

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 345**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2016 PCT/US2016/023524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16154177**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2016 E 16769535 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3273992**

54 Título: **Anticuerpos contra ICOS**

30 Prioridad:

23.03.2015 US 201562137034 P

14.04.2015 US 201562147484 P

04.05.2015 US 201562156588 P

16.10.2015 US 201562242489 P

16.11.2015 US 201562255635 P

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

11.03.2021

73 Titular/es:

JOUNCE THERAPEUTICS, INC. (100.0%)

780 Memorial Drive

Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

SAZINSKY, STEPHEN;

MICHAELSON, JENNIFER S.;

SATHYANARAYANAN, SRIRAM y

ELPEK, KUTLU GOKSU

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 811 345 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra ICOS

5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de las solicitudes provisionales de Estados Unidos núms. 62/137,034 presentada el 23 de marzo de 2015; 62/147,484 presentada el 14 de abril de 2015; 62/156,588 presentada el 4 de mayo de 2015; 62/242,489 presentada el 16 de octubre de 2015; y 62/255,635 presentada el 16 de noviembre de 2015.

Campo de la invención

Se proporcionan anticuerpos que se unen a un coestimulador inducible de células T (ICOS) así como también el uso de estos en métodos de tratamiento que comprenden administrar los anticuerpos anti-ICOS.

Antecedentes

ICOS es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas B7/CD28/CTLA-4 y se expresa específicamente en las células T. A diferencia de CD28, que se expresa constitutivamente en las células T y proporciona señales coestimuladoras necesarias para la activación completa de las células T en reposo, el ICOS se expresa solo después de la activación inicial de las células T.

ICOS se ha implicado en aspectos diversos de las respuestas de células T (revisado en Simpson y otros, 2010, Curr. Opin. Immunol., 22: 326-332). Tiene un papel en la formación de centros germinales, la colaboración de células T/B y el cambio de clase de inmunoglobulinas. Los ratones deficientes de ICOS muestran una afectación en la formación de centros germinales y tienen disminución en la producción de interleucina IL-10. Estos defectos se han vinculado específicamente a deficiencias en células T cooperadoras foliculares.

ICOS también desempeña un papel en el desarrollo y la función de otros subconjuntos de células T, que incluyen Th1, Th2 y Th17. Cabe destacar que ICOS coestimula la proliferación de células T y la secreción de citocinas asociadas con las células Th1 y Th2. En consecuencia, los ratones con desactivación de ICOS demuestran una afectación del desarrollo de fenotipos autoinmunitarios en una variedad de modelos de enfermedad, que incluyen diabetes (Th1), inflamación de las vías respiratorias (Th2) y modelos neuroinflamatorios de EAE (Th17).

Además de su papel en la modulación de la función de células T efectoras (Tef), ICOS modula además las células T reguladoras (Tregs). El ICOS se expresa a altos niveles en las células Tregs, y se ha implicado en la homeostasis y función de las células Treg.

Tras la activación, ICOS, un homodímero enlazado por disulfuro, induce una señal a través de las vías PI3K y AKT. Los eventos de señalización posteriores resultan en la expresión de factores de transcripción específicos del linaje (por ejemplo, T-bet, GATA-3) y, a su vez, efectos sobre la proliferación y supervivencia de las células T.

El ligando de ICOS (ICOSL; B7-H2; B7RP1; CD275; GL50), además un miembro de la superfamilia B7, es el único ligando para ICOS y se expresa en la superficie celular de células B, macrófagos y células dendríticas. ICOSL funciona como un homodímero enlazado no covalentemente en la superficie celular en su interacción con ICOS. Se ha informado que el ICOSL humano, aunque no el ICOSL de ratón, se une a CD28 humano y CTLA-4 (Yao y otros, 2011, Immunity, 34: 729-740).

50 Breve descripción

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a ICOS, en donde el anticuerpo comprende (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67; y en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana o una región constante de cadena pesada de IgG3 humana.

Se describe un anticuerpo aislado que se une a ICOS, en donde el anticuerpo es un agonista de células T CD4 (tales como células T CD4 efectoras (Tef)). En algunos casos, se describe un anticuerpo aislado que se une a ICOS, en donde el anticuerpo es un agonista de células T CD4 (tales como células Tef CD4) y agota las células T reguladoras (Treg). En algunos casos, se describe un anticuerpo aislado que se une a ICOS, en donde el anticuerpo agota las células Treg, pero no agota las células Tef. En algunos casos, se describe un anticuerpo aislado que se une a ICOS, en donde el anticuerpo induce la señalización de pAKT en las células T CD4. En algunos casos, se describe un anticuerpo aislado que se une a ICOS, en donde el anticuerpo induce la señalización de pAKT en las células T CD4 y

agota las células Treg. En algunos casos, se describe un anticuerpo aislado que se une a ICOS, en donde el anticuerpo comprende:

- 5 i) (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; o
- 10 ii) (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47; o
- 15 iii) (a) HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 22, 62, 72, 82, 92, 102 y 112; (b) HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 23, 63, 73, 83, 93, 103 y 113; (c) HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 24, 64, 74, 84, 94, 104 y 114; (d) LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 25, 65, 75, 85, 95, 105 y 115; (e) LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 26, 66, 76, 86, 96, 106 y 116; y (f) LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 27, 67, 77, 87, 97, 107 y 117; o
- 20 iv) (a) HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 32, 162, 172 y 182; (b) HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 33, 163, 173 y 183; (c) HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 34, 164, 174 y 184; (d) LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 35, 165, 175 y 185; (e) LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 36, 166, 176 y 186; y (f) LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 37, 167, 177 y 187; o
- 25 v) (a) HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 52, 122, 132, 142 y 152; (b) HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 53, 123, 133, 143 y 153; (c) HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 54, 124, 134, 144 y 154; (d) LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 55, 125, 135, 145 y 155; (e) LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 56, 126, 136, 146 y 156; y (f) LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 57, 127, 137, 147 y 157; o
- 30 vi) (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27; o
- 35 vii) (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; o
- 40 viii) (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57; o
- 45 ix) (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 73; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 74; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77; o
- 50 x) (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 84; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 87; o
- 55 xi) (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 92; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 93; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 96; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97; o
- 60 xii) (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 102; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 103; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 104; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 105; (e) LCDR2 que
- 65

xv) la V_H comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 160 y la V_L comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 161; o

5 xvi) la V_H comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 170 y la V_L comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 171; o

xvii) la V_H comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 180 y la V_L comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 181.

10 El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de un Fab, Fab', Fv, scFv o un fragmento (Fab')₂. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

15 En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo que se une a ICOS, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 188 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 189.

20 En algunas modalidades, la administración del anticuerpo a un mamífero da como resultado un aumento en las células T efectoras (Tef) en el mamífero. En algunas modalidades, la administración del anticuerpo a un mamífero da como resultado la activación de células T efectoras (Tef) en el mamífero. En algunas modalidades, la administración del anticuerpo a un mamífero aumenta la relación de células Tef con respecto a las células Treg. En algunas modalidades, las células Tef son células T CD4+ FoxP3-. En algunas modalidades, las células Tef son células T CD4+ FoxP3- y células T CD8+. En algunas modalidades, las células Tef son células T CD8+. En algunas modalidades, la administración del anticuerpo a un mamífero da como resultado una disminución en las células T reguladoras (Treg) en el mamífero. En algunas modalidades, las células Treg son células T CD4+ FoxP3+.

30 En algunos casos, se proporciona un anticuerpo aislado que se une al ICOS humano, en donde el anticuerpo se une, además, al ICOS de ratón y/o ICOS de rata. En algunos casos, el anticuerpo aislado se une al ICOS humano con una afinidad (K_D) de menos de 5 nM. En algunos casos, el anticuerpo aislado se une al ICOS de rata con una afinidad (K_D) de menos de 10 nM. En algunos casos, la afinidad se determina mediante interferometría de biocapa (*ver, por ejemplo, Abdiche y otros, 2008, Anal Biochem, 377: 209-217; y el sistema ForteBio Octet®*). En algunos casos, el anticuerpo se une al ICOS humano, ICOS de ratón, e ICOS de rata. En algunos casos, el anticuerpo se une al ICOS de macaco cangrejero. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de un Fab, Fab', Fv, scFv o un fragmento (Fab')₂. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En algunas modalidades, la administración del anticuerpo a un mamífero da como resultado un aumento en las células T efectoras (Tef) en el mamífero. En algunas modalidades, la administración del anticuerpo a un mamífero da como resultado la activación de células T efectoras (Tef) en el mamífero. En algunas modalidades, las células Tef son células T CD4+ FoxP3-. En algunas modalidades, las células Tef son células T CD4+ FoxP3- y células T CD8+. En algunas modalidades, las células Tef son células T CD8+. En algunas modalidades, la administración del anticuerpo a un mamífero da como resultado una disminución en las células T reguladoras (Treg) en el mamífero. En algunas modalidades, las células Treg son células T CD4+ FoxP3+. En algunas modalidades, el mamífero se selecciona de un ratón, rata, mono cangrejero y ser humano.

45 En algunos casos, después del tratamiento del tejido tumoral pulmonar con un anticuerpo proporcionado en la presente, el nivel de una quimiocina o citocina seleccionada de GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CXCL13 es de al menos 2 veces o al menos 3 veces más alto que el nivel de la quimiocina después del tratamiento del tejido tumoral pulmonar con un anticuerpo control. En algunos casos, el nivel es el nivel de un ARNm. En algunas modalidades, el nivel es el nivel de una proteína. En algunos casos, un anticuerpo de control es un anticuerpo de isotipo similar que se une a un antígeno no relacionado, y que no se espera que tenga un efecto sobre los niveles de quimiocinas. En algunos casos, el nivel de la quimiocina se mide 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas o 6 horas después del tratamiento. En algunos casos, la quimiocina es CXCL11. En algunos casos, el nivel de la quimiocina se mide 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 36 horas o 48 horas después del tratamiento. En algunos casos, el nivel de la quimiocina se mide 24 horas después del tratamiento. En algunos casos, el tejido tumoral pulmonar es tejido tumoral pulmonar humano.

60 En algunos casos, un anticuerpo proporcionado en la presente aumenta el nivel de al menos una quimiocina y/o citocina seleccionada de GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CXCL13 en un mamífero al que se ha administrado el anticuerpo al menos 2 veces. En algunos casos, el nivel de la quimiocina se mide 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas o 6 horas después de la administración del anticuerpo. En algunos casos, el nivel es el nivel de un ARNm. En algunos casos, el nivel es el nivel de una proteína. En algunos casos, la quimiocina es CXCL11. En algunos casos, el nivel de la quimiocina se mide 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 36 horas o 48 horas después de la administración del anticuerpo. En algunos casos, el nivel de la quimiocina se mide 24 horas después de la administración del anticuerpo.

65 En algunos casos, se proporciona un anticuerpo agonista anti-ICOS, donde el anticuerpo aumenta el nivel de al menos

una quimiocina y/o citocina seleccionada de GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CXCL13 en un mamífero al que se ha administrado el anticuerpo al menos 2 veces. En algunos casos, se proporciona un anticuerpo agonista anti-ICOS, en donde el anticuerpo aumenta el nivel de al menos una quimiocina y/o citocina seleccionada de GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en un mamífero al que se ha administrado el anticuerpo al menos 2 veces. En algunos casos, el nivel de la quimiocina se mide 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas o 6 horas después de la administración del anticuerpo. En algunos casos, el nivel es el nivel de un ARNm. En algunas modalidades, el nivel es el nivel de una proteína. En algunos casos, la quimiocina es CXCL11. En algunas modalidades, el nivel de la quimiocina se mide 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 36 horas o 48 horas después de la administración del anticuerpo. En algunos casos, el nivel de la quimiocina se mide 24 horas después de la administración del anticuerpo. En algunas modalidades, el mamífero es un ser humano. En algunas modalidades, el ser humano tiene cáncer. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma de células renales (RCC), cáncer gástrico, cáncer de vejiga, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) y cáncer de mama triple negativo (TNBC). En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de mama triple negativo (TNBC).

En algunos casos, se describe un anticuerpo que se une a ICOS, en donde el anticuerpo aumenta el nivel del ligando de NKp46 (NKp46-L) en las células T. En algunos casos, el aumento del nivel de NKp46-L en las células T se determina mediante un dominio extracelular de NKp46 soluble en un ensayo de citometría de flujo. En algunos casos, el anticuerpo aumenta el nivel de NKp46-L en las células Treg más que el aumento del nivel de NKp46-L en las células Tef. En algunos casos, el anticuerpo aumenta la pérdida de CD16 en las células NK.

En algunas modalidades, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento. En algunas modalidades, se proporciona un vector que comprende el ácido nucleico. En algunas modalidades, se proporciona una célula huésped que comprende el vector. En algunas modalidades, se proporciona una célula huésped que produce un anticuerpo descrito en el presente documento. En algunas modalidades, se proporciona un método para producir un anticuerpo anti-ICOS, que comprende cultivar la célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y recuperar el anticuerpo producido por la célula huésped.

En algunos casos, se describe una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo anti-ICOS descrito en la presente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-ICOS descrito en el presente documento es para usar en métodos para tratar un cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-ICOS descrito en el presente documento o una composición farmacéutica descrita en este documento. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma de células renales (RCC), cáncer gástrico, cáncer de vejiga, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) y cáncer de mama triple negativo (TNBC). En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de mama triple negativo (TNBC).

En algunos casos, se describe un método para aumentar la cantidad de células T efectoras (Tef) en un mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-ICOS descrito en el presente documento o una composición farmacéutica descrita en este documento. En algunos casos, el método comprende además activar las células Tef. En algunos casos, se describe un método para activar células T efectoras (Tef) en un mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-ICOS descrito en el presente documento o una composición farmacéutica descrita en este documento. En algunos casos, se describe un método para aumentar la relación de células Tef con respecto a las células Treg en un mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-ICOS descrito en el presente documento o una composición farmacéutica descrita en este documento. En algunos casos, las células Tef son células T CD4+ FoxP3-. En algunos casos, las células Tef son células T CD4+ FoxP3- y células T CD8+. En algunos casos, las células Tef son células T CD8+. En algunos casos, el método comprende además disminuir la cantidad de células T reguladoras (Treg).

En algunos casos, se describe un método para disminuir la cantidad de células T reguladoras (Treg) en un mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-ICOS descrito en el presente documento o una composición farmacéutica descrita en este documento. En algunos casos, las células Treg son células T CD4+ FoxP3+.

En algunos casos, se describe un método para aumentar el nivel de al menos una quimiocina y/o citocina seleccionadas de GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CXCL13 en un mamífero, que comprende administrar al mamífero un anticuerpo proporcionado en la presente. En algunos casos, el nivel de al menos una quimiocina aumenta en al menos 2 veces o al menos 3 veces. En algunos casos, el nivel de la quimiocina se mide 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas o 6 horas después de la administración del anticuerpo. En algunos casos, el nivel es el nivel de un ARNm. En algunos casos, el nivel es el nivel de una proteína. En algunos casos, la quimiocina es CXCL11. En algunos casos, el nivel de la quimiocina se mide 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16

horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 36 horas o 48 horas después de la administración del anticuerpo. En algunos casos, el nivel de la quimiocina se mide 24 horas después de la administración del anticuerpo. En algunas modalidades, el mamífero es un ser humano. En algunas modalidades, el ser humano tiene cáncer. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma de células renales (RCC), cáncer gástrico, cáncer de vejiga, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) y cáncer de mama triple negativo (TNBC). En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de mama triple negativo (TNBC).

En algunas modalidades, el mamífero es un ser humano.

En algunas modalidades, el mamífero se administra con al menos un agente terapéutico adicional. En algunos casos, el agente terapéutico adicional se administra simultáneamente o secuencialmente con el anticuerpo anti-ICOS. En algunos casos, el agente terapéutico adicional es una terapia de PD-1. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional se selecciona de un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo anti-PD-L1. En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción se administra con nivolumab. En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción se administra con pembrolizumab. En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción se administra con atezolizumab. En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción se administra con avelumab. En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción se administra con durvalumab.

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es una vacuna contra el cáncer. En algunas de estas modalidades, la vacuna contra el cáncer se desarrolla mediante el uso de un neoantígeno. En algunas modalidades, la vacuna contra el cáncer es una vacuna de ADN. En algunas modalidades, la vacuna contra el cáncer es un virus modificado genéticamente que comprende un antígeno del cáncer, como PROSTVAC (rilmogene galvacirepvec/rilmogene glafolivec). En algunas modalidades, la vacuna contra el cáncer comprende células tumorales modificadas genéticamente, tales como GVAX.

En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente se administra con un anticuerpo agonista anti-OX40. En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción se administra con un anticuerpo anti-CTLA4. En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente se administra con ipilimumab.

En algunos casos, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos ilustrativos no limitantes incluyen capecitabina, ciclofosfamida, dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, cisplatino, carboplatino, epirubicina, eribulina, 5-FU, gemcitabina, irinotecán, ixabepilona, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, nab-paclitaxel, ABRAXANE® (paclitaxel unido a proteínas), pemetrexed, vinorelbina y vincristina. En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción se administra con ABRAXANE® (Celgene). En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción se administra con al menos un inhibidor de quinasa. Los inhibidores de quinasas ilustrativos no limitantes incluyen erlotinib, afatinib, gefitinib, crizotinib, dabrafenib, trametinib, vemurafenib y cobimetanib.

En algunos casos, el agente terapéutico adicional es un inhibidor deIDO. Los ejemplos no limitantes de inhibidores deIDO incluyen Indoximod (New Link Genetics), INCB024360 (Incyte Corp), 1-metil-D-triptófano (New Link Genetics) y GDC-0919 (Genentech). En algunos casos, el agente terapéutico adicional es un fármaco modificador inmunitario (IMiD). Los IMiD ilustrativos no limitantes incluyen talidomida, lenalidomida y pomalidomida.

En algunos casos, el mamífero recibe terapia CAR-T además de la administración de un anticuerpo anti-ICOS descrito en el presente documento.

En algunos casos, el mamífero experimenta cirugía y/o radioterapia además de la administración de un anticuerpo anti-ICOS descrito en el presente documento, con o sin un agente terapéutico adicional. En algunos casos, el mamífero experimenta radioterapia además de la administración de un anticuerpo anti-ICOS descrito en el presente documento, con o sin un agente terapéutico adicional.

En algunos casos, se proporciona el uso de un anticuerpo descrito en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer. En algunos casos, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma de células renales (RCC), cáncer gástrico, cáncer de vejiga, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) y cáncer de mama triple negativo (TNBC). En algunos casos, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de mama triple negativo (TNBC). En algunos casos, el medicamento es para la administración con al menos un agente terapéutico adicional. En algunos casos, el agente terapéutico adicional se selecciona de un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo anti-PD-L1.

- En algunos casos, se proporciona el uso de un anticuerpo descrito en el presente documento o una composición farmacéutica descrita en este documento para tratar el cáncer. En algunos casos, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma de células renales (RCC), cáncer gástrico, cáncer de vejiga, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) y cáncer de mama triple negativo (TNBC). En algunos casos, el
- En algunos casos, se proporciona el uso de un anticuerpo descrito en el presente documento o una composición farmacéutica descrita en este documento y al menos un agente terapéutico adicional para tratar el cáncer. En algunos casos, el agente terapéutico adicional se selecciona de un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo anti-PD-L1. En algunos casos, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma de células renales (RCC), cáncer gástrico, cáncer de vejiga, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) y cáncer de mama triple negativo (TNBC). En algunos casos, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de mama triple negativo (TNBC).
- En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo descrito en el presente documento o una composición farmacéutica descrita en este documento para el uso en el tratamiento del cáncer. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma de células renales (RCC), cáncer gástrico, cáncer de vejiga, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) y cáncer de mama triple negativo (TNBC). En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de mama triple negativo (TNBC).

Breve descripción de las figuras

- Figura 1A-B. Niveles de ARNm de ICOS en múltiples tumores humanos. A) Se representan la intensidad media y los intervalos de confianza del 75 % de los niveles normalizados de ARNm de ICOS en diversas indicaciones médicas. Se indican las muestras con intensidades fuera del intervalo de confianza del 75 % (puntos). B) El porcentaje de cada tipo de tumor indicado que muestra una tinción para ICOS de 0, 1+, 2+ o 3+ mediante inmunohistoquímica (IHC).
- Figura 2. Correlación de la expresión de ICOS con infiltración de células T. Los niveles de ARNm de ICOS de ~450 tumores HNSCC se compararon con una puntuación de la firma de quimiocinas asociada con 12 genes de células T o los niveles de ARNm de FoxP3. Los niveles de la firma de quimiocinas normalizada o el ARNm de FoxP3 para cada tumor se grafican en el eje Y, los niveles de ARNm de ICOS se representan en el eje X. La correlación de Spearman (R) de la asociación se muestra en el gráfico [Corr(S)]. Una correlación de $>0,75$ (R de Spearman) se observa como corte para una correlación fuerte.
- Figura 3. La expresión de ARNm de ICOS se comparó con ~450 tumores HNSCC mediante el uso de datos de secuenciación de ARN TCGA (NCI). Los niveles de ARNm de CTLA-4 o PD-1 o PD-L1 normalizados para cada tumor se grafican en el eje Y, los niveles de ARNm de ICOS se representan en el eje X. La correlación de Spearman (R) de la asociación se muestra en el gráfico [Corr(S)]. Los niveles de expresión de ICOS se correlacionan significativamente con la expresión de las moléculas de puntos de control CTLA-4, PD-1. Se observó una débil correlación entre ICOS y PD-L1. Una correlación de $>0,75$ (R de Spearman) se observa como corte para una correlación fuerte.
- Figura 4. Imágenes representativas de las diferentes intensidades de una tinción para ICOS en un tumor de NSCLC humano.
- Figura 5. Distribución de la densidad de células con ICOS de tumores humanos. La densidad de células con ICOS se determinó en cada uno de los tumores humanos, y la densidad media de ICOS de cada tipo de tumor se grafica en el eje Y [NSCLC (N=100); HNSCC (N=102); cáncer de mama, todos los subtipos principales (N=94); subtipo triple negativo de cáncer de mama, TNBC (N=95); cáncer de ovario (N=94)]. El análisis estadístico se realizó mediante el uso de ANOVA.
- Figura 6. Diversidad de la densidad de células con ICOS en muestras de NSCLC. A) La densidad de la expresión de ICOS se evaluó en un panel de muestras de tumores pulmonares (N=98) y los tumores se clasificaron sobre la base de la densidad de células positivas ICOS+ / mm². B) Diversidad de la expresión de ICOS en una segunda cohorte independiente de muestras clínicas de NSCLC (N=204).
- Figura 7. Distribución de la densidad de células con ICOS en diferentes subconjuntos de células T de cáncer humano. A) Imagen representativa que representa la tinción para ICOS en los distintos compartimentos de células T. Las flechas señalan células Treg ICOS+ FOXP3+ o células efectoras CD4 ICOS+ CD8-. B) La densidad de células con ICOS de tumores individuales se analizó en células Tregs CD4 positivas para FoxP3 o células T positivas para CD8 o células CD4 negativas para CD8 y negativas para FoxP3. Se representan la densidad media de ICOS y la desviación estándar de cada uno de estos tipos de tumor. [Cáncer de pulmón (N=100); HNSCC (N=102); Subtipo triple negativo de cáncer de mama, TNBC (N=95); Cáncer de ovario (N=94)].
- Figura 8A-B. Se observa una expresión elevada de ICOS en tumores NSCLC con alta expresión de PD-L1.

Mediante la utilización de la IHC múltiple para PD-L1/ICOS/PD-1 se evaluaron los niveles de ICOS y PD-L1 en un conjunto de adenocarcinoma de NSCLC (n=150). A) Imágenes representativas de un tumor con alto contenido de PD-L1 (panel izquierdo) o con bajo contenido de PD-L1 (panel derecho) teñidos para ICOS, PD-1 y PD-L1. B) Cuantificación de la densidad de células con ICOS en carcinoma de células escamosas (panel izquierdo) y adenocarcinoma (panel derecho) con alto contenido de PD-L1 (>5 % de las células son positivas para PD-L1) o bajo contenido de PD-L1 (<5 % de las células son positivas para PD-L1).

Figura 9A-C. El análisis de TIL de tumores humanos muestra la expresión de ICOS en células Treg y efectores CD4. A) Gráficas de contornos representativos de la expresión de PD-1 e ICOS en diferentes subconjuntos de células T de pacientes con HNSCC (N=4). B) Se muestra la frecuencia de las células positivas para ICOS solamente o las células dobles positivas para ICOS y PD-1 en el compartimento de células T (HNSCC N=4; NSCLC N=3; Ovario N=4). C) Comparación de los niveles de ICOS en células Treg CD4 y Tef CD4. Se grafica la intensidad de la tinción de ICOS según se mide por la Intensidad fluorescente media (MFI; o media geométrica de ICOS) en los subconjuntos de células T CD4 de muestras de tumores de pacientes.

Figura 10A-C. A) Se muestra el efecto de los anticuerpos anti-ICOS sobre la proliferación de células T CD4+ humanas primarias en un formato unido a la placa en presencia de anti-CD3 subóptimo. Se grafica el porcentaje de células divididas. B) Se muestra el efecto de los anticuerpos anti-ICOS sobre la proliferación de células T CD4+ humanas en formato soluble en presencia de PMA subóptimo. Se grafica el porcentaje de células divididas. C) Efecto del anticuerpo anti-ICOS 37A10S713-hlgG1 en la proliferación de células T CD4+ humanas primarias en un formato unido a la placa en presencia de anti-CD3 subóptimo.

Figura 11A-B. Se muestra la evaluación de anticuerpos anti-ICOS en un ensayo indicador de NF-Kb. Los gráficos muestran el porcentaje de células GFP+.

Figura 12. Se muestra la evaluación de anticuerpos anti-ICOS solubles en un ensayo con PBMC con estimulación con superantígeno (SEB). La lectura es la producción de IFN γ .

Figura 13. Los anticuerpos anti-ICOS se evaluaron para determinar el posible superagonismo en un ensayo de proliferación de células T humanas en ausencia de anti-CD3. La lectura en este ensayo es el porcentaje de proliferación.

Figura 14A-B. Evaluación de un anticuerpo anti-ICOS en un ensayo de fosfo-AKT (pAKT) en presencia o ausencia de un enlazador cruzado secundario. La lectura es el por ciento de células T CD4 que son positivas para pAKT. A) Resultados en ausencia de un enlazador cruzado secundario. B) Resultados en presencia de un enlazador cruzado secundario.

Figura 15A-B. Se evaluaron los anticuerpos anti-ICOS en el modelo de tumor singénico de fibrosarcoma Sa1/N. El crecimiento tumoral se grafica en el eje y. A) Las líneas discontinuas indican el crecimiento tumoral de ratones individuales; la línea continua indica la curva de crecimiento promedio para el grupo. Se indica la cantidad de ratones libres de tumor por grupo. B) Volumen tumoral promedio en cada grupo de tratamiento.

Figura 16. Los ratones sin tumor tratados previamente con anti-ICOS 7F12 se volvieron a retar con tumores Sa1/N. El crecimiento tumoral se graficó en el eje y.

Figura 17. Efecto del anticuerpo anti-ICOS de hámster 37A10 con Fc mG1 y mG2a sobre el crecimiento de tumores Sa1/N. Las líneas discontinuas indican el crecimiento tumoral individual de ratones individuales; la línea continua indica la curva promedio de crecimiento tumoral para el grupo. Se indica la cantidad de ratones libres de tumor por grupo.

Figura 18. Evaluación de anticuerpos anti-ICOS como agentes únicos o en combinación con anti-PDI en el modelo de tumor singénico CT26. Las líneas discontinuas indican ratones individuales; la línea continua indica la curva de crecimiento promedio para el grupo. Se indica la cantidad de ratones libres de tumor por grupo.

Figura 19. Agotamiento de células Treg FoxP3+ en tumores Sa1/N tras el tratamiento con anticuerpo anti-ICOS. Se muestra la frecuencia de células CD8, CD4 Tef, y Treg, en bazo y tumor, y la cantidad de células Treg por mg de tumor. Cada forma indica un ratón individual.

Figura 20. Agotamiento de células Treg y activación de células Tef en tumores Sa1/N tras el tratamiento con anticuerpo anti-ICOS. Fila superior: Frecuencia de células CD8, Tef CD4 y Treg, relación de CD8 a Treg y frecuencia de células T CD8 PD-1+ en los tumores. Fila inferior: Frecuencia de las células Ki-67+ CD8 y CD4 Tef en división, y células Tef CD4 Tbet+ entre las células CD3+ en los tumores. Cada forma indica un ratón individual.

Figura 21. Evaluación de un anticuerpo anti-ICOS en el modelo tumoral Sa1/N después del agotamiento de las células T. Se grafica el crecimiento tumoral en el tiempo. Se indica la cantidad de ratones libres de tumor.

Figura 22A-B. A) Reducción de las células Tregs en un ensayo con PBMC tras el tratamiento con un anticuerpo anti-ICOS humanizado. B) Las células Treg y Tef expresan niveles similares de ICOS después de cinco días de tratamiento con IL-2.

Figura 23. Nuevo reto tumoral después del tratamiento con anticuerpo anti-ICOS. El panel izquierdo muestra el volumen tumoral en los ratones después de la administración de una o dos dosis de anticuerpo anti-ICOS. El panel derecho muestra el volumen tumoral en ratones control o ratones que estaban libres de tumor después de la administración del anticuerpo anti-ICOS, después del nuevo reto tumoral.

Figura 24A-B. Aumento en la expresión de ICOSL en ratones que portan tumor Sa1/N (A) y monos cangrejeros (B) administrados con anticuerpo anti-ICOS.

Figura 25. Cambio en la expresión de quimiocinas y citocinas de Th-1 después del tratamiento del tejido tumoral pulmonar con anticuerpo anti-ICOS (paneles derechos) o anticuerpo anti-PD-1 (paneles izquierdos), a las 6 horas (paneles superiores) o 24 horas (paneles inferiores).

Figura 26. Niveles del ligando de Nkp46 en células Tef (A, C, E) y células Treg (B, D, F) de tres donantes diferentes, después del tratamiento con anticuerpos agonistas y antagonistas anti-ICOS.

Figura 27. Pérdida de CD16 (disminución de CD16) en células NK tratadas con anticuerpo agonista anti-ICOS.

Descripción detallada de algunas modalidades

5 Se proporcionan anticuerpos que se unen a ICOS. Se proporcionan, además, cadenas pesadas y cadenas ligeras de un anticuerpo, capaces de formar anticuerpos que se unen a ICOS. Además, se proporcionan anticuerpos, cadenas pesadas y cadenas ligeras que comprenden una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) particulares. Se proporcionan polinucleótidos que codifican anticuerpos para ICOS. Se proporcionan, además, polinucleótidos que codifican cadenas pesadas o cadenas ligeras de un anticuerpo. Se proporcionan métodos para producir y/o purificar anticuerpos contra ICOS. Se proporcionan métodos de tratamiento con anticuerpos contra ICOS. Tales métodos incluyen, pero sin limitarse a, métodos para tratar el cáncer. Se proporcionan métodos para detectar ICOS. Dichos métodos incluyen métodos para identificar a un individuo que puede beneficiarse del tratamiento con un anticuerpo anti-ICOS, para monitorear el tratamiento de un individuo con un anticuerpo anti-ICOS y para mejorar la eficacia terapéutica de un anticuerpo anti-ICOS en un individuo.

15 Los títulos de las secciones que se usan en el presente documento son solamente para propósitos organizativos y no deben interpretarse como limitantes de la materia descrita.

20 Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en la presente descripción generalmente se conocen bien y comúnmente se emplean con el uso de metodología convencional por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ra. edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F. M. Ausubel, y otros, eds., (2003)); la serie *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A PRACTICAL APPROACH* (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, y *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 y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, y D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis y otros, eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan y otros, eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway y 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 y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V. T. Devita y otros, eds., J.B. Lippincott Company, 1993); y versiones actualizadas.

40 I. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente descripción tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos en la técnica. Además, a menos que se requiera de cualquier otra manera por contexto o se indique expresamente, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. Para cualquier conflicto en las definiciones entre varias fuentes o referencias, prevalecerá la definición proporcionada en la presente descripción.

50 Se entiende que las modalidades de la invención descritas en este documento incluyen modalidades "que consisten en" y/o "que consisten esencialmente en". Como se usa en la presente descripción, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que se indique de cualquier otra manera. El uso del término "o" en la presente no pretende implicar que las alternativas sean mutuamente excluyentes.

55 En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique expresamente o se comprenda por un experto en la técnica. En el contexto de una reivindicación dependiente múltiple, el uso de "o" se refiere a más de una reivindicación independiente o dependiente anterior.

60 Como entiende un experto en la técnica, la referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en la presente descripción incluye (y describe) modalidades que se dirigen a ese valor o parámetro per se. Por ejemplo, la descripción con referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

Los términos "molécula de ácido nucleico", "ácido nucleico" y "polinucleótido" pueden usarse indistintamente, y referirse a un polímero de nucleótidos. Tales polímeros de nucleótidos pueden contener nucleótidos naturales y/o no naturales e incluyen, entre otros, ADN, ARN y PNA. "Secuencia de ácido nucleico" se refiere a la secuencia lineal de nucleótidos que comprende la molécula de ácido nucleico o polinucleótido.

65 Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de

aminoácidos, y no se limitan a una longitud mínima. Tales polímeros de residuos de aminoácidos pueden contener residuos de aminoácidos naturales o no naturales, e incluyen, pero no se limitan a, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros y multímeros de residuos de aminoácidos. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de estas se abarcan en la definición. Los términos incluyen además modificaciones después de la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación, y similares. Además, para los propósitos de la presente descripción, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), a la secuencia nativa, siempre y cuando la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida a un sitio, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones de hospederos que producen las proteínas o errores debido a la amplificación por PCR.

