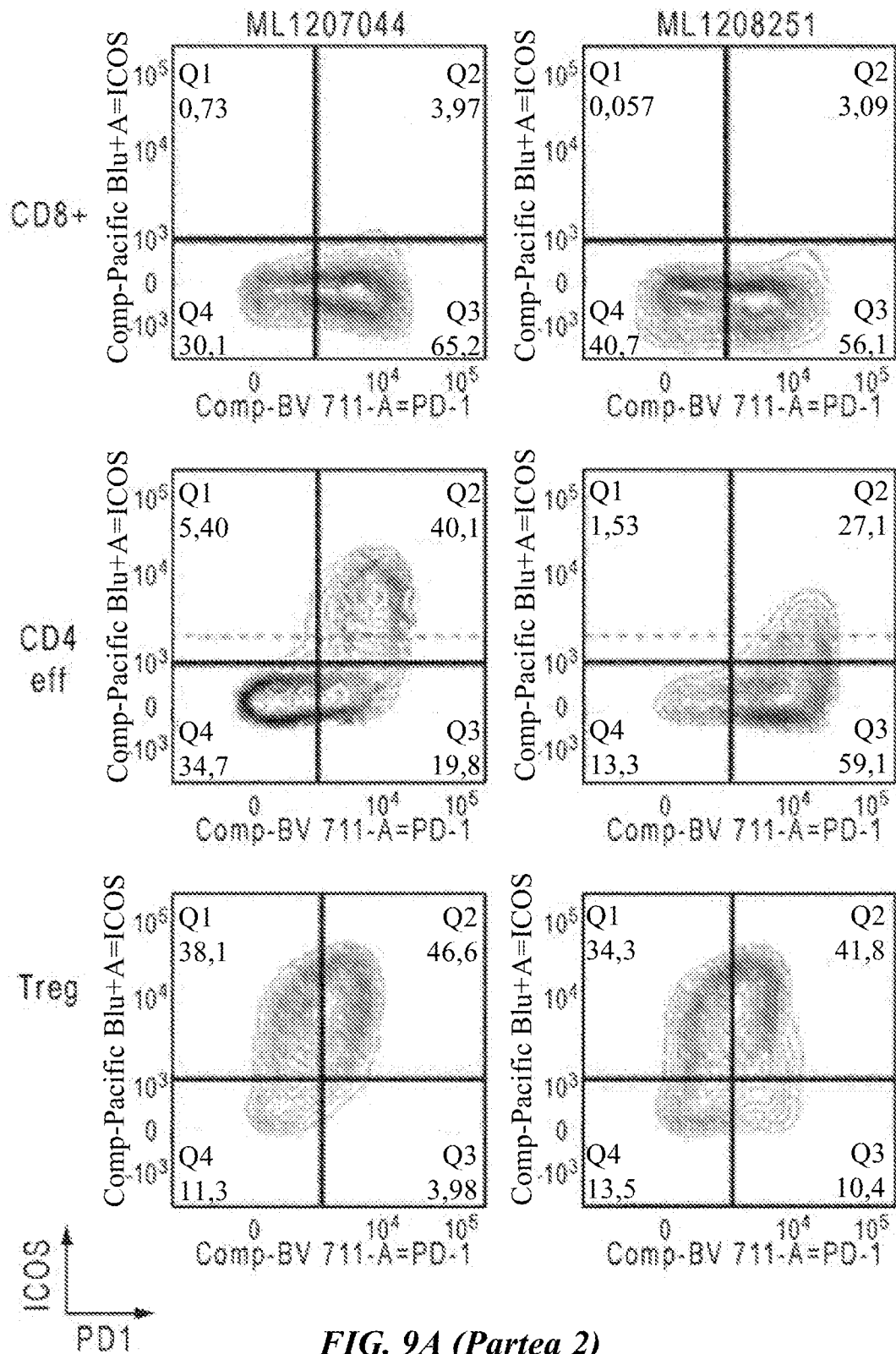


FIG. 9A (Partea 2)

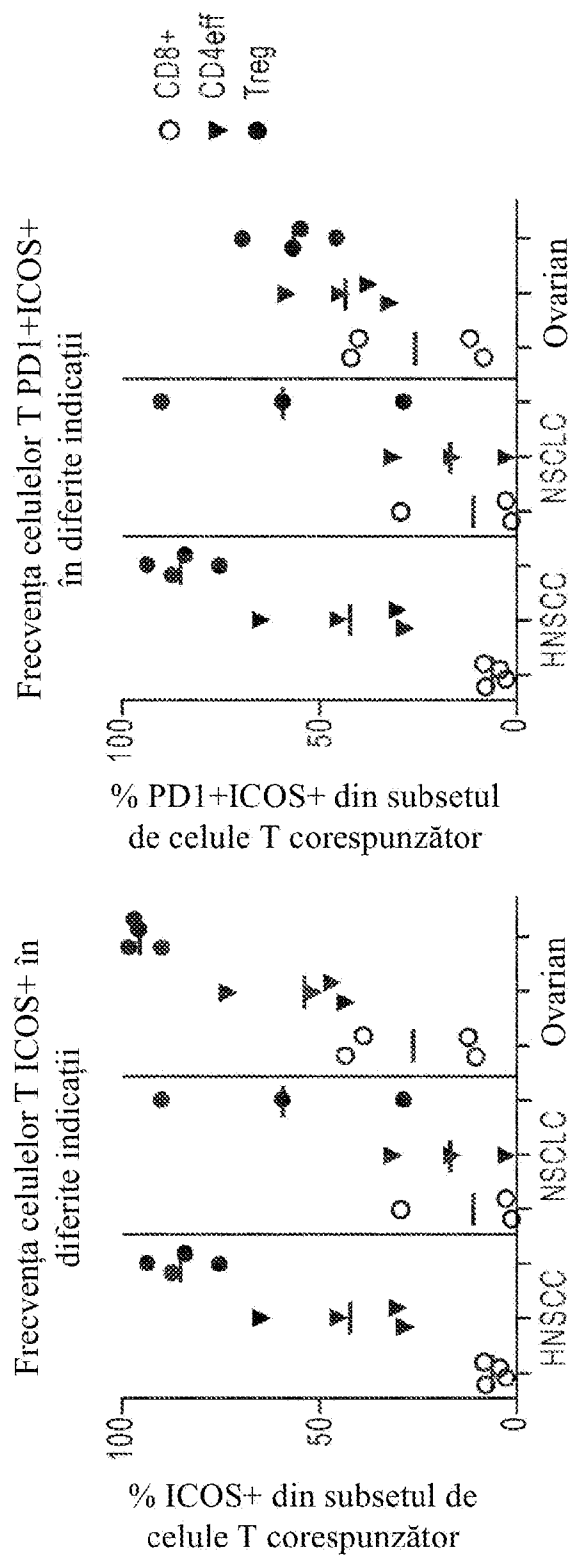
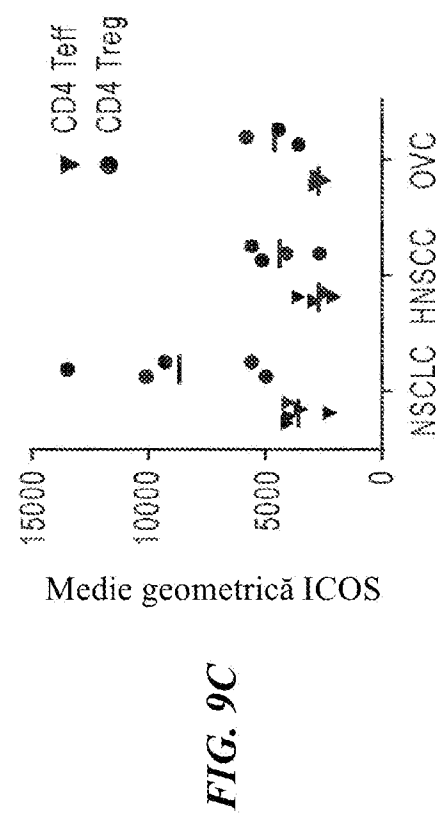