"ICOS" y "coestimulador inducible de células T" como se usa en la presente descripción se refieren a cualquier ICOS nativo que resulta de la expresión y el procesamiento de ICOS en una célula. El término incluye ICOS de cualquier fuente de vertebrado, que incluye mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos y monos cangrejeros) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de cualquier otra manera. El término incluye, además, variantes de origen natural de ICOS, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de una proteína precursora de ICOS humano ilustrativa, con secuencia señal (con secuencia señal, aminoácidos 1-20) se muestra en la SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de un ICOS humano maduro ilustrativo se muestra en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos de una proteína precursora de ICOS de ratón ilustrativa, con la secuencia señal (con secuencia señal, aminoácidos 1-20) se muestra en la SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos de un ICOS de ratón maduro ilustrativo se muestra en la SEQ ID NO: 4. La secuencia de aminoácidos de una proteína precursora de ICOS de rata ilustrativa, con la secuencia señal (con secuencia señal, aminoácidos 1-20) se muestra en la SEQ ID NO: 190. La secuencia de aminoácidos de un ICOS de rata maduro ilustrativo se muestra en la SEQ ID NO: 191. La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de proteína precursora de ICOS de mono cangrejero, con la secuencia señal (con secuencia señal, aminoácidos 1-20) se muestra en la SEQ ID NO: 5. La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de ICOS maduro de mono cangrejero se muestra en la SEQ ID NO: 6.

El término "se une específicamente" a un antígeno o epítipo es un término que se entiende bien en la técnica, y los métodos para determinar dicha unión específica también se conocen bien en la técnica. Se dice que una molécula presenta "unión específica" o "unión preferencial" si reacciona o se asocia con mayor frecuencia, con mayor rapidez, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular que su unión a otras células o sustancias. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferentemente" a un objetivo si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que su unión a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente o preferentemente a un epítipo de ICOS es un anticuerpo que se une a este epítipo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que su unión a otros epítipos de ICOS o epítipos que no son de ICOS. Al leer esta definición se entiende, además, que, por ejemplo, un anticuerpo (o porción o epítipo) que se une específica o preferentemente a un primer objetivo puede o no unirse específica o preferentemente a un segundo objetivo. Como tal, una "unión específica" o "unión preferencial" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) una unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a la unión se refiere a una unión preferencial. "Especificidad" se refiere a la capacidad de una proteína de unión para unirse selectivamente a un antígeno.

Como se usa en la presente descripción, "esencialmente puro" se refiere a un material que es al menos 50 % puro (es decir, libre de contaminantes), con mayor preferencia, al menos 90 % puro, con mayor preferencia, al menos 95 % puro, aún con mayor preferencia, al menos 98 % puro, y con la máxima preferencia, al menos 99 % puro.

Como se usa en la presente, el término "epítipo" se refiere a un sitio en una molécula objetivo (por ejemplo, un antígeno, tal como una proteína, ácido nucleico, carbohidrato o lípido) al cual se une una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de soporte que contiene regiones de unión a anticuerpos). Los epítipos a menudo incluyen un grupo superficial químicamente activo de moléculas tales como aminoácidos, polipéptidos o cadenas laterales de azúcar y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas. Los epítipos pueden formarse a partir de residuos contiguos y/o yuxtapuestos no continuos (por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, azúcares, porción de lípido) de la molécula objetivo. Los epítipos formados a partir de residuos contiguos (por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, azúcares, porción de lípido) típicamente se retienen al exponerse a solventes desnaturizantes mientras que los epítipos formados por el plegamiento terciario típicamente se pierden en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo puede incluir, entre otros, al menos 3, al menos 5 u 8-10 residuos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos). En algunos ejemplos, un epítipo tiene menos de 20 residuos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos) de longitud, menos de 15 residuos o menos de 12 residuos. Dos anticuerpos pueden unirse al mismo epítipo dentro de un antígeno si muestran una unión competitiva por el antígeno. En algunas modalidades, un epítipo puede identificarse por una distancia mínima determinada a un residuo de CDR en la molécula de unión al antígeno. En algunas modalidades, un epítipo puede identificarse por la distancia anterior, y limitarse además a los residuos implicados en un enlace (por ejemplo, un enlace de hidrógeno) entre un residuo del anticuerpo y un residuo del antígeno. Un epítipo puede identificarse mediante diversos barridos, por ejemplo, un barrido de alanina o arginina puede indicar uno o más residuos con los que la molécula de unión al antígeno puede interactuar. A menos que se

indique explícitamente, un conjunto de residuos como un epítipo no excluye que otros residuos sean parte del epítipo para un anticuerpo particular. Más bien, la presencia de tal conjunto designa una serie mínima (o conjunto de especies) de epítipos. Por lo tanto, en algunas modalidades, un conjunto de residuos identificados como un epítipo designa un epítipo mínimo de relevancia para el antígeno, en lugar de una lista exclusiva de residuos para un epítipo en un antígeno.

Un "epítipo no lineal" o "epítipo conformacional" comprende polipéptidos, aminoácidos y/o azúcares no contiguos dentro de la proteína antigénica a la que se une un anticuerpo específico para el epítipo. En algunas modalidades, al menos uno de los residuos será no contiguo con los otros residuos señalados del epítipo; sin embargo, uno o más residuos pueden ser también contiguos con los otros residuos.

Un "epítipo lineal" comprende polipéptidos, aminoácidos y/o azúcares contiguos dentro de la proteína antigénica a la que se une un anticuerpo específico para el epítipo. Se observa que, en algunas modalidades, no todos los residuos dentro de los epítipos lineales necesitan unirse directamente (o estar implicados en un enlace) con el anticuerpo. En algunas modalidades, los epítipos lineales pueden ser de inmunizaciones con un péptido que consistió de manera eficaz en la secuencia del epítipo lineal, o de secciones estructurales de una proteína que están relativamente aisladas del resto de la proteína (de manera que el anticuerpo puede interactuar, al menos principalmente), con esa sección de secuencia.

El término "anticuerpo" en la presente descripción se usa en el sentido más amplio y abarca varias estructuras de anticuerpos, que incluyen pero no se limitan a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos (como anticuerpos acopladores de células T biespecíficos) y triespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que exhiban la actividad deseada de unión al antígeno.

El término anticuerpo incluye, pero sin limitarse a, fragmentos que son capaces de unirse a un antígeno, tal como Fv, Fv de cadena simple (scFv), Fab, Fab', di-scFv, sdAb (anticuerpo de dominio único) y (Fab')₂ (que incluye un F(ab')₂ unido químicamente). La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación al antígeno y aún es capaz de unirse de manera cruzada al antígeno. El término anticuerpo incluye, además, pero sin limitarse a, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos de diversas especies tales como ratón, ser humano, monos cangrejeros, etc. Además, para todas las construcciones de anticuerpo proporcionadas en la presente descripción, se contemplan además variantes que tienen las secuencias de otros organismos. Por lo tanto, si se describe una versión humana de un anticuerpo, un experto en la técnica apreciará cómo transformar el anticuerpo basado en la secuencia humana en una secuencia de ratón, rata, gato, perro, caballo, etc. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, además, cualquier orientación de scFv de cadena simple, di-scFv en tándem, diacuerpos, tri-sdcFv en tándem, minicuerpos, etc. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, además, nanocuerpos (sdAb, un anticuerpo que tiene un dominio monomérico único, tal como un par de dominios variables de cadenas pesadas, sin una cadena ligera). Un fragmento de anticuerpo puede denominarse como específico de una especie en algunas modalidades (por ejemplo, scFv humano o un scFv de ratón). Esto denota las secuencias de al menos parte de las regiones que no son CDR, en lugar de la fuente de la construcción.

El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. Por lo tanto, una muestra de anticuerpos monoclonales puede unirse al mismo epítipo en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse por el método de hibridomas descrito primero por Kohler y Milstein, 1975, Nature 256:495, o pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante tales como los descritos en la patente de Estados Unidos Núm. 4,816,567. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse, además, a partir de genotecas de fagos generadas mediante el uso de las técnicas descritas en McCafferty y otros, 1990, Nature 348:552-554, por ejemplo.

El término "CDR" denota una región determinante de la complementariedad como se define por al menos una manera de identificación para un experto en la técnica. En algunas modalidades, las CDR pueden definirse de acuerdo con cualquiera de los esquemas de numeración de Chothia, el esquema de numeración de Kabat, una combinación de Kabat y Chothia, la definición de AbM, la definición de contacto, y/o una combinación de las definiciones de Kabat, Chothia, AbM, y/o de contacto. Las CDR ilustrativas (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se producen en los residuos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3. (Kabat y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed. Public Health Service, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD (1991)). La definición de AbM puede incluir, por ejemplo, las CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) en los residuos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, H26-H35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3. La definición por contacto puede incluir, por ejemplo, las CDR (CDR-

L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) en los residuos de aminoácidos 30-36 de L1, 46-55 de L2, 89-96 de L3, 30-35 de H1, 47-58 de H2 y 93-101 de H3. La definición de Chothia puede incluir, por ejemplo, las CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) en los residuos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 26-32...34 de H1, 52-56 de H2 y 95-102 de H3. Las CDR pueden proporcionarse, además, como se muestra en cualquiera o más de las figuras acompañantes. Con la excepción de CDR1 en V_H , las CDR generalmente comprenden los residuos de aminoácidos que forman los lazos hipervariables. Las diversas CDR dentro de un anticuerpo pueden designarse por su número adecuado y tipo de cadena, que incluyen, sin limitarse a: a) CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3; b) CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 y CDRH3; c) LCDR-1, LCDR-2, LCDR-3, HCDR-1, HCDR-2 y HCDR-3; o d) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3; etc. El término "CDR" se usa en la presente descripción para abarcar además HVR o una "región hipervariable", que incluye lazos hipervariables. Los lazos hipervariables ilustrativos se producen en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

El término "región variable de cadena pesada" como se usa en la presente descripción se refiere a una región que comprende al menos tres CDR de cadena pesada. En algunas modalidades, la región variable de cadena pesada incluye las tres CDR y al menos FR2 y FR3. En algunas modalidades, la región variable de cadena pesada incluye al menos HCDR1 de cadena pesada, un marco (FR) 2, HCDR2, FR3 y HCDR3. En algunas modalidades, una región variable de cadena pesada comprende además al menos una porción de un FR1 y/o al menos una porción de un FR4.

El término "región constante de cadena pesada" como se usa en la presente descripción se refiere a una región que comprende al menos tres dominios constantes de cadena pesada, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Por supuesto, las deleciones y modificaciones dentro de los dominios que no alteran la función se incluyen dentro del alcance del término "región constante de cadena pesada", a menos que se designe de cualquier otra manera. Las regiones constantes de cadena pesada ilustrativas no limitantes incluyen γ , δ y α . Las regiones constantes de cadena pesada ilustrativas no limitantes incluyen, además, ϵ y m . Cada región constante pesada corresponde a un isotipo de anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo que comprende una región constante de γ es un anticuerpo IgG, un anticuerpo que comprende una región constante δ es un anticuerpo IgD, y un anticuerpo que comprende una región constante α es un anticuerpo IgA. Además, un anticuerpo que comprende una región constante m es un anticuerpo IgM, y un anticuerpo que comprende una región constante ϵ es un anticuerpo IgE. Determinados isotipos pueden subdividirse adicionalmente en subclases. Por ejemplo, los anticuerpos IgG incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos IgG1 (que comprenden una región constante de γ_1), IgG2 (que comprenden una región constante de γ_2), IgG3 (que comprenden una región constante γ_3), e IgG4 (que comprenden una región constante γ_4); los anticuerpos IgA incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos IgA1 (que comprenden una región constante γ_1) e IgA2 (que comprenden una región constante α_2); y los anticuerpos IgM incluyen, pero sin limitarse a, IgM1 e IgM2.

El término "cadena pesada" como se usa en la presente descripción se refiere a un polipéptido que comprende al menos una región variable de cadena pesada, con una secuencia líder o sin ella. En algunas modalidades, una cadena pesada comprende al menos una porción de una región constante de cadena pesada. El término "cadena pesada de longitud completa" como se usa en la presente descripción se refiere a un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada y una región constante de cadena pesada, con una secuencia líder o sin ella.

El término "región variable de cadena ligera" como se usa en la presente descripción se refiere a una región que comprende al menos tres CDR de cadena ligera. En algunas modalidades, la región variable de cadena ligera incluye las tres CDR y al menos FR2 y FR3. En algunas modalidades, la región variable de cadena ligera incluye al menos LCDR1 de cadena ligera, un marco (FR) 2, LCDR2, FR3 y LCDR3. Por ejemplo, una región variable de cadena ligera puede comprender CDR1 de cadena ligera, marco (FR) 2, CDR2, FR3 y CDR3. En algunas modalidades, una región variable de cadena ligera comprende, además, al menos una porción de un FR1 y/o al menos una porción de un FR4.

El término "región constante de cadena ligera" como se usa en la presente descripción se refiere a una región que comprende un dominio constante de cadena ligera, C_L . Las regiones constantes de cadena ligera ilustrativas no limitantes incluyen λ y κ . Por supuesto, las eliminaciones y modificaciones dentro de los dominios que no alteran la función se incluyen dentro del alcance del término "región constante de cadena ligera", a menos que se designe de cualquier otra manera.

El término "cadena ligera" como se usa en la presente descripción se refiere a un polipéptido que comprende al menos una región variable de cadena ligera, con una secuencia líder o sin ella. En algunas modalidades, una cadena ligera comprende al menos una porción de una región constante de cadena ligera. El término "cadena ligera de longitud completa" como se usa en la presente descripción se refiere a un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera, con una secuencia líder o sin ella.

Un "marco humano aceptor" para los propósitos en la presente descripción es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de un dominio variable de cadena ligera (V_L) o un marco de un dominio variable de cadena pesada (V_H) derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano, como se define a continuación. Un marco humano aceptor derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano puede comprender su misma secuencia de aminoácidos, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, la cantidad de cambios de aminoácidos es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos,

7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o menos. En algunas modalidades, el marco humano aceptor de V_L tiene una secuencia idéntica a la secuencia del marco de V_L de inmunoglobulina humana o una secuencia de marco consenso humano.

- 5 "Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (K_D). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica (tales como, por ejemplo, K_D por ELISA, KinExA, interferometría de biocapa (BLI) y/o dispositivos de resonancia de plasmones superficiales (como un dispositivo BIAcore®), que incluye los descritos en la presente descripción).

El término " K_D ", como se usa en la presente descripción, se refiere a la constante de disociación de equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno.

- 15 En algunas modalidades, la K_D , " K_d ", " Kd " o "valor de Kd " del anticuerpo se mide mediante el uso de ensayos de resonancia de plasmones superficiales usando un BIAcore®-2000 o BIAcore®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) a 25 °C con chips CM5 de antígenos inmovilizados en ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, los chips de biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) se activan con N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida clorhidrato (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de conformidad con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 mg/ml (~0,2 mM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 ml/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de la proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie del polipéptido, por ejemplo, anticuerpo de longitud completa, en PBS con tensioactivo TWEEN-20™ al 0,05 % (PBST) a 25 °C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 ml/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y las velocidades de disociación (k_{off}) se calculan mediante el uso de un modelo simple de unión de Langmuir de uno a uno (Software de evaluación BIAcore® versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo de los sensorgramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen y otros, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación excede $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmones superficiales anterior, entonces la velocidad de asociación puede determinarse mediante el uso de una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación=295 nm; emisión=340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno según se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro con parada de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

- 35 En algunas modalidades, la diferencia entre dichos dos valores (por ejemplo, los valores de K_d) es sustancialmente la misma, por ejemplo, menos de aproximadamente 50 %, menos de aproximadamente 40 %, menos de aproximadamente 30 %, menos de aproximadamente 20 % y/o menos de aproximadamente 10 % como una función del valor de referencia/comparación.

- 40 En algunas modalidades, la diferencia entre dichos dos valores (por ejemplo, los valores de K_d) es sustancialmente diferente, por ejemplo, mayor que aproximadamente 10 %, mayor que aproximadamente 20 %, mayor que aproximadamente 30 %, mayor que aproximadamente 40 % y/o mayor que aproximadamente 50 % en función del valor para la molécula de referencia/comparación.

- 45 "Resonancia de plasmones superficiales" denota un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensores, por ejemplo mediante el uso del sistema BIAcore™ (BIAcore International AB, una empresa de GE Healthcare, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.). Para obtener más descripciones, véase Jonsson y otros (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26.

- 50 "Interferometría de biocapa" se refiere a una técnica analítica óptica que analiza el patrón de interferencia de la luz reflejada desde una capa de proteína inmovilizada en una punta del biosensor y una capa de referencia interna. Los cambios en el número de moléculas unidas a la punta del biosensor provocan cambios en el patrón de interferencia que pueden medirse en tiempo real. Un dispositivo ilustrativo no limitante para la interferometría de biocapa es el sistema ForteBio Octet® RED96 (Pall Corporation). Véase, por ejemplo, Abdiche y otros, 2008, Anal. Biochem. 377: 209-277.

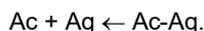
- 60 El término " k_{on} ", como se usa en la presente descripción, se refiere a la constante de velocidad para la asociación de un anticuerpo a un antígeno. Específicamente, las constantes de velocidad (k_{on} y k_{off}) y las constantes de disociación de equilibrio se miden mediante el uso de IgG (bivalentes) con antígeno ICOS monovalente. " K_{on} ", " k_{on} ", "constante de velocidad de asociación" o " k_a ", se usan indistintamente en la presente descripción. El valor indica la velocidad de unión de una proteína de unión a su antígeno objetivo o la velocidad de formación de complejos entre un anticuerpo y un antígeno, que se muestra por la ecuación:

65



El término " k_{off} ", como se usa en la presente descripción, se refiere a la constante de velocidad para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno. k_{off} también se denota como " K_{off} " o la "constante de velocidad de disociación".

- 5 Este valor indica la velocidad de disociación de un anticuerpo de su antígeno objetivo o la separación del complejo Ac-Ag en el tiempo para dar el anticuerpo y el antígeno libres como se muestra por la ecuación:



- 10 El término "actividad biológica" se refiere a cualquiera de una o más propiedades biológicas de una molécula (ya sea presentes de manera natural como se encuentra *in vivo*, o proporcionadas o habilitadas por medios recombinantes). Las propiedades biológicas incluyen, pero no se limitan a, unión a un receptor, inducción de la proliferación celular, inhibición del crecimiento celular, inducción de otras citocinas, inducción de apoptosis y actividad enzimática. En algunas modalidades, la actividad biológica de una proteína ICOS incluye, por ejemplo, la coestimulación de la proliferación de células T y la secreción de citocinas asociadas con células Th1 y Th2; la modulación de células Treg; los efectos sobre la diferenciación de las células T que incluyen la modulación de la expresión génica de factores de transcripción; la inducción de la señalización a través de las vías PI3K y AKT; y la mediación de ADCC.

- 20 Un anticuerpo "con maduración de la afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más CDR en comparación con un anticuerpo original que no posee tales alteraciones, dichas alteraciones resultan en una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

- 25 Un "anticuerpo quimérico" como se usa en la presente descripción se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particulares, mientras que al menos una parte del resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferentes. En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico se refiere a un anticuerpo que comprende al menos una región variable de una primera especie (tal como ratón, rata, macaco cangrejero, *etc.*) y al menos una región constante de una segunda especie (tal como un ser humano, mono cangrejero, *etc.*). En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico comprende al menos una región variable de ratón y al menos una región constante humana. En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico comprende al menos una región variable de mono cangrejero y al menos una región constante humana. En algunas modalidades, todas las regiones variables de un anticuerpo quimérico son de una primera especie y todas las regiones constantes del anticuerpo quimérico son de una segunda especie. La construcción quimérica también puede ser un fragmento funcional, como se señaló anteriormente.

- 35 Un "anticuerpo humanizado" como se usa en la presente descripción se refiere a un anticuerpo en el que al menos un aminoácido en una región marco de una región variable no humana se ha sustituido con el aminoácido correspondiente de una región variable humana. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado comprende al menos una región constante humana o fragmento de esta. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado es un fragmento de anticuerpo, tal como Fab, un scFv, un $(\text{Fab}')_2$, *etc.* El término humanizado denota, además, formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de estos (tales como Fv, Fab, Fab', $\text{F}(\text{ab}')_2$ u otras subsecuencias de unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados pueden incluir inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región del marco Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o marco importadas, pero se incluyen para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado puede comprender, además, al menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente el de una inmunoglobulina humana. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2 y/o CDR H3) que se alteran con respecto al anticuerpo original, que se denomina además una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo original. Como se apreciará, una secuencia humanizada puede identificarse por su secuencia primaria y no necesariamente denota el proceso mediante el cual se creó el anticuerpo.

- 60 Un "anticuerpo injertado con CDR" como se usa en la presente descripción se refiere a un anticuerpo humanizado en el que una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una primera especie (no humana) se han injertado en las regiones del marco (FR) de una segunda especie (humana).

- 65 Un "anticuerpo humano" como se usa en la presente descripción, abarca anticuerpos producidos en seres humanos, anticuerpos producidos en animales no humanos que comprenden genes de inmunoglobulinas humanas, tales como ratones Xenomouse® y anticuerpos seleccionados mediante el uso de métodos *in vitro*, tales como la presentación

en fagos (Vaughan y otros, 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets y otros, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks y otros, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581), en donde el repertorio de anticuerpos se basa en una secuencia de inmunoglobulina humana. El término "anticuerpo humano" denota el género de secuencias que son secuencias humanas. Por lo tanto, el término no designa el proceso mediante el cual se creó el anticuerpo, sino el género de las secuencias que son de interés.

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" ilustrativas incluyen la unión al receptor de Fc; unión de C1q; CDC; ADCC; fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. Tales funciones efectoras requieren generalmente que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y puede evaluarse mediante el uso de varios ensayos.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se encuentra en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos A y diferentes de A); una región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; una región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y una región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa así como sus variantes de origen natural.

Una "variante de la región Fc" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa debido a al menos una modificación de aminoácidos. En algunas modalidades, una "variante de la región Fc" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa debido a al menos una modificación de aminoácidos, aunque mantiene al menos una función efectora de la región Fc de secuencia nativa. En algunas modalidades, la variante de la región Fc tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido original, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente, de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido original. En algunas modalidades, la variante de la región Fc en la presente descripción poseerá al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido original, al menos aproximadamente 90 % de identidad de secuencia con ella, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con ella.

"Receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas modalidades, un Fc γ R es un FcR humano nativo. En algunas modalidades, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, que incluyen variantes alélicas y formas de empalmes alternativos de esos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un "receptor activador") y Fc γ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador Fc γ RIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina del inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático (ver, por ejemplo, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel y otros, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas y otros, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluidos los que se identificarán en el futuro, se incluyen en el término "FcR" en la presente.

El término "receptor de Fc" o "FcR" incluye además el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y otros, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim y otros, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) y la regulación de la homeostasis de las inmunoglobulinas. Los métodos para medir la unión a FcRn se conocen (ver, por ejemplo, Ghetie y Ward., *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie y otros, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton y otros, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); documento WO 2004/92219 (Hinton y otros).

Las "funciones efectoras" se refieren a actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: Unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y activación de células B.

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En algunas modalidades, las células expresan al menos Fc γ RIII y realizan la(s) función(es) efectora(s) de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente natural, por ejemplo, de sangre.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que una Ig secretada se une a receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células NK, neutrófilos y macrófagos) lo que permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula objetivo portadora de antígenos y posteriormente matan a la célula objetivo con citotoxinas. Las células

primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan únicamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede llevarse a cabo un ensayo de ADCC in vitro, tal como el descrito en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,500,362 o 5,821,337 o la patente de Estados Unidos núm. 6,737,056 (Presta). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células PBMC y NK. Alternativa o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes y otros *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998). Las variantes polipeptídicas adicionales con secuencias de aminoácidos alteradas de la región Fc (polipéptidos con una variante de la región Fc) y la actividad de ADCC aumentada o disminuida se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 7,923,538 y la patente de Estados Unidos núm. 7,994,290.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula objetivo en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada), que se unen a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y otros, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Las variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos alteradas de la región Fc (polipéptidos con una variante de la región Fc) y la capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 6,194,551 B1, la patente de Estados Unidos núm. 7,923,538, la patente de Estados Unidos núm. 7,994,290 y el documento WO 1999/51642. Véase además, por ejemplo, Idusogie y otros, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Una variante del polipéptido con alteración de la afinidad de unión a FcR o de la actividad ADCC es aquella que tiene aumento o disminución de la actividad de unión a FcR y/o actividad de ADCC en comparación con un polipéptido original o con un polipéptido que comprende una región Fc de secuencia nativa. La variante del polipéptido que "muestra una mayor unión" a un FcR se une a al menos un FcR con mejor afinidad que el polipéptido original. La variante del polipéptido que "muestra una reducción de la unión" a un FcR, se une al menos a un FcR con menor afinidad que un polipéptido original. Tales variantes que muestran disminución de la unión a un FcR pueden poseer poca o ninguna unión apreciable a un FcR, por ejemplo, 0-20 % de unión al FcR en comparación con una región Fc de IgG de secuencia nativa.

La variante del polipéptido que "media la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) en presencia de células efectoras humanas de manera más eficaz" que un anticuerpo original es aquella que in vitro o in vivo es más eficaz en la mediación de ADCC, cuando las cantidades de la variante del polipéptido y el anticuerpo original usados en el ensayo son esencialmente iguales. Generalmente, tales variantes se identificarán mediante el uso del ensayo de ADCC in vitro como se describe en el presente documento, pero se contemplan otros ensayos o métodos para determinar la actividad de ADCC, por ejemplo en un modelo animal *etc.*

El término "sustancialmente similar" o "sustancialmente el mismo", como se usa en la presente descripción, denota un grado de similitud suficientemente alto entre dos o más valores numéricos de manera que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos o más valores es de poca o ninguna significación biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dicho valor. En algunas modalidades los dos o más valores sustancialmente similares difieren en no más de cualquiera de aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % o 50 %.

La frase "sustancialmente diferente" como se usa en la presente descripción, denota un grado de diferencia suficientemente alto entre dos valores numéricos de manera que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores es de significación estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores. En algunas modalidades, los dos valores numéricos sustancialmente diferentes difieren en más de aproximadamente cualquiera de 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %.

La frase "sustancialmente reducida", como se usa en la presente descripción, denota un grado suficientemente alto de reducción entre un valor numérico y un valor numérico de referencia de manera que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores es de significación estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores. En algunas modalidades, los valores numéricos sustancialmente reducidos están reducidos por más de cualquiera de aproximadamente 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % comparado con el valor de referencia.

El término "secuencia líder" se refiere a una secuencia de residuos de aminoácidos localizados en el extremo N-terminal de un polipéptido que facilita la secreción de un polipéptido de una célula de mamífero. Una secuencia líder puede escindirse tras la exportación del polipéptido de la célula de mamífero, para formar una proteína madura. Las secuencias líderes pueden ser naturales o sintéticas, y pueden ser heterólogas u homólogas a la proteína a la que están unidas.

Un polipéptido de "secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la

5 secuencia de aminoácidos de un polipéptido de origen natural de cualquier mamífero. Dicho polipéptido de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse mediante medios recombinantes o sintéticos. El término polipéptido de "secuencia nativa" abarca específicamente las formas truncadas o secretadas de origen natural del polipéptido (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas de variantes de origen natural (por ejemplo, formas empalmadas alternativamente) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido.

10 Una "variante" de polipéptido se refiere a un polipéptido biológicamente activo que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Tales variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en donde se añaden o se eliminan uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N o C terminal del polipéptido. En algunas modalidades, una variante tendrá al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, una variante tendrá al menos aproximadamente 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, una variante tendrá al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa.

20 Como se usa en la presente descripción, "Por ciento (%)" de identidad de secuencia de aminoácidos" y "homología" con respecto a una secuencia de péptido, polipéptido o anticuerpo se definen como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia peptídica o polipeptídica específica, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con fines de determinar el por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que se encuentran dentro de la técnica, por ejemplo, mediante el uso de software informático disponible públicamente tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, lo que incluye cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima sobre toda la longitud de las secuencias que se están comparando.

30 Una sustitución de aminoácidos puede incluir, entre otros, el reemplazo de un aminoácido en un polipéptido con otro aminoácido. En la Tabla 1 se muestran sustituciones ilustrativas. Las sustituciones de aminoácidos pueden introducirse en un anticuerpo de interés y los productos se analizan para determinar una actividad deseada, por ejemplo, retención/mejora de la unión al antígeno, menor inmunogenicidad o mejor ADCC o CDC.

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones ilustrativas
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; Norleucina
Leu (L)	Norleucina; 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

(continuación)

Residuo original	Sustituciones ilustrativas
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con las propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases para otra clase.

El término "vector" se usa para describir un polinucleótido que puede modificarse genéticamente para contener un polinucleótido o polinucleótidos clonados que pueden propagarse en una célula huésped. Un vector puede incluir uno o más de los siguientes elementos: un origen de replicación, una o más secuencias reguladoras (como, por ejemplo, promotores y/o potenciadores) que regulan la expresión del polipéptido de interés, y/o uno o más genes marcadores de selección (como, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos y genes que pueden usarse en ensayos colorimétricos, por ejemplo, β -galactosidas). El término "vector de expresión" se refiere a un vector que se usa para expresar un polipéptido de interés en una célula huésped.

Una "célula huésped" se refiere a una célula que puede ser o ha sido un receptor de un vector o polinucleótido aislado. Las células huésped pueden ser células procariotas o células eucariotas. Las células eucariotas ilustrativas incluyen células de mamífero, como células animales de primate o no; células fúngicas, como de levadura; células vegetales; y células de insectos. Las células de mamíferos ilustrativas no limitantes incluyen, pero sin limitarse a, células NSO, células PER.C6@ (Crucell) y células 293 y CHO y sus derivados, tales como células 293-6E y DG44, respectivamente. Las células huésped incluyen la progenie de una célula huésped única, y la progenie puede no necesariamente ser completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula original debido a una mutación natural, accidental o intencional. Una célula huésped incluye células transfectadas in vivo con polinucleótido(s) proporcionado(s) en la presente descripción.

El término "aislado" como se usa en la presente descripción se refiere a una molécula que se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que típicamente se encuentra en la naturaleza o se produce. Por ejemplo, se hace referencia a un polipéptido como "aislado" cuando se separa de al menos algunos de los componentes de la célula en la que se produjo. Cuando un polipéptido es secretado por una célula después de su expresión, separar físicamente el sobrenadante que contiene el polipéptido de la célula que lo produjo se considera que es "aislar" el polipéptido. De manera similar, se refiere a un polinucleótido como "aislado" cuando no es parte del polinucleótido más grande (tal como, por ejemplo, ADN genómico o ADN mitocondrial, en el caso de un polinucleótido de ADN) en el que típicamente se encuentra en la naturaleza, o se separa de al menos algunos de los componentes de la célula en la que se produjo, por ejemplo, en el caso de un polinucleótido de ARN. Por lo tanto, un polinucleótido de ADN que está contenido en un vector dentro de una célula huésped puede denominarse "aislado".

Los términos "individuo" o "sujeto" se usan indistintamente en la presente para referirse a un animal; por ejemplo un mamífero. En algunas modalidades, se proporcionan métodos para tratar mamíferos, que incluyen, pero sin limitarse a, seres humanos, roedores, simios, felinos, caninos, equinos, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, animales mamíferos de laboratorio, animales mamíferos de granja, animales mamíferos deportivos y mascotas mamíferos. En algunos ejemplos, un "individuo" o "sujeto" se refiere a un individuo o sujeto que necesita tratamiento para una enfermedad o trastorno. En algunas modalidades, el sujeto que recibe el tratamiento puede ser un paciente, que designa el hecho de que el sujeto se ha identificado que tiene un trastorno de relevancia para el tratamiento, o que tiene un riesgo adecuado de contraer el trastorno.

Una "enfermedad" o "trastorno" como se usa en la presente descripción se refiere a una afección donde se necesita y/o se desea un tratamiento.

"Cáncer" y "tumor," como se usan en la presente descripción, son términos intercambiables que se refieren a cualquier

crecimiento o proliferación anormal de células o tejidos en un animal. Como se usa en la presente descripción, los términos "cáncer" y "tumor" abarcan cánceres sólidos y hematológicos/linfáticos y también abarcan un crecimiento maligno, premaligno y benigno, como la displasia. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos no limitantes más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de la hipófisis, cáncer esofágico, astrocitoma, sarcoma de tejido blando, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma uterino o endometrial, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer de encéfalo, cáncer de endometrio, cáncer de testículo, colangiocarcinoma, carcinoma de vesícula biliar, cáncer gástrico, melanoma, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Como se usa en la presente descripción, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. "Tratamiento" como se usa en la presente descripción, cubre cualquier administración o aplicación de un producto terapéutico para la enfermedad en un mamífero, que incluye un ser humano. Para los fines de esta descripción, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de: alivio de uno o más síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, prevención o retraso de la propagación (por ejemplo, metástasis, por ejemplo, metástasis en el pulmón o en el ganglio linfático) de la enfermedad, prevención o retraso de la recurrencia de la enfermedad, retraso o ralentización del avance de la enfermedad, mejora del estado de la enfermedad, inhibición de la enfermedad o la progresión de la enfermedad, inhibición o ralentización de la enfermedad o su progresión, detención de su desarrollo, y remisión (ya sea parcial o total). El término "tratamiento" también abarca una reducción de la consecuencia patológica de una enfermedad proliferativa. Los métodos proporcionados en la presente descripción contemplan uno o más de estos aspectos del tratamiento. En línea con lo anterior, el término tratamiento no requiere cien por ciento de eliminación de todos los aspectos del trastorno.

"Mejorar" significa una reducción o mejora de uno o más síntomas en comparación con no administrar un anticuerpo anti-ICOS. La "mejora" incluye además acortamiento o reducción de la duración de un síntoma.

En el contexto de cáncer, el término "tratar" incluye cualquiera o todos los siguientes: inhibir el crecimiento de células cancerosas, inhibir la replicación de células cancerosas, disminuir la carga tumoral total y mejorar uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

El término "muestra biológica" significa una cantidad de una sustancia de un organismo vivo o que estuvo vivo. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, (por ejemplo, sangre completa), plasma, suero, orina, líquido amniótico, líquido sinovial, células endoteliales, leucocitos, monocitos, otras células, órganos, tejidos, médula ósea, ganglios linfáticos y bazo.

Una muestra que tiene un "nivel elevado de ICOS" o "que expresa ICOS a un nivel elevado" o es "ICOS^{ALTO}" significa que el nivel de ICOS es tal que un experto en la técnica concluiría que el cáncer puede tratarse con una terapia anti-ICOS, como un anticuerpo proporcionado en la presente descripción. En algunas modalidades, un "nivel elevado de ICOS" es uno en el que 1 % de las células dentro de una muestra de tumor muestra tinción para ICOS. En algunas modalidades, un "alto nivel" con respecto a ICOS es una tinción de 1 % o más, por ejemplo, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % de las células dentro de la muestra tumoral que muestran tinción. En algunas modalidades, los niveles de ICOS pueden medirse mediante IHC cromogénica o IHC de inmunofluorescencia (puntuación Aqua).

Una muestra que "expresa ICOS" o tiene "tinción positiva para ICOS" o es "ICOS positiva" significa que 1 % o más de las células en una muestra muestran tinción para ICOS. En algunas modalidades, una muestra que es positiva para ICOS presenta al menos una tinción celular débil, moderada y/o fuerte (sobre la base de la expresión de ICOS en la membrana). Una muestra con tinción de células moderada o fuerte para ICOS también se considera que es "ICOS^{ALTO}".

Una muestra que tiene un "nivel bajo de PD-L1" o expresa "PD-L1 a un nivel bajo" o es "PD-L1^{BAJO}" significa que el nivel de PD-L1 está por debajo del nivel umbral de expresión para un cáncer al que normalmente se indica un tratamiento con una terapia de PD-1. En algunas modalidades, un "bajo nivel de PD-L1" es uno en el que menos del 5 % de las células en el tumor muestran tinción de membrana para PD-L1. En algunas modalidades, un "nivel bajo" con respecto a PD-L1 es menos de 5 % de tinción, por ejemplo, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o 0 % de las células del tumor que muestran tinción. En algunas modalidades, los niveles de PD-L1 pueden medirse mediante IHC cromogénica o IHC de inmunofluorescencia (puntuación Aqua). Una muestra que no expresa PD-L1 detectable también puede decirse "que expresa un nivel bajo de PD-L1". Por lo tanto, el término "bajo" abarca cuando no hay PD-L1 detectable.

Una muestra que tiene un "nivel elevado de PD-L1" o "expresa PD-L1 a un nivel elevado" o es "PD-L1^{ALTO}" significa que el nivel de PD-L1 es tal que un experto en la técnica concluiría que el cáncer puede tratarse con una terapia de PD-1. En algunas modalidades, un "nivel elevado de PD-L1" es uno en el que 5 % de las células en el tumor o más tienen tinción de membrana de PD-L1. En algunas modalidades, un "alto nivel" con respecto a PD-L1 es 5 % o más de tinción, por ejemplo, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % de las células del tumor que muestran tinción. En

algunas modalidades, los niveles de PD-L1 pueden medirse mediante IHC cromogénica o IHC de inmunofluorescencia (puntuación Aqua).

5 Una muestra que "expresa PD-L1" o tiene "tinción positiva para PD-L1" o es "positiva para PD-L1" significa que el 1 % o más de las células tienen tinción de membrana para PD-L1. En algunas modalidades, una muestra que es positiva para PD-L1 presenta al menos una tinción celular débil, moderada y/o fuerte (sobre la base de la expresión en membrana de PD-L1). Una muestra con tinción de células moderada o fuerte para PD-L1 también se considera que es "PD-L1^{ALTO}".

10 Una muestra que "carece de expresión de PD-L1" o tiene "tinción negativa para PD-L1" o es "negativa para PD-L1" significa que la expresión de PD-L1 en la superficie de las células de la muestra es indetectable por IHC, tal como IHC cromogénica o IHC de inmunofluorescencia (puntuación Aqua). Una muestra negativa para PD-L1 también se considera que es "PD-L1^{BAJO}".

15 En algunas modalidades, puede emplearse cualquier método para medir el nivel de PD-L1. En algunas modalidades, esto puede incluir usar la prueba de IHC para PD-L1 22C3 pharmDx (Dako Inc., Carpinteria, CA), que es una prueba clínicamente validada y aprobada por la FDA para la evaluación de la expresión de PD-L1 en el NSCLC. IHC para PD-L1 22C3 pharmDx es un ensayo inmunohistoquímico cualitativo que usa anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 de ratón, (clon 22C3), que puede usarse en la detección de la proteína PD-L1 en tejidos con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE). El ensayo puede llevarse a cabo en el sistema Autostainer Link 48 y visualizarse mediante el uso del sistema EnVision FLEX. La expresión de la proteína PD-L1 se califica mediante el uso de la Puntuación de Proporción del tumor (TPS), que es el porcentaje de células tumorales viables que muestran tinción de membrana parcial o completa. En algunas modalidades, la muestra se considera positiva para PD-L1 si TPS \geq 50 % de las células tumorales viables exhiben tinción de membrana en cualquier intensidad. IHC para PD-L1 22C3 pharmDx se indica como un auxiliar para identificar pacientes con NSCLC para el tratamiento con KEYTRUDA® (pembrolizumab). Los detalles adicionales del sistema de puntuación y la respuesta a pembrolizumab se describen en el artículo de Garon y otros (N Engl J Med 2015;372:2018-28). En algunas modalidades, las muestras de pacientes con NSCLC pueden considerarse positivas para la expresión de PD-L1 si la puntuación de proporción del tumor muestra que \geq 50 % de las células tumorales viables exhiben tinción de membrana (parcial o completa) con cualquier intensidad (es decir \geq 1+). En algunas modalidades, esto puede ser específico con respecto al clon de anticuerpo 22C3. En algunas modalidades, si TPS = 5 % a 50 % de las células tumorales viables exhiben tinción de membrana en cualquier intensidad, la muestra y/o el paciente se consideran positivos para PD-L1. En algunas modalidades, si TPS muestra que \geq 50 % de las células tumorales viables exhiben tinción de membrana en cualquier intensidad, la muestra y/o el paciente se consideran con PD-L1^{ALTO}.

35 El término "control" se refiere a una composición conocida por no contener un analito ("control negativo") o por contener un analito ("control positivo"). Un control positivo puede comprender una concentración conocida de un analito. "Control," "control positivo," y "calibrador" pueden usarse indistintamente en la presente descripción para referirse a una composición que comprende una concentración conocida de un analito. Un "control positivo" puede usarse para establecer características de desempeño del ensayo y es un indicador útil de la integridad de los reactivos (por ejemplo, los analitos).

45 "Valor de corte predeterminado" y "nivel predeterminado" se refieren generalmente a un valor de corte de un ensayo que se usa para evaluar los resultados de la eficacia diagnóstica/pronóstica/terapéutica mediante la comparación de los resultados del ensayo contra el valor de corte/nivel predeterminado, donde el valor de corte/nivel predeterminado ya se ha vinculado o asociado con diversos parámetros clínicos (por ejemplo, gravedad de la enfermedad, progresión/no progresión/mejora, etcétera). Si bien la presente descripción puede proporcionar niveles predeterminados ilustrativos, es bien conocido que los valores de corte pueden variar según la naturaleza del inmunoensayo (por ejemplo, anticuerpos empleados, etc.). Dentro de la habilidad de un experto en la técnica está, además, adaptar la descripción de este documento para otros inmunoensayos para obtener valores de corte específicos del inmunoensayo para esos otros inmunoensayos sobre la base de esta descripción. Si bien el valor preciso del valor de corte/nivel predeterminado puede variar entre ensayos, generalmente pueden aplicarse correlaciones como se describe en el presente documento (si existen).

55 Los términos "inhibición" o "inhibir" se refieren a una disminución o cese de cualquier característica fenotípica o a la disminución o cese en la incidencia, grado o probabilidad de esa característica. "Reducir" o "inhibir" es disminuir, reducir o detener una actividad, función, y/o cantidad en comparación con una referencia. En algunas modalidades, por "reducir" o "inhibir" se entiende la capacidad de provocar una disminución total de 20 % o más. En algunas modalidades, por "reducir" o "inhibir" se entiende la capacidad de provocar una disminución total de 50 % o más. En algunas modalidades, por "reducir" o "inhibir" se entiende la capacidad de provocar una disminución total de 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o más. En algunas modalidades, se inhibe o disminuye la cantidad indicada anteriormente durante un período de tiempo, con respecto a una dosis de control (tal como un placebo) durante el mismo período de tiempo. Una "referencia" como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier muestra, patrón o nivel que se usa con fines de comparación. Una referencia puede obtenerse de una muestra saludable y/o no patológica. En algunos ejemplos, una referencia puede obtenerse de una muestra no tratada. En algunos ejemplos, una referencia se obtiene de una muestra no patológica o no tratada de un sujeto individual. En algunos ejemplos, una referencia se obtiene de

uno o más individuos sanos que no son el sujeto o el paciente.

Como se usa en la presente, "retrasar el desarrollo de una enfermedad" significa diferir, dificultar, ralentizar, retardar, estabilizar, suprimir y/o aplazar el desarrollo de la enfermedad (tal como cáncer). Este retraso puede ser de largos períodos de tiempo, según la historia de la enfermedad y/o individuo que se trata. Tal como es evidente para un experto en la técnica, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, abarcar la prevención, donde el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, puede retrasarse un cáncer en etapa tardía, tal como el desarrollo de metástasis.

"Prevenir" como se usa en la presente descripción, incluye proporcionar profilaxis con respecto a la aparición o recurrencia de una enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero aún no ha sido diagnosticado con la enfermedad. A menos que se especifique lo contrario, los términos "reducir", "inhibir" o "prevenir" no indican ni requieren prevención completa en todo el tiempo.

Como se usa en la presente descripción, "suprimir" una función o actividad es reducir la función o actividad en comparación con cualquier otra condición similar excepto para una condición o parámetro de interés, o alternativamente, en comparación con otra condición. Por ejemplo, un anticuerpo que inhibe el crecimiento tumoral reduce la velocidad de crecimiento del tumor en comparación con la velocidad de crecimiento del tumor en ausencia del anticuerpo.

Una "cantidad con eficacia terapéutica" de una sustancia/molécula, agonista o antagonista puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula, agonista o antagonista de inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad con eficacia terapéutica también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula, agonista o antagonista se sopesa con los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una cantidad con eficacia terapéutica puede administrarse en una o más administraciones. Una cantidad con eficacia terapéutica se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico y/o profiláctico deseado.

Una "cantidad con eficacia profiláctica" se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de una etapa temprana de la enfermedad o en una etapa más temprana de esta, la cantidad con eficacia profiláctica será menor que la cantidad con eficacia terapéutica.

Los términos "formulación farmacéutica" y "composición farmacéutica" se refieren a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica del (de los) ingrediente(s) activo(s) sea eficaz, y que no contenga componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto a los que la formulación se administrará. Dichas formulaciones pueden ser estériles.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un sólido, semisólido, o relleno líquido, diluyente, material de encapsulación, auxiliar de la formulación, o portador no tóxicos, convencionales en la técnica, para su uso con un agente terapéutico, que juntos comprenden una "composición farmacéutica" para su administración a un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable no es tóxico para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación. El portador farmacéuticamente aceptable es adecuado para la formulación empleada.

Una formulación "estéril" es aséptica o está esencialmente libre de microorganismos vivos y sus esporas.

Una "terapia de PD-1" abarca cualquier terapia que module la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Las terapias de PD-1 pueden, por ejemplo, interactuar directamente con PD-1 y/o PD-L1. En algunas modalidades, una terapia de PD-1 incluye una molécula que se une directamente a y/o influye en la actividad de PD-1. En algunas modalidades, una terapia de PD-1 incluye una molécula que se une directamente a y/o influye en la actividad de PD-L1. Por lo tanto, un anticuerpo que se une a PD-1 o PD-L1 y bloquea la interacción de PD-1 a PD-L1 es un agente terapéutico de PD-1. Cuando se pretende un subtipo deseado de terapia de PD-1, se designará por la frase "específico para PD-1" para una terapia que implica una molécula que interactúa directamente con PD-1 o "específico para PD-L1" para una molécula que interactúa directamente con PD-L1, según sea apropiado. A menos que se designe de cualquier otra manera, toda la descripción contenida en este documento con respecto a la terapia de PD-1 se aplica en general a la terapia de PD-1, así como a terapias específicas de PD-1 y/o específicas de PD-L1. Los ejemplos no limitantes de terapias de PD-1 incluyen nivolumab (anticuerpo anti-PD-1; BMS-936558, MDX- 1106, ONO-4538; OPDIVO®; Bristol-Myers Squibb); pidilizumab (anticuerpo anti-PD-1, CureTech), pembrolizumab (anticuerpo anti-PD-1; KEYTRUDA®, MK-3475, lambrolizumab); durvalumab (anticuerpo anti-PD-L1, MEDI-4736; AstraZeneca/MedImmune); RG-7446; MSB-0010718C; AMP-224; BMS-936559 (un anticuerpo anti-PD-L1; Bristol-Myers Squibb); AMP-514; MDX-1105; ANB-011; anti-LAG-3/PD-1; Ac anti-PD-1 (CoStim); Ac anti-PD-1 (Kadmon Pharm.); Ac anti-PD-1 (Immunovo); Ac anti-TIM-3/PD-1 (AnaptysBio); Ac anti-PD-L1 (CoStim/Novartis); atezolizumab (un anticuerpo anti-PD-L1, Genentech/Roche); avelumab (un anticuerpo anti-PD-L1, MSB0010718C, Pfizer); KD-033, antagonista de PD-1 (Agenus); STI-A1010; STI-A1110; TSR-042; y otros anticuerpos dirigidos contra la proteína de muerte programada 1 (PD-1) o el ligando 1 de muerte programada (PD-L1).

El término "inhibidor de IDO" se refiere a un agente capaz de inhibir la actividad de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) e invertir de esta manera la inmunosupresión mediada por IDO. El inhibidor de IDO puede inhibir IDO1 y/o IDO2 (INDOL1). Un inhibidor de IDO puede ser un inhibidor de IDO reversible o irreversible. Un "inhibidor reversible de IDO" es un compuesto que inhibe de forma reversible la actividad enzimática IDO ya sea en el sitio catalítico o en un sitio no catalítico y un "inhibidor irreversible de IDO" es un compuesto que inhibe de forma irreversible la actividad enzimática IDO formando una unión covalente con la enzima. Los ejemplos no limitantes de inhibidores de IDO incluyen Indoximod (New Link Genetics), INCB024360 (Incyte Corp.), 1-metil-D triptofano (New Link Genetics) y GDC-0919 (Genentech).

Una "terapia de células T con receptor de antígeno quimérico" o "terapia CAR-T" se refiere a un agente terapéutico que comprende una célula T modificada genéticamente para expresar un receptor que reconoce un antígeno expresado por una célula tumoral. El antígeno puede ser un antígeno expresado específicamente por el tumor o un antígeno expresado tanto por células cancerosas como en tejido saludable. En algunas modalidades la terapia CAR-T es terapia CAR-T adoptiva, en la que se extraen células T del paciente y se modifican para expresar el receptor de antígeno quimérico, y después se regresan al paciente. Véase, *por ejemplo*, Dai y otros, 2016, J Natl Cancer Inst, 108 (7): djv439, doi: 10.1093/jnci/djv439; Gill y otros, 2015, Blood Rev, pii: S0268-960X(15)00080-6, doi: 10.1016/j.blre.2015.10.003; Gill y otros, 2015, Immunol Rev, 263(1):68-89. doi: 10.1111/imr.12243.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva o secuencial en cualquier orden.

El término "concurrentemente" se usa en la presente descripción para referirse a la administración de dos o más agentes terapéuticos, donde al menos parte de la administración coincide en el tiempo o donde la administración de un agente terapéutico cae dentro de un período corto de tiempo con relación a la administración del otro agente terapéutico. Por ejemplo, los dos o más agentes terapéuticos se administran con una separación de tiempo de no más que aproximadamente un número especificado de minutos.

El término "secuencialmente" se usa en la presente descripción para referirse a la administración de dos o más agentes terapéuticos donde la administración de uno o más agentes continúa después de interrumpir la administración de uno o más agentes, o en donde la administración de uno o más agentes comienza antes de la administración de uno o más de otros agentes. Por ejemplo, la administración de los dos o más agentes terapéuticos se administran con una separación de tiempo de más de aproximadamente un número especificado de minutos.

Como se usa en la presente descripción, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra modalidad de tratamiento. Como tal, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de la otra modalidad de tratamiento al individuo.

El término "prospecto" se usa para referirse a instrucciones incluidas habitualmente en paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre indicaciones, uso, dosificación, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de tales productos terapéuticos.

Un "artículo de fabricación" es cualquier fabricación (por ejemplo, un paquete o contenedor) o kit que comprende al menos un reactivo, por ejemplo, un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer), o una sonda para detectar específicamente un biomarcador descrito en el presente documento. En algunas modalidades, la fabricación o kit se promociona, distribuye o comercializa como una unidad para llevar a cabo los métodos descritos en la presente descripción.

Los términos "marcador" y "marcador detectable" significan una porción unida a un anticuerpo o a su analito para hacer que una reacción (por ejemplo, la unión) entre los miembros del par de unión específico, sea detectable. El miembro marcado del par de unión específico se denomina "marcado de manera detectable". Por lo tanto, el término "proteína de unión marcada" se refiere a una proteína con un marcador incorporado que proporciona la identificación de la proteína de unión. En algunas modalidades, el marcador es un marcador detectable que puede producir una señal que es detectable por medios visuales o instrumentales, por ejemplo, incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de restos de biotínulo que pueden detectarse por avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse por métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho o ^{153}Sm); cromógenos, marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos biotínulo; epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un reportero secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopos); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio. Los ejemplos representativos de marcadores comúnmente empleados para inmunoensayos incluyen restos que producen luz, por ejemplo, compuestos de acridinio, y restos que producen fluorescencia, por ejemplo, fluoresceína. En este sentido, el resto en sí puede no estar marcado de manera detectable pero puede volverse detectable tras la reacción con otro resto.

El término "conjugado" se refiere a un anticuerpo que se une químicamente a un segundo resto químico, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" incluye un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto obtenido a partir de materiales biológicos. En algunas modalidades, los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, pero sin limitarse a, toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracenodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y sus análogos u homólogos. Cuando se usa en el contexto de un inmunoensayo, el anticuerpo conjugado puede ser un anticuerpo marcado de manera detectable usado como el anticuerpo de detección.

II. Anticuerpos anti-ICOS

Se proporcionan anticuerpos novedosos dirigidos contra ICOS. Los anticuerpos anti-ICOS incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de ratón, anticuerpos humanos y anticuerpos que comprenden las CDR de cadena pesada y/o cadena ligera analizadas en la presente descripción. En algunos casos, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a ICOS. En algunos casos, se proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a ICOS. En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS es un anticuerpo agonista anti-ICOS. En algunos casos, la administración de los anticuerpos anti-ICOS descritos en la presente aumenta la cantidad de células Tef; activa las células Tef; agota las células Treg en un sujeto; y/o aumenta la relación de las células Tef con respecto a las células Treg. En algunos casos, las células Treg son células T CD4+ FoxP3+. En algunos casos, las células Tef son células T CD8+. En algunos casos, las células Tef son células T CD4+ FoxP3- y células T CD8+.

En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR que se seleccionan de (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR que se seleccionan de (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47.

En la invención, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67.

En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR que se seleccionan de (a) HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 22, 62, 72, 82, 92, 102 y 112; (b) HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 23, 63, 73, 83, 93, 103 y 113; (c) HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 24, 64, 74, 84, 94, 104 y 114; (d) LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 25, 65, 75, 85, 95, 105 y 115; (e) LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 26, 66, 76, 86, 96, 106 y 116; y (f) LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 27, 67, 77, 87, 97, 107 y 117.

En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR que se seleccionan de (a) HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 32, 162, 172 y 182; (b) HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 33, 163, 173 y 183; (c) HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 34, 164, 174 y 184; (d) LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 35, 165, 175 y 185; (e) LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 36, 166, 176 y 186; y (f) LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 37, 167, 177 y 187.

En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR que se seleccionan de (a) HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 52, 122, 132, 142 y 152; (b) HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 53, 123, 133, 143 y 153; (c) HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 54, 124, 134, 144 y 154; (d) LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 55, 125, 135, 145 y 155; (e) LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 56, 126,

136, 146 y 156; y (f) LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 57, 127, 137, 147 y 157.

5 En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera. En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS comprende al menos una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada y al menos una porción de una región constante de cadena pesada, y al menos una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera y al menos una porción de una región constante de cadena ligera. En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS comprende dos cadenas pesadas, en donde cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada y al menos una porción de una región constante de cadena pesada, y dos cadenas ligeras, en donde cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera y al menos una porción de una región constante de cadena ligera. Como se usa en la presente descripción, un Fv de cadena simple (scFv), o cualquier otro anticuerpo que comprenda, por ejemplo, una sola cadena polipeptídica que comprende las seis CDR (tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera) se considera que tiene una cadena pesada y una cadena ligera. En algunos casos, la cadena pesada es la región del anticuerpo anti-ICOS que comprende las tres CDR de cadena pesada. En algunos casos, la cadena ligera es la región del anticuerpo anti-ICOS que comprende las tres CDR de cadena ligera.

20 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

25 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27.

30 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37.

35 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47.

45 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57.

50 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 73; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 74; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77.

55 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 84; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 87.

60 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 92; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 93; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 96; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97.

65 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia

de aminoácidos de la SEQ ID NO: 102; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 103; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 104; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 105; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 106; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 107.

5 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 112; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 113; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 114; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 115; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 117.

15 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 122; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 123; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 124; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 125; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 126; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 127.

20 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 132; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 133; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 134; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 135; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 136; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 137.

25 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 142; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 143; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 144; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 145; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 146; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 147.

30 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 152; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 153; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 154; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 155; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 156; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 157.

35 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 162; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 163; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 164; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 165; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 166; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 167.

45 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 172; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 173; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 174; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 175; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 176; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 177.

50 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende seis CDR que incluyen (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 182; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 183; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 184; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 185; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 186; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 187.

55 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-ICOS comprende las seis CDR como se describió anteriormente y se une a ICOS. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-ICOS comprende las seis CDR como se describió anteriormente, se une a ICOS y aumenta la cantidad de células Tef y/o activa las células Tef y/o disminuye la cantidad de células Treg y/o aumenta la relación de células Tef con respecto a las células Treg en un mamífero, tal como un ser humano. En algunas modalidades, las células Treg son células T CD4+ FoxP3+. En algunas modalidades, las células Tef son células T CD8+. En algunas modalidades, las células Tef son células T CD4+ FoxP3- y/o células T CD8+.

60 En algunos casos, se proporciona un anticuerpo anti-ICOS que compite con un anticuerpo anti-ICOS descrito en el presente documento para unirse a ICOS. En algunos casos, puede producirse y/o usarse un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente descripción para su unión.

65 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de CDR de VH seleccionadas de (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; (b) HCDR2 que

seleccionadas de (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 105; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 106; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 107.

- 5 En algunos casos, el anticuerpo comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de CDR de VL seleccionadas de (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 115; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 117.
- 10 En algunos casos, el anticuerpo comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de CDR de VL seleccionadas de (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 125; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 126; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 127.
- 15 En algunos casos, el anticuerpo comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de CDR de VL seleccionadas de (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 135; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 136; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 137.
- 20 En algunos casos, el anticuerpo comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de CDR de VL seleccionadas de (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 145; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 146; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 147.
- 25 En algunos casos, el anticuerpo comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de CDR de VL seleccionadas de (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 155; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 156; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 157.
- 30 En algunos casos, el anticuerpo comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de CDR de VL seleccionadas de (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 165; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 166; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 167.
- 35 En algunos casos, el anticuerpo comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de CDR de VL seleccionadas de (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 175; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 176; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 177.
- 40 En algunos casos, el anticuerpo comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de CDR de VL seleccionadas de (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 185; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 186; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 187.
- 45 En algunos casos, cualquiera de las seis CDR proporcionadas en la presente pueden combinarse como subpartes con cualquiera de las otras CDR proporcionadas en la presente descripción, para un total de seis CDR en una construcción. Así, en algunos casos, dos CDR de un primer anticuerpo (por ejemplo, HCDR1 y HCDR2) pueden combinarse con cuatro CDR de un segundo anticuerpo (HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3). En algunos casos, dos o menos residuos en una o más de las CDR pueden reemplazarse para obtener una variante de esta. En algunos casos, dos o menos residuos pueden reemplazarse en 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las CDR.

55 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende (I) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de CDR de VH seleccionadas de (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; y (II) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de CDR de VL seleccionadas de (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

60 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende (I) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de CDR de VH seleccionadas de (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; y (II) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de CDR de VL seleccionadas de (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27.

- ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-ICOS que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a ICOS. En algunos casos, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en las SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 o 180. En algunos casos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las CDR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-ICOS comprende la secuencia de VH en la SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 o 180, que incluye modificaciones postraduccionales de esa secuencia.
- 5
- En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.
- 10
- En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24.
- 15
- En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.
- 20
- En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44.
- 25
- En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54.
- 30
- En la invención, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64.
- 35
- En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 73; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 74.
- 40
- En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 84.
- 45
- En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 92; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 93; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94.
- 50
- En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 102; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 103; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 104.
- 55
- En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 112; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 113; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 114.
- 60
- En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 122; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 123; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 124.
- 65
- En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 132; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 133; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 134.
- En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 142; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 143; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 144.
- En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 152; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 153; y (c) HCDR3 que comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 154.

En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 162; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 163; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 164.

En algunos casos, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 172; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 173; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 174.

En algunas modalidades, la VH comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 182; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 183; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 184.

En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo anti-ICOS, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61. En algunos casos, una secuencia VL que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-ICOS que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a ICOS. En algunos casos, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en las SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 o 181. En algunos casos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las CDR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-ICOS comprende la secuencia VL en las SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 o 181, que incluye modificaciones postraduccionales de esa secuencia.

En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27.

En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37.

En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47.

En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57.

En la invención, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67.

En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77.

En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 87.

En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 96; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97.

En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 105; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 106; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 107.

En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 115; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 117.

5 En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 125; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 126; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 127.

10 En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 135; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 136; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 137.

15 En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 145; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 146; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 147.

20 En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 155; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 156; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 157.

En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 165; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 166; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 167.

25 En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 175; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 176; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 177.

30 En algunos casos, la VL comprende: (a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 185; (b) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 186; y (c) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 187.

35 En algunas modalidades, un anticuerpo anti-ICOS comprende una secuencia del dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 y un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61. En algunos casos, una secuencia de VH que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con relación a la secuencia de referencia, y una secuencia de VL que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-ICOS que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a ICOS. En algunos casos, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en las SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 o 180. En algunos casos, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en la SEQ ID NO: 11,21,31,41,51,61,71,81,91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 o 181. En algunos casos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las CDR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-ICOS comprende la secuencia VH en las SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 o 180 y la secuencia VL de las SEQ ID NO: 11,21,31,41,51,61,71,81,91,101,111,121,131,141,151, 161, 171 o 181, que incluyen modificaciones posttraduccionales de una o ambas secuencias.

50 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende (I) un dominio VH que comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; y (II) un dominio VL que comprende: (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

60 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-ICOS comprende (I) un dominio VH que comprende: (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23; y (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; y (II) un dominio VL que comprende: (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27.

65 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS comprende (I) un dominio VH que comprende: (a) HCDR1 que comprende

secuencias. En algunos casos, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en la SEQ ID NO: 120 y la SEQ ID NO: 121, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En algunos casos, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en la SEQ ID NO: 130 y la SEQ ID NO: 131, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En algunos casos, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en la SEQ ID NO: 140 y la SEQ ID NO: 141, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En algunos casos, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en la SEQ ID NO: 150 y la SEQ ID NO: 151, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En algunos casos, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en la SEQ ID NO: 160 y la SEQ ID NO: 161, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En algunos casos, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en la SEQ ID NO: 170 y la SEQ ID NO: 171, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En algunos casos, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en la SEQ ID NO: 180 y la SEQ ID NO: 181, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias.

15 En algunos casos, se proporcionan anticuerpos que compiten con los anticuerpos anti-ICOS proporcionados en la presente descripción para unirse a ICOS. En algunos casos, los anticuerpos compiten con los anticuerpos anti-ICOS proporcionados en la presente descripción para unirse a un epítipo en ICOS.

20 En algunos casos, los ensayos de competencia pueden usarse para identificar un anticuerpo monoclonal que compite con un anticuerpo anti-ICOS descrito en el presente documento (tal como 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 o 35A9S89) para unirse a ICOS. Los ensayos de competencia pueden usarse para determinar si dos anticuerpos se unen al mismo epítipo mediante el reconocimiento de epítipos idénticos o solapados estéricamente o un anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión de otro anticuerpo al antígeno. En algunos casos, un anticuerpo competidor de este tipo se une al mismo epítipo que se une un anticuerpo descrito en el presente documento. Los ensayos de competencia ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, ensayos de rutina tales como los proporcionados en Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Métodos ilustrativos detallados para mapear un epítipo al cual se une un anticuerpo se pueden encontrar en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, N.J.). En algunos casos, se dice que dos anticuerpos se unen al mismo epítipo si cada uno bloquea la unión del otro en un 50 % o más. En algunos casos, el anticuerpo que compite con un anticuerpo anti-ICOS descrito en el presente documento es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En algunos casos, se proporciona un anticuerpo que compite con un anticuerpo anti-ICOS quimérico, humanizado o humano como se describe en el presente documento.

35 En algunos casos, se proporcionan anticuerpos que se unen a cualquiera de uno o más de los epítipos que los anticuerpos proporcionados en la presente descripción. En algunos casos, se proporcionan anticuerpos que se unen y se superponen a un epítipo al que se unen los anticuerpos de la presente. En algunos casos, se proporciona un anticuerpo que compite con al menos uno de los anticuerpos proporcionados en la presente descripción. En algunos casos, se proporciona un anticuerpo que compite con al menos dos de los anticuerpos proporcionados en la presente descripción. En algunos casos, se proporciona un anticuerpo que compite con al menos tres de los anticuerpos proporcionados en la presente descripción. En algunos casos, el anticuerpo se une a un epítipo superpuesto como un anticuerpo descrito en los ejemplos en la presente descripción. En algunos casos, el anticuerpo competidor se une y/u obstruye todo el epítipo. En algunos casos, el anticuerpo competidor se une y/u obstruye una parte del epítipo. En algunos casos, el paratopo del anticuerpo competidor se une al menos a una parte del epítipo de un anticuerpo proporcionado en la presente descripción. En algunos casos, el paratopo del anticuerpo competidor se une al objetivo, y una sección diferente de la estructura del anticuerpo competidor obstruye al menos una parte del epítipo de un anticuerpo proporcionado en la presente descripción.

50 Anticuerpos quiméricos ilustrativos

En algunas modalidades, un anticuerpo proporcionado en la presente descripción es un anticuerpo quimérico. Determinados anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 4,816,567 y Morrison y otros, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo "con cambio de clase" en el que la clase o subclase se ha cambiado con respecto a la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen sus fragmentos de unión a antígeno.

60 Los anticuerpos quiméricos ilustrativos no limitantes incluyen anticuerpos quiméricos que comprenden las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo que se selecciona de 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 o 35A9S89. Los anticuerpos quiméricos ilustrativos adicionales incluyen anticuerpos quiméricos que comprenden CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 o

35A9S89. Otros anticuerpos quiméricos ilustrativos no limitantes incluyen anticuerpos quiméricos que comprenden CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 o 35A9S89. En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS quimérico comprende las regiones variables descritas anteriormente y se une a ICOS. En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS quimérico comprende las regiones variables descritas anteriormente, se une a ICOS, y aumenta la cantidad de células Tef y/o activa las células Tef y/o disminuye la cantidad de células Treg y/o aumenta la relación de células Tef con respecto a las células Treg. En algunos casos, las células Treg son células T CD4+ FoxP3+. En algunos casos, las células Tef son células T CD4+ FoxP3-. En algunos casos, las células Tef son células T CD8+. En algunos casos, las células Tef son células T CD4+ FoxP3- y células T CD8+.

En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS quimérico comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 o 180, en donde el anticuerpo se une a ICOS. En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS quimérico comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 o 181, en donde el anticuerpo se une a ICOS. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-ICOS quimérico comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 60; y una cadena ligera que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 61; en donde el anticuerpo se une a ICOS.

Los anticuerpos anti-ICOS quiméricos ilustrativos incluyen, además, anticuerpos quiméricos que compiten por la unión a ICOS con un anticuerpo o fragmento de este descrito en el presente documento. Por lo tanto, en algunos casos, se proporciona un anticuerpo anti-ICOS quimérico que compite por la unión a ICOS con un anticuerpo seleccionado de 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 y 35A9S89 o un fragmento de estos. En algunos casos, el anticuerpo compite por unirse a ICOS y aumenta la cantidad de células Tef y/o activa las células Tef y/o disminuye la cantidad de células Treg y/o aumenta la relación de células Tef con respecto a las células Treg. En algunos casos, las células Treg son células T CD4+ FoxP3+. En algunos casos, las células Tef son células T CD8+. En algunos casos, las células Tef son células T CD4+ FoxP3- y células T CD8+.

En algunos casos, un anticuerpo quimérico descrito en el presente documento comprende una o más regiones constantes humanas. En algunos casos, la región constante de cadena pesada humana es de un isotipo seleccionado de IgA, IgG e IgD. En algunos casos, la región constante de cadena ligera humana es de un isotipo seleccionado de κ y λ . En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico descrito en el presente documento comprende una región constante de IgG1 humana. En algunos casos, un anticuerpo quimérico descrito en el presente documento comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 humana. En algunos casos, un anticuerpo quimérico descrito en el presente documento comprende una región constante de IgG4 humana y una cadena ligera κ humana.

Como se señaló anteriormente, si la función efectora es conveniente o no puede depender del método particular de tratamiento previsto para un anticuerpo. Por lo tanto, en algunos casos, cuando la función efectora es conveniente, se selecciona un anticuerpo anti-ICOS quimérico que comprende una región constante de cadena pesada IgG1 humana o una región constante de cadena pesada IgG3 humana. En algunas modalidades, cuando la función efectora no es conveniente, se selecciona un anticuerpo anti-ICOS quimérico que comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 o IgG2 humana.

Anticuerpos humanizados ilustrativos

En algunas modalidades, se proporcionan anticuerpos humanizados que se unen a ICOS. Los anticuerpos humanizados son útiles como moléculas terapéuticas porque los anticuerpos humanizados reducen o eliminan la respuesta inmunitaria humana en comparación con los anticuerpos no humanos, lo que puede resultar en una respuesta inmunitaria contra un agente terapéutico (como la respuesta de anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA)), y una disminución de la eficacia del agente terapéutico.

En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad para los seres humanos, a la vez que retiene la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano original. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las CDR, (o porciones de estas) se derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o porciones de estas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Opcionalmente, un anticuerpo humanizado comprenderá, además, al menos una porción de una región constante humana. En algunas modalidades, algunos

residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo a partir del cual se derivan los residuos de CDR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad de los anticuerpos.