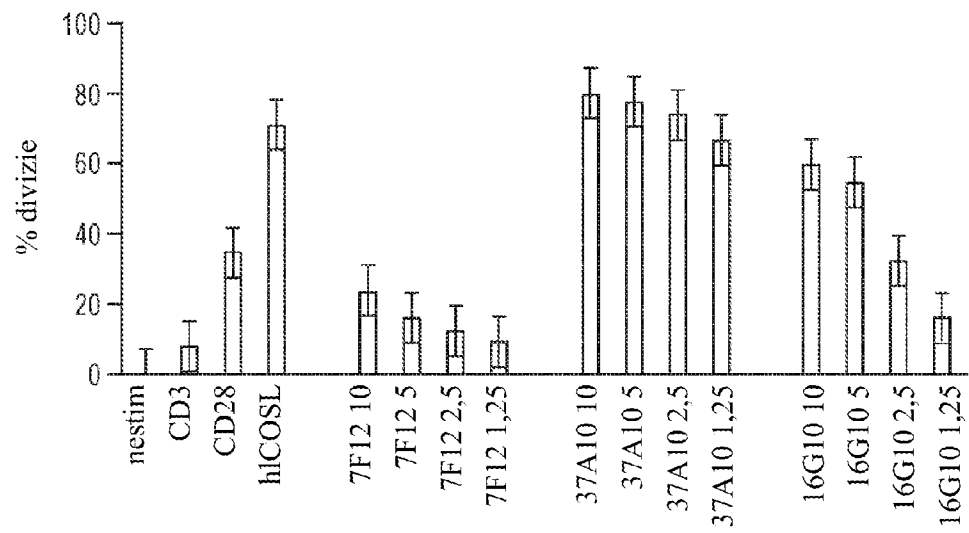
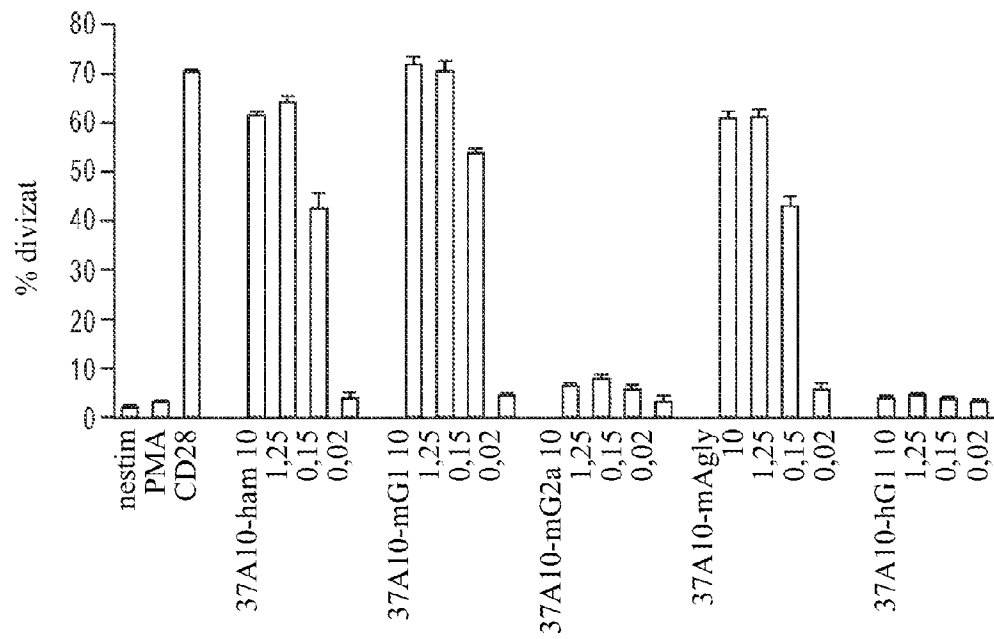
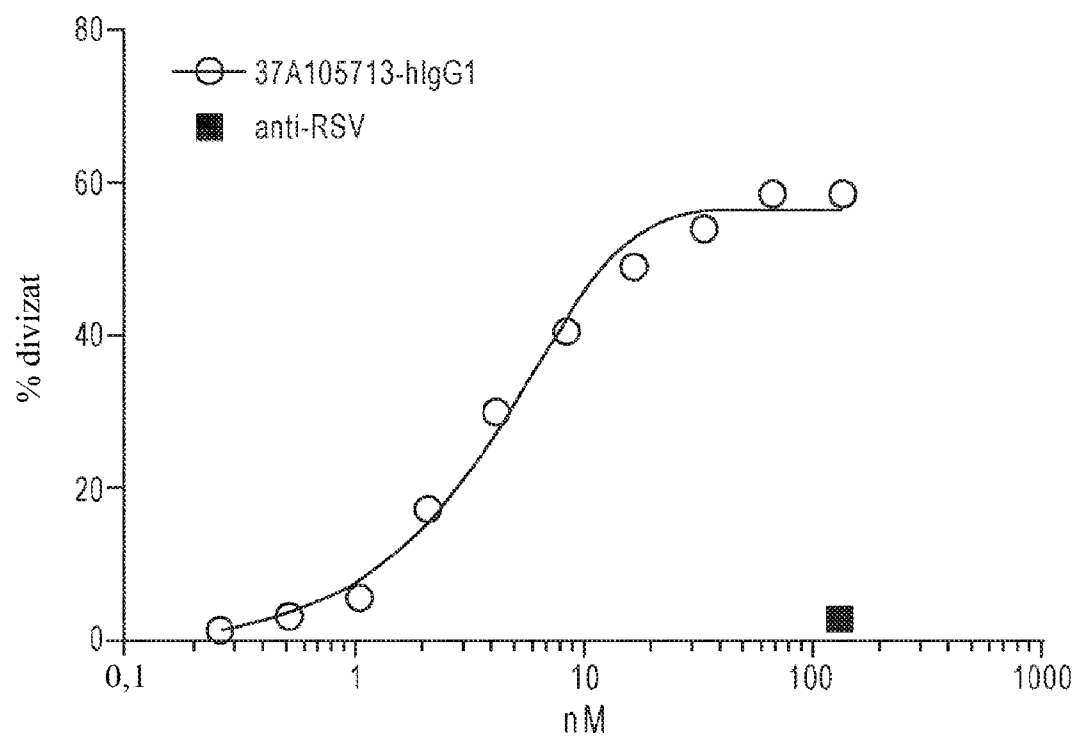