- 5 Los anticuerpos humanizados y los métodos para obtenerlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, (2008) Front. Biosci. 13: 1619-1633, y se describen además, por ejemplo, en Riechmann y otros, (1988) Nature 332:323-329; Queen y otros, (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86: 10029-10033; patentes de Estados Unidos núm. 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321 y 7,087,409; Kashmiri y otros, (2005) Methods 36:25-34; Padlan, (1991) Mol. Immunol. 28:489-498 (que describe la "remodelación de la superficie"); Dall'Acqua y otros, (2005) Methods 36:43-60 (que describe el
10 "barajado de FR"); y Osbourn y otros, (2005) Methods 36:61-68 y Klimka y otros, (2000) Br. J. Cancer, 83:252-260 (que describe el enfoque de "selección guiada" para el barajado de FR).

- Las regiones del marco humanas que pueden usarse para la humanización incluyen pero no se limitan a: regiones del marco seleccionadas con el uso del método de "mejor ajuste" (ver, por ejemplo, Sims y otros (1993) J. Immunol. 151:2296); regiones del marco derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena pesada y ligera (ver, por ejemplo, Carter y otros (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; y Presta y otros (1993) J. Immunol, 151:2623); regiones del marco maduras humanas (mutadas somáticamente) o regiones del marco de la línea germinal humana (ver, por ejemplo, Almagro y Fransson, (2008) Front. Biosci. 13:1619-1633); y regiones del marco derivadas del tamizaje de genotecas de FR (ver, por ejemplo, Baca y otros, (1997) J. Biol. Chem. 272: 10678-10684 y Rosok y otros, (1996) J. Biol. Chem. 271:22611-22618).

- Los anticuerpos humanizados ilustrativos no limitantes incluyen 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 y 35A9S89, descritos en la presente. Los anticuerpos humanizados ilustrativos no limitantes incluyen, además, anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada de un anticuerpo seleccionado de 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 y 35A9S89 y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 y 35A9S89. Los anticuerpos humanizados ilustrativos no limitantes incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada seleccionada de las SEQ ID NO: 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 y 180 y/o una región variable de cadena ligera seleccionada de las SEQ ID NO: 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 y 181. Los anticuerpos humanizados ilustrativos incluyen, además, pero sin limitarse a, anticuerpos humanizados que comprenden CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 y 35A9S89. En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS humanizado comprende las CDR descritas anteriormente y se une a ICOS. En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS humanizado comprende las CDR descritas anteriormente, se une a ICOS y aumenta la cantidad de células Tef y/o activa las células Tef y/o disminuye la cantidad de células Treg y/o aumenta la relación de células Tef con respecto a las células Treg. En algunos casos, las células Treg son células T CD4+ FoxP3+. En algunas modalidades, las células Tef son células T CD8+. En algunos casos, las células Tef son células T CD4+ FoxP3- y células T CD8+.

- En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS humanizado comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y/o una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 y 35A9S89.

- En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS humanizado comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 y 180 y en donde el anticuerpo se une a ICOS. En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS humanizado comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 y 181, en donde el anticuerpo se une a ICOS. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-ICOS humanizado comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90%, al menos 91%, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 60; y una cadena ligera que comprende una secuencia de región variable que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 61; en donde el anticuerpo se une a ICOS.

- En algunos casos, se mantienen una o más de las secuencias de CDR proporcionadas en la presente descripción, mientras que la región restante de cadena pesada, ligera o pesada y ligera (es decir, FR1, FR2, FR3 y FR4) es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al

menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 11, 21, 31,41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171 y 181.

- 5 En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS humanizado comprende al menos una de las CDR descritas en la presente descripción. Es decir, en algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS humanizado comprende al menos una CDR seleccionada de una CDR1 de cadena pesada analizada en este documento, una CDR2 de cadena pesada analizada en este documento, una CDR3 de cadena pesada analizada en este documento, una CDR1 de cadena ligera analizada en este documento, una CDR2 de cadena ligera analizada en este documento, y una CDR3 de cadena ligera analizada en este documento. Además, en algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS humanizado comprende al menos una CDR mutada basada en una CDR analizada en la presente descripción, en donde la CDR mutada comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos con relación a la CDR analizada en la presente descripción. En algunos casos, una o más de las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras. Un experto en la técnica puede seleccionar una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras adecuadas para una secuencia de CDR particular, en donde las sustituciones conservadoras adecuadas de aminoácidos no están destinadas a alterar significativamente las propiedades de unión del anticuerpo que comprende la CDR mutada.

Los anticuerpos anti-ICOS humanizados ilustrativos incluyen, además, anticuerpos que compiten por la unión a ICOS con un anticuerpo o fragmento de este descrito en el presente documento. Por lo tanto, en algunos casos, se proporciona un anticuerpo anti-ICOS humanizado que compite por la unión a ICOS con un anticuerpo o fragmento de este seleccionado de 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 y 35A9S89. En algunos casos, se proporciona un anticuerpo anti-ICOS humanizado que compite por la unión a ICOS con un anticuerpo o fragmento de este seleccionado de 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 y 35A9S89 y aumenta la cantidad de células Tef y/o activa las células Tef y/o disminuye la cantidad de células Treg y/o aumenta la relación de células Tef a células Treg. En algunos casos, las células Treg son células T CD4+ FoxP3+. En algunas modalidades, las células Tef son células T CD8+. En algunos casos, las células Tef son células T CD4+ FoxP3- y células T CD8+.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-ICOS humanizado comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 188 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 189.

35 Anticuerpos humanos ilustrativos

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de diversas técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos humanos se describen generalmente en van Dijk y van de Winkel, (2001) *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-374 y Lonberg, (2008) *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459. En algunas modalidades, el anticuerpo humano no es un anticuerpo de origen natural. En algunas modalidades, el anticuerpo humano es un anticuerpo monoclonal; por lo tanto, en algunas modalidades, cada uno de los anticuerpos humanos en un conjunto puede unirse al mismo epítipo en el antígeno.

Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la estimulación antigénica. Tales animales contienen típicamente toda o una porción de los loci de inmunoglobulinas humanas, que reemplazan los loci endógenos de inmunoglobulinas, o que están presentes de manera extracromosómica o integrada aleatoriamente en los cromosomas del animal. En tales ratones transgénicos, los loci endógenos de inmunoglobulinas se han inactivado generalmente. Para la revisión de métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos ver Lonberg, (2005) *Nat. Biotech.* 23: 1117-1125. Véase además, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 6,075,181 y 6,150,584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de Estados Unidos núm. 5,770,429 que describe la tecnología HUMAB® la patente de Estados Unidos núm. 7,041,870 que describe la tecnología K-M MOUSE®, y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por tales animales pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, combinándose con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos pueden producirse, además, mediante métodos basados en hibridomas. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma humano-ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Ver, por ejemplo, Kozbor (1984) *J. Immunol.* 133: 3001; Brodeur y otros, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner y otros, (1991) *J. Immunol.*, 147:86). Los anticuerpos humanos generados por medio de la tecnología de hibridoma de células B humanas se describen, además, en Li y otros, (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562. Otros métodos incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 7,189,826 (que describe la producción de anticuerpos monoclonales IgM humanos a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, (2006) *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268

(que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridomas humanos (tecnología de Triomas) se describe además en Vollmers y Brandlein, (2005) *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers and Brandlein, (2005) *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3): 185-191.

5 Los anticuerpos humanos pueden generarse, además, mediante el aislamiento de secuencias del dominio variable de clones de Fv, seleccionadas de genotecas de presentación en fagos derivadas de humanos. Tales secuencias del dominio variable pueden combinarse después con un dominio constante humano deseado. A continuación se describen técnicas para seleccionar anticuerpos humanos a partir de genotecas de anticuerpos.

10 Los anticuerpos pueden aislarse mediante análisis de genotecas combinatorias para anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, en la técnica se conoce una variedad de métodos para generar genotecas de presentación en fagos y tamizar tales genotecas para anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Tales métodos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom y otros, en *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien y otros, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen además, por ejemplo, en McCafferty y otros, (1990) *Nature* 348:552-554; Clackson y otros, (1991) *Nature* 352: 624-628; Marks y otros, (1992) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597; Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248: 161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu y otros, (2004) *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310; Lee y otros, (2004) *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093; Fellouse, (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472; y Lee y otros, (2004) *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 y la publicación PCT WO 99/10494.

20 En determinados métodos de presentación en fagos, los repertorios de los genes VH y VL se clonan por separado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en genotecas de fagos, que después pueden analizarse en busca de un fago con unión al antígeno como se describe en Winter y otros, (1994) *Ann. Rev. Immunol.* 12:433-455. Los fagos típicamente muestran fragmentos de anticuerpo, ya sea como fragmentos Fv de cadena simple (scFv) o como fragmentos Fab. Las genotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad contra el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De manera alternativa, el repertorio virgen puede clonarse (por ejemplo, de ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos a una amplia variedad de antígenos no propios y además autoantígenos sin ninguna inmunización según lo descrito por Griffiths y otros, (1993) *EMBO J* 12:725-734. Finalmente, las genotecas vírgenes pueden hacerse, además, sintéticamente mediante la clonación de segmentos génicos V no reorganizados de células madre, y mediante el uso de cebadores de PCR que contienen secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr la reorganización in vitro, como se describe por Hoogenboom y Winter (1992), *J. Mol. Biol.* 227:381-388. Las publicaciones de patentes que describen genotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de Estados Unidos núm. 5,750,373 y las publicaciones de patente de Estados Unidos núm. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS humano se une a un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 2. En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS humano se une a ICOS y aumenta la cantidad de células Tef y/o activa las células Tef y/o disminuye la cantidad de células Treg y/o aumenta la relación de células Tef con respecto a las células Treg. En algunos casos, las células Treg son células T CD4+ FoxP3+. En algunos casos, las células Tef son células T CD8+. En algunos casos, las células Tef son células T CD4+ FoxP3- y células T CD8+.

Los anticuerpos anti-ICOS humanos ilustrativos incluyen, además, anticuerpos que compiten por la unión a ICOS con un anticuerpo humano o fragmento de este descrito en el presente documento. Por lo tanto, en algunos casos, se proporciona un anticuerpo anti-ICOS humano que compite por la unión a ICOS con un anticuerpo o fragmento de este seleccionado de 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 y 35A9S89. En algunos casos, se proporciona un anticuerpo anti-ICOS humano que compite por la unión a ICOS con un anticuerpo o fragmento de este seleccionado de 7F12, 37A10, 35A9, 36E10, 16G10, 37A10S713, 37A10S714, 37A10S715, 37A10S716, 37A10S717, 37A10S718, 16G10S71, 16G10S72, 16G10S73, 16G10S83, 35A9S79, 35A9S710 y 35A9S89 y aumenta la cantidad de células Tef y/o activa las células Tef y/o disminuye la cantidad de células Treg y/o aumenta la relación de células Tef a células Treg. En algunos casos, las células Treg son células T CD4+ FoxP3+. En algunos casos, las células Tef son células T CD8+. En algunos casos, las células Tef son células T CD4+ FoxP3- y células T CD8+.

55 En algunos casos, se proporciona un anticuerpo anti-ICOS humano quimérico, donde el anticuerpo comprende la región variable de un anticuerpo humano que se une a ICOS y la región constante de un anticuerpo humano diferente. En algunos casos, se proporciona un anticuerpo anti-ICOS humano quimérico, donde el anticuerpo comprende las CDR de un anticuerpo humano que se une a ICOS y un marco de un anticuerpo humano diferente. En algunos casos, el anticuerpo no es un anticuerpo humano de origen natural.

60 En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS humano comprende una o más regiones constantes humanas. En algunos casos, la región constante de cadena pesada humana es de un isotipo seleccionado de IgA, IgG e IgD. En algunos casos, la región constante de cadena ligera humana es de un isotipo seleccionado de κ y λ . En algunas modalidades, un anticuerpo humano descrito en el presente documento comprende una región constante de IgG1 humana. En algunos casos, un anticuerpo humano descrito en el presente documento comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 humana. En algunos casos, un anticuerpo humano descrito en el presente documento comprende

una región constante de IgG4 humana y una cadena ligera κ humana.

En algunos casos, cuando la función efectora es conveniente, se selecciona un anticuerpo anti-ICOS humano que comprende una región constante de cadena pesada IgG1 humana o una región constante de cadena pesada IgG3 humana. En algunos casos, cuando la función efectora no es conveniente, se selecciona un anticuerpo anti-ICOS humano que comprende una región constante de cadena pesada IgG4 o IgG2 humana.

Como se señala en la presente descripción, el término "anticuerpo humano" denota el género de las secuencias posibles para la construcción del anticuerpo, en lugar de una fuente del anticuerpo.

Regiones constantes de anticuerpo ilustrativas

En algunos casos, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende una o más regiones constantes humanas. En algunos casos, la región constante de cadena pesada humana es de un isotipo seleccionado de IgA, IgG e IgD. En algunos casos, la región constante de cadena ligera humana es de un isotipo seleccionado de κ y λ. En algunas modalidades, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende una región constante de IgG1 humana. En algunos casos, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 humana. En algunos casos, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende una región constante de IgG4 humana y una cadena ligera κ humana.

A lo largo de la presente descripción y las reivindicaciones a menos que se indique explícitamente o sea conocido por un experto en la técnica, la numeración de los residuos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice de EU como en Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md. (1991), incorporado expresamente en la presente descripción como referencia. El "índice de EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo IgG1 EU humano.

Como se señaló anteriormente, si la función efectora es conveniente o no puede depender del método particular de tratamiento previsto para un anticuerpo. Por lo tanto, en algunas modalidades, cuando la función efectora es conveniente, se selecciona un anticuerpo anti-ICOS que comprende una región constante de cadena pesada IgG1 humana o una región constante de cadena pesada IgG3 humana. En algunos casos, cuando la función efectora no es conveniente, se selecciona un anticuerpo anti-ICOS que comprende una región constante de cadena pesada IgG4 o IgG2 humana.

En algunos casos, un anticuerpo comprende una variante de región Fc que tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con la región Fc de una IgG natural o un anticuerpo natural. En algunos casos, la variante de la región Fc tiene dos o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc del anticuerpo natural. En algunos casos, la variante de la región Fc tiene tres o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc del anticuerpo natural. En algunos casos, la variante de la región Fc tiene al menos una, dos o tres o más sustituciones de aminoácidos de la región Fc, descritas en la presente descripción. En algunos casos, la variante de la región Fc en la presente descripción poseerá al menos aproximadamente 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido original. En algunos casos, la variante de la región Fc en la presente descripción poseerá al menos aproximadamente 90 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido original. En algunos casos, la variante de la región Fc en la presente descripción poseerá al menos aproximadamente 95 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido original.

En algunos casos, un anticuerpo proporcionado en la presente se modifica para aumentar o disminuir el grado en que el anticuerpo se glicosila. La adición o eliminación de sitios de glicosilación a un anticuerpo puede lograrse convenientemente modificando la secuencia de aminoácidos de manera que se crean o se eliminan uno o más sitios de glicosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a este puede modificarse. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido biantenarico ramificado que se une generalmente por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright y otros *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como también una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunos casos, las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo pueden realizarse para crear variantes de anticuerpos con determinadas propiedades mejoradas.

En algunos casos, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en tal anticuerpo puede ser de 1 % a 80 %, de 1 % a 65 %, de 5 % a 65 % o de 20 % a 40 %. La cantidad de fucosa se determina mediante el cálculo de la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, en relación con la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa) según se mide mediante espectrometría de masa MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina ubicado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración de EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede ubicarse aproximadamente

± 3 aminoácidos corriente arriba o corriente abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones menores de secuencia en los anticuerpos. Tales variantes de fucosilación pueden tener una mejor función de ADCC. Véase, por ejemplo, las publicaciones de patentes de Estados Unidos núm. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucosiladas" o "deficientes de fucosa" incluyen: 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 y otros, J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki y otros Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en la fucosilación de proteínas (Ripka y otros, Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); solicitud de patente de Estados Unidos núm. US 2003/0157108 A1, Presta, L; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams y otros, especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares con genes desactivados, como células CHO con genes desactivados, gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8 (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki y otros, Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. y otros, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); y documento WO2003/085107).

Las variantes de anticuerpos se proporcionan además con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en los cuales un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo está bisecado por GlcNAc. Tales variantes de anticuerpos pueden tener una fucosilación reducida y/o una mejor función de ADCC. Los ejemplos de tales variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet y otros); patente de Estados Unidos núm. 6,602,684 (Umana y otros); y US 2005/0123546 (Umana y otros). Se proporcionan, además, variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Tales variantes de anticuerpos pueden tener una mejor función CDC. Tales variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel y otros); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

Las variantes de anticuerpos se proporcionan, además, con extensiones de líder amino-terminal. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia líder amino terminal están presentes en el extremo amino terminal de cualquiera de una o más cadenas pesadas o ligeras de un anticuerpo. Una extensión de líder amino terminal ilustrativa comprende o consiste en tres residuos de aminoácidos, VHS, presentes en una o ambas cadenas ligeras de una variante de anticuerpo.

El tiempo de vida media in vivo o en suero de polipéptidos de unión a FcRn humano de alta afinidad pueden analizarse, por ejemplo, en ratones transgénicos, en seres humanos o en primates no humanos a los que se administran los polipéptidos con una variante de región Fc. Véase además, por ejemplo, Petkova y otros International Immunology 18(12):1759-1769 (2006).

En algunos casos, la variante de anticuerpo media la ADCC en presencia de células efectoras humanas más eficazmente que un anticuerpo original. En algunos casos, la variante de anticuerpo es sustancialmente más eficaz en la mediación de ADCC in vitro, cuando las cantidades de la variante del polipéptido y el anticuerpo original utilizados en el ensayo son esencialmente iguales. En algunos casos, la variante de anticuerpo es sustancialmente más eficaz en la mediación de ADCC in vivo, cuando las cantidades de la variante del polipéptido y el anticuerpo original utilizadas en el ensayo son esencialmente iguales. Generalmente, tales variantes se identificarán mediante el uso del ensayo de ADCC in vitro como se describe en el presente documento, pero se contemplan otros ensayos o métodos para determinar la actividad de ADCC, por ejemplo en un modelo animal *etc.*

Conjugados de anticuerpo ilustrativos

En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS se conjuga a otra molécula. En algunos casos, la molécula adicional puede ser un marcador detectable, tal como una etiqueta. En algunos casos, la molécula adicional puede ser una molécula terapéutica, tal como un agente citotóxico. En algunos casos, una etiqueta y/o un agente citotóxico pueden conjugarse al anticuerpo. Como se usa en la presente descripción, una etiqueta es un resto que facilita la detección del anticuerpo y/o facilita la detección de una molécula a la que se une el anticuerpo. Los ejemplos de etiquetas no limitantes incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos, grupos fluorescentes, grupos enzimáticos, grupos quimioluminiscentes, biotina, etiquetas de epítopos, etiquetas de unión a metales, *etc.* Un experto en la técnica puede seleccionar una etiqueta adecuada de conformidad con la aplicación específica.

Como se usa en la presente descripción, un agente citotóxico es un resto que reduce la capacidad proliferativa de una o más células. Una célula tiene una capacidad de proliferación reducida cuando la célula se vuelve menos capaz de proliferar, por ejemplo, debido a que la célula experimenta apoptosis o muere de cualquier otra manera, la célula no avanza a través del ciclo celular y/o no se divide, la célula se desdiferencia, *etc.* Los agentes citotóxicos ilustrativos no limitantes incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos, toxinas y agentes quimioterapéuticos. Un experto en la técnica puede seleccionar un agente citotóxico adecuado de acuerdo con la aplicación prevista. En algunos casos, el agente citotóxico es al menos uno de un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citocina, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, una antraciclina, toxina o un agente apoptótico.

En algunos casos, una etiqueta y/o un agente citotóxico se conjuga a un anticuerpo mediante el uso de métodos

químicos *in vitro*. Los métodos químicos ilustrativos de conjugación no limitantes se conocen en la técnica, e incluyen servicios, métodos y/o reactivos disponibles comercialmente de, por ejemplo, Thermo Scientific Life Science Research Produces (anteriormente Pierce; Rockford, 111.), Prozyme (Hayward, Calif.), SACRI Antibody Services (Calgary, Canadá), AbD Serotec (Raleigh, N.C.), *etc.* En algunos casos, cuando una etiqueta y/o un agente citotóxico es un polipéptido, la etiqueta y/o agente citotóxico puede expresarse a partir del mismo vector de expresión con al menos una cadena de anticuerpo para producir un polipéptido que comprende la etiqueta y/o el agente citotóxico fusionado a una cadena de anticuerpo. Un experto en la técnica puede seleccionar un método adecuado para conjugar una etiqueta y/o agente citotóxico a un anticuerpo de acuerdo con la aplicación prevista.

En algunos casos, la conjugación puede ser covalente. En algunos casos, la conjugación puede ser no covalente. En algunos casos, la conjugación puede ser por medio de una interacción de unión específica, por ejemplo, a través de la unión de un anticuerpo secundario.

Secuencias líder ilustrativas

Para que algunas proteínas secretadas se expresen y secreten en grandes cantidades, puede ser conveniente una secuencia líder de una proteína heteróloga. En algunos casos, emplear secuencias líder heterólogas puede ser ventajoso ya que un polipéptido maduro resultante puede permanecer inalterado mientras que la secuencia líder se elimina en el ER durante el proceso de secreción. La adición de una secuencia líder heteróloga puede ser útil para expresar y secretar algunas proteínas.

Determinadas secuencias líder ilustrativas se describen, por ejemplo, en la base de datos de secuencias líder en línea mantenida por el Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional de Singapur. Véase Choo y otros, BMC Bioinformatics, 6: 249 (2005); y publicación PCT núm. WO 2006/081430.

IV. Expresión y producción de anticuerpos

Moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-ICOS

En la presente se proporcionan moléculas de ácido nucleico que comprenden polinucleótidos que codifican una o más cadenas de un anticuerpo anti-ICOS. En algunos casos, una molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo anti-ICOS. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada y un polinucleótido que codifica una cadena ligera, de un anticuerpo anti-ICOS. En algunas modalidades, una primera molécula de ácido nucleico comprende un primer polinucleótido que codifica una cadena pesada y una segunda molécula de ácido nucleico comprende un segundo polinucleótido que codifica una cadena ligera.

En algunas modalidades, la cadena pesada y la cadena ligera se expresan a partir de una molécula de ácido nucleico o de dos moléculas de ácido nucleico separadas, como dos polipéptidos separados. En algunas modalidades, como cuando un anticuerpo es un scFv, un único polinucleótido codifica un único polipéptido que comprende tanto una cadena pesada como una cadena ligera unidas entre sí.

En algunos casos, un polinucleótido que codifica una cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo anti-ICOS comprende una secuencia nucleotídica que codifica al menos una de las CDR proporcionadas en la presente descripción. En algunos casos, un polinucleótido que codifica una cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo anti-ICOS comprende una secuencia nucleotídica que codifica al menos 3 de las CDR proporcionadas en la presente descripción. En algunas modalidades, un polinucleótido que codifica una cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo anti-ICOS comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos 6 de las CDR proporcionadas en la presente descripción. En algunos casos, un polinucleótido que codifica una cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo anti-ICOS comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, que, cuando se traduce, se ubica en el extremo N terminal de la cadena pesada o la cadena ligera. Como se analizó anteriormente, la secuencia líder puede ser la secuencia líder de cadena pesada o ligera natural, o puede ser otra secuencia líder heteróloga.

En algunos casos, el ácido nucleico es uno que codifica cualquiera de las secuencias de aminoácidos para los anticuerpos en la Tabla de secuencias en la presente descripción. En algunos casos, el ácido nucleico es uno que es al menos 80 % idéntico a un ácido nucleico que codifica cualquiera de las secuencias de aminoácidos para los anticuerpos en la Tabla de secuencias en la presente, por ejemplo, al menos 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica. En algunos casos, el ácido nucleico es uno que se hibrida a cualquiera o más de las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas en la presente descripción. En algunos casos, la hibridación es en condiciones moderadas. En algunos casos, la hibridación es en condiciones altamente rigurosas, tales como: al menos aproximadamente 6X SSC y SDS al 1 % a 65 °C, con un primer lavado durante 10 minutos a aproximadamente 42 °C con aproximadamente 20 % (v/v) de formamida en SSC 0,1X, y con un lavado posterior con SSC 0,2 X y 0,1 % de SDS a 65 °C.

Las moléculas de ácido nucleico pueden construirse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante

convencionales en la materia. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico es un vector de expresión que es adecuado para la expresión en una célula huésped seleccionada.

5 Se proporcionan vectores que comprenden polinucleótidos que codifican cadenas pesadas anti-ICOS y/o cadenas ligeras anti-ICOS. Se proporcionan, además, vectores que comprenden polinucleótidos que codifican cadenas pesadas anti-ICOS y/o cadenas ligeras anti-ICOS. Tales vectores incluyen, pero sin limitarse a, vectores de ADN, vectores de fagos, vectores virales, vectores retrovirales, etc. En algunas modalidades, un vector comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena pesada y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena ligera. En algunos casos, la cadena pesada y la cadena ligera se expresan a partir del vector
10 como dos polipéptidos separados. En algunos casos, la cadena pesada y la cadena ligera se expresan como parte de un polipéptido único, tal como, por ejemplo, cuando el anticuerpo es un scFv.

En algunos casos, un primer vector comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada y un segundo vector comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera. En algunos casos, el primer vector y el segundo vector se transfecan en células huésped en cantidades similares (tales como cantidades molares similares o cantidades de masa similares). En algunos casos, una relación molar o de masa de entre 5:1 y 1:5 del primer vector y el segundo vector se transfecta en células huésped. En algunos casos, se usa una relación de masa de entre 1:1 y 1:5 para el vector que codifica la cadena pesada y el vector que codifica la cadena ligera. En algunos casos, se usa una relación de masa de 1:2 para el vector que codifica la cadena pesada y el vector que codifica la cadena ligera.
20

En algunos casos, se selecciona un vector que se optimiza para la expresión de polipéptidos en células CHO o derivadas de CHO o en células NSO. Tales vectores ilustrativos se describen, por ejemplo, en Running Deer y otros, Biotechnol. Prog. 20:880-889 (2004).

25 Células huésped

En algunos casos, las cadenas pesadas de anticuerpo anti-ICOS y/o las cadenas ligeras de anticuerpos anti-ICOS pueden expresarse en células procariontas, como células bacterianas; o en células eucariotas, como células fúngicas (como levadura), células vegetales, células de insectos y células de mamíferos. Dicha expresión puede llevarse a cabo, por ejemplo, de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica. Las células eucariotas ilustrativas que pueden usarse para expresar polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, células COS, que incluyen células COS 7; células 293, que incluyen células 293-6E; células CHO, que incluyen CHO-S, células CHO DG44. Lec3 y células CHO FUT8; células PER.C6® (Crucell); y células NSO. En algunos casos, las cadenas pesadas de anticuerpo anti-ICOS y/o las cadenas ligeras de anticuerpos anti-ICOS pueden expresarse en levadura. Véase, por ejemplo, la publicación de Estados Unidos núm. US 2006/0270045 A1. En algunos casos, una célula huésped eucariota particular se selecciona sobre la base de su capacidad para realizar modificaciones postraduccionales deseadas a las cadenas pesadas de anticuerpo anti-ICOS y/o las cadenas ligeras de anticuerpos anti-ICOS. Por ejemplo, en algunos casos, las células CHO producen polipéptidos que tienen un mayor nivel de sialilación que el mismo polipéptido producido en células 293.
30
35

La introducción de uno o más ácidos nucleicos en una célula huésped deseada puede lograrse mediante cualquier método, que incluye pero sin limitarse a, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, etc. Los métodos ilustrativos no limitantes se describen, por ejemplo, en Sambrook y otros, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ra ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Los ácidos nucleicos pueden transfectarse transitoriamente o establemente en las células huésped deseadas, de conformidad con cualquier método adecuado.
40
45

Se proporcionan, además, células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos o vectores descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, se proporciona una célula huésped que comprende un anticuerpo anti-ICOS. Cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogo puede usarse con el propósito de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Los ejemplos no limitantes de células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células COS, HeLa y CHO. Véase también la publicación PCT núm. WO 87/04462. Las células huésped adecuadas que no son de mamífero incluyen procariontas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levadura (tal como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o *K. lactis*).
50
55

Purificación de anticuerpos

Los anticuerpos anti-ICOS pueden purificarse mediante cualquier método adecuado. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, el uso de matrices de afinidad o cromatografía de interacción hidrofóbica. Los ligandos de afinidad adecuados incluyen el ECD ROR1 y los ligandos que se unen a las regiones constantes del anticuerpo. Por ejemplo, una columna de afinidad de Proteína A, Proteína G, Proteína A/G o de anticuerpos puede usarse para unirse a la región constante y purificar un anticuerpo anti-ICOS. La cromatografía interactiva hidrofoba, por ejemplo, una columna de butilo o fenilo, también puede ser adecuada para purificar algunos polipéptidos tales como anticuerpos. La cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo cromatografía de intercambio aniónico y/o cromatografía de intercambio catiónico) también puede ser adecuada para purificar algunos polipéptidos tales como anticuerpos. La cromatografía en modo mixto (por ejemplo fase inversa/ intercambio de aniones, fase inversa/ intercambio de cationes,
60
65

interacción hidrofílica/intercambio de aniones, interacción hidrofílica/intercambio de cationes, *etc.*) también puede ser adecuada para purificar algunos polipéptidos tales como anticuerpos. En la técnica se conocen muchos métodos de purificación de polipéptidos.

5 Producción de anticuerpos libre de células

En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS se produce en un sistema libre de células. Los sistemas sin células ilustrativos no limitantes se describen, por ejemplo, en Sitaraman y otros, *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004); Endo y otros, *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003).

10 Composiciones

En algunos casos, se describen anticuerpos preparados mediante los métodos descritos anteriormente. En algunos casos, el anticuerpo se prepara en una célula huésped. En algunos casos, el anticuerpo se prepara en un sistema libre de células. En algunos casos, el anticuerpo se purifica. En algunos casos, el anticuerpo preparado en una célula huésped o un sistema libre de células es un anticuerpo quimérico. En algunos casos, el anticuerpo preparado en una célula huésped o un sistema libre de células es un anticuerpo humanizado. En algunos casos, el anticuerpo preparado en una célula huésped o un sistema libre de células es un anticuerpo humano. En algunos casos, se proporciona un medio de cultivo celular que comprende un anticuerpo anti-ICOS. En algunos casos, se proporciona un fluido de cultivo celular huésped que comprende un anticuerpo anti-ICOS.

En algunos casos, se describen composiciones que comprenden anticuerpos preparados mediante los métodos descritos anteriormente. En algunos casos, la composición comprende un anticuerpo preparado en una célula huésped. En algunos casos, la composición comprende un anticuerpo preparado en un sistema libre de células. En algunos casos, la composición comprende un anticuerpo purificado. En algunos casos, la composición comprende un anticuerpo quimérico preparado en una célula huésped o un sistema libre de células. En algunos casos, la composición comprende un anticuerpo humanizado preparado en una célula huésped o un sistema libre de células. En algunos casos, la composición comprende un anticuerpo humano preparado en una célula huésped o un sistema libre de células.

En algunos casos, se proporciona una composición que comprende anticuerpo anti-ICOS a una concentración de más de aproximadamente cualquiera de 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 o 250 mg/ml. En algunos casos, la composición comprende un anticuerpo quimérico preparado en una célula huésped o un sistema libre de células. En algunos casos, la composición comprende un anticuerpo humanizado preparado en una célula huésped o un sistema libre de células. En algunos casos, la composición comprende un anticuerpo humano preparado en una célula huésped o un sistema libre de células.

40 V. Composiciones y métodos terapéuticos

Métodos para tratar enfermedades mediante el uso de anticuerpos anti-ICOS

Los anticuerpos y composiciones que comprenden anticuerpos se proporcionan para usar en métodos de tratamiento para seres humanos o animales. Se describen, además, métodos para tratar una enfermedad, que comprenden administrar anticuerpos anti-ICOS. Las enfermedades ilustrativas no limitantes que pueden tratarse con anticuerpos anti-ICOS incluyen, pero no se limitan al cáncer.

En algunos casos, se proporciona un método para tratar un tumor, en donde las células dentro de una muestra del tumor expresan ICOS. En algunos casos, el tumor puede considerarse como positivo para ICOS o que expresa ICOS. La expresión de ICOS puede determinarse por IHC, por ejemplo, como se analiza en el presente documento. En algunas modalidades, se considera que un tumor expresa ICOS cuando una muestra del tumor muestra una tinción de ICOS de 1+, 2+ o 3+ mediante IHC. En algunas modalidades, la muestra del tumor muestra una tinción de ICOS de 2+ o 3+ mediante IHC. En algunos casos, una muestra de tumor de un sujeto se analiza para determinar la expresión de ICOS y el sujeto se selecciona para el tratamiento con un anticuerpo descrito en el presente documento si la muestra de tumor muestra expresión de ICOS. En algunos casos, el sujeto se selecciona si la muestra tumoral muestra una expresión elevada de ICOS.

En algunos casos, se selecciona un sujeto para el tratamiento con un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente si el tumor del sujeto es PD-L1^{BAJO}. En algunos casos, un sujeto se selecciona para el tratamiento con un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente si el tumor del sujeto es ICOS^{ALTO}/PD-L1^{BAJO}. En algunos casos, un sujeto se selecciona para el tratamiento con un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente si el tumor del sujeto es ICOS^{ALTO}/PD-L1^{ALTO}.

El anticuerpo anti-ICOS puede administrarse a los sujetos según sea necesario. La determinación de la frecuencia de administración puede realizarse por los expertos en la técnica, como un médico especialista sobre la base de consideraciones de la afección que se trata, la edad del sujeto que se trata, la gravedad de la afección que se trata, el

estado general de salud del sujeto que se trata y similares. En algunas modalidades, una dosis eficaz de un anticuerpo anti-ICOS se administra a un sujeto una o más veces. En algunos casos, una dosis eficaz de un anticuerpo anti-ICOS se administra al sujeto una vez al mes, menos de una vez al mes, tal como, por ejemplo, cada dos meses o cada tres meses. En algunos casos, una dosis eficaz de un anticuerpo anti-ICOS se administra menos de una vez al mes, tal como, por ejemplo, una vez cada tres semanas, una vez cada dos semanas o una vez cada semana. Una dosis eficaz de un anticuerpo anti-ICOS se administra al sujeto al menos una vez. En algunos casos, la dosis eficaz de un anticuerpo anti-ICOS puede administrarse múltiples veces, que incluye durante períodos de al menos un mes, al menos seis meses o al menos un año.