FIG. 9B



**FIG. 10A****FIG. 10B**

**FIG. 10C**

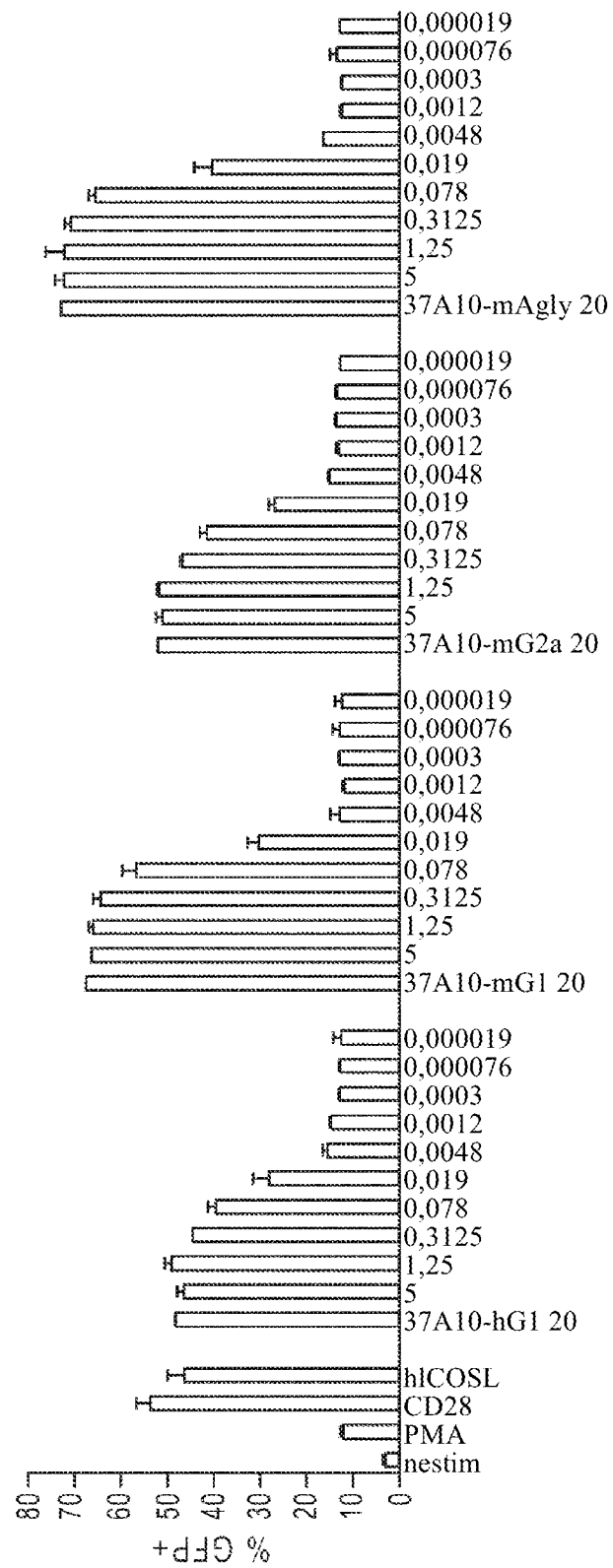


FIG. 11A

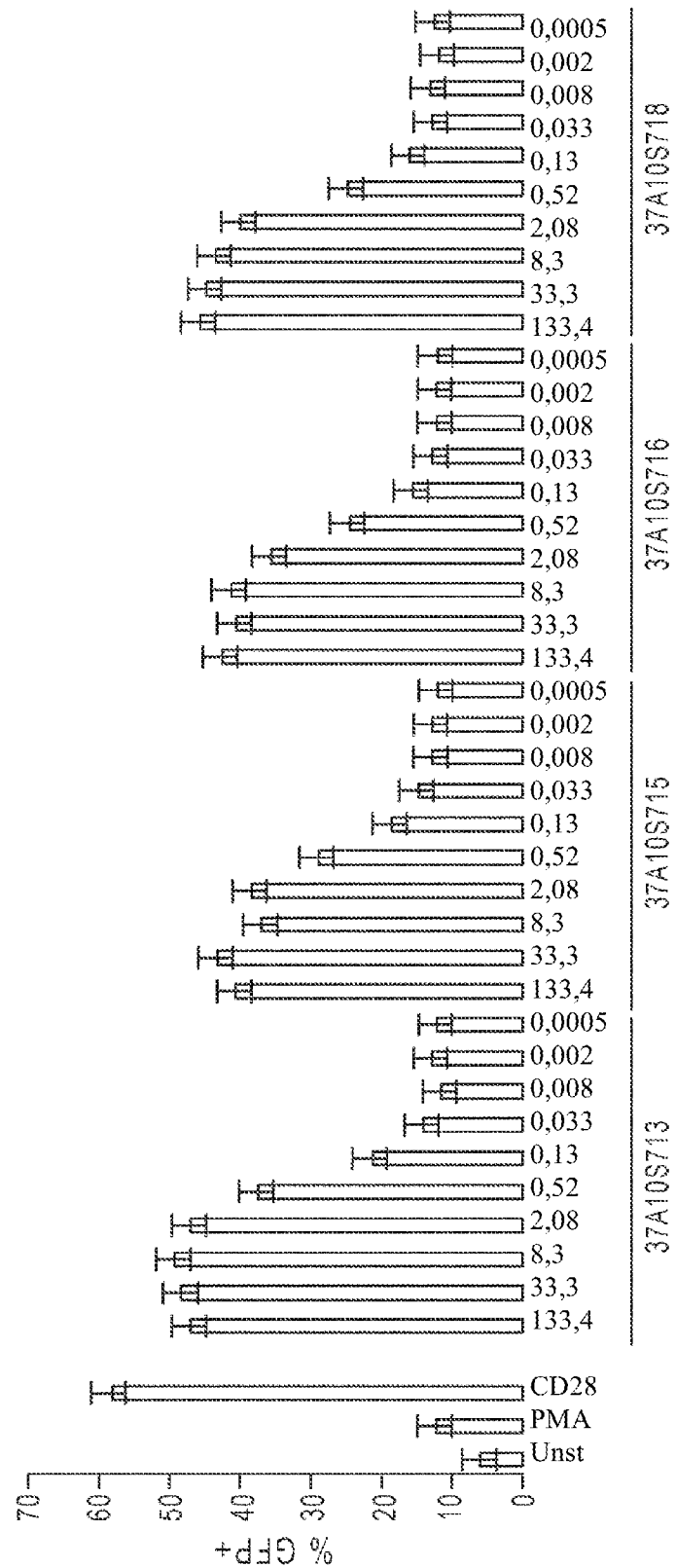
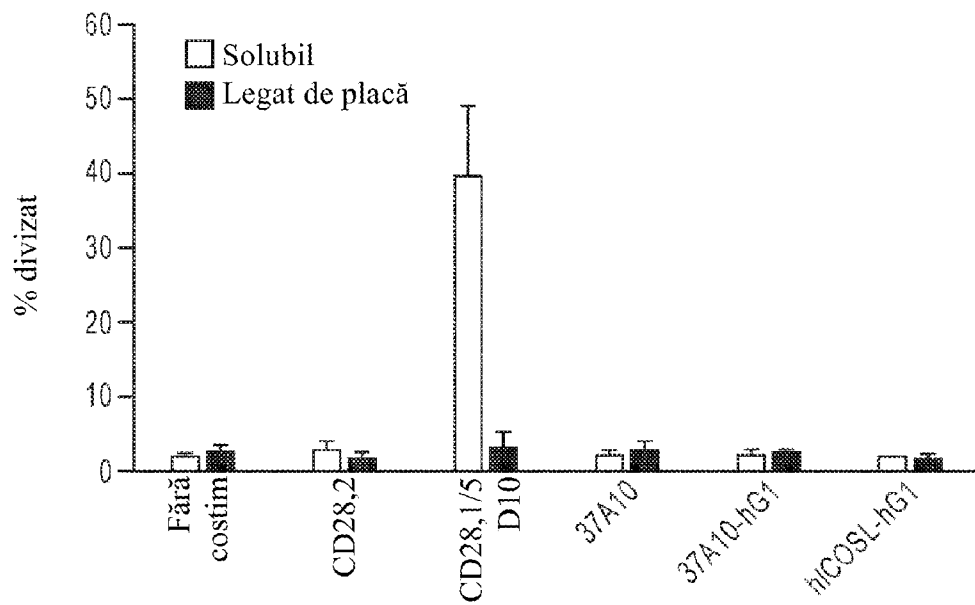
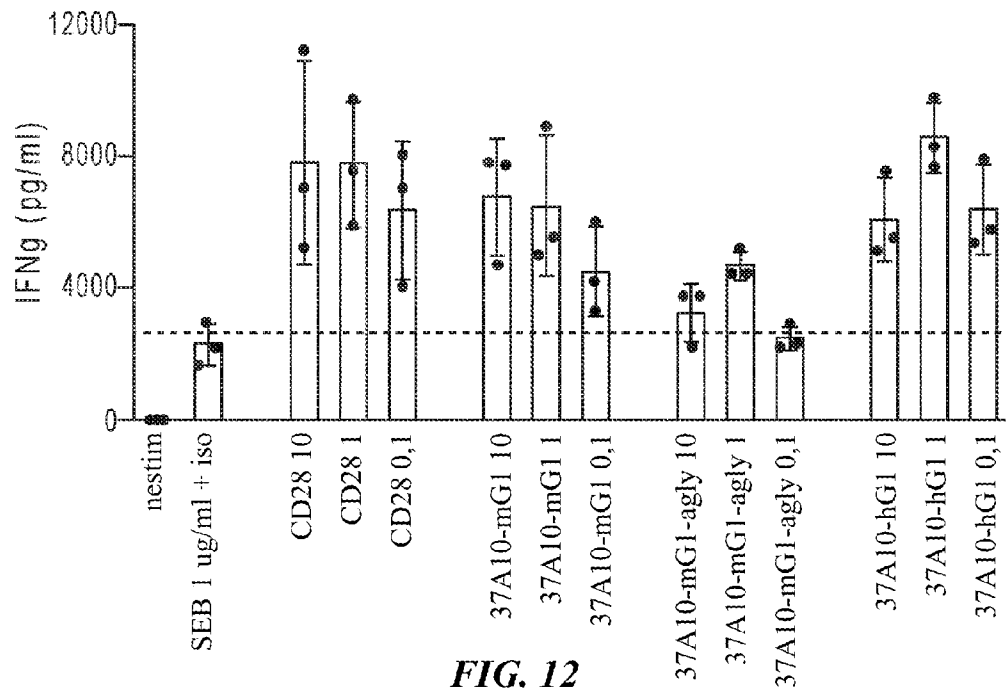
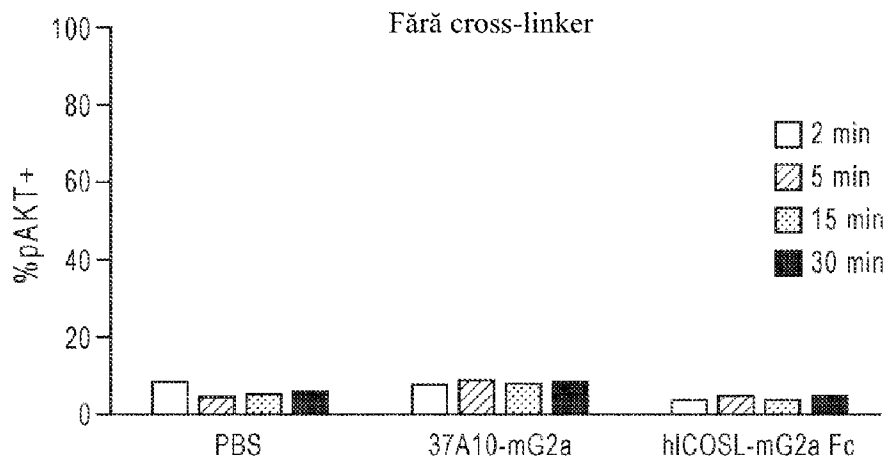
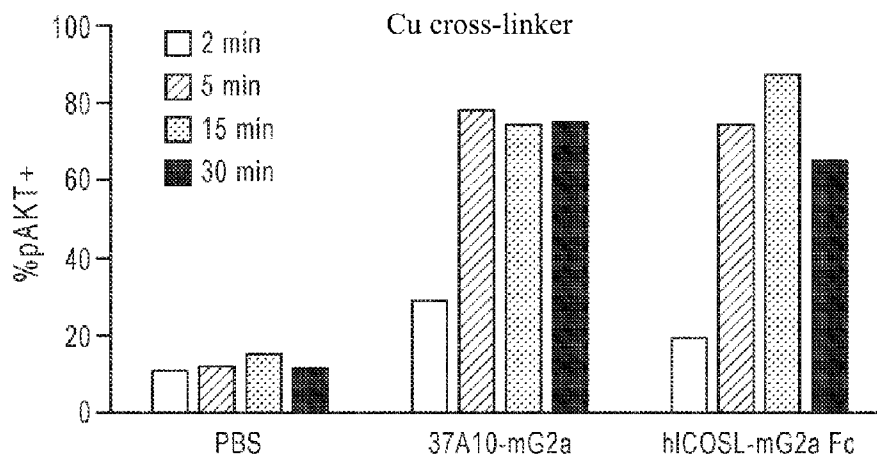
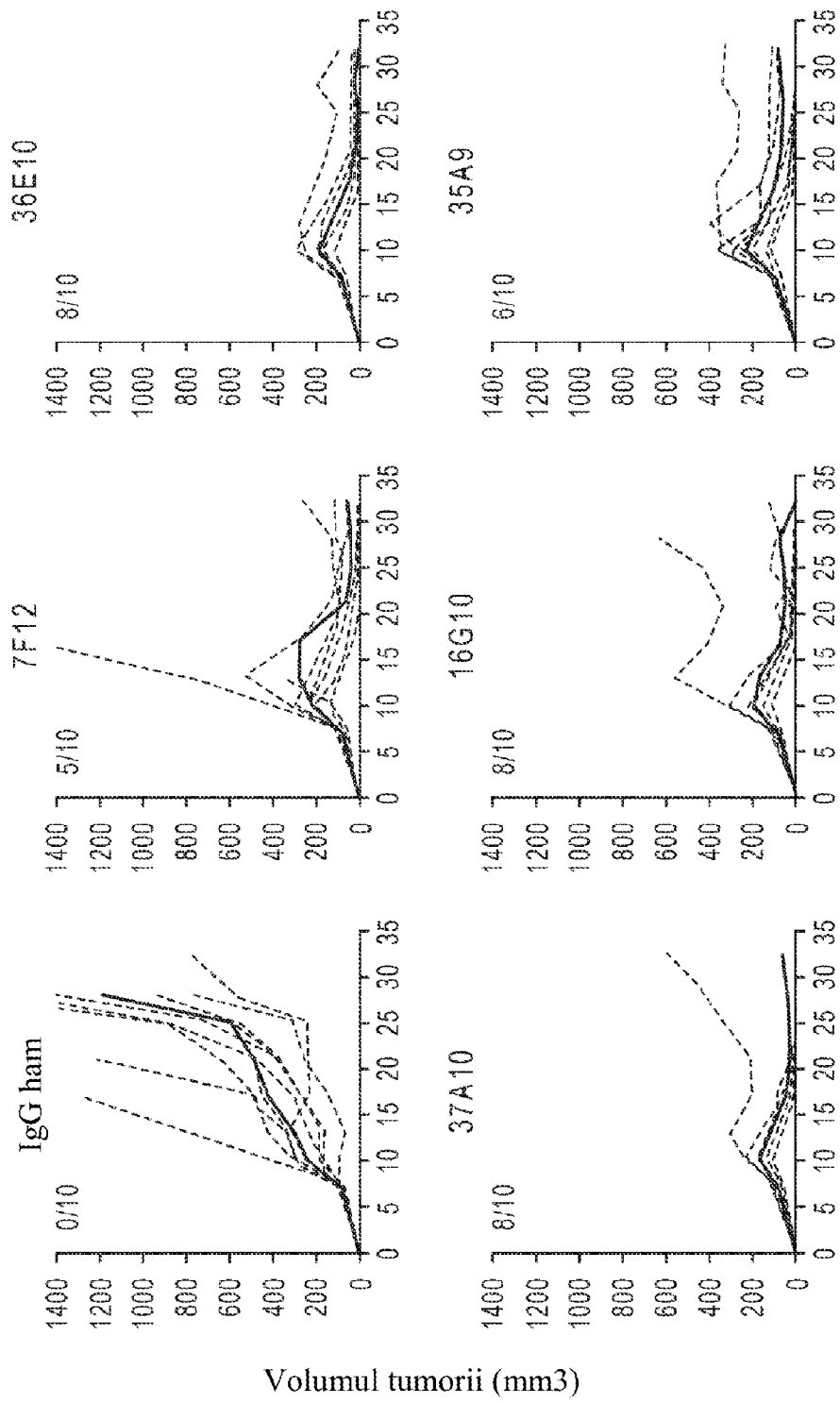
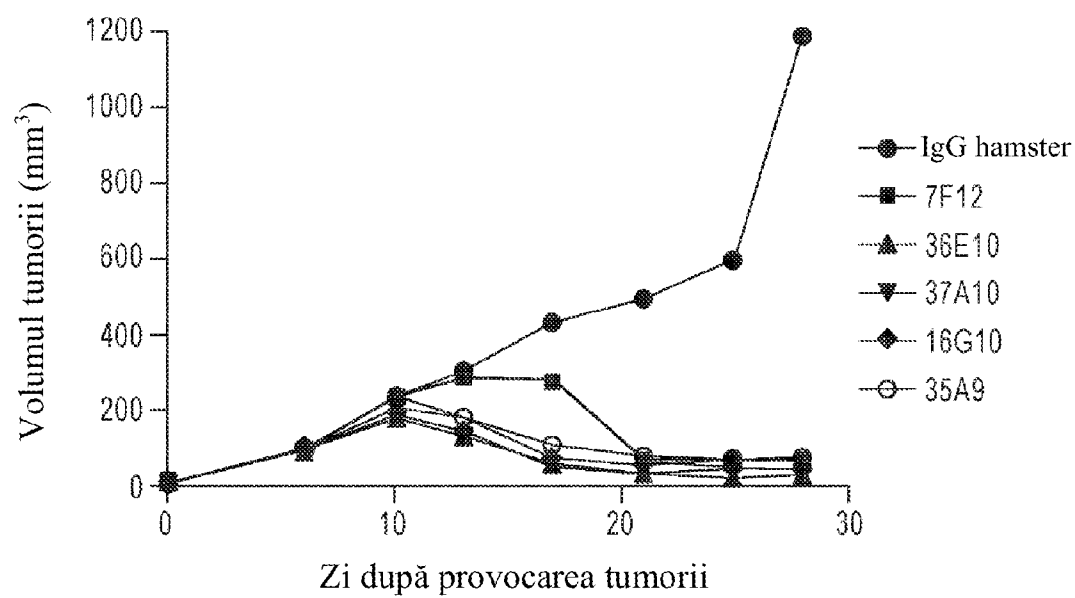
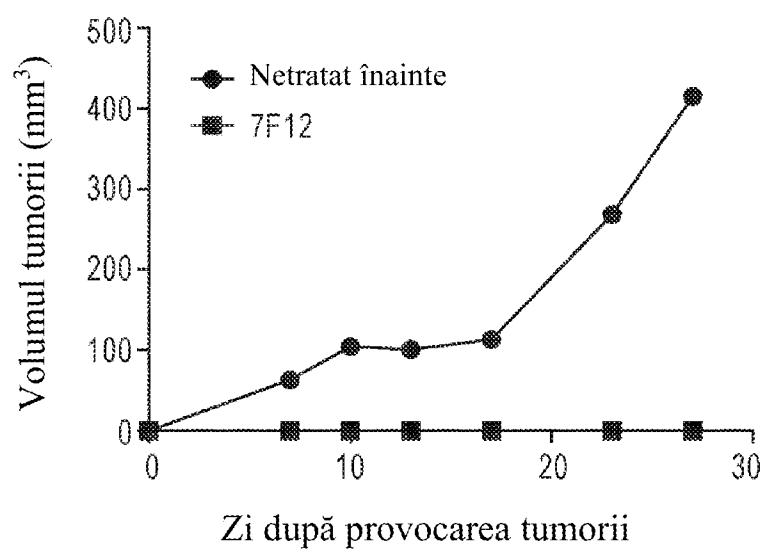