En algunos casos, las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad eficaz para el tratamiento (que incluye profilaxis) de cáncer. La cantidad con eficacia terapéutica depende típicamente del peso del sujeto que se trata, su afección física o de salud, la capacidad de propagación de la afección a tratar o la edad del sujeto que se trata. En general, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por dosis.

Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad eficaz para aumentar la cantidad de células Tef; activar las células Tef; agotar las células Treg; y/o aumentar la relación de las células Tef con respecto a las células Treg. En algunos casos, las células Treg son células T CD4+ FoxP3+. En algunas modalidades, las células Tef son células T CD8+. En algunos casos, las células Tef son células T CD4+ FoxP3- y células T CD8+.

En algunos casos, el tratamiento con anticuerpo anti-ICOS da como resultado una lectura de la farmacodinámica, tal como la regulación positiva del ligando de ICOS (ICOSL). En algunos casos, se observa regulación positiva de ICOSL en la superficie de las células B. En algunos casos, se observa regulación positiva de ICOSL en la superficie de granulocitos. En algunos casos, se observa regulación positiva de ICOSL en la superficie de neutrófilos. La regulación positiva de ICOSL puede observarse en células en el tumor; en células del bazo; en células de sangre periférica. La regulación positiva de ICOSL en la superficie celular puede detectarse, por ejemplo, mediante citometría de flujo. En algunos casos, el ICOSL soluble aumenta en el suero después del tratamiento con anticuerpo anti-ICOS. El ICOSL soluble puede detectarse mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a, ELISA, MSD y espectrometría de masa. En algunos casos, el acoplamiento al objetivo ICOS, según se mide por disponibilidad del receptor libre, por anticuerpos anti-ICOS puede usarse, además, como una lectura de la farmacodinámica. En algunos casos, después del tratamiento con un anticuerpo anti-ICOS, puede cuantificarse la cantidad de receptores ICOS en la superficie de linfocitos T libres para unirse a otros anticuerpos. La disminución en los receptores disponibles observados puede servir como una indicación de que los anticuerpos anti-ICOS se unen a su molécula objetivo.

La cantidad con eficacia terapéutica depende típicamente del peso del sujeto que se trata, su afección física o de salud, la capacidad de propagación de la afección a tratar o la edad del sujeto que se trata. En general, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por dosis.

Composiciones farmacéuticas

En algunos casos, las composiciones que comprenden anticuerpos anti-ICOS se proporcionan en formulaciones con una amplia variedad de portadores farmacéuticamente aceptables (véase, por ejemplo, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20a ed. (2003); Ansel y otros, Pharmaceutical Dosing Forms and Drug Delivery Systems, 7a ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe y otros, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3a ed., Pharmaceutical Press (2000)). Varios portadores farmacéuticamente aceptables, que incluyen vehículos, adyuvantes y diluyentes, están disponibles. Además, también están disponibles diversas sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste del pH y tampones, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares. Los ejemplos no limitantes de portadores incluyen solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de estos.

En algunos casos, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-ICOS. En algunos casos, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo quimérico. En algunos casos, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo humanizado. En algunos casos, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo preparado en una célula huésped o sistema libre de células como se describe en el presente documento.

5 En algunos casos, la composición farmacéutica comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunos casos, las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad eficaz para el tratamiento (que incluye profilaxis) de cáncer. La cantidad con eficacia terapéutica depende típicamente del peso del sujeto que se trata, su afección física o de salud, la capacidad de propagación de la afección a tratar o la edad del sujeto que se trata.

10 En general, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal o menor, por ejemplo menos de 4, menos de 3, menos de 2 o menos de 1 mg/kg del anticuerpo.

30 En algunos casos, los anticuerpos anti-ICOS pueden estar presentes en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por dosis. Por ejemplo, en algunos casos, una dosis para una persona de 20 kg puede estar dentro de un intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg. En algunos casos, la dosis puede estar dentro de un intervalo de 2 mg a 200 mg del anticuerpo anti-ICOS. En algunos casos, la dosis puede estar dentro de un intervalo de 10 mg a 400 mg del anticuerpo anti-ICOS.

Vías de administración

40 En algunos casos, pueden administrarse anticuerpos anti-ICOS *in vivo* por diversas vías, que incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, intraarterial, parenteral, intratumoral, intraperitoneal o subcutánea. La formulación y vía de administración apropiadas pueden seleccionarse de acuerdo con la aplicación prevista.

Terapia de combinación

45 Los anticuerpos anti-ICOS pueden administrarse solos o con otros modos de tratamiento. Pueden proporcionarse antes, sustancialmente de manera simultánea, y/o después de otros modos de tratamiento, por ejemplo, cirugía, quimioterapia, radioterapia o la administración de un agente biológico, como otro anticuerpo terapéutico. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-ICOS se administra junto con otro agente anticanceroso.

50 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS se administra simultáneamente con un segundo agente terapéutico. Por ejemplo, los dos o más agentes terapéuticos se administran con una separación temporal de no más de aproximadamente 60 minutos, tal como no más de aproximadamente 30, 15, 10, 5 o 1 minuto. En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS se administra secuencialmente con un segundo agente terapéutico. Por ejemplo, la administración de los dos o más agentes terapéuticos se realiza con una separación de tiempo de más de

55 aproximadamente 15 minutos, tal como aproximadamente 20, 30, 40, 50 o 60 minutos, 1 día, 2 días, 3 días, 1 semana, 2 semanas o 1 mes o más.

60 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-ICOS se administra con un segundo método terapéutico para el tratamiento. Por lo tanto, la administración de un anticuerpo proporcionado en la presente descripción puede estar en combinación con otro sistema de tratamiento.

65 En algunas modalidades, un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción se administra con una terapia de PD-1. Los ejemplos de terapias de PD-1 incluyen, pero sin limitarse a, nivolumab (OPDIVO®, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538); pidilizumab, lambrolizumab/pembrolizumab (KEYTRUDA, MK-3475); durvalumab (anticuerpo anti-PD-L1, MEDI-4736; Astrazeneca/ Medimmune); RG-7446; avelumab (anticuerpo anti-PD-L1; MSB-0010718C; Pfizer); AMP-224; BMS-936559 (anticuerpo anti-PD-L1); AMP-514; MDX-1105; ANB-011; anti-LAG-3/PD-1; anticuerpo

anti-PD-1 (CoStim); anticuerpo anti-PD-1 (Kadmon Pharm.); anticuerpo anti-PD-1 (Immunovo); anticuerpo anti-TIM-3/PD-1 (AnaptysBio); anticuerpo anti-PD-L1 (CoStim/Novartis); RG7446/MPDL3280A (anticuerpo anti-PD-L1, Genentech/Roche); KD-033, antagonista de PD-1 (Agenus); STI-A1010; STI-A1110; TSR-042; y otros anticuerpos que se dirigen contra la proteína de muerte programada -1 (PD-1) o el ligando de muerte programada 1 (PD-L1).

5 En algunas modalidades, un sujeto se selecciona para el tratamiento con un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción y una terapia de PD-1 si el tumor del sujeto expresa PD-L1. En algunas modalidades, un sujeto se selecciona para el tratamiento con un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción y una terapia de PD-1 si el tumor del sujeto es PD-L1^{ALTO}. En algunas modalidades, un sujeto se selecciona para el tratamiento con un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción y una terapia de PD-1 si el tumor del sujeto expresa ICOS y PD-L1. En algunas modalidades, un sujeto se selecciona para el tratamiento con un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción y una terapia de PD-1 si el tumor del sujeto es ICOS^{ALTO}/PD-L1^{ALTO}. Determinar el nivel de PD-L1 y/o ICOS puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de IHC. Un tumor de un paciente se considera que expresa PD-L1, en algunos casos, cuando 1 % o más o 5 % o más, de las células tumorales en una muestra muestran tinción de la membrana para PD-L1 mediante IHC. En algunos casos, más del 50 % de las células tumorales en una muestra muestran tinción de membrana para PD-L1 mediante IHC. En algunos casos, el tumor del sujeto se considera PD-L1^{ALTO}. Se considera que el tumor de un paciente expresa ICOS, en algunos casos, cuando 1 % o más de las células en una muestra de tumor muestran tinción para ICOS por IHC. En algunos casos, un sujeto se trata primero con una terapia de PD-1, y después se trata con un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción, con o sin continuar con la terapia de PD-1. Por lo tanto, los métodos proporcionados en la presente descripción incluyen el tratamiento de un sujeto con un anticuerpo anti-ICOS, en donde el sujeto ha sido tratado previamente con una terapia de PD-1.

25 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente se administra con un anticuerpo agonista anti-OX40 (tal como Medi6469, MedImmune; MOXR0916/RG7888, Roche). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente se administra con un anticuerpo anti-CTLA4 (tal como ipilimumab, YERVOY®, BMS).

30 En algunas modalidades, un agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos ilustrativos que pueden combinarse con los anticuerpos anti-ICOS proporcionados en la presente incluyen, pero no se limitan a, capectiabina, ciclofosfamida, dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, daunorubicina, cisplatino, carboplatino, epirubicina, eribulina, 5-FU, gemcitabina, irinotecán, ixabepilona, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, nab-paclitaxel, ABRAXANE® (paclitaxel unido a proteína), pemetrexed, vinorelbina y vincristina. En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción se administra con al menos un inhibidor de quinasa. Los inhibidores de quinasa ilustrativos no limitantes incluyen erlotinib, afatinib, gefitinib, crizotinib, dabrafenib, trametinib, vemurafenib y cobimetanib.

40 En algunos casos, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de IDO. Los inhibidores de IDO ilustrativos no limitantes se describen, por ejemplo, en los documentos US 2016/0060237 y US 2015/0352206. Los ejemplos no limitantes de inhibidores de IDO incluyen Indoximod (New Link Genetics), INCB024360 (Incyte Corp), 1-metil-D-triptófano (New Link Genetics) y GDC-0919 (Genentech).

45 En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente se administra en combinación con un fármaco modificador de la inmunidad (IMI^D). Los IMI^D ilustrativos no limitantes incluyen talidomida, lenalidomida y pomalidomida.

50 En algunas modalidades, un agente terapéutico adicional es una vacuna contra el cáncer. Las vacunas contra el cáncer se han investigado como un posible enfoque para la transferencia de antígenos y la activación de células dendríticas. En particular, la vacunación en combinación con puntos de control inmunológico o agonistas para las vías coestimuladoras ha demostrado evidencia de superar la tolerancia y generar una respuesta antitumoral aumentada. Se ha evaluado una variedad de vacunas contra el cáncer que emplean diferentes enfoques para promover una respuesta inmunitaria contra el tumor (*ver, por ejemplo*, Emens LA, Expert Opin Emerg Drugs 13(2): 295-308 (2008)). Se han diseñado enfoques para mejorar la respuesta de células B, células T o células presentadoras de antígeno profesionales contra los tumores. Los tipos ilustrativos de vacunas contra el cáncer incluyen, pero sin limitarse a, vacunas basadas en péptidos que emplean el direccionamiento a antígenos tumorales distintos, que pueden administrarse como péptidos/proteínas o como vectores de ADN genéticamente modificados, virus, bacterias o similares; y enfoques de biología celular, por ejemplo, para el desarrollo de vacunas contra el cáncer contra objetivos menos definidos, que incluyen, pero sin limitarse a, vacunas desarrolladas a partir de células dendríticas derivadas de pacientes, células tumorales autólogas o lisados celulares tumorales, células tumorales alogénicas, y similares.

60 Por lo tanto, en determinadas modalidades, los anticuerpos anti-ICOS proporcionados en la presente descripción pueden usarse en combinación con una vacuna contra el cáncer. Las vacunas contra el cáncer ilustrativas incluyen, pero sin limitarse a, vacunas de células dendríticas, virus oncolíticos, vacunas de células tumorales, etc. En algunos casos, tales vacunas aumentan la respuesta antitumoral. Los ejemplos de vacunas contra el cáncer que pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti-ICOS proporcionados en la presente incluyen, pero sin limitarse a, vacuna de MAGE3 (por ejemplo, para el cáncer de melanoma y vejiga), vacuna de MUC1 (por ejemplo, para el cáncer de mama),

EGFRv3 (como Rindopepimut, por ejemplo, para el cáncer de cerebro, que incluye glioblastoma multiforme) o ALVAC-CEA (por ejemplo, para cánceres CEA+).

5 Las vacunas contra el cáncer ilustrativas no limitantes incluyen, además, Sipuleucel-T, que se deriva de células mononucleares de sangre periférica autólogas (PBMC) que incluyen células presentadoras de antígeno (*ver, por ejemplo*, Kantoff PW y otros, N Engl J Med 363:411-22 (2010)). En la generación de Sipuleucel-T, las PBMC del paciente se activan *ex vivo* con PA2024, una proteína de fusión recombinante de la fosfatasa ácida prostática (un antígeno prostático) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (un activador de células inmunitarias). Otro enfoque de una vacuna candidata contra el cáncer es generar una respuesta inmunitaria contra péptidos específicos mutados en tejido tumoral, tal como melanoma (*ver, por ejemplo*, Carreno BM y otros, Science 348:6236 (2015)). Tales péptidos mutados, en algunos casos, pueden denominarse neoantígenos. Como ejemplo no limitante del uso de neoantígenos en vacunas tumorales, los neoantígenos en el tumor que se predice que se unen a la proteína del complejo mayor de histocompatibilidad HLA-A*02:01 se identifican para pacientes individuales con un cáncer, tal como melanoma. Las células dendríticas del paciente se maduran *ex vivo*, después se incuban con neoantígenos. Las células dendríticas activadas se administran después al paciente. En algunos casos, después de la administración de la vacuna contra el cáncer, puede detectarse una fuerte inmunidad de células T contra el neoantígeno.

20 En algunas de estas modalidades, la vacuna contra el cáncer se desarrolla mediante el uso de un neoantígeno. En algunas modalidades, la vacuna contra el cáncer es una vacuna de ADN. En algunas modalidades, la vacuna contra el cáncer es un virus modificado genéticamente que comprende un antígeno del cáncer, como PROSTVAC (rilimogene galvacirepvec/rilimogene glafolivec). En algunas modalidades, la vacuna contra el cáncer comprende células tumorales modificadas genéticamente, como GVAX, que es una vacuna de células tumorales transfectadas con el gen del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (*ver, por ejemplo*, Nemunaitis, 2005, Expert Rev Vaccines, 4: 259-74).

30 En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS descrito en el presente documento se administra antes, simultáneamente, y/o después de una vacuna contra el cáncer. En algunas modalidades, las vacunas contra el cáncer desarrolladas mediante el uso de neoantígenos se usan en combinación con los anticuerpos anti-ICOS descritos en la presente descripción. En algunos casos, la combinación se usa para tratar un cáncer con una carga mutacional alta, tal como melanoma, cáncer de pulmón, vejiga o colorrectal.

35 En algunos casos, un anticuerpo anti-ICOS proporcionado en la presente descripción se administra en combinación con una terapia con células T con receptor de antígeno quimérico (terapia CAR-T).

Usos de diagnóstico

40 En la presente se describen métodos para usar los anticuerpos anti-ICOS, polipéptidos y polinucleótidos para la detección, el diagnóstico y el control de una enfermedad, trastorno o afección asociados con la expresión de epítomos de anticuerpos anti-ICOS (ya sea aumentada o disminuida con relación a una muestra normal, y/o expresión inapropiada, tal como la presencia de expresión en tejido(s) y/o célula(s) que normalmente carecen de la expresión de los epítomos). En la presente se describen métodos para determinar si un paciente responderá a una terapia con anticuerpos anti-ICOS.

45 En algunos casos, el método comprende detectar si el paciente tiene células que expresan ICOS usando un anticuerpo anti-ICOS. En algunos casos, el método de detección comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo, polipéptido o polinucleótido y determinar si el nivel de unión difiere del de una muestra de referencia o de comparación (tal como un control). En algunos casos, el método puede ser útil para determinar si los anticuerpos o polipéptidos descritos en la presente son un tratamiento adecuado para el sujeto.

50 En algunos casos, las células o lisado celular/tisular se ponen en contacto con un anticuerpo anti-ICOS y se determina la unión entre el anticuerpo y la célula. Cuando las células de prueba muestran actividad de unión en comparación con una célula de referencia del mismo tipo de tejido, puede indicar que el sujeto podría beneficiarse del tratamiento con un anticuerpo anti-ICOS. En algunos casos, las células de prueba son de tejidos humanos.

55 Pueden usarse varios métodos conocidos en la técnica para detectar la unión específica entre un anticuerpo y un antígeno. Los inmunoensayos ilustrativos que pueden llevarse a cabo incluyen inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA), inmunoensayo de fluorescencia (FIA), inmunoensayo enzimático (EIA), inmunoensayo de inhibición nefelométrica (NIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), y radioinmunoensayo (RIA). Un resto indicador o grupo marcador, puede unirse a los anticuerpos objetivo y se selecciona para satisfacer las necesidades de varios usos del método que se establecen frecuentemente por la disponibilidad del equipo de ensayo y los procedimientos de inmunoensayo compatibles. Las etiquetas adecuadas incluyen, sin limitación, radionúclidos (por ejemplo, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ³H o ³²P), enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, luciferasa o β-galactosidasa), restos o proteínas fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, GFP o BFP) o restos luminiscentes (por ejemplo, nanopartículas Qdot™ suministradas por Quantum Dot Corporation, Palo Alto, Calif.). Las técnicas generales para usar en la realización de los diversos inmunoensayos señalados anteriormente se

conocen por los expertos en la técnica.

5 Para propósitos de diagnóstico, el polipéptido que incluye anticuerpos puede marcarse con un resto detectable que incluye, entre otros, radioisótopos, etiquetas fluorescentes y diversas etiquetas enzima-sustrato, conocidos en la técnica. Los métodos de conjugación de etiquetas a un anticuerpo se conocen en la técnica.

En algunos casos, no es necesario que los anticuerpos anti-ICOS se etiqueten, y la presencia de estos puede detectarse mediante el uso de un segundo anticuerpo marcado que se une al primer anticuerpo anti-ICOS.

10 En algunos casos, el anticuerpo anti-ICOS puede emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

15 Los anticuerpos y polipéptidos anti-ICOS pueden usarse, además, para ensayos de diagnóstico in vivo, tales como la obtención de imágenes in vivo. Generalmente, el anticuerpo o el polipéptido se marca con un radionúclido (como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H o cualquier otra etiqueta de radionúclido, que incluye las descritas en la presente descripción) de manera que las células o el tejido de interés pueden localizarse mediante el uso de inmunoscintigrafía.

20 El anticuerpo puede usarse además como reactivo de tinción en patología mediante el uso de técnicas conocidas en la materia.

En algunos casos, se usa un primer anticuerpo para un diagnóstico y se usa un segundo anticuerpo como un agente terapéutico. En algunos casos, el primer y segundo anticuerpos son diferentes. En algunos casos, el primer anticuerpo no es de un ser humano, mientras que el agente terapéutico es de un ser humano. En algunos casos, el primer y segundo anticuerpos pueden unirse al antígeno al mismo tiempo, al unirse a epítopos separados.

Kits/artículos de fabricación

30 En la presente también se proporcionan kits, medicamentos, composiciones y formas de dosificación unitaria para usar en cualquiera de los métodos descritos en la presente.

35 Los kits pueden incluir uno o más contenedores que comprenden un anticuerpo anti-ICOS (o formas de dosificación unitaria y/o artículos de fabricación). En algunos casos, se proporciona una dosis unitaria en donde la dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de una composición que comprende un anticuerpo anti-ICOS, con o sin uno o más agentes adicionales. En algunos casos, tal dosificación unitaria se suministra en una jeringa precargada de un solo uso para inyección. En algunos casos, la composición contenida en la dosificación unitaria puede comprender solución salina, sacarosa o similares; un tampón, como fosfato o similares; y/o se formula dentro de un intervalo de pH estable y eficaz. En algunos casos, la composición puede proporcionarse como un polvo liofilizado que puede reconstituirse tras la adición de un líquido apropiado, por ejemplo, agua estéril. En algunos casos, la composición

40 comprende una o más sustancias que inhiben la agregación de proteínas, que incluyen, entre otros, sacarosa y arginina. En algunos casos, una composición comprende heparina y/o un proteoglicano.

45 En algunos casos, la cantidad del anticuerpo anti-ICOS usada en la dosis unitaria puede ser cualquiera de las cantidades proporcionadas en la presente para los diversos métodos y/o composiciones descritos.

En algunos casos, los kits comprenden además instrucciones para usar en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente. El kit puede comprender además una descripción de la selección de un individuo adecuado o tratamiento. Las instrucciones que se suministran en los kits son instrucciones por escrito típicamente en una etiqueta o prospecto (por ejemplo, una lámina de papel incluida en el kit), pero también son aceptables instrucciones legibles por una máquina (por ejemplo, instrucciones transportadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico). En algunos casos, el kit comprende además otro agente terapéutico.

50 Los kits están en un empaque adecuado. El empaque adecuado incluye, pero no se limita a, frascos, botellas, botes, empaques flexibles (por ejemplo, bolsas Mylar o plásticas selladas) y similares. Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa. La presente solicitud también proporciona artículos de fabricación, que incluyen frascos (como frascos sellados), botellas, botes, empaques flexibles y similares.

60 Ejemplos

Los ejemplos analizados a continuación son puramente ilustrativos de la invención y no deben considerarse que limitan la invención de ninguna manera. Los ejemplos no pretenden representar que los experimentos a continuación sean todos o solo los experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc()) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique de cualquier otra manera, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados Centígrados y la presión es la

atmosférica o cercana a esta.

Ejemplo 1: Análisis bioinformático de la expresión de ARNm de ICOS en tumores humanos.

5 Mediante la utilización de los datos de secuenciación de ARN recopilados como parte de TCGA, la expresión de ICOS se comparó en ~ 7500 tumores en 24 indicaciones diferentes. Se encontraron altos niveles de ARNm de ICOS en subconjuntos de cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de mama triple negativo (TNBC). Ver la Figura 1A.

10 Se investigó la asociación entre la infiltración de células T y los niveles de expresión de ICOS. La expresión de un conjunto de 12 genes de quimiocinas se ha asociado con altos niveles de infiltración de células T y la formación de estructuras tipo ganglio linfático (Messina y otros, 2012, Sci Reports. 2:765-771). La puntuación de la firma de quimiocinas se calculó para cada muestra sobre la base de la expresión promedio de estos 12 genes de quimiocinas. Esta puntuación de la firma se calculó en todas las muestras de cáncer de células escamosas de cabeza y cuello
15 (HNSCC). Se correlacionaron los niveles de la firma de quimiocinas o un marcador de células Treg (FoxP3) con los niveles de ICOS en los tumores de HNSCC. Ver la Figura 2. Hubo una fuerte correlación entre la firma de quimiocinas y los niveles de ICOS (R=0,83; correlación de Spearman) o ICOS y FoxP3, un marcador de células Treg (R=0,88; correlación de Spearman). Estos datos demuestran que la expresión de ICOS se asocia estrechamente con la infiltración de células T y las células Treg. Se observaron datos similares en NSCLC y TNBC.

20 En los tumores HNSCC, la expresión de ICOS se correlacionó significativamente (R=0,93 y 0,78 respectivamente) con los niveles de expresión de otras moléculas de puntos de control como CTLA-4 y PD-1. Ver la Figura 3. La correlación de ICOS con PD-L1 fue débil (R=0,62). Se observaron datos similares en otras indicaciones tales como NSCLC. Estos datos sugieren que ICOS puede expresarse en las mismas células T que expresan otras moléculas de puntos de control como CTLA-4 y PD-1. La correlación más débil con PD-L1 e ICOS sugiere que podría haber un subconjunto
25 de pacientes con ICOS alto que podrían ser de PD-L1 bajo o negativo. Estos datos apoyan a ICOS como un agente único en pacientes negativos para PD-L1 y también una estrategia de combinación con terapias anti-PD-1 o anti-CTLA-4.

30 **Ejemplo 2: Análisis IHC de tumores humanos**

Los niveles de expresión de la proteína ICOS se determinaron mediante el uso de un ensayo inmunohistoquímico (IHC). Este ensayo, que usa un anticuerpo monoclonal anti-ICOS de conejo (SP98, Spring Biosciences, Pleasanton, CA), se validó para determinar la especificidad de ensayo, la precisión del ensayo (intra-ejecuciones y entre
35 ejecuciones, y reproducibilidad entre lotes) y la sensibilidad. Los estudios de validación se realizaron mediante el uso de secciones de tejido fijados en formalina, embebidos en parafina (FFPE) y líneas celulares control (CHO modificadas genéticamente para expresar ICOS humano (control positivo) o una línea celular control de vector CHO que no expresa ICOS (control negativo)). El ensayo se realizó en una plataforma de tinción automatizada Leica-Bond Rx y se detectó tinción específica de ICOS en las células CHO de control positivo y en subconjuntos de células T en la amígdala
40 humana normal.

Los portaobjetos se calificaron por un patólogo capacitado mediante el uso de los siguientes criterios para la tinción cromogénica:

Frecuencia de células positivas para ICOS	Puntuación
< 1 % de las células son positivas para ICOS	0
> 1 % pero < 5 % de las células son positivas para ICOS	1+
> 5 % pero < 15 % de las células son positivas para ICOS	2+
> 15 % de las células son positivas para ICOS	3+

45 Las micromatrices de tejidos de 11 tipos de tumor diferentes se tiñeron y clasificaron mediante el uso de este sistema de puntuación. Ver la Figura 1B. Los datos de IHC confirmaron los datos basados en ARNm en el hecho que HNSCC, NSCLC y TNBC contenían el mayor porcentaje de infiltración de células inmunitarias ICOS+ alto (es decir, 3+). Ver la Figura 1B. Además de estos tumores, los subconjuntos de pacientes con melanoma, cáncer colorrectal y adenocarcinoma gástrico tuvieron niveles moderados de infiltración celular positiva a ICOS. Ver la Figura 1B.

50 Para evaluar la prevalencia y naturaleza de las células T que expresan ICOS, se desarrolló un ensayo IHC de inmunofluorescencia múltiple para la detección de ICOS, FOXP3 y CD8. Se utilizó un marcador de ADN (DAPI) para contar la cantidad total de núcleos en las secciones tumorales humanas.

55 La expresión de ICOS se determinó mediante el uso de análisis inmunohistoquímico con el clon de anticuerpo monoclonal de conejo que reconoce ICOS humano (Spring Biosciences Inc. Pleasanton, CA). La especificidad y sensibilidad del ensayo IHC de ICOS se confirmó con el uso de amígdalas humanas y líneas celulares que sobreexpresan ICOS de manera constitutiva. La intensidad de la tinción fue evaluada por un patólogo capacitado con
60 el uso de los siguientes criterios. A toda tinción positiva se le asignó una puntuación sobre la base de la expresión de membrana en al menos dos tercios de las células.

Una imagen representativa del esquema de puntuación se muestra en la Figura 4. La puntuación se realizó sobre la base de los siguientes criterios para la inmunofluorescencia:

- 5 0 (negativo) = No hay o hay menos de 0,1 % de células con tinción de la membrana
- 1+ (leve) = 0,1 a 5 % de las células son positivas
- 2+ (moderado) = 5 a 10 % de las células son positivas
- 3+ (Fuerte) = > 10 a 50 % en las células son positivas

10 La prevalencia de la expresión de ICOS en varios subconjuntos de NSCLC o muestras de pulmón normales adyacentes se resumen en la Tabla 2. En el tejido pulmonar normal adyacente en los pacientes con cáncer no se observó expresión fuerte de ICOS. Se observó una expresión fuerte de ICOS en todos los subtipos principales de cáncer de pulmón. Aproximadamente 29-31 % de los subtipos de NSCLC más comunes (adenocarcinoma o carcinoma de células escamosas) tuvieron una fuerte tinción para ICOS.

15

Tabla 2. Distribución de la tinción para ICOS en varios subconjuntos de muestras de NSCLC en función de la puntuación patológica.

Subtipo de tumor	N	Fuerte (3+)	Moderada (2+)	Débil (1+)	Negativo (0)
SCLC	2	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)
Escamoso	49	14 (29%)	14 (29%)	17 (35%)	4 (8%)
Adenocarcinoma	16	5 (31%)	2 (13%)	8 (50%)	1 (6%)
Adenoescamoso	9	3 (11%)	2 (11%)	3 (11%)	1 (67%)
Carcinoma broquioalveolar	9	2 (22%)	2 (22%)	5 (56%)	0 (0%)
No diferenciado	5	1 (20%)	0 (0%)	3 (60%)	1 (20%)
Normal	3		1 (33%)	2 (67%)	0 (0%)

20 Además, se empleó una metodología automatizada para medir las células positivas a ICOS, mediante el uso de un programa informático de análisis de imágenes (Strataquest de Tissuegnostics Inc., Tarzana, CA). La densidad de células positivas a ICOS en un área fija de tejido tumoral se calculó mediante la determinación de la cantidad de células positivas a ICOS en la región viable de tejido tumoral humano como se define por la región de tinción con DAPI. La densidad de células con ICOS se determinó a partir de un conjunto separado de aproximadamente 500

25 pacientes individuales en 4 tipos de tumor principales [NSCLC (N=100); HNSCC (N=102); cáncer de mama, todos los subtipos principales (N=94); subtipo triple negativo de cáncer de mama, TNBC (N=95); cáncer de ovario (N=94)]. Un resumen de los resultados del análisis se muestra en la Figura 5. De acuerdo con el análisis de ARNm de ICOS, los tumores de HNSCC y NSCLC tuvieron una densidad significativamente mayor de tumores positivos a ICOS en comparación con el cáncer de ovario o de mama. Aunque la expresión de ICOS es baja en el cáncer de mama, se

30 observaron altos niveles de expresión de ICOS en el subtipo TNBC, que constituye aproximadamente 10 % del cáncer de mama. *Ver la* Figura 5. Este subtipo de cáncer de mama TNBC es el subtipo más agresivo con opciones de tratamiento limitadas y la mayor necesidad médica no satisfecha.

35 La variabilidad de paciente a paciente en la expresión de ICOS en dos cohortes diferentes de tipos tumorales que expresan ICOS altos (NSCLC) se muestra en las Figuras 6A y 6B. Un intervalo de densidad de células con ICOS se observó en NSCLC a partir de 98 muestras de cáncer de pulmón (Figura 6A) disponibles de un proveedor comercial. Se observó una diversidad similar en la expresión de ICOS mediante el uso de una cohorte clínica independiente (Figura 6B) de NSCLC (N=204).

40 Una IHC múltiple con ICOS, FoxP3 (un marcador de células Treg) y CD8 de las muestras de tumor humano descritas anteriormente se analizaron y cuantificaron mediante el uso de un programa informático de análisis de imágenes (Strataquest de Tissuegnostics Inc., Tarzana, CA). Una imagen representativa de la tinción múltiple para ICOS con estos marcadores de células T se muestra en la Figura 7A. Las células positivas a ICOS, que también son positivas para FOXP3, se denominan células Treg CD4 ICOS+. Las células positivas a ICOS y positivas a CD8 se denominan células CD8 ICOS+. Las positivas para ICOS pero negativas para CD8 y FoxP3 se denominan Tef CD4 ICOS+. La densidad de los diferentes subconjuntos de células T positivas a ICOS se cuantificó mediante el uso del software de análisis de imágenes como se describió anteriormente. En las muestras de pulmón (N=100) y TNBC (n=95) hubo una gran cantidad de efectores CD4 y células Treg CD4 que eran positivas a ICOS (Figura 7B). Por el contrario, no se

45 observaron muchas células positivas a ICOS en el cáncer de ovario (n=94). Los tumores HNSCC (N=102) tuvieron una gran población de células Treg CD4 positivas a ICOS. Solo hubo una pequeña población de células T CD8 positivas a ICOS observadas en todos los tipos de tumores examinados. Estos datos sugieren que ICOS se expresa predominantemente en el compartimento CD4 en comparación con las células T CD8, y que la variación en las proporciones relativas de Treg vs Tef puede observarse en todas las indicaciones.

50

Para entender si la expresión de ICOS se asocia directamente con el estado de PD-L1, se evaluó la correlación entre los niveles de PDL1 y la expresión de ICOS. El análisis bioinformático sugirió que la expresión de PD-L1 y los niveles de ICOS se correlacionaron débilmente ($R=0,62$). Los niveles de PD-L1, ICOS y PD-1 se evaluaron por IHC múltiple. Se muestra una imagen representativa de IHC múltiple de tumor de pulmón con PD-L1 alto y bajo. Ver la Figura 8. Se evaluaron PD-L1 e ICOS en 154 tumores de NSCLC de subtipo de adenocarcinoma. Los tumores se subdividieron en tumores con PD-L1 alto o bajo sobre la base del 5 % de células positivas para PD-L1. Los resultados indican que los tumores positivos para PD-L1 tenían una mayor densidad de expresión de ICOS.

10 Ejemplo 3: Análisis de citometría de flujo

Para confirmar los datos de la expresión de ICOS obtenidos por IHC y para comparar las intensidades relativas de ICOS expresado en diferentes poblaciones de células T, se evaluó la expresión de ICOS en linfocitos infiltrantes de tumores mediante el uso de citometría de flujo de múltiples colores. Se analizaron muestras de cuatro pacientes con HNSCC, tres tumores de pulmón, y cuatro pacientes con cáncer de ovario. De manera congruente con los datos de IHC, la expresión de ICOS se observó predominantemente en las células T CD4. Ver la Figura 9 (HNSCC). La frecuencia de células positivas a ICOS en la población de CD8 es muy baja en la mayoría de estos tumores. También observamos que la mayoría de las células efectoras CD4 coexpresan ICOS y PD-1. Estos datos respaldan el desarrollo de un agente terapéutico para ICOS en la clínica solo o en combinación con terapias anti-PD-1. La intensidad media de fluorescencia (MFI) de la tinción para ICOS proporciona una medida de la expresión de ICOS en las diferentes poblaciones de células T. La MFI de las células positivas a ICOS en las células Treg fue 2-3 veces mayor que los efectores CD4. Ver la Figura 9C. Debe señalarse que existen poblaciones pequeñas de efectores CD4 que tienen MFI de ICOS alto. La confirmación de la diferencia en las densidades del receptor ICOS en las células Tef contra las células Treg, junto con los datos de los ensayos de ADCC en curso para evaluar la sensibilidad diferencial a la disminución de Tef y Treg, apoyaría el desarrollo de un anticuerpo agonista con un Fc activo que podría agotar potencialmente las células Tregs.