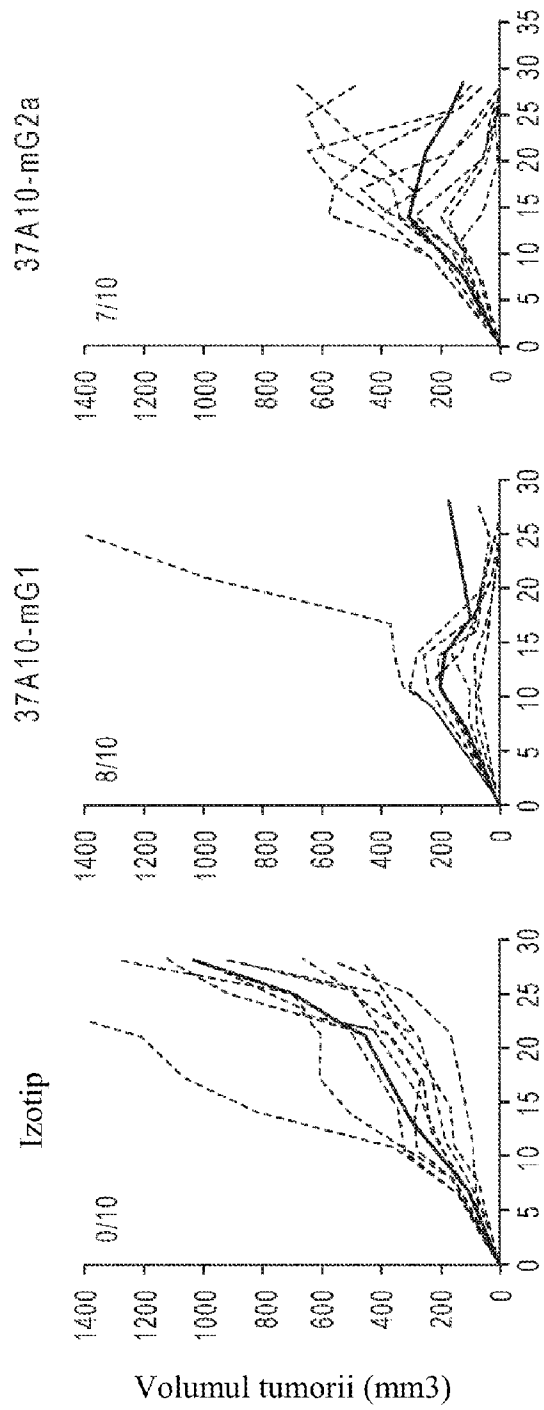
FIG. 11B



**FIG. 14A****FIG. 14B**

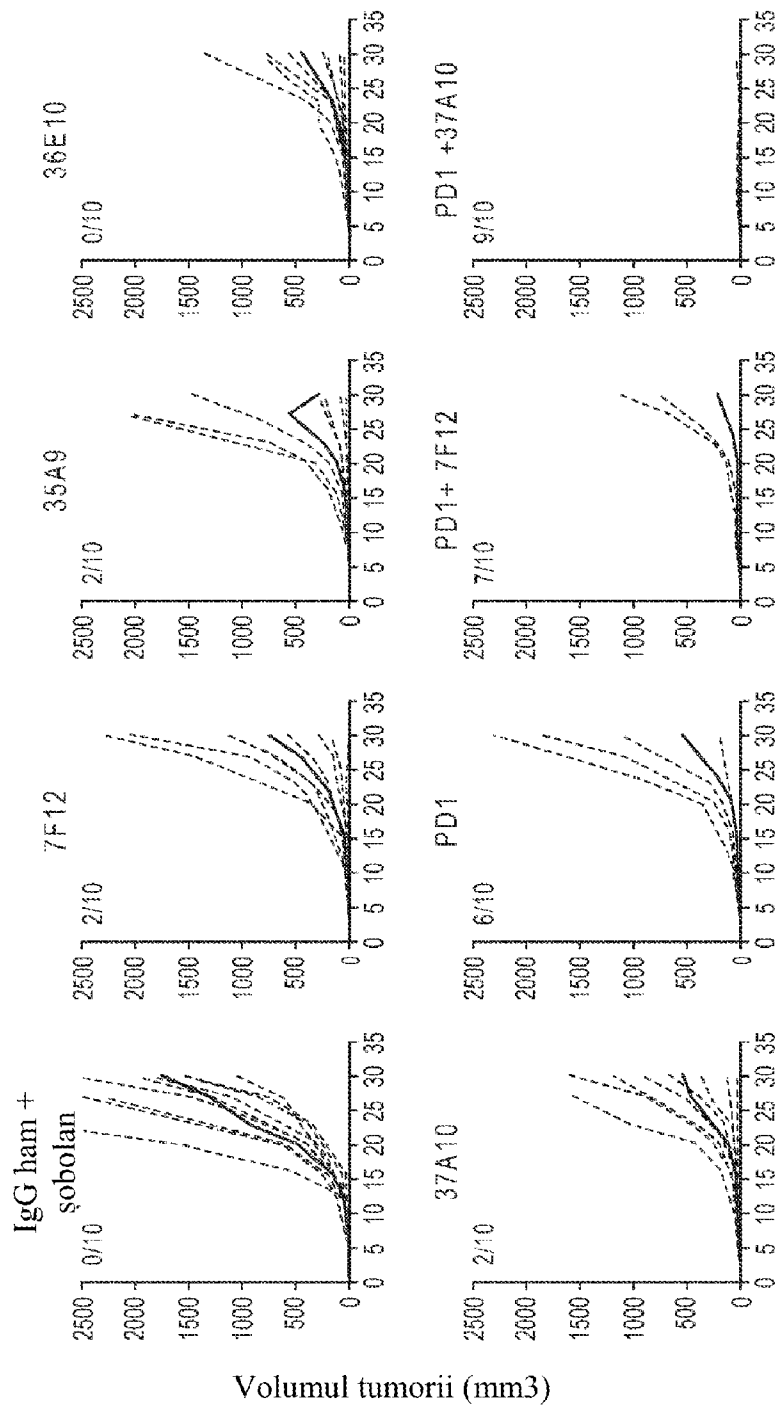
**FIG. 15A**

**FIG. 15B****FIG. 16**



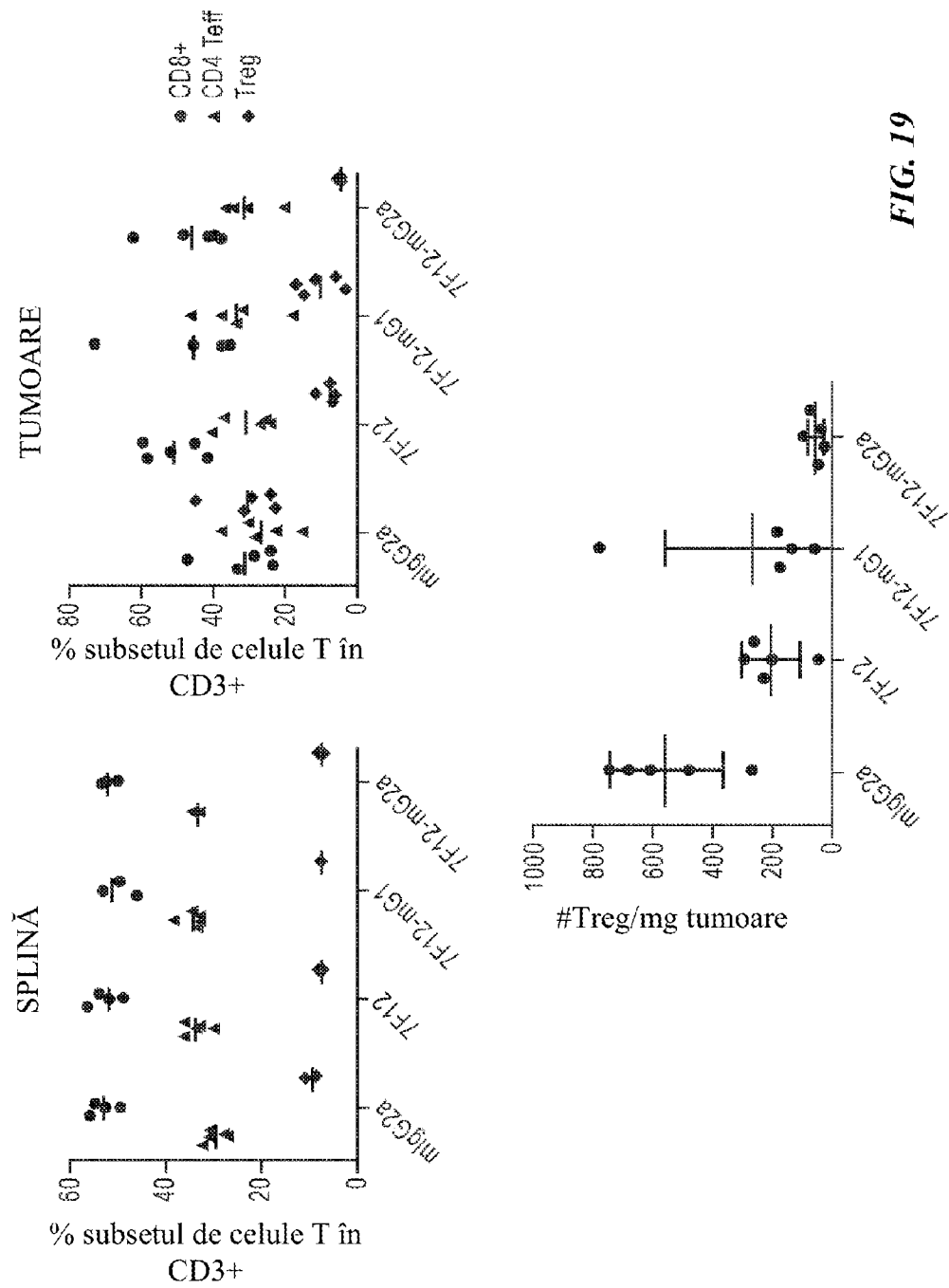
Zile după provocarea tumorii