Los estudios de traducción muestran altos niveles de células T positivas para ICOS, infiltrantes de tumores, en un subconjunto de tumores humanos (tales como HNSCC, NSCLC, etc.). La expresión de ICOS se correlaciona con la expresión de otros reguladores de puntos de control tales como CTLA-4 y PD-1. El análisis de los subconjuntos de células T mostró que la expresión de ICOS se restringe predominantemente al compartimento de células T CD4. El ICOS se expresa en las células Treg positivas para FoxP3 así como las células Tef CD4. Los estudios muestran, de acuerdo con la literatura, que el nivel de expresión de ICOS es mayor en las células Treg en comparación con las células Tef CD4.

35 Ejemplo 4: Generación de anticuerpos

Reactivos

Las proteínas ICOS que representan especies humanas, de ratón, rata y mono cangrejero se produjeron como fusiones Fc, homodiméricas (cadena principal de IgG1), y los ICOS-hFc humano y de ratón se usaron como antígenos para las inmunizaciones de roedores. ICOS humano-hFc incluyó los aminoácidos de ICOS humano 1 a 141 (21 a 141 en la construcción madura); ICOS de ratón-hFc incluyó los aminoácidos de ICOS de ratón 1 a 142 (21 a 142 en la construcción madura).

45 ICOS-Fc se generó como moléculas de fusión de Fc tanto bivalentes como monovalentes para evaluar la avidéz y la unión monovalente de anticuerpos contra ICOS, respectivamente.

50 Para propósitos de tamizaje, se generaron líneas celulares CHO estables que sobreexpresan ICOS de ratón o humano de longitud completa (células CHO ICOS+ o "células CHO-ICOS") como las construcciones que codifican ICOS de rata o mono cangrejero de longitud completa para permitir el tamizaje después de la transfección transitoria.

Campaña de anticuerpo de roedor

55 Las campañas de roedor se realizaron con un anticuerpo de precisión. Los ratones (10), ratas (6), hámsteres sirios (6) y hámsteres armenios (6) se inmunizaron con hICOS-hFc o mICOS-hFc. Los hibridomas se generaron y los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA para determinar la unión a hICOS y a mICOS, así como tamizaje múltiple mediante FACS para determinar la unión a células CHO-hICOS y CHO-mICOS. Los hibridomas se evaluaron adicionalmente para determinar la capacidad de bloquear la unión de ICOSL a las células CHO-ICOS. Los clones que dieron positivo para la unión a ICOS de ratón y humano se seleccionaron para la purificación de proteínas. Posteriormente, los anticuerpos purificados se volvieron a seleccionar en los ensayos de unión y bloqueo, y los anticuerpos que resultaron positivos se evaluaron *in vitro* como se describe a continuación. Todos los anticuerpos seleccionados para su investigación adicional a partir del enfoque de inmunización derivaron de fusiones de hámster armenio.

65 *Caracterización bioquímica de los anticuerpos*

Las mediciones de afinidad se llevaron a cabo mediante el uso de la tecnología de Interferometría de biocapa (BLI) (ForteBio Octet® RED96). Las afinidades monovalentes se generaron con versiones de IgG de los anticuerpos con formas monovalentes, heterodiméricas, del receptor ICOS. Las afinidades por avidéz se generaron mediante el uso de IgG de longitud completa contra formas homodiméricas del receptor ICOS. Las afinidades de hICOS monomérico y bivalente de los anticuerpos de hámster seleccionados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Afinidad de anticuerpos derivados de hámster.

AcM	Afinidad de hICOS monomérico			Afinidad de hICOS bivalente		
	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

Además se determinó la afinidad de unión de los anticuerpos para ICOS de mono cangrejero, ratón y rata, y se encontró que los anticuerpos se unían a todas las especies con afinidad comparable. Las mediciones de reactividad cruzada se llevaron a cabo mediante el uso de tecnología BLI con paneles de anticuerpos que se analizan para determinar la unión a fusiones de ICOS-Fc humano, de ratón y mono cangrejero (formas homodiméricas, bivalentes). La Tabla 4 muestra datos de unión representativos para varios anticuerpos de hámster para ICOS humano y de mono cangrejero.

Tabla 4. Afinidades de unión bivalente de varios anticuerpos de hámster contra ICOS-Fc humano y de mono cangrejero (cino).

ligando/AcM	hICOS-Fc			ICOScino-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

Para evaluar la especificidad, se analizó individualmente la unión a células CHO ICOS+ humano y a las células CHO ICOS+ de ratón mediante citometría de flujo. Como control para analizar los anticuerpos panreactivos, se examinó, además, la tinción en células CHO que carecen de la expresión del receptor ICOS. Todos los anticuerpos seleccionados se unieron a células CHO ICOS+ humano y de ratón, y no a células CHO que carecen de la expresión de ICOS.

Para evaluar adicionalmente la especificidad de los anticuerpos anti-ICOS, los anticuerpos se analizaron para determinar la unión a otros miembros de la familia de proteínas CD28 (CD28, BTLA, PD-1 y CTLA-4). No se observó reactividad cruzada de los anticuerpos seleccionados para CD28, BTLA, PD-1 o CTLA4 humanos o de ratón. Específicamente, se evaluó la unión a las fusiones Fc (de CD28, BTLA, PD-1 y CTLA-4) en formas diméricas, y no se observó unión. Para un subconjunto de los miembros de la familia CD28, la proteína humana o de ratón se sobreexpresó en la superficie de las células HEK293 y CHOK1. No se observó ninguna unión del anticuerpo por encima del fondo con respecto a las células originales no transducidas.

Se encontró además que los anticuerpos no se unían a proteínas de suero abundantes ni a plaquetas o glóbulos rojos.

La unión al epítipo se llevó a cabo mediante el uso de BLI. Además, los anticuerpos se agruparon contra una fusión ICOSL-Fc (forma homodimérica, bivalente). Se encontró que todos los anticuerpos seleccionados estaban en el mismo grupo de epítopos y todos bloquearon la unión de ICOS al ligando de ICOS.

Humanización

Los anticuerpos seleccionados se humanizaron mediante la realización de estudios de homología entre las regiones del marco variable de anticuerpo de origen humano y de hámster. Se proporcionó un panel de diseños primarios para el análisis y después se produjeron anticuerpos para la comparación con el anticuerpo natural (forma de hámster o quimera). Una vez que se produjeron los paneles humanizados, los cables se caracterizaron y se clasificaron sobre la base de la afinidad y la actividad *in vitro*. Se ejecutaron otros diseños de humanización para reducir las vulnerabilidades de las secuencias y sitios inmunogénicos de puntuación baja que resulten en menores variaciones de secuencias. Las vulnerabilidades de las secuencias consideradas incluyeron la presencia de cisteínas libres y posibles sitios para la degradación química (desamidación de asparagina, isomerización de aspartato, metionina/triptófano y glicación de lisina no enzimática).

La afinidad de un anticuerpo humanizado que tiene las regiones variables de 37A10S713 para las formas monoméricas de ICOS de humanos, mono cangrejero y rata se midió mediante tecnología de Interferometría de biocapa (BLI) (ForteBio Octet® RED96) y las K_D se muestran en la Tabla 5. Las K_D se consideraron comparables entre las especies ya que estaban dentro de las 2 a 5 veces. La funcionalidad de la unión se confirmó evaluando la potencia de inducción de la proliferación de células T CD4+ primarias aisladas de cada especie.

Tabla 5. Afinidad de unión monovalente de 37A10S713 a ICOS humano, de mono cangrejero y rata.

	Humano	Mono cangrejero	Rata
Afinidad de unión (K_D nM) ^A	1,50±0,39	0,66±0,16	7,20±2,55
Potencia en la proliferación de células T CD4+ primarias (EC50 nM) ^B	4,27-49,75	8,25 - 13,14	10,7-30,0
^A Las afinidades se muestran como media ± SEM de 6 experimentos; ^B se muestra el rango de 4 donantes			

20

Ejemplo 5: Caracterización funcional *in vitro* de anticuerpos anti-ICOS

Un número de ensayos *in vitro* basados en células se usaron para evaluar la actividad de los AcM anti-ICOS. El propósito principal fue tamizar los anticuerpos con propiedades agonistas/coestimuladoras. Dado que el sistema celular (célula primaria versus la línea celular transfectada) y el método de presentación de anticuerpos (soluble versus unido a la placa o reticulado) pueden influir en la actividad agonista, se emplearon varios formatos de ensayos diferentes. Además, también se usó un ensayo para detectar actividad superagonista no deseada (ver Suntharalingam y otros, 2006, N. Eng. J. Med., 355: 1018-28).

Los ensayos diseñados para determinar la actividad agonista/coestimuladora de los AcM anti-ICOS se realizaron en los tipos de células descritos a continuación, donde la primera señal para las células T (señal 1) fue proporcionada mediante el uso ya sea de concentraciones subóptimas de anti-CD3 o PMA o en el ensayo con PBMC con estimulación con superantígeno (SEB):

- 35 1. Ensayo de células T CD4+ humanas primarias
 - a. Formato de anticuerpos reticulados/unidos a la placa coestimulados con anti-CD3
 - b. Formato de anticuerpos solubles coestimulados con PMA
- 40 2. Ensayo de Jurkat (línea celular indicadora con construcciones de ICOS humano o de ratón transfectadas)
 - a. Formato unido a la placa/reticulado con anti-CD3 o PMA
 - b. Formato de anticuerpos solubles coestimulados con PMA
- 45 3. Ensayo con PBMC humanas
 - a. Formato de anticuerpos solubles con superantígeno (SEB)

Los paneles de AcM anti-ICOS de hámster se tamizaron en los ensayos anteriores para identificar anticuerpos con propiedades agonistas. Un ejemplo de la actividad agonista observada en un ensayo con el uso de células T CD4+ humanas primarias coestimuladas con anti-CD3 subóptimo con la adición del anticuerpo anti-ICOS unido a la placa se muestra en la Figura 10A para una selección de anticuerpos anti-ICOS de hámster. En este ensayo, la célula T CD4+ humana aislada de PBMC se activa con anti-CD3 unido a la placa subóptimo en presencia de anticuerpos anti-ICOS de hámster unidos a la placa (7F12, 37A10 y 16G10) en cuatro concentraciones (mg/ml). El hICOSL unido a la placa y el anti-CD28 soluble en presencia de anti-CD3 se usan como controles positivos. Se grafica el % de células divididas. En este ensayo múltiples anticuerpos anti-ICOS muestran actividad. La Figura 10B muestra los resultados del ensayo que usó anticuerpos solubles y coestimulación con PMA subóptimo. Las células T CD4+ humanas se aislaron de

PBMC mediante selección negativa y se marcaron con CFSE. Las células se activaron en placas de 96 pocillos con PMA subóptimo (0,25 ng/ml) solo o en presencia de diferentes versiones de Fc (de hámster, mG1, mG2a, mG1Agly o hG1) del anticuerpo anti-ICOS 37A10 en las concentraciones indicadas (mg/ml). Se usó un anticuerpo anti-CD28 soluble como control. La proliferación se analizó en el día 3 mediante citometría de flujo. Las versiones de IgG1 de ratón e IgG1-agly de ratón mostraron actividad en el ensayo, junto con el anticuerpo original completamente de hámster. Al menos el anticuerpo 37A10 mostró actividad agonista en ambos formatos soluble y unido a la placa. Ver las Figuras 10A y 10B.

La Figura 10C muestra la actividad agonista de los resultados del anticuerpo 37A10S713 con una IgG1 humana en el ensayo de células T CD4+ humanas primarias. Las células T CD4+ se aislaron a partir de PBMC de 4 donantes saludables, se marcaron con colorante CFSE y después se incubaron en placas recubiertas con una concentración subóptima de anti-CD3 y diversas concentraciones de 37A10S713-hIgG1 o un anticuerpo IgG1 humano control negativo (contra el virus sincitial respiratorio (RSV)). Después de 3 días, el porcentaje de células divididas se determinó mediante el uso de citometría de flujo. Los valores de EC50 variaron de 4,27 a 49,75 nM para los 4 donantes analizados. La proliferación se grafica como el porcentaje de células divididas (medido por dilución de CFSE mediante el uso de citometría de flujo) y son la media de duplicados. La Figura 10C muestra los datos de un donante representativo.

Otro ejemplo de un ensayo en el que los anticuerpos de hámster demostraron actividad agonista es el ensayo indicador de Jurkat. Se desarrolló un ensayo indicador de Jurkat en el laboratorio mediante la transducción de una construcción de expresión quimérica de hICOS-hCD28 en una línea celular reportera de NFkB Jurkat. Las células reporteras Jurkat-hICOS-hCD28 se activaron durante 5 horas con PMA y un anticuerpo anti-ICOS soluble 37A10 de hámster con diferentes extremos Fc en 11 concentraciones (mg/ml). Se usan anti-CD28 soluble e hICOSL-Fc como controles. Se graficó el % de células GFP+. En la Figura 11 se muestran datos representativos del ensayo indicador de Jurkat con el uso de anticuerpos anti-ICOS de hámster. La Figura 11A muestra los resultados para diferentes versiones de Fc de anticuerpo anti-ICOS 37A10 (hG1, mG1, mG2a, mG1Agly) en las concentraciones indicadas (mg/ml). Todas las versiones de Fc del anticuerpo anti-ICOS, que incluyen la versión mG1-agly (es decir, mínima función efectora de Fc) muestran actividad en este ensayo. La Figura 11B muestra los resultados para los anticuerpos humanizados 37A10S713, 37A10S715, 37A10S716 y 37A10S718 en las concentraciones indicadas (mg/ml). Los cuatro anticuerpos humanizados analizados mostraron actividad agonista en el ensayo.

Otro formato de ensayo que muestra actividad agonista es el ensayo con PBMC con la enterotoxina B estafilocócica (SEB) como superantígeno mediante el uso de la producción de citocinas (por ejemplo, IFN γ) como lectura. Este ensayo típicamente tiene una pequeña ventana de un efecto de 1,5 - 3 veces sobre la liberación de citocinas. De acuerdo con los datos de anti-PD-1 publicados, la inducción de citocinas con los anticuerpos anti-ICOS es de ~2 veces pero se observa de manera reproducible en este ensayo a través de múltiples donantes. Véase, *por ejemplo*, Korman y otros, 2014, *Cancer Res.*, 2: 846-856. Un ensayo representativo se muestra en la Figura 12. Las PBMC congeladas de donantes saludables se estimularon con SEB y el anticuerpo anti-ICOS 37A10 soluble (con mG1, mG1-agly o hG1 Fc) en las concentraciones indicadas (mg/ml) durante 3 días. Los sobrenadantes se recogieron y los niveles de IFN γ se midieron mediante la matriz de perlas de citocinas con el uso de citometría de flujo. Los anticuerpos anti-CD28 y de isotipo IgG1 de ratón se usaron como controles. IFN γ es inducido por las PBMC después de la estimulación con SEB en presencia de anticuerpos anti-ICOS solubles. En este formato de ensayo, una versión de mG1-agly de 37A10 mostró una actividad reducida.

Para analizar cualquier posible superagonista, se empleó un ensayo en el que las células T CD4+ humanas primarias se incubaron con anticuerpos anti-ICOS solubles o unidos a la placa en ausencia de una señal 1 mediante el uso de un anticuerpo superagonista anti-CD28 conocido como control positivo. Las células T CD4 humanas activadas en ausencia de anti-CD3 proliferarán solo cuando se tratan con un anticuerpo superagonista anti-CD28 (clon CD28.2/5D10) en forma soluble, pero no cuando se tratan con hICOSL-Fc o anticuerpo anti-ICOS 37A10 (versiones Fc de hámster y hG1) o un anticuerpo anti-CD28 no superagonista (CD28.2). Ninguno de los AcM anti-ICOS analizados mostró actividad superagonista en este ensayo. En la Figura 13 se representan datos representativos.

Se establece bien que ICOS puede señalar a través de la vía de señalización de AKT (revisado en Simpson y otros, 2010, *Curr. Opin. Immunol.*, 22: 326-332). La capacidad del anticuerpo anti-ICOS para inducir la señalización a través de AKT se evaluó como un medio adicional para demostrar la actividad agonista del anticuerpo.

Las células T CD4 aisladas a partir de PBMC humanas se estimularon durante 24 horas con anti-CD3/anti-CD28, y después se dejaron en reposo durante 24 horas en medio de cultivo. Las células se incubaron después con anti-ICOS 37A10-mG2a, hICOSL-mG2a Fc o PBS durante 2, 5, 15 o 30 minutos con o sin anticuerpo reticulado anti-IgG de ratón. Después de la incubación, las células se fijaron, permeabilizaron y después se tiñeron con un anticuerpo anti-fosfo-AKT. El porcentaje de células positivas a pAKT se analizó por citometría de flujo.

Como se muestra en las Figuras 14A-B, pAKT se indujo en células T CD4 después del tratamiento con 37A10-mG2a con una cinética similar en comparación con el tratamiento con hICOSL-mG2a. La inducción de la señalización de pAKT se observó solamente en presencia del agente de reticulación secundario.

Ejemplo 6: Caracterización funcional *in vivo* de anticuerpos anti-ICOS

Los anticuerpos seleccionados de los ensayos de tamizaje descritos anteriormente se evaluaron *in vivo* mediante el uso de modelos tumorales singénicos.

El modelo de fibrosarcoma Sa1N (Ostrand-Rosenberg, 2001, Curr. Protoc. Immunol., Capítulo 20) puede usarse para evaluar anticuerpos anti-ICOS *in vivo*. El perfil inmunitario del modelo de ratón Sa1N muestra que está altamente infiltrado con células T CD4, y que las células T CD4 expresan altos niveles de ICOS. Este perfil inmunitario es similar a los perfiles inmunitarios de las muestras de pacientes con NSCLC en los que observamos altos niveles de infiltración de CD4, con la expresión de ICOS restringida en gran medida al compartimento CD4.

Un segundo modelo usado para evaluar la eficacia de los anticuerpos anti-ICOS es el modelo de carcinoma de colon CT26 (Wang y otros, 1995, J. Immunol., 9: 4685-4692). El perfil inmunitario del modelo de ratón CT26 mostró altos niveles de infiltración de CD8. Se observó la expresión de ICOS en el subconjunto de células T CD8 en este modelo. Una pequeña proporción de muestras de NSCLC humanas demuestra de manera similar la expresión de ICOS en las células T CD8.

*Formatos de anticuerpos para la evaluación *in vivo**

La IgG1 humana (hIgG1) puede unirse a múltiples receptores de Fc, que incluyen una fuerte unión a los receptores de Fc activadores que son capaces de unirse de forma cruzada con el receptor y mediar ADCC y CDC. Dada la capacidad de unirse a los receptores de Fc activadores, hIgG1 es típicamente capaz de agotar las células que expresan un alto nivel del objetivo. El equivalente de ratón más cercano a hIgG1 es IgG2a de ratón (mIgG2a). Por lo tanto, como un ejemplo, los experimentos *in vivo* para evaluar un anticuerpo agonista de ICOS con capacidad de agotamiento utilizarían mIgG2a para imitar las propiedades de hIgG1.

La IgG4 humana (hIgG4) se utiliza en situaciones terapéuticas donde no se desea el agotamiento, aunque hIgG4 es capaz de cierto nivel de agotamiento. Se encuentra aproximadamente, aunque no perfectamente, alineada con la IgG1 de ratón (mIgG1), que casi se une exclusivamente a los receptores FcγRII inhibidores, y por lo tanto es capaz de unirse de forma cruzada, aunque no es particularmente competente, en el agotamiento.

Con respecto a los anticuerpos anti-ICOS, los anticuerpos de hámster se evaluaron inicialmente *in vivo* como Ac de hámster completos. Los Ac de hámster tienen una IgG1 de hámster, que tiene características de unión a FcR similar a mIgG1. Los anticuerpos de hámster de interés se clonaron como quimeras con regiones Fc de ratón, ya sea como mIgG2a o mIgG1.

Modelo de fibrosarcoma Sa1N

El modelo *in vivo* principal usado para seleccionar candidatos a anticuerpos anti-ICOS para determinar su eficacia es el modelo de fibrosarcoma Sa1N. Por lo tanto, los anticuerpos seleccionados de los ensayos de tamizaje descritos anteriormente se evaluaron en el modelo Sa1N. En estudios iniciales, varios anticuerpos de hámster (clones 7F12, 36E10, 37A10, 16G10 y 35A9) demostraron una actividad antitumoral robusta cuando se administraron como agentes únicos a una dosis de 8 mg/kg en el modelo Sa1N. Ver la Figura 15. Se inyectaron células de fibrosarcoma Sa1N (1×10^6) por vía s.c. en el flanco derecho de ratones A/J vírgenes (6-8 semanas de edad, hembras). Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron 50-100 mm³ en el día 7, los ratones se aleatorizaron. Los ratones recibieron dosis de anticuerpo anti-ICOS de hámster (7F12, 36E10, 37A10, 16G10 y 35A9) o anticuerpo de isotipo IgG de hámster por vía i.p. en los días 7, 10, 14 y 17. El crecimiento tumoral se monitoreó dos veces por semana. N=10.

Un rasgo potencialmente beneficioso de un agente inmunoterapéutico contra el cáncer es la capacidad de levantar una respuesta inmunitaria sostenida y duradera contra el tumor. Se determinó la capacidad de un ratón tratado previamente con un anticuerpo anti-ICOS para rechazar posteriormente un tumor. Los ratones se trataron a 8 mg/kg de anticuerpo en los días 7, 10, 14 y 17. Posteriormente, los ratones que estaban libres de tumor se volvieron a implantar con un tumor el día 60. Todos los ratones tratados previamente con el anticuerpo anti-ICOS 7F12 (n=7) rechazaron el tumor recién implantado, en contraste con los ratones vírgenes (n=10) en los que los tumores crecieron en todos los ratones. Ver la Figura 16.

Los anticuerpos de hámster se clonaron como anticuerpos quiméricos con regiones Fc de ratón (mG1 o mG2a) para permitir la evaluación de la contribución de la función efectora de Fc a la actividad *in vivo*. Los ratones recibieron un total de 4 dosis bisemanalmente de 4 mg/kg de anticuerpo a partir del día 11. El anticuerpo anti-CTLA-4 se incluyó como un control positivo. El experimento de tamizaje inicial se realizó a una dosis de 4 mg/kg y se observó eficacia con ambos formatos mG1 y mG2a. En la Figura 17 se muestran datos representativos para uno de los anticuerpos de hámster, 37A10.

Modelo tumoral singénico CT26 de colon

El modelo tumoral singénico CT26 de colon se usó para evaluar la actividad de un solo agente, así como también la

terapia de combinación con anticuerpo anti-PD-1.

En el modelo CT26, varios de los anticuerpos de hámster anti-ICOS (por ejemplo, 7F12, 35A9, 36E10, 37A10) exhibieron actividad como agente único. Ver la Figura 18. El modelo CT26 también se usó para evaluar la posible actividad de combinación con anti-PD-1. Cuando los anticuerpos anti-ICOS se combinaron con un anticuerpo anti-PD-1, la eficacia antitumoral mejoró notablemente. Los ratones portadores de tumores CT26 se trataron bisemanalmente (4 dosis a partir del día 3) con anticuerpos anti-ICOS de hámster (8 mg/kg) solos o en combinación con anticuerpo anti-PD-1 (8 mg/kg). Debemos señalar que la combinación de anticuerpo anti-PD-1 con anti-ICOS 37A10 dio como resultado 9/10 ratones sin tumor. Ver la Figura 18.

Ejemplo 7: El agotamiento selectivo de las células Tregs contribuye a la eficacia de los anticuerpos anti-ICOS

Se realizaron estudios *ex vivo* para caracterizar el estado de los infiltrados de células inmunitarias después de la dosificación con anticuerpos anti-ICOS. Los estudios en el modelo Sa1N mostraron una disminución en la población de células Tregs después del tratamiento con 7F12. Los ratones recibieron dos dosis de anti-ICOS de hámster 7F12, 7F12-mG1 o 7F12-mG2a a 8 mg/kg en los días 7 y 10. Los tumores y los bazo se extrajeron y analizaron en el día 12. Hubo una reducción marcada en las células Tregs pero no en las células Tef, pero poco impacto en las poblaciones de células T en los órganos linfoides como el bazo o ganglios linfáticos. Ver la Figura 19.

También se han observado resultados similares con otros anticuerpos anti-ICOS, como 37A10. Ver la Figura 20. Los ratones recibieron dos dosis de anticuerpos anti-ICOS a 8 mg/kg en los días 7 y 10. Los tumores se extrajeron y analizaron en el día 12. Una reducción similar en la población de células Tregs también se ha observado en el modelo CT26 después de la dosificación con el anticuerpo anti-ICOS.

En conjunto, los estudios de TIL (linfocitos infiltrantes de tumores) respaldan la hipótesis de que las células Treg se agotan selectivamente por los anticuerpos anti-ICOS descritos en la presente descripción, sin el agotamiento correspondiente de las poblaciones de células Tef, y específicamente en los tumores pero no en otros órganos o en la periferia.

Para demostrar formalmente la contribución del sistema inmunitario a la eficacia del anticuerpo anti-ICOS, se realizaron experimentos de agotamiento celular en el contexto del modelo tumoral, Sa1N. Específicamente, los ratones se agotaron de células T CD8, células T CD4 o una combinación de células T CD4 + CD8. En los días 6 y 13 después de la implantación del tumor, los ratones se trataron con anti-CD8, anti-CD4, anti-CD4 + anti-CD8 o anticuerpo Ig control (n=10 por grupo). El anticuerpo anti-ICOS 7F12 se administró a 8 mg/kg de anticuerpo en los días 7, 10, 14 y 17. El crecimiento tumoral se monitoreó dos veces por semana.

Se observó una marcada reducción en la eficacia antitumoral de 7F12 cuando los ratones se agotaron de células T CD4, CD8 o CD4 + CD8. Ver la Figura 21.

Ejemplo 8: Reducción selectiva de células Treg por un anticuerpo anti-ICOS humanizado

Se incubaron PBMC humanas a 37 °C con IL-2 humana recombinante a 100 ng/ml durante 48 horas en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂. Después de 48 horas, se agregó el anticuerpo 37A10S713 a las concentraciones indicadas. El anticuerpo se preparó como diluciones en serie de 10 veces en medios de cultivo que contenían IL-2. La mezcla de anticuerpo/célula se dejó incubar unas 72 horas adicionales. Después de la incubación, las células se tiñeron para CD3, CD4, CD8, CD25 y FoxP3 mediante métodos estándar y se analizaron por citometría de flujo. La cuantificación de células Treg (CD4+ CD25+ FoxP3+) y Tef (CD4+ CD25- FoxP3-) se llevó a cabo para cada concentración y tratamiento. Los datos se normalizaron en por ciento de cada subconjunto en un grupo tratado con trastuzumab para cada concentración.

Los resultados de ese experimento se muestran en la Figura 22A. El anticuerpo 37A10S713 provocó una reducción de las células Treg dependiente de la dosis. Como se muestra en la Figura 22B, las células Tef y Treg expresaban niveles similares de ICOS después de cinco días de tratamiento con IL-2.

Ejemplo 9: Nuevo reto tumoral después del tratamiento con anticuerpo anti-ICOS

Los ratones A/J hembras de seis a ocho semanas de edad se inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho con 1×10^6 células Sa1/N en 100 ml de PBS con jeringas de tuberculina con agujas calibre 27. El crecimiento tumoral se monitoreó y el día 7, los animales se redistribuyeron en nuevas cajas después de normalizar el volumen tumoral promedio a 100-150 mm³ para cada grupo de tratamiento. Se incluyeron diez ratones en cada grupo de tratamiento. Los animales se trataron con anticuerpos mediante inyecciones intraperitoneales de 0,25 mg/kg de anticuerpo anti-ICOS (VH y VL de 37A10S713 (SEQ ID NO: 60 y 61) con una IgG2a de ratón) o un control de isotipo. La dosificación se realizó en el día 7 para una dosis única o los días 7 y 14 para 2 dosis. El crecimiento tumoral y los pesos corporales de los animales se controlaron dos veces por semana. Los ratones se sacrificaron cuando los volúmenes tumorales alcanzaron ~2000 mm³ o si existiera signos de malestar clínico como ulceraciones graves conforme al protocolo del IACUC.

La Figura 23, panel izquierdo, muestra el volumen tumoral en ratones administrados con una única dosis de anticuerpo anti-ICOS (n=10) o dos dosis de anticuerpo anti-ICOS (n=10).

5 Se realizó un experimento de un nuevo reto tumoral para evaluar la durabilidad de la respuesta. Los 7 ratones retados previamente con células Sa1/N cuyos tumores se erradicaron con una dosis única o dos dosis de 0,25 mg/kg de anticuerpo 37A10S713-mlgG2a se volvieron a retar en el flanco contralateral con células Sa1/N 10 semanas después del reto tumoral inicial. Como un control, los ratones vírgenes también se retaron con células Sa1/N (N=10). Los animales se evaluaron para determinar el crecimiento tumoral bisemanalmente.

10 Como se muestra en la Figura 23, panel derecho, ninguno de los ratones que habían tenido previamente tumores erradicados con tratamiento con anticuerpo anti-ICOS mostró crecimiento tumoral en el experimento de nuevo reto.

15 **Ejemplo 10: Expresión de ligando de ICOS (ICOSL) en ratones portadores de tumores Sa1/N y monos cangrejeros administrados con anticuerpo anti-ICOS**

Se inocularon ratones A/J hembras de ocho semanas de edad con células tumorales Sa1/N en el día cero. En el día 7, cuando los tumores alcanzaron ~100 mm³, los ratones se administraron con una dosis única de 5 o 100 mg i.p. de anticuerpo 37A10 con una IgG1 o IgG2a de ratón o un anticuerpo control de isotipo. Los ratones se administraron con una dosis posterior de anticuerpo en el día 10, y se extrajeron los tejidos (sangre, bazo y tumor) en el día 12. Después del procesamiento de los tejidos, las células se incubaron con un bloqueador de Fc al 5 % (5 % de suero normal reconstituido de rata, humano y ratón, 5 % de suero fetal bovino, 0,1 mg/ml de Ac bloqueador de Fc 2.4G2, 0,01 % de azida sódica) durante 15 min en hielo en tampón de tinción de flujo (FSB: 5 % de FBS, 0,01 % de azida sódica en PBS 1x). Después del bloqueo de Fc, las células se tiñeron con un cóctel de tinción extracelular (anti-CD45-BV510, anti-CD19-BV605, anti-ICOSLPE, colorante de viabilidad fijable eFluor 780) en FSB durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron dos veces con FSB. Las células se fijaron con solución de fijación/permeabilización durante 30 min en hielo. Las células se lavaron dos veces con tampón de permeabilización 1x, después se tiñeron con un cóctel de tinción intracelular (anti-CD3-BUV496, en tampón de permeabilización durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron dos veces con tampón de permeabilización, después se resuspendieron en solución de FSB PFA al 1,5 %. Las células se examinaron en BD Fortessa y los datos se analizaron mediante el uso del programa informático FlowJo.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo BD Fortessa. Para el análisis de la expresión de ICOSL, se analizó la tinción de ICOSL en células B CD45+ CD3- CD19+ viables. Se informan las intensidades de fluorescencia (MFI) promedio de ICOSL.

35 El anticuerpo 37A10S713 con una IgG1 humana se administró a través de una infusión intravenosa durante 1 hora a tres monos cangrejeros por grupo de dosis (0,5 mg/kg, 5 mg/kg, 75 mg/kg y vehículo solo). Se obtuvo sangre previo a la primera dosis (día 1), 48 horas después de la primera dosis (día 3), 7 días después de la primera dosis (previo a la segunda dosis; día 8) y 48 horas después de la segunda dosis (día 10). En las muestras de 95 µl de sangre total primero se bloqueó el Fc con TruStain humano 5mE durante 15 min en hielo. Después del bloqueo de Fc, se agregó 100 µl de una mezcla de anticuerpos que contenía anti-CD3 FITC, anti-CD20 PE, anti-CD14 PE/Cy7, colorante de viabilidad e780 y cinoICOSFc DyLight 650. La mezcla de sangre y anticuerpos se incubó en hielo durante 60 min. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 500 xg durante 5 min. El sobrenadante se decantó y las muestras se resuspendieron en 200 µl de tampón de tinción de FACS. Las etapas de lavado se repitieron tres veces, con resuspensión final en 200 ml de tampón de tinción + paraformaldehído al 0,1 %.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo BD Fortessa. Para el análisis de la expresión de ICOSL, se analizó la tinción de ICOSL por cinoICOS-Fc marcado con DyLight 650 en células B CD3- CD20+ viables. Las MFI de ICOSL se normalizaron con respecto al vehículo en cada punto de tiempo.

50 Los resultados de esos experimentos se muestran en las Figuras 24A y 24B. Se observó un aumento dependiente de la dosis en la expresión de ICOS-L en todos los tratamientos con anticuerpos y en las dosis y en todos los tejidos con relación a los ratones tratados con control de isotipo. Ver la Figura 24A. Similarmente, se observó un aumento dependiente de la dosis en la expresión de ICOS-L en todos los puntos de tiempo para los grupos de dosis de 0,5 y 5 mg/kg en monos cangrejeros con relación a las muestras del vehículo y previas al estudio. Ver la Figura 24B. También se observó inducción de ICOSL en el grupo de 75mg/kg, pero la expresión observada puede ser una subrepresentación debido a una posible interferencia del fármaco ya que el anticuerpo anti-ICOS es capaz de unirse al reactivo de tinción (cinoICOS-Fc).

60 El acoplamiento de ICOS y el objetivo puede evaluarse, además, según se mide mediante el ensayo de disponibilidad de receptores, por ejemplo, de la siguiente manera. Los ratones vírgenes se inyectaron por vía i.p. con el control de isotipo mlgG2a a 2,5 mg/kg o 37A10S713 con una IgG2a de ratón a 2,5 mg/kg. En varios puntos de tiempo posteriores a la inyección, se extrajo sangre en microtubos recubiertos con EDTA a mediante una extracción submandibular.