FIG. 17



Zile după provocarea tumorii

FIG. 18



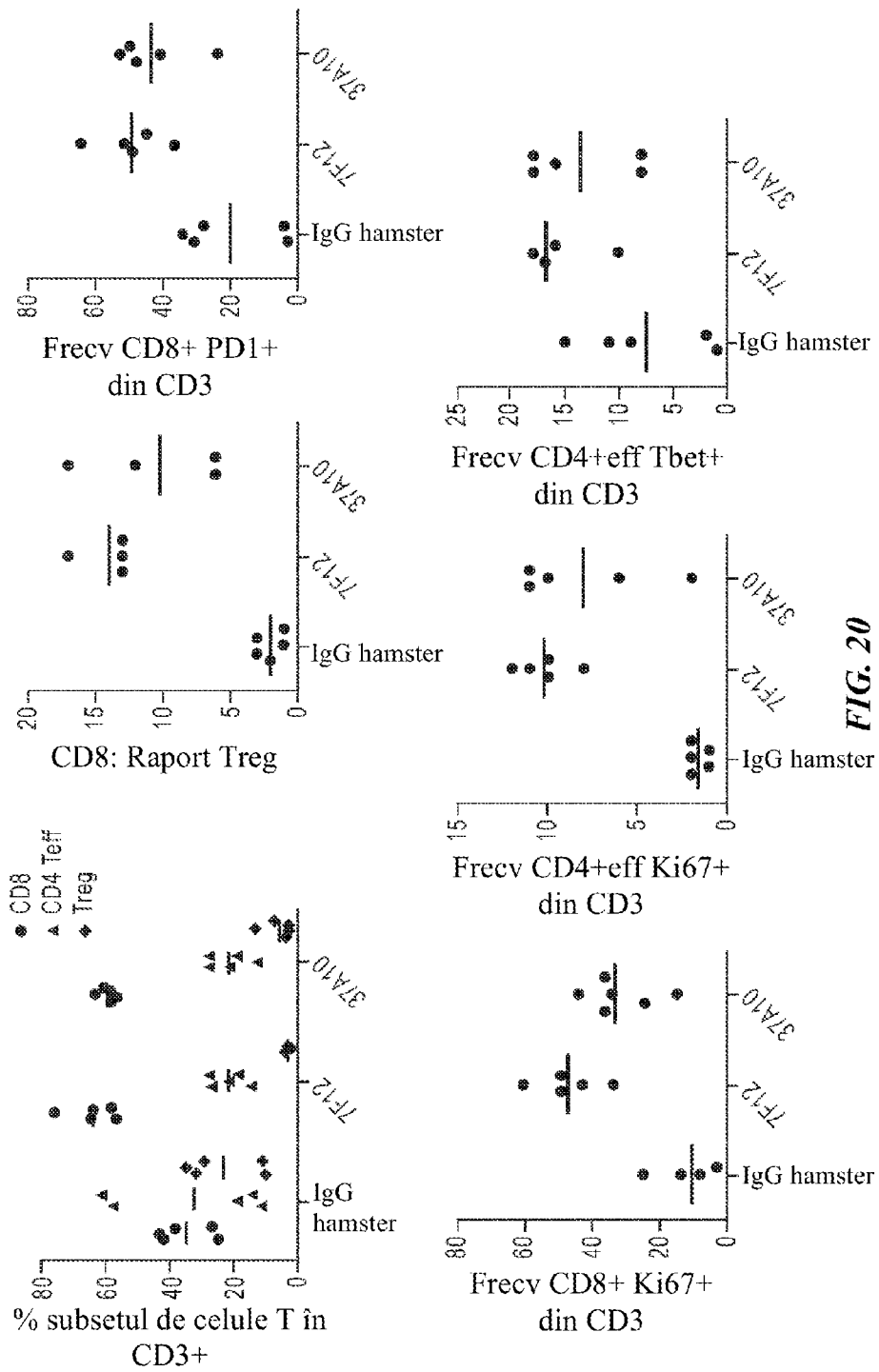


FIG. 20

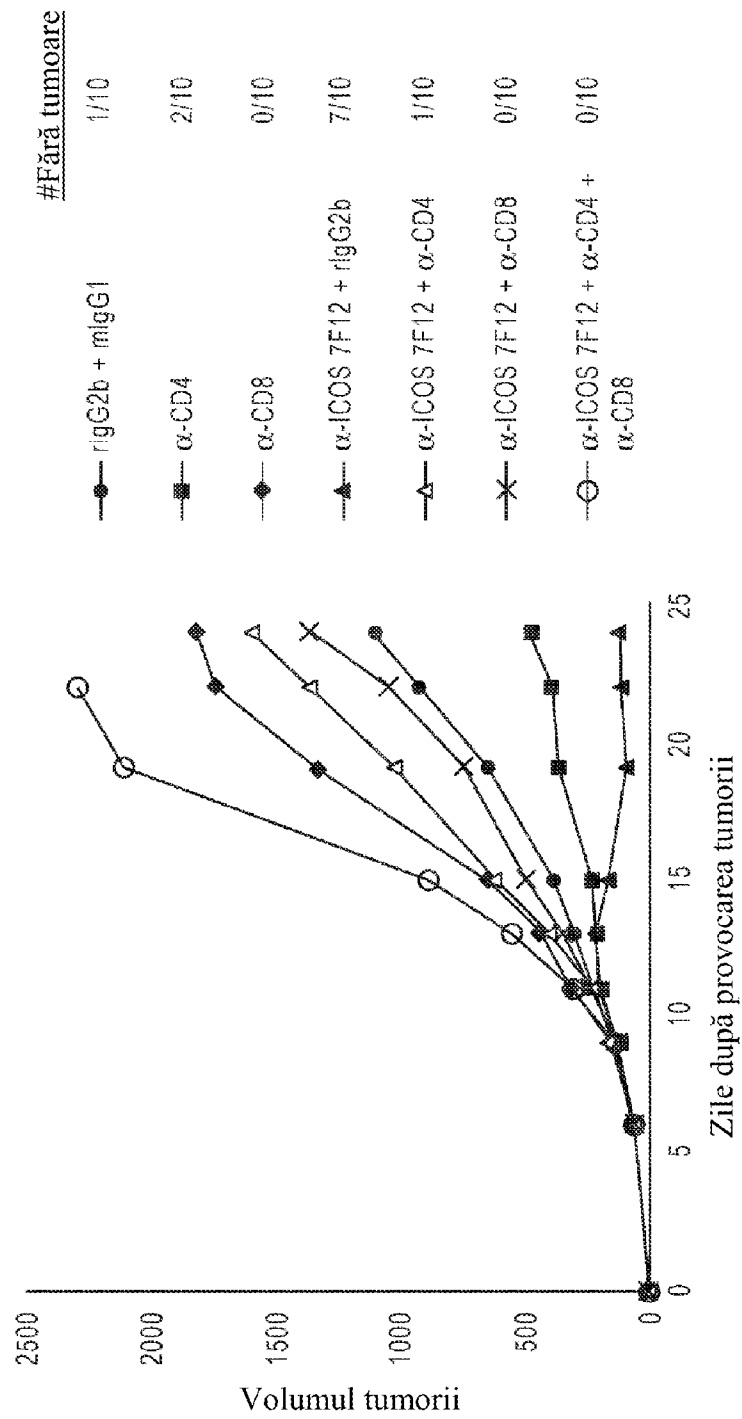
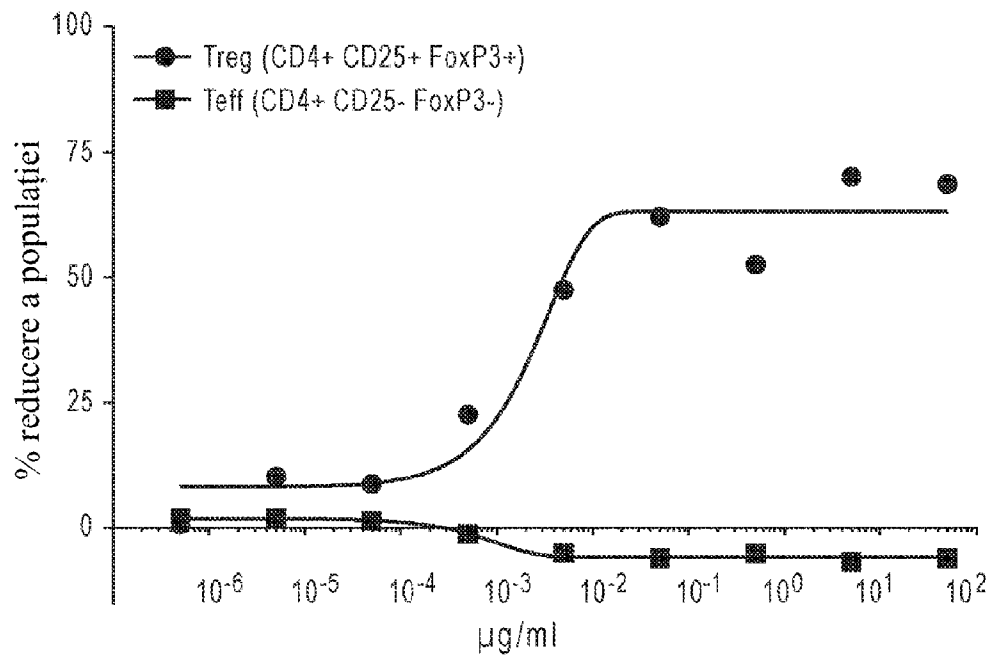
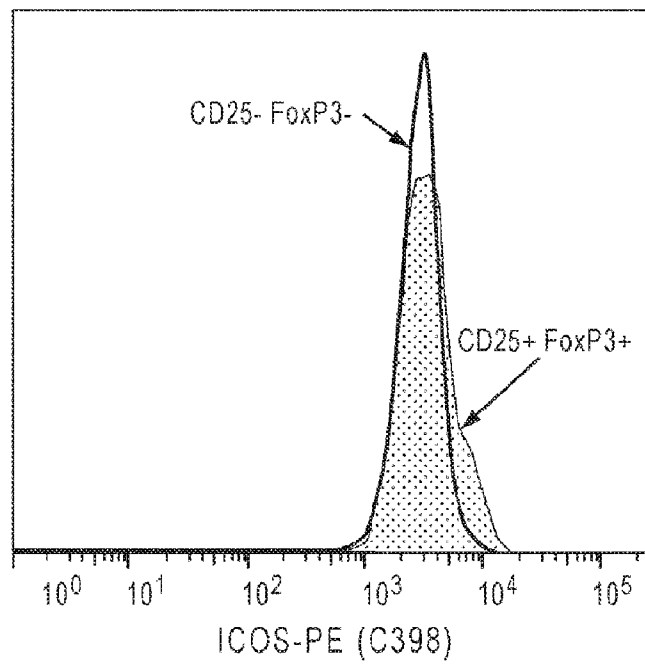