65 En la sangre completa se bloqueó el Fc mediante el uso de TruStain de ratón (BioLegend) durante 5 minutos en hielo. Después de la incubación, se agregaron 100 µl de la mezcla de anticuerpos de tinción extracelular concentrada 2x a

5 cada muestra durante 30 minutos a 4 °C. Las muestras se centrifugaron y se fijaron y permeabilizaron en tampón de tinción de Foxp3 (eBioSciences) durante 30 minutos a 4 °C. Después las muestras se centrifugaron y se resuspendieron en tinción de anticuerpo intracelular durante 30 minutos a 4 °C. Las muestras se centrifugaron y se resuspendieron en PFA al 0,1 %. Las muestras se analizaron en un BD LSRII Fortessa. Las células Tregs se identificaron como CD45+ CD3+ CD4+ Foxp3+ vivas. Las células Tef se identificaron como CD45+ CD3+ CD4+ Foxp3- vivas. Las células CD8+ se identificaron como CD45+ CD3+ CD8+ vivas. Se usó 37A10S713-mG2a marcado de manera fluorescente (conjugado con DyLight 650) como el reactivo de tinción para ICOS. La disponibilidad del receptor en cada punto de tiempo se determinó mediante el uso de la siguiente fórmula:

10
$$\% \text{ de Receptor disponible en el tiempo } t = \frac{((\text{MFI de } 37A10S713\text{-mG2aDy650 en el tiempo } t - \text{MFI de isotipo de Dy650 en el tiempo } t))}{((\text{MFI de } 37A10S713\text{-mG2aDy650preestudio} - \text{MFI de isotipoDy650preestudio}))} \times 100$$

Los resultados mostraron que después de la administración de anticuerpos anti-ICOS, los niveles de receptor libre son indetectables, lo que sugiere que los anticuerpos saturan todas las moléculas de ICOS objetivo disponibles.

15 **Ejemplo 11: Inducción de quimiocinas y citocinas de Th-1 después del tratamiento con anticuerpo anti-ICOS**

Los tumores frescos de pulmón de pacientes se obtuvieron 24 horas después de la cirugía. El tejido blando se eliminó manualmente del tumor y el tumor sólido restante se embebió en agar de baja fusión al 4 % en un molde contenedor y se permitió solidificar en hielo. El tumor incorporado en gel se cortó con vibrátomo (Leica) (velocidad: 2, frecuencia: 9) para generar cortes con un grosor de 300 µm. Si el tumor era demasiado blando y no podía cortarse por el vibrátomo, el tejido se cortó manualmente con una cuchilla.

20 Los cortes tumorales se colocaron en un filtro transwell de 40 mm (Millipore) (~1 corte/pocillo) y la unidad se movió a los pocillos de una placa de 6 pocillos, que contenía 1,5 ml de medio de cultivo tisular (RPMI completo 1640/AIM-V). El tratamiento adecuado se añadió después al medio del pocillo correspondiente. Los tratamientos incluyeron 10 mg/ml de anti-RSV hIgG1 (Lake Pharma, lote núm. 3086-849598) como un control de isotipo, anticuerpo 37A10S713 a 10 mg/ml con una IgG1 humana (SEQ ID NO: 188 y 189) o anticuerpo anti-PD-1 (IgG4) a 10 mg/ml. Las placas de replicación se prepararon para varios puntos de tiempo, en el intervalo de 6-72 horas. Las placas se colocaron en una incubadora a 37 °C, 5 % de CO₂.

25 En los puntos de tiempo deseados, los cortes tumorales se recogieron y sumergieron en RNALater (Ambion). El ARN se extrajo con un Mini kit RNeasy (Qiagen, cat#74106) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la extracción de ARN, se usó 1 mg de ARN para la transcripción inversa mediante el uso de un kit de síntesis de ADNc Bio-Rad iScript (cat#170-8891). El producto de RT se diluyó 1 a 7 y se usaron 3 µl para cada reacción de qPCR. La qPCR se llevó a cabo mediante el uso de la mezcla TaqMan Gene Expression Master Mix de Thermo Fisher Scientific (cat#4369016) con el uso de un sistema en tiempo real de Bio-Rad. Los ensayos TaqMan usados se enumeran en la Tabla 6.

40 La expresión se normalizó con respecto a CD45, donde el cambio en veces se calculó como:

$$\text{cambio en veces} = \frac{1/2^{(\text{exp.objetivo Ct} - \text{exp.CD45 Ct})}}{1/2^{(\text{Iso.objetivo Ct} - \text{Iso.CD45 Ct})}}$$

45 Tabla 6. Ensayos TaqMan de quimiocinas y citocinas

Objetivo	ID del ensayo	Fuente
CD8B	Hs00174762 ml	ThermoFisher Scientific
CSF2	Hs00929873 ml	ThermoFisher Scientific
PRF1	Hs00169473 m1	ThermoFisher Scientific
GZMA	Hs00989184 ml	ThermoFisher Scientific
GZMB	Hs00188051 m1	ThermoFisher Scientific
IL2	Hs00174114 ml	ThermoFisher Scientific
CXCL9	Hs00171065 m1	ThermoFisher Scientific
CXCL10	Hs01124251 g1	ThermoFisher Scientific
CXCL11	Hs04187682 gl	ThermoFisher Scientific
FOXP3	Hs01085834 ml	ThermoFisher Scientific

(continuación)

Objetivo	ID del ensayo	Fuente
CTLA4	Hs00175480 ml	ThermoFisher Scientific
CD45	Hs04189704_ml	ThermoFisher Scientific
CXCL13	Hs00757930 ml	ThermoFisher Scientific

Los resultados de ese experimento se muestran en la Figura 25. En el punto de tiempo de 6 horas con el tumor pulmonar 1, el anticuerpo anti-ICOS dio como resultado un aumento de la expresión de GZMa, GZMb, CSF2, IL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CXCL13. El anticuerpo anti-PD-1 también aumentó la expresión de GZMa, GZMb, CSF2, CXCL9 y CXCL10, aunque en menor medida, y mostró un aumento similar en CXCL11. Para el tumor pulmonar 2 en el punto de tiempo de 24 horas, el tratamiento con anticuerpo anti-ICOS mostró un aumento sostenido en CXCL11, y alguna continua elevación de IL2, CXCL9 y CXCL10. El anticuerpo anti-PD-1 sólo mostró una ligera elevación en CXCL11 a las 24 horas.

10 Ejemplo 12: Inducción del ligando de NKp46 en células Treg después del tratamiento con anticuerpo anti-ICOS agonista

Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron a partir de donantes humanos sanos (Research Blood Components) mediante el uso de centrifugación con Ficoll (GE Life Sciences), se congelaron en BamBanker (Wako-Chem) y se almacenaron a -150 °C hasta su uso. Las PBMC se incubaron con anticuerpo anti-ICOS soluble y anti-CD3 humano unido a la placa (1 mg/ml de recubrimiento, Biolegend, OKT3) a 37 °C en RPMI (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (Sigma-Aldrich) y 1 % de penicilina/estreptomicina (Gibco). En el ensayo se analizaron tres anticuerpos: el anticuerpo agonista fuerte 37A10S713, un anticuerpo agonista débil, y un anticuerpo antagonista débil. Después de cuatro días, las PBMC se rasparon suavemente de las placas y se lavaron con DPBS (Gibco) que contenía suero fetal bovino al 1 %, azida sódica al 0,05 % (Ricco) y EDTA 2 mM (Ambion). Las células se bloquearon después con FcX TruStain Humano (Biolegend). Para detectar el ligando de NKp46, las células se incubaron con 2 mg/ml de NKp46-hlgG1 Fc (R&D Systems, 1850-NK). Se detectó NKp46-hlgG1 Fc unido a las células mediante el uso de un anti-IgG humano conjugado con PE (Biolegend, policlonal). Las células se bloquearon de nuevo con FcX TruStain humano y después se tiñeron con anti-CD56 humano (Biolegend, Violeta brillante 711, HCD56), anti-CD16 humano (Biolegend, Violeta brillante 785, 3G8), anti-CD4 humano (Biolegend, Violeta brillante 510, OKT4), anti-CD8 humano (BD Biosciences, BUV395, RPA-T8), anti-CD25 humano (Biolegend, Violeta brillante 605, BC96), y colorante de viabilidad fijable (eBioscience, eFluor 780). Después de la tinción, las células se fijaron y permeabilizaron con Conjunto de Foxp3 / tampón de tinción para factor de transcripción (eBioscience). Después de la permeabilización, las células se tiñeron intracelularmente con anti-CD3 humano (BD Biosciences, PE-CF594, UCHT1) y anti-Foxp3 humano (eBioscience, APC, PCH101). Las células se fijaron después en paraformaldehído (Alfa Aesar). Los datos se adquirieron en un BD LSRII Fortessa y se analizaron en el programa informático FlowJo v10.1.

Los resultados de ese experimento se muestran en la Figura 26 y la Figura 27. El tratamiento con el anticuerpo agonista anti-ICOS 37A10S713 resultó en una inducción fuerte del ligando de NKp46 en células Treg de tres donantes diferentes. Ver las Figuras 26A-F (las Figuras 26A-B muestran datos del donante 1, las Figuras 26C-D muestran datos del donante 2 y las Figuras 26E-F muestran datos del donante 3). La inducción del ligando de NKp46 en las células Tef no fue tan fuerte como en las células Treg. Ver las Figuras 26A-F. Además, el tratamiento con el anticuerpo agonista anti-ICOS 37A10S713 conduce a la pérdida de CD16 (reducción de CD16) en células NK, lo que sugiere la activación de las células NK. Ver la Figura 27.

Sin pretender estar sujetos a ninguna teoría en particular, se postula que el anticuerpo agonista anti-ICOS 37A10S713 aumenta significativamente los niveles del ligando de NKp46 en las células Treg y también activa las células NK, lo que conduce a un agotamiento selectivo de las células Tregs

45 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> JOUNCE THERAPEUTICS, INC.

<120> ANTICUERPOS CONTRA ICOS

<130> 01140-0001-00PCT

<140> PCT/US16/23524

<141> 22-03-2016

<150> US 62/137.034

<151> 23-03-2015

<150> US 62/147.484
<151> 14-04-2015

5 <150> US 62/156.588
<151> 04-05-2015

<150> US 62/242.489
<151> 16-10-2015

10 <150> US 62/255.635
<151> 16-11-2015

<160> 191

15 <170> Patent In versión 3.5

<210> 1

<211> 199

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 811 345 T3

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
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

ES 2 811 345 T3

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
- <213> *Mus musculus*
- <400> 3

5

ES 2 811 345 T3

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
 <213> *Mus musculus*
 <400> 4

5

ES 2 811 345 T3

Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met Phe Ser Phe His Asn Gly
 1 5 10 15
 Gly Val Gln Ile Ser Cys Lys Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln Leu Lys
 20 25 30
 Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu Val Leu Cys Glu Leu Thr Lys Thr
 35 40 45
 Lys Gly Ser Gly Asn Ala Val Ser Ile Lys Asn Pro Met Leu Cys Leu
 50 55 60
 Tyr His Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu Asn Asn Pro Asp
 65 70 75 80
 Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser Leu Ser Ile Phe Asp Pro
 85 90 95
 Pro Pro Phe Gln Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu His 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 Val Val Leu Leu Phe Gly Cys Ile Leu Ile Ile Trp
 130 135 140
 Phe Ser Lys Lys Lys Tyr Gly 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 Val Thr Ser
 180

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

5

ES 2 811 345 T3

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
 <213> *Macaca fascicularis*

5

<400> 6

ES 2 811 345 T3

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

5 <400> 7
 000

<210> 8

10 <400> 8
 000

<210> 9

15 <400> 9
 000

<210> 10

ES 2 811 345 T3

<211> 117
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*

5 <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

10 <210> 11
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*

15 <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

ES 2 811 345 T3

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

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

<400> 12

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

15 <210> 13
<211> 17
<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

20 **Gly**

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mesocricetus auratus*

25 <400> 14

Trp Gly Arg Tyr Ala Phe Asp Ser
1 5

30 <210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> *Mesocricetus auratus*

35 <400> 15

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

<210> 16

ES 2 811 345 T3

<211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*

5 <400> 16

Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
 1 5

10 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*

15 <400> 17

Gln His His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr
 1 5

20 <210> 18
 <400> 18
 000

25 <210> 19
 <400> 19
 000

30 <210> 20
 <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

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

ES 2 811 345 T3

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> 21
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*

5

<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

10

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*

15

<400> 22

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

20

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*

25

<400> 23

ES 2 811 345 T3

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

Gly

5 <210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*
 <400> 24

Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser
 1 5

10
 15 <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

20
 25 <210> 26
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*
 <400> 26

Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
 1 5

30 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*
 35 <400> 27

His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
 1 5

40 <210> 28
 <400> 28
 000
 45 <210> 29
 <400> 29
 000
 50 <210> 30
 <211> 117
 <212> PRT

ES 2 811 345 T3

<213> *Mesocricetus auratus*

<400> 30

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

5

<210> 31

<211> 111

<212> PRT

10 <213> *Mesocricetus auratus*

<400> 31

ES 2 811 345 T3

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
 <213> *Mesocricetus auratus*

<400> 32

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

<210> 33
 <211> 17
 <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
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*

<400> 34

Trp Gly Arg Phe Ala Phe Asp Ser
 1 5

ES 2 811 345 T3

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
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*

<400> 42

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

Gly

<210> 44
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*

<400> 44

Trp Gly Arg Phe Ala Phe Asp Ser
 1 5

ES 2 811 345 T3

5 <210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*

<400> 45

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

10 <210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*

15 <400> 46

Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
 1 5

20 <210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*

25 <400> 47

His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
 1 5

30 <210> 48
 <400> 48
 000

35 <210> 49
 <400> 49
 000

40 <210> 50
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*

45 <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

ES 2 811 345 T3

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

5 <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

10 <210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> *Mesocricetus auratus*

ES 2 811 345 T3

<400> 52

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

5 <210> 53
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mesocricetus auratus*

10 <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*

20 <400> 54

Trp Gly His Tyr Ala Phe Asp Ser
1 5

25 <210> 55
<211> 15
<212> PRT
<213> *Mesocricetus auratus*

<400> 55

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

35 <210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mesocricetus auratus*

<400> 56

Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

40 <210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mesocricetus auratus*

45 <400> 57

Gln His His Tyr Ser Ser Pro Pro Thr
1 5

50 <210> 58

ES 2 811 345 T3

<400> 58
000

5 <210> 59

<400> 59
000

10 <210> 60
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Región variable de cadena pesada de 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

20

<210> 61
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de 37A10S713

30 <400> 61

ES 2 811 345 T3

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
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> CDR1 de VH de 37A10S713

10

<400> 62

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

<210> 63
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> CDR2 de VH de 37A10S713

20

<400> 63

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

Gly

25

<210> 64
<211> 8

ES 2 811 345 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> CDR3 de VH de 37A10S713

<400> 64

Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser
 1 5

10 <210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> CDR1 de VL de 37A10S713

20 <400> 65

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

25 <210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> CDR2 de VL de 37A10S713

<400> 66

Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
 1 5

35 <210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> CDR3 de VL de 37A10S713

<400> 67

His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
 1 5

45 <210> 68

50 <400> 68
 000

<210> 69

55 <400> 69
 000

<210> 70

ES 2 811 345 T3

<211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Región variable de cadena pesada de 37A10S714
 <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

10
 15 <210> 71
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena ligera de 37A10S714

20 <400> 71

ES 2 811 345 T3

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
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR1 de VH de 37A10S714

<400> 72

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

<210> 73
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 de VH de 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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 811 345 T3

<220>
<223> CDR3 de VH de 37A10S714

<400> 74

5

Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser
1 5

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> CDR1 de 37A10S714

15

<400> 75

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

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> 37A10S714 CDR2

25

<400> 76

Tyr Ala Ser Thr Arg Glu Thr
1 5

30

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> 37A10S714 CDR3

40

<400> 77

His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
1 5

<210> 78

45

<400> 78
000

<210> 79

50

<400> 79
000

<210> 80
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55

ES 2 811 345 T3

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de 37A10S715

<400> 80

5

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

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera de 37A10S715

15

<400> 81

ES 2 811 345 T3

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

5 <210> 82
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR1 de VH de 37A10S715
 <400> 82

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

15 <210> 83
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de VH de 37A10S715
 <400> 83

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

25 Gly
 <210> 84
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

ES 2 811 345 T3

<220>
<223> CDR3 de VH de 37A10S715

5 <400> 84

Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser
1 5

10 <210> 85
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> CDR1 de 37A10S715

<400> 85

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

20 <210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> CDR2 de 37A10S715

<400> 86

30 **Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr**
1 5

35 <210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> CDR3 de 37A10S715

<400> 87

His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
1 5

45 <210> 88

<400> 88
000

50 <210> 89

<400> 89
000

55 <210> 90
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 811 345 T3

<220>
 <223> Región variable de cadena pesada de 37A10S716

5 <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

10 <210> 91
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera de 37A10S716

<400> 91

ES 2 811 345 T3

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

5 <210> 92
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR1 de VH de 37A10S716
 <400> 92

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

15 <210> 93
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de VH de 37A10S716
 <400> 93

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

25 Gly
 <210> 94
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

ES 2 811 345 T3

<220>
<223> CDR3 de VH de 37A10S716

<400> 94

5

Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser
1 5

<210> 95
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> CDR1 de VL de 37A10S716

15

<400> 95

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

<210> 96
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> CDR2 de VL de 37A10S716

25

<400> 96

Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

30

<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> CDR3 de VL de 37A10S716

<400> 97

40

His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
1 5

<210> 98

45

<400> 98
000

<210> 99

50

<400> 99
000

<210> 100
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55

ES 2 811 345 T3

<220>
 <223> Región variable de cadena pesada de 37A10S717

5 <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

10 <210> 101
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera de 37A10S717

<400> 101

ES 2 811 345 T3

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
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR1 de VH de 37A10S717

<400> 102

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

<210> 103
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 de VH de 37A10S717

<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

ES 2 811 345 T3

<210> 110
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Región variable de cadena pesada de 37A10S718

<400> 110

10

```

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
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Región variable de cadena ligera de 37A10S718

20

<400> 111

```

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

ES 2 811 345 T3

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

5 <210> 112
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR1 de VH de 37A10S718
 <400> 112

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

15 <210> 113
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de VH de 37A10S718
 <400> 113

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

25 Gly
 <210> 114
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR3 de VH de 37A10S718
 35 <400> 114

ES 2 811 345 T3

Trp Gly Arg Phe Gly Phe Asp Ser
1 5

5 <210> 115
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR1 de VL de 37A10S718
 <400> 115

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

15 <210> 116
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de VL de 37A10S718
 <400> 116

Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr
1 5

25 <210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> CDR3 de VL de 37A10S718
 <400> 117

His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
1 5

40 <210> 118
 <400> 118
 000

45 <210> 119
 <400> 119
 000

50 <210> 120
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Región variable de cadena pesada de 16G10S71
 <400> 120

ES 2 811 345 T3

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> 121
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena ligera de 16G10S71

<400> 121

ES 2 811 345 T3

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
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR1 de VH de 16G10S71
 <400> 122

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

<210> 123
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 de VH de 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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 811 345 T3

<220>
<223> CDR3 de VH de 16G10S71

5 <400> 124

Trp Gly His Tyr Ala Phe Asp Ser
1 5

<210> 125
<211> 15
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR1 de VL de 16G10S71

15 <400> 125

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

20 <210> 126
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> CDR2 de VL de 16G10S71

<400> 126

Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

30 <210> 127
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR3 de VL de 16G10S71

40 <400> 127

Gln His His Tyr Ser Ser Pro Pro Thr
1 5

45 <210> 128
<400> 128
000

50 <210> 129
<400> 129
000

55 <210> 130
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 811 345 T3

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de 16G10S72

<400> 130

5

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

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera de 16G10S72

15

<400> 131

ES 2 811 345 T3

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

5 <210> 132
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR1 de VH de 16G10S72
 <400> 132

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

15 <210> 133
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de VH de 16G10S72
 <400> 133

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

25 **Gly**
 30 <210> 134
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 811 345 T3

<220>
<223> CDR3 de VH de 16G10S72

<400> 134

5

Trp Gly His Tyr Ala Phe Asp Ser
1 5

<210> 135
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> CDR1 de VL de 16G10S72

15

<400> 135

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

<210> 136
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> CDR2 de VL de 16G10S72

25

<400> 136

Tyr Ala Ser Thr Arg Glu Thr
1 5

30

<210> 137
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> CDR3 de VL de 16G10S72

<400> 137

40

Gln His His Tyr Ser Ser Pro Pro Thr
1 5

<210> 138

45

<400> 138
000

<210> 139

50

<400> 139
000

<210> 140
<211> 117
<212> PRT

55

ES 2 811 345 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de 16G10S73

5

<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

10 <210> 141

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Región variable de cadena ligera de 16G10S73

<400> 141

ES 2 811 345 T3

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

5 <210> 142
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR1 de VH de 16G10S73
 <400> 142

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

15 <210> 143
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de VH de 16G10S73
 <400> 143

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

25 Gly
 <210> 144
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

ES 2 811 345 T3

<220>
<223> CDR3 de VH de 16G10S73

5 <400> 144

Trp Gly His Tyr Ala Phe Asp Ser
1 5

10 <210> 145
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> CDR1 de VL de 16G10S73

<400> 145

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

20 <210> 146
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> CDR2 de VL de 16G10S73

<400> 146

30

Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr
1 5

35 <210> 147
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> CDR3 de VL de 16G10S73

<400> 147

Gln His His Tyr Ser Ser Pro Pro Thr
1 5

45 <210> 148

<400> 148
000

50 <210> 149

<400> 149
000

55 <210> 150
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 811 345 T3

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de 16G10S83

5 <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

10 <210> 151
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera de 16G10S83

<400> 151

ES 2 811 345 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> CDR1 de VH de 16G10S83

<400> 152

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

15 <210> 153

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> CDR2 de VH de 16G10S83

<400> 153

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

Gly

25

<210> 154

<211> 8

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

ES 2 811 345 T3

<220>
<223> CDR3 de VH de 16G10S83

5 <400> 154

Trp Gly His Tyr Ala Phe Asp Ser
1 5

10 <210> 155
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> CDR1 de VL de 16G10S83

<400> 155

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

20 <210> 156
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> CDR2 de VL de 16G10S83

<400> 156

30

Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr
1 5

35 <210> 157
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> CDR3 de VL de 16G10S83

<400> 157

Gln His His Tyr Ser Ser Pro Pro Thr
1 5

45 <210> 158

<400> 158
000

50 <210> 159

<400> 159
000

55 <210> 160
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 811 345 T3

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de 35A9S79

5 <400> 160

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

10

<210> 161

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Región variable de cadena ligera de 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

20

ES 2 811 345 T3

Trp Gly Arg Phe Ala Phe Asp Ser
1 5

5 <210> 165
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR1 de VL de 35A9S79
 <400> 165

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

15 <210> 166
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de VL de 35A9S79
 <400> 166

Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr
1 5

25 <210> 167
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> CDR3 de VL de 35A9S79
 <400> 167

His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
1 5

40 <210> 168
 <400> 168
 000

45 <210> 169
 <400> 169
 000

50 <210> 170
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Región variable de cadena pesada de 35A9S710
 <400> 170

ES 2 811 345 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Región variable de cadena ligera de 35A9S710

<400> 171

ES 2 811 345 T3

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
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR1 de VH de 35A9S710
 <400> 172

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

<210> 173
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 de VH de 35A9S710
 <400> 173

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

Gly

<210> 174
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR3 de VH de 35A9S710

ES 2 811 345 T3

<400> 174

Trp Gly Arg Phe Ala Phe Asp Ser
1 5

5

<210> 175
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> CDR1 de VL de 35A9S710

15

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

20

<210> 176
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> CDR2 de VL de 35A9S710
 <400> 176

Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

30

<210> 177
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> CDR3 de VL de 35A9S710
 <400> 177

His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
1 5

40

<210> 178

45

<400> 178
 000

<210> 179

50

<400> 179
 000

55

<210> 180
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena pesada de 35A9S89

ES 2 811 345 T3

<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

5

- <210> 181
- <211> 111
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

10

- <220>
- <223> Región variable de cadena ligera de 35A9S89

15

<400> 181

ES 2 811 345 T3

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

5 <210> 182
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR1 de VH de 35A9S89
 <400> 182

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

15 <210> 183
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de VH de 35A9S89
 <400> 183

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

25 Gly
 <210> 184
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

ES 2 811 345 T3

<220>
<223> CDR3 de VH de 35A9S89

5 <400> 184

Trp Gly Arg Phe Ala Phe Asp Ser
1 5

10 <210> 185
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> CDR1 de VL de 35A9S89

<400> 185

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

20 <210> 186
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> CDR2 de VL de 35A9S89

<400> 186

30

Tyr Ala Ser Thr Arg Gln Thr
1 5

35 <210> 187
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> CDR3 de VL de 35A9S89

<400> 187

His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
1 5

45 <210> 188
<211> 447
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cadena pesada de IgG1 humana 37A10S713

<400> 188

ES 2 811 345 T3

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

ES 2 811 345 T3

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

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera kappa humana de 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

ES 2 811 345 T3

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
5 <212> PRT
<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

ES 2 811 345 T3

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

- 5 <210> 191
- <211> 180
- <212> PRT
- <213> *Rattus norvegicus*

- 10 <400> 191

ES 2 811 345 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a ICOS, en donde el anticuerpo comprende (a) HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62; (b) HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63; (c) HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64; (d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65; (e) LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66; y (f) LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, y en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana o una región constante de cadena pesada de IgG3 humana.
2. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena ligera (V_L), en donde la V_H es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 y la V_L es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61.
3. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena ligera (V_L), en donde la V_H comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 y la V_L comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61.
4. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana.
5. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
6. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 188 o una variante biológicamente activa de esta en donde uno o más residuos de aminoácidos se añaden o eliminan en el extremo N o C terminal del polipéptido; y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 189 o una variante biológicamente activa de esta en donde uno o más residuos de aminoácidos se añaden o eliminan en el N o C terminal del polipéptido.
7. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 188 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 189.
8. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la administración del anticuerpo a un mamífero da como resultado: (a) un aumento en las células T efectoras (Tef) en el mamífero, y/o (b) la activación de las células T efectoras (Tef) en el mamífero, y/o (c) una disminución en las células T reguladoras (Treg) en el mamífero; en donde las células Tef son opcionalmente células T CD4+ FoxP3- o células T CD4+ FoxP3- y células T CD8+ o células T CD8+; y en donde las células Treg son opcionalmente células T CD4+ FoxP3+.
9. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el ácido nucleico está comprendido opcionalmente en un vector.
10. Una célula huésped que comprende el vector de conformidad con la reivindicación 9, o que produce el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
11. Un método para producir un anticuerpo anti-ICOS, que comprende cultivar la célula huésped de conformidad con la reivindicación 10 en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y recuperar el anticuerpo producido por la célula huésped.
12. Un anticuerpo anti-ICOS que se puede producir por el método de conformidad con la reivindicación 11.
13. El anticuerpo anti-ICOS de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y 12 para usar en un método para tratar un cáncer en un mamífero.
14. El anticuerpo anti-ICOS para usar de conformidad con la reivindicación 13, en donde el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma de células renales (RCC), cáncer gástrico, cáncer de vejiga, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), y cáncer de mama triple negativo (TNBC).
15. El anticuerpo anti-ICOS para usar de conformidad con la reivindicación 13 o la reivindicación 14, que es para usar con al menos un agente terapéutico adicional, en donde el agente terapéutico adicional se selecciona opcionalmente de un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo anti-PD-L1, o es opcionalmente una vacuna contra el cáncer, y en donde la vacuna contra el cáncer se selecciona opcionalmente de una vacuna de ADN, una vacuna de virus modificado genéticamente, una vacuna de células tumorales modificadas genéticamente, y una vacuna contra el cáncer desarrollada mediante el uso de neoantígenos.

16. El anticuerpo anti-ICOS para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde el mamífero es un ser humano.
- 5 17. El anticuerpo anti-ICOS para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en donde se ha determinado que una muestra del cáncer expresa ICOS, en donde la muestra opcionalmente muestra una tinción de ICOS de 1+, 2+ o 3+ mediante inmunohistoquímica (IHC).
- 10 18. El anticuerpo anti-ICOS para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en donde se ha determinado que la muestra tiene un nivel bajo de PD-L1, o es negativa para PD-L1, o tiene un nivel elevado de PD-L1, en donde los niveles de PD-L1 se determinan opcionalmente mediante el uso de IHC.