FIG. 21

**FIG. 22A****FIG. 22B**

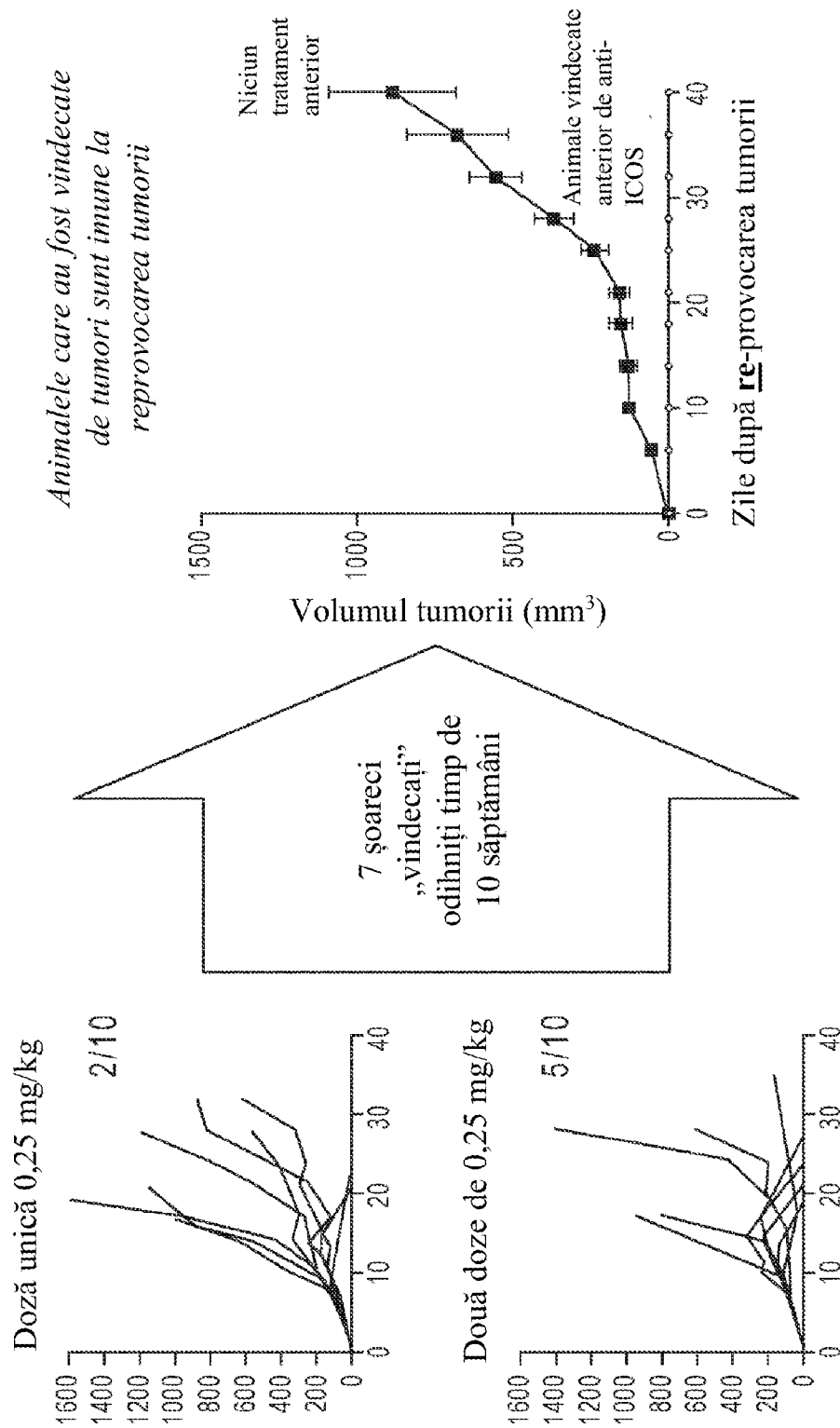


FIG. 23

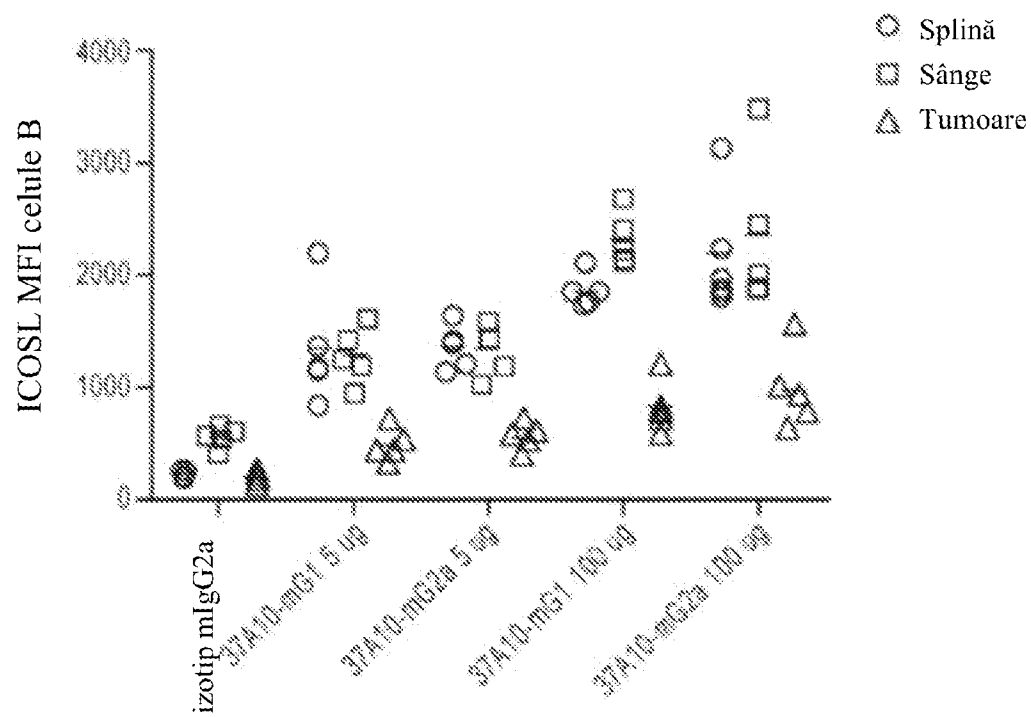


FIG. 24A

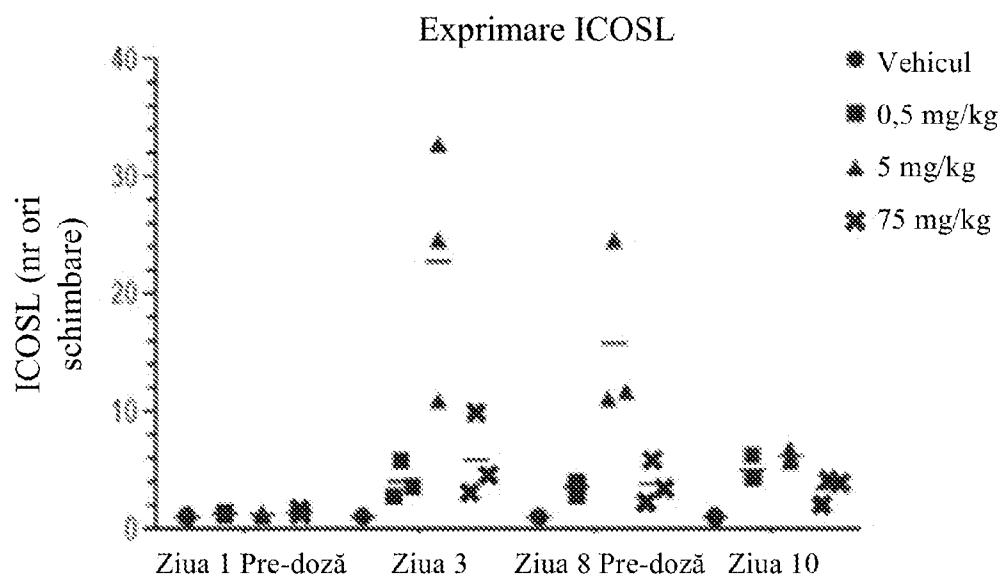
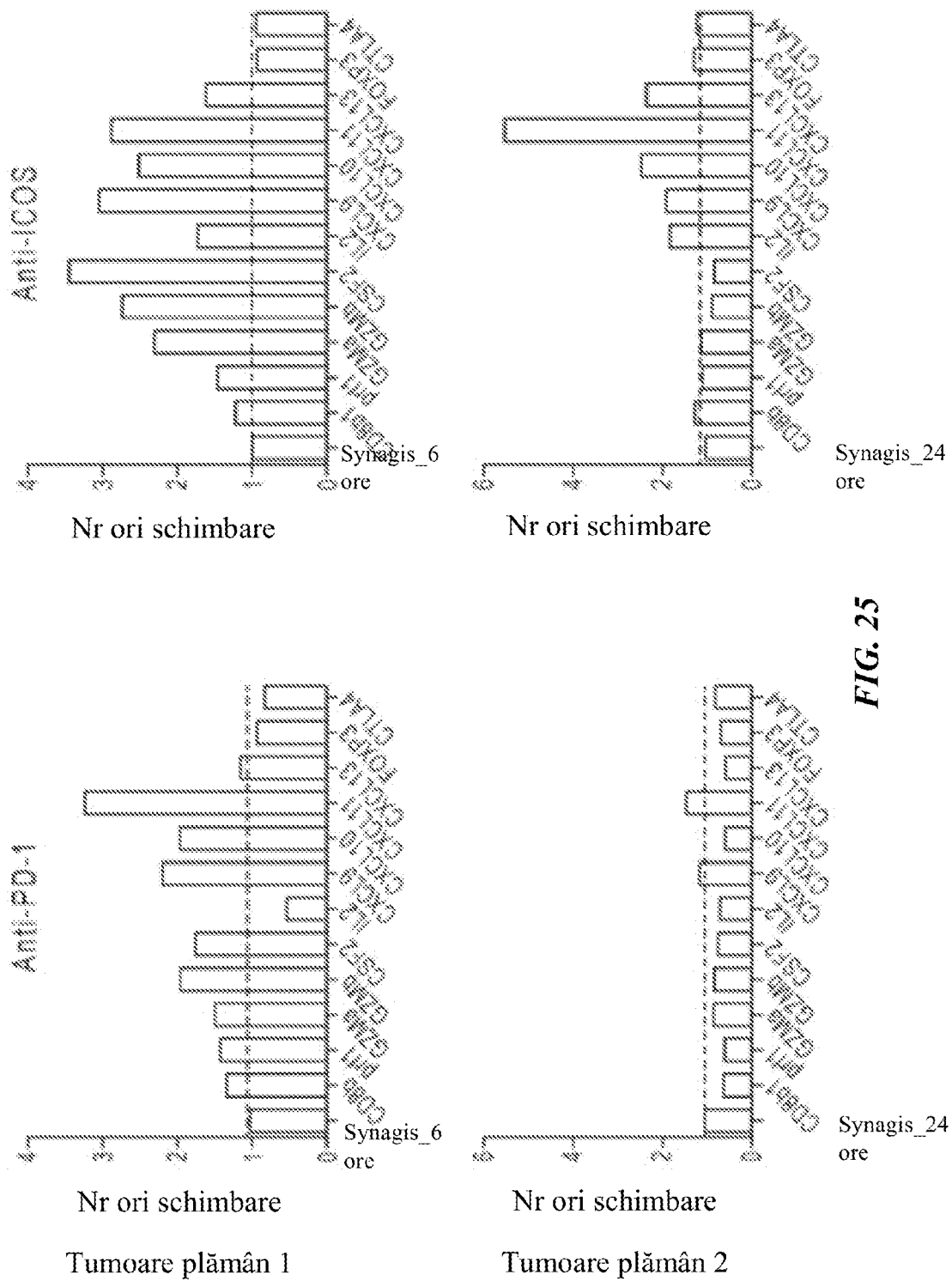
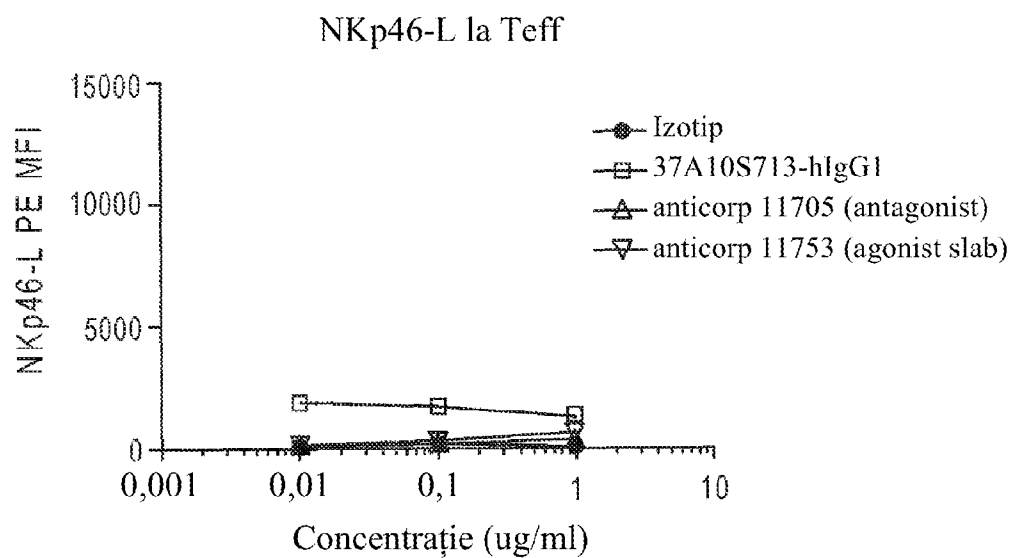
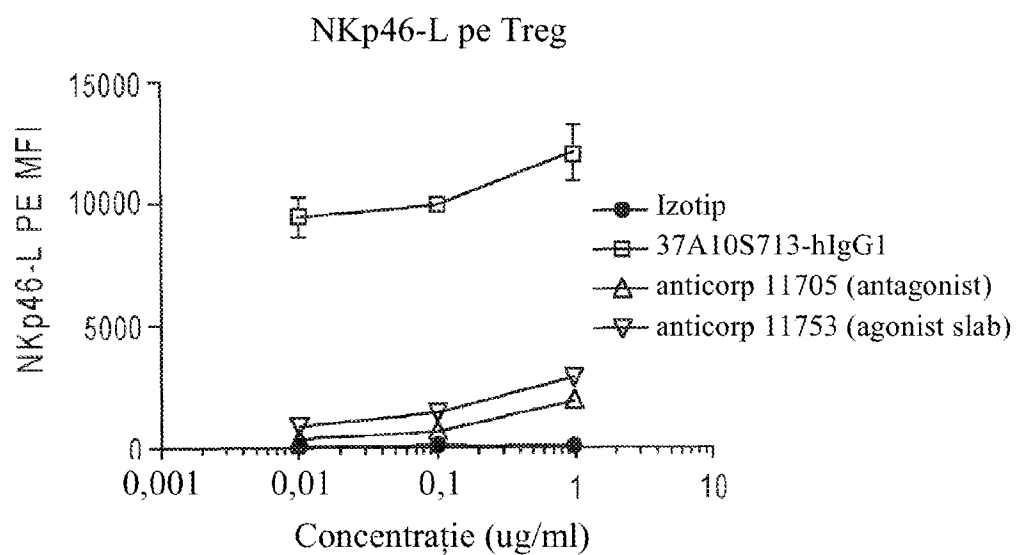
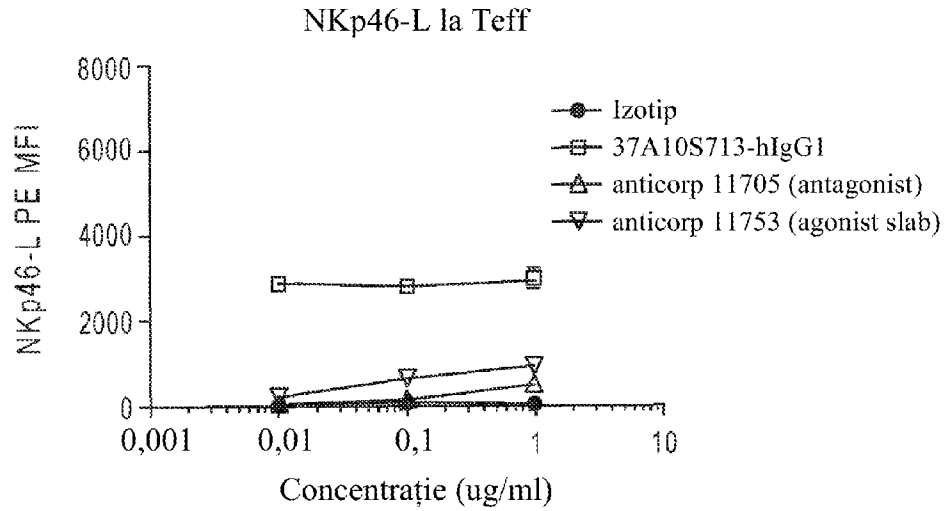
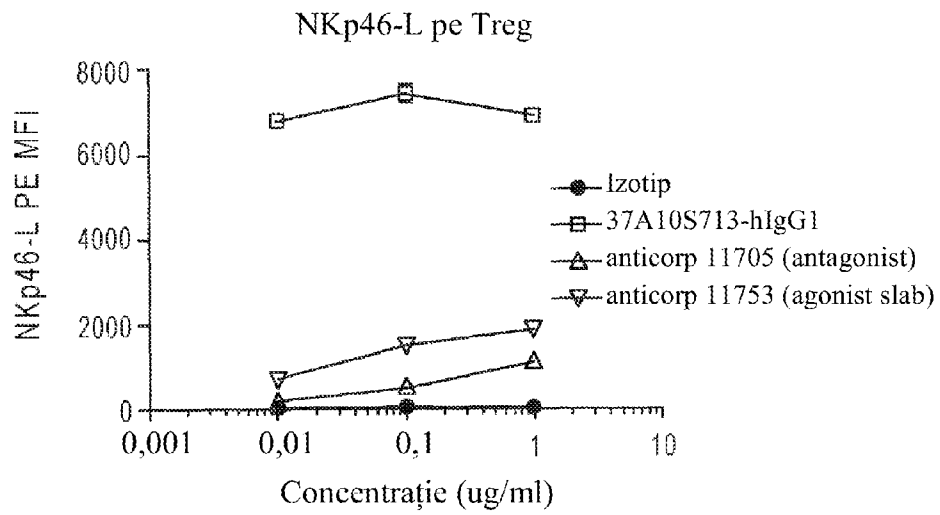
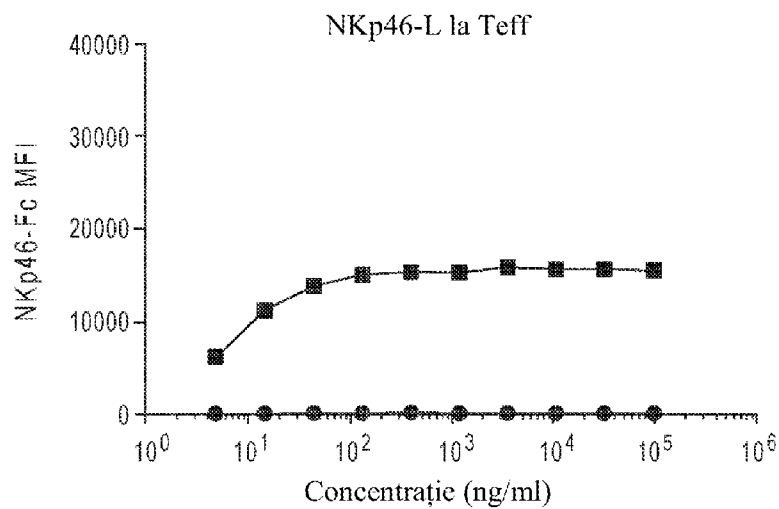
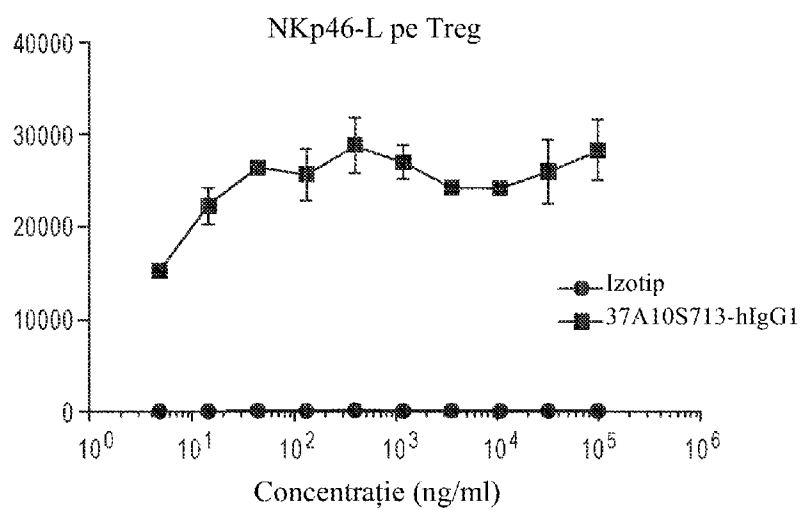


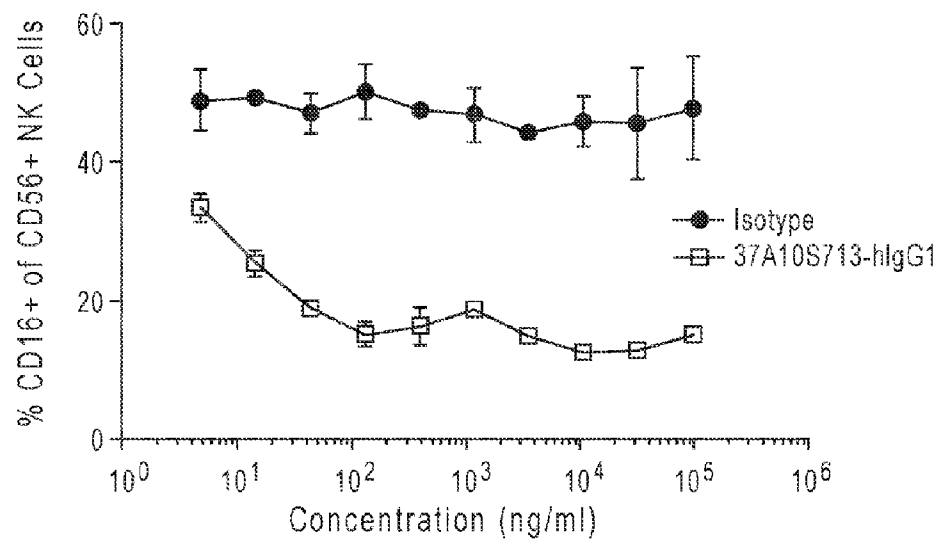
FIG. 24B



**FIG. 26A****FIG. 26B**

**FIG. 26C****FIG. 26D**

**FIG. 26E****FIG. 26F**

**FIG. 27**