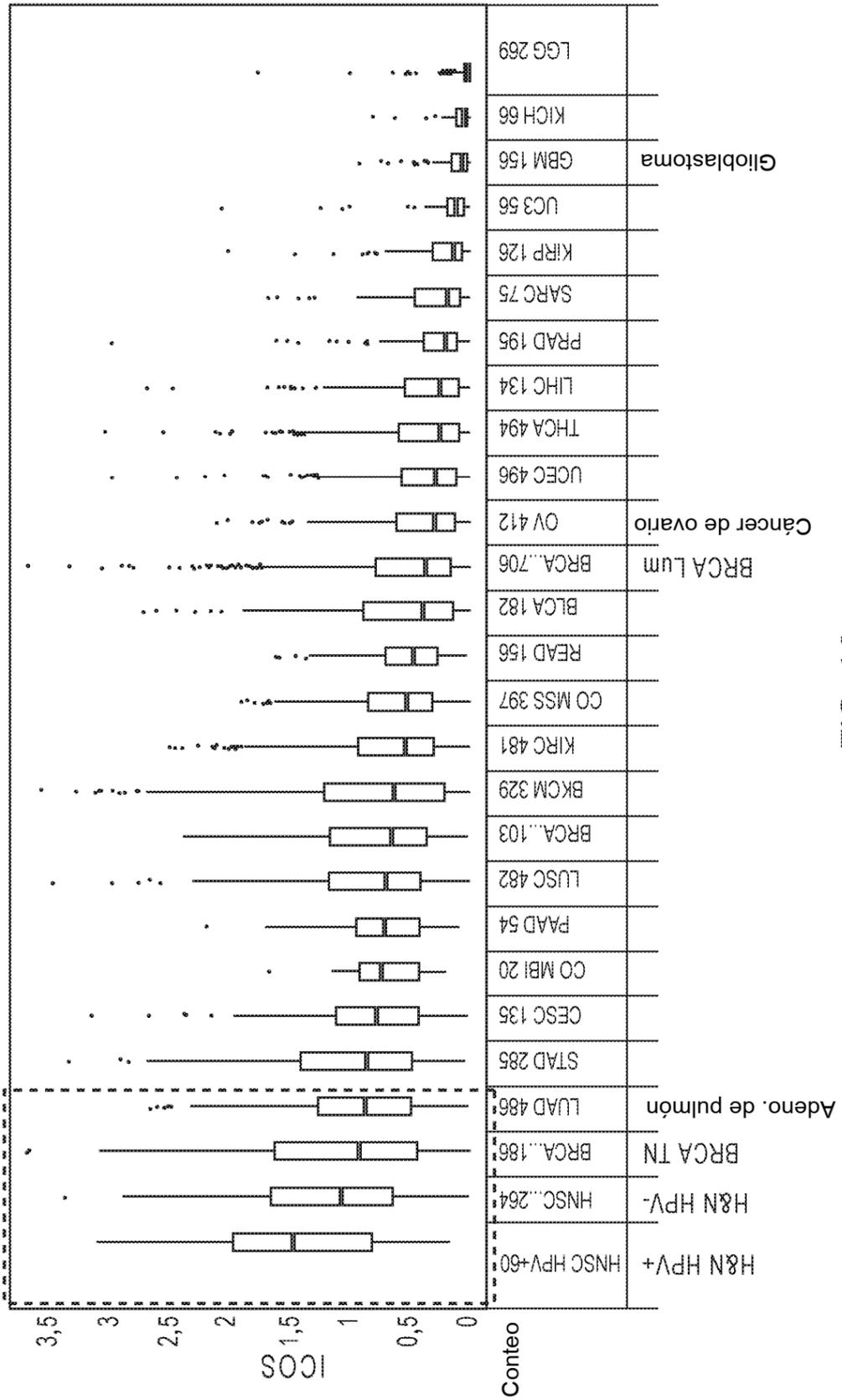


FIG. 1A

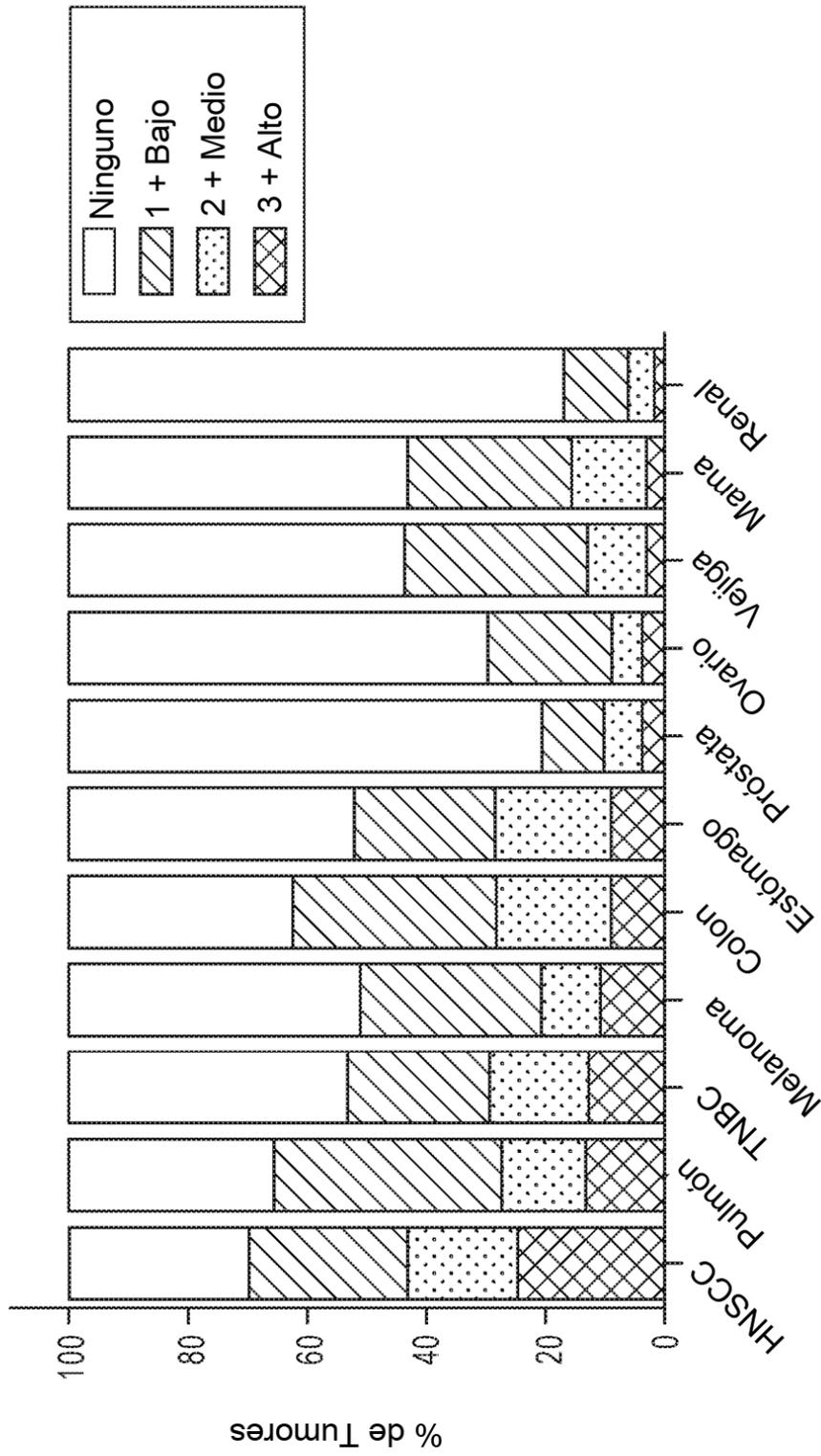


FIG. 1B

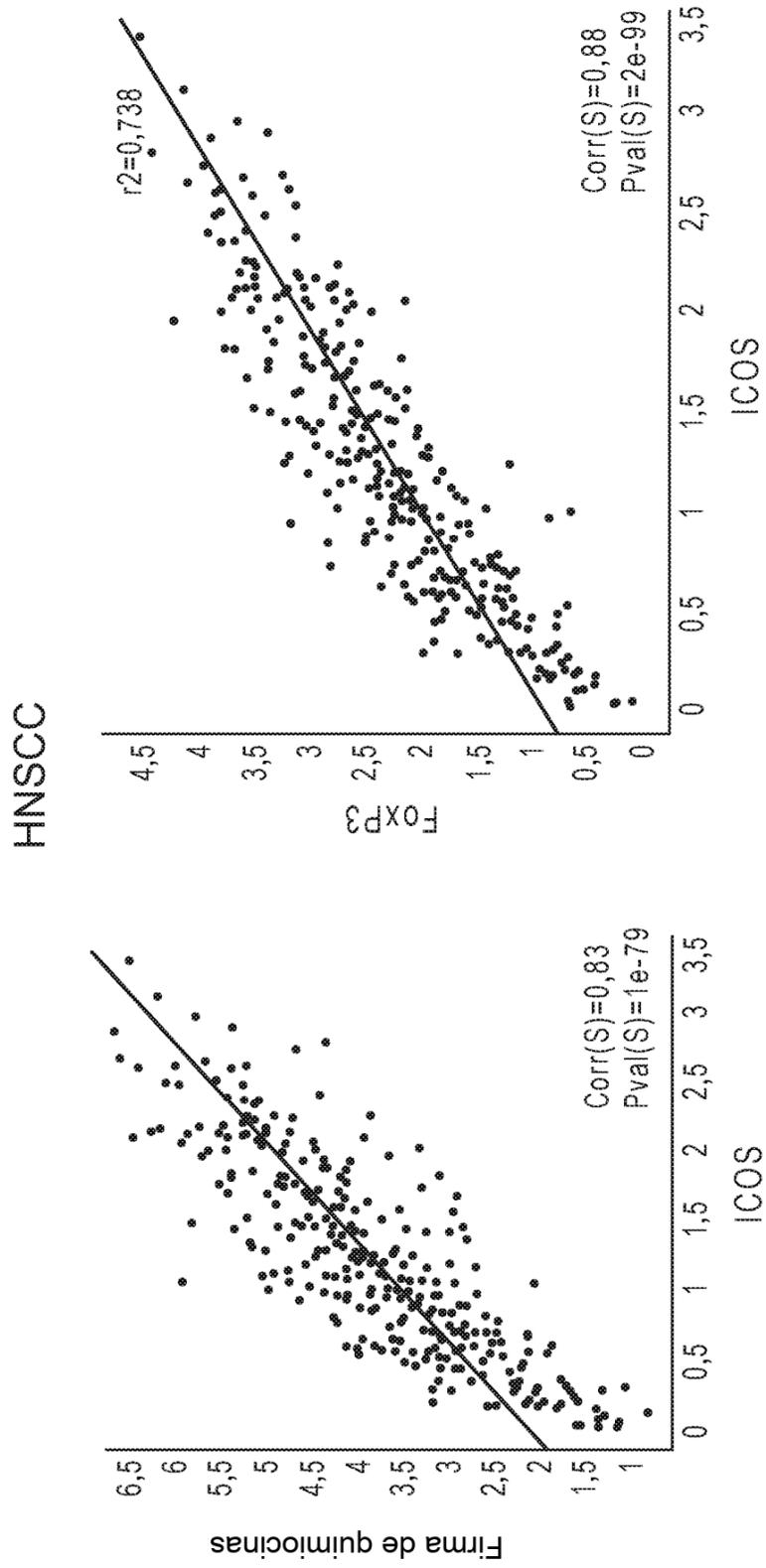


FIG. 2

HNSCC

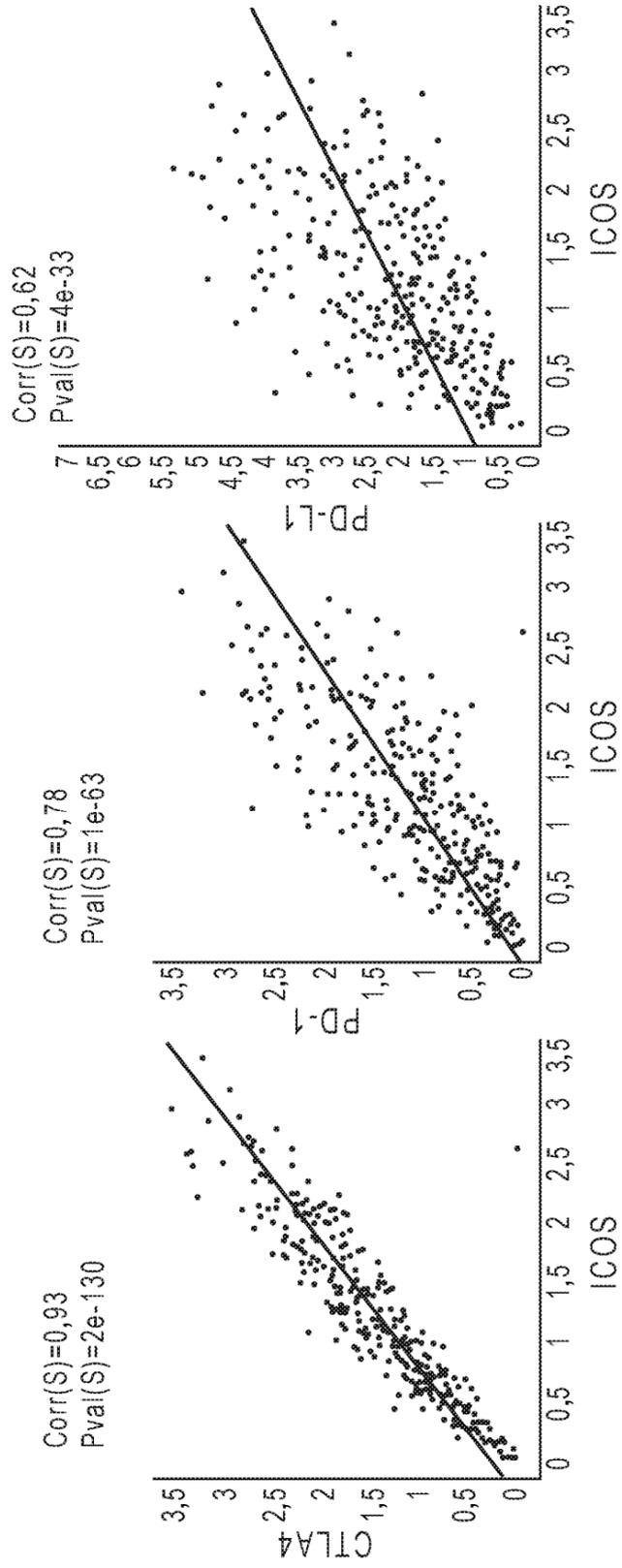


FIG. 3

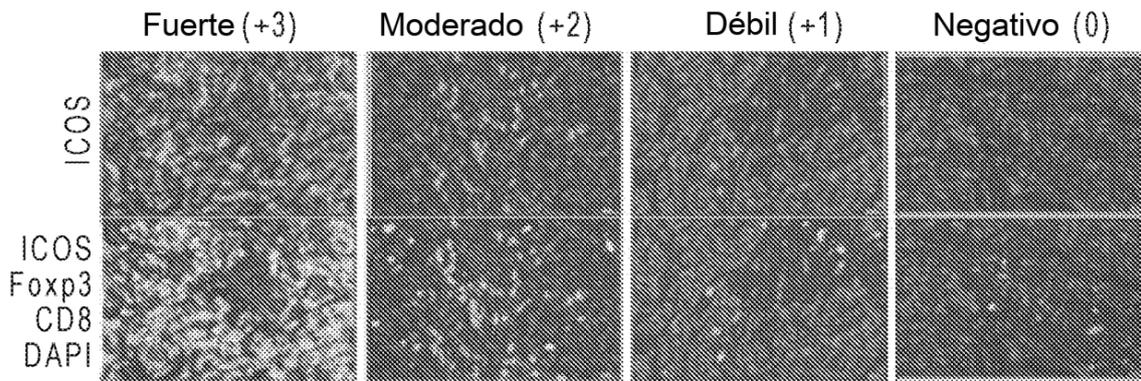


FIG. 4

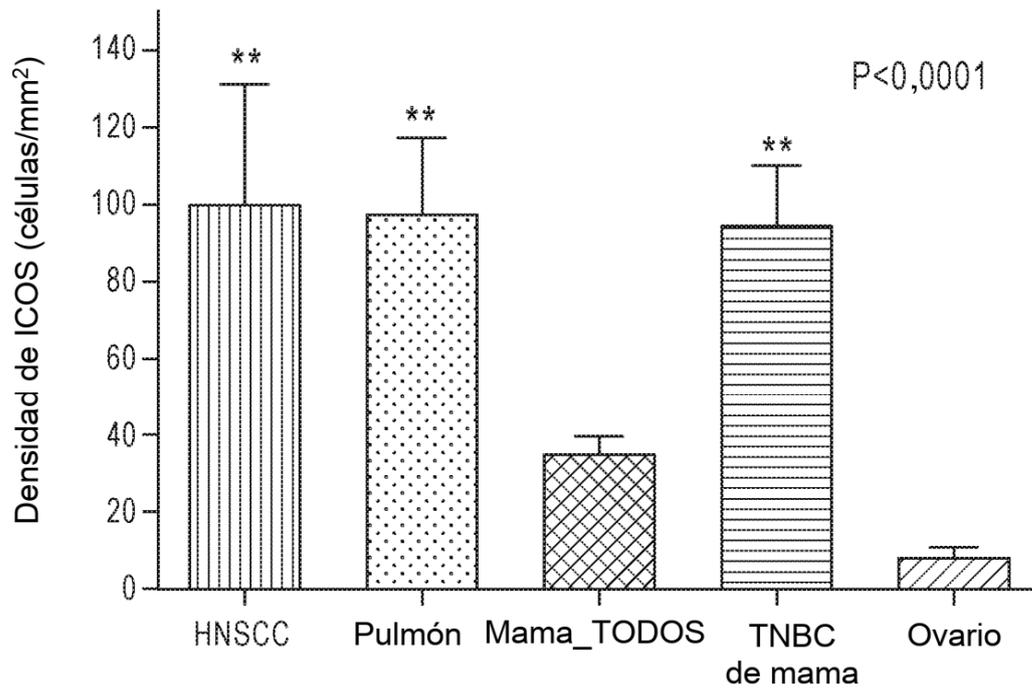


FIG. 5

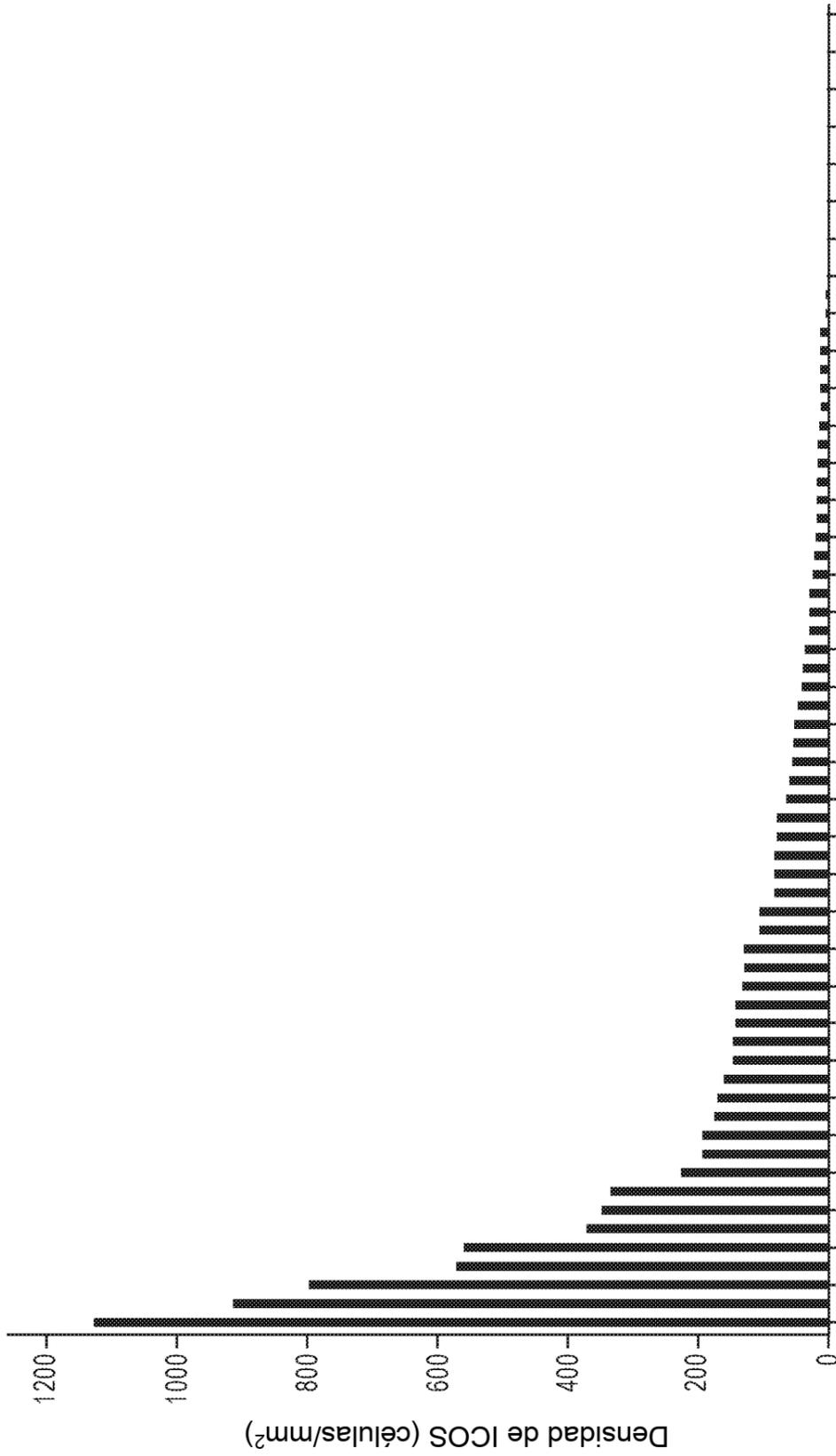


FIG. 6A

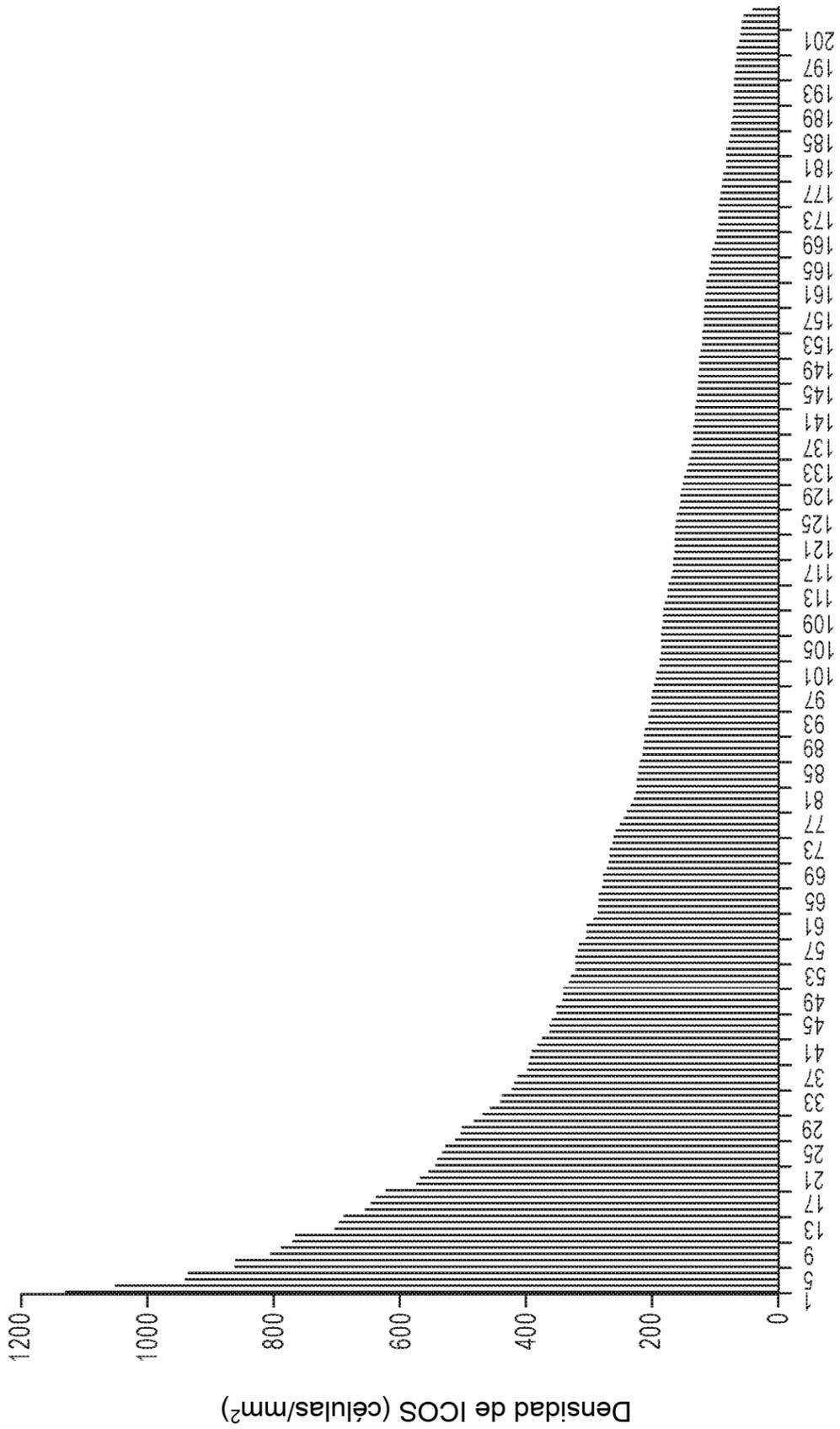


FIG. 6B

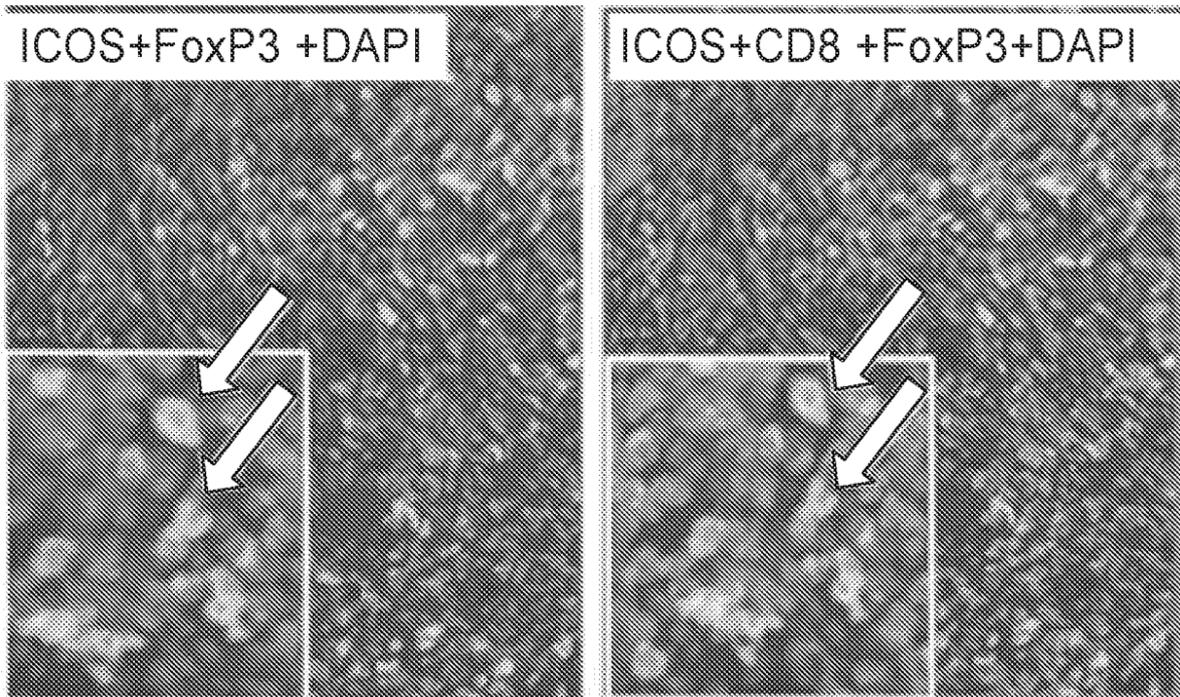


FIG. 7A

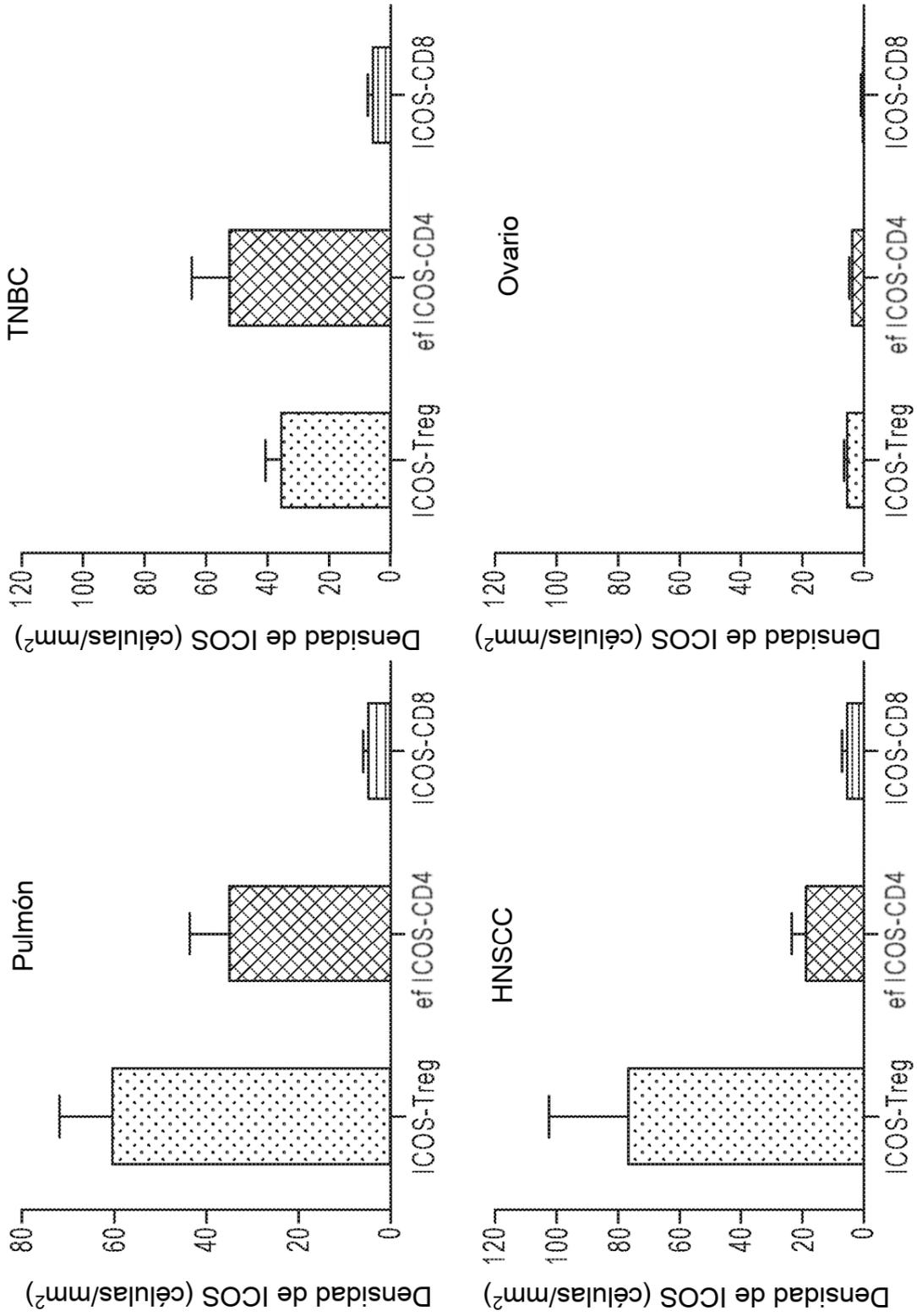


FIG. 7B

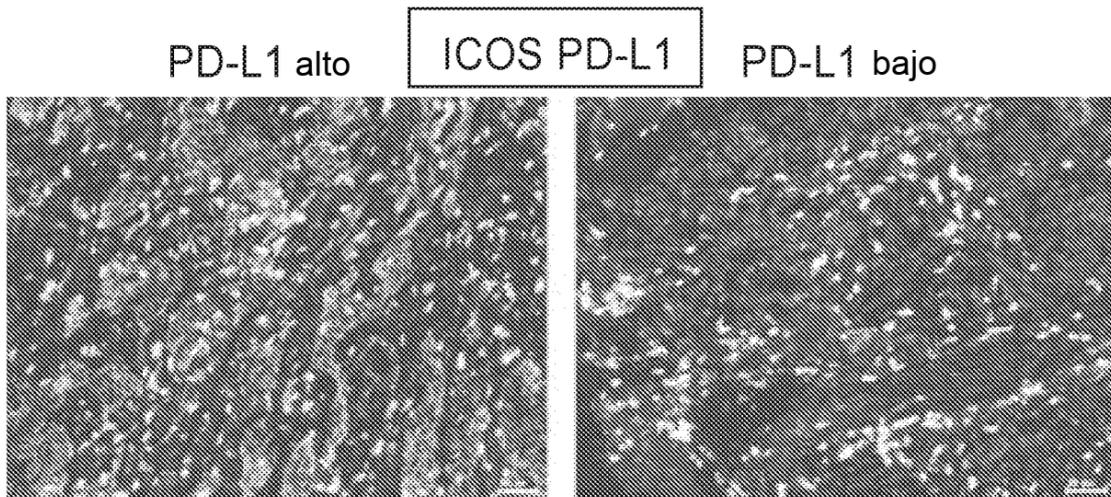


FIG. 8A

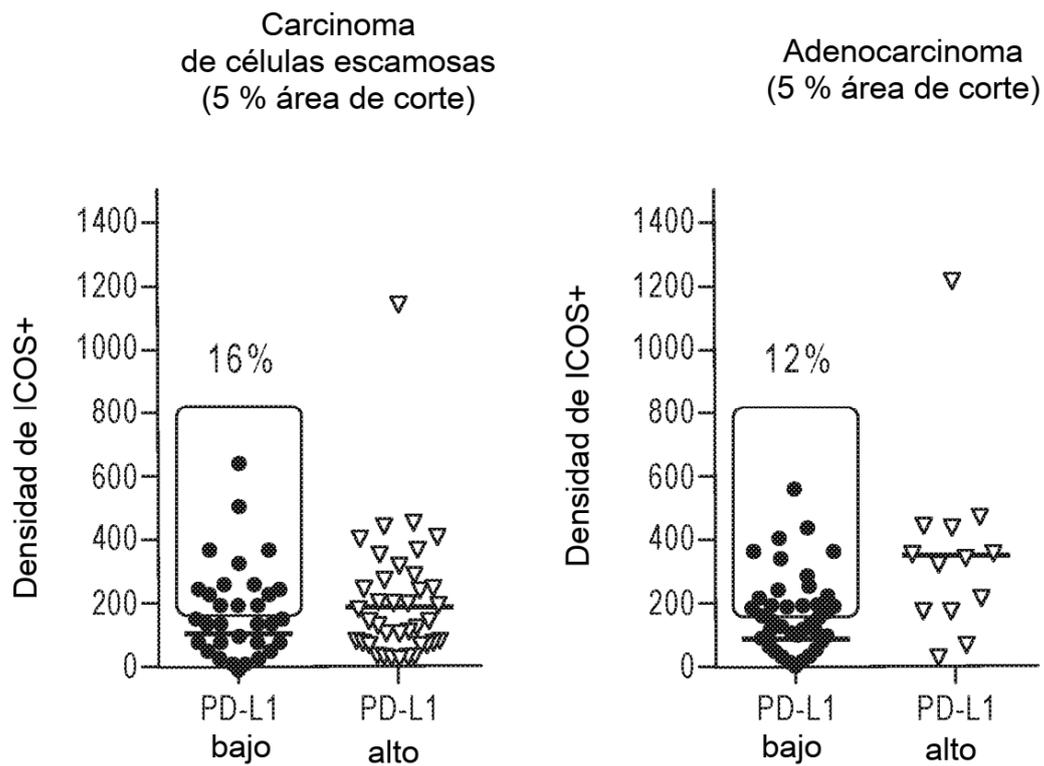


FIG. 8B

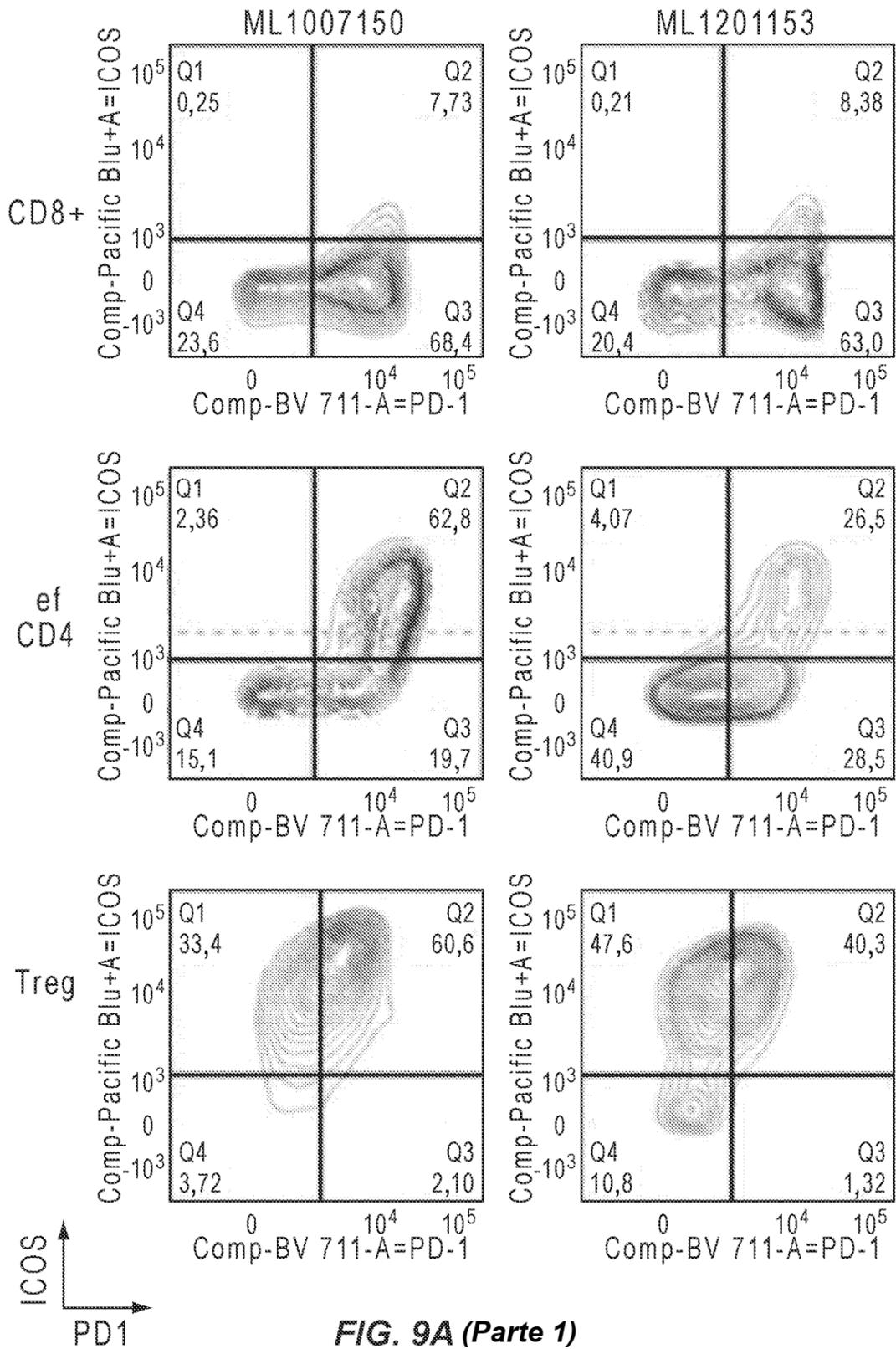


FIG. 9A (Parte 1)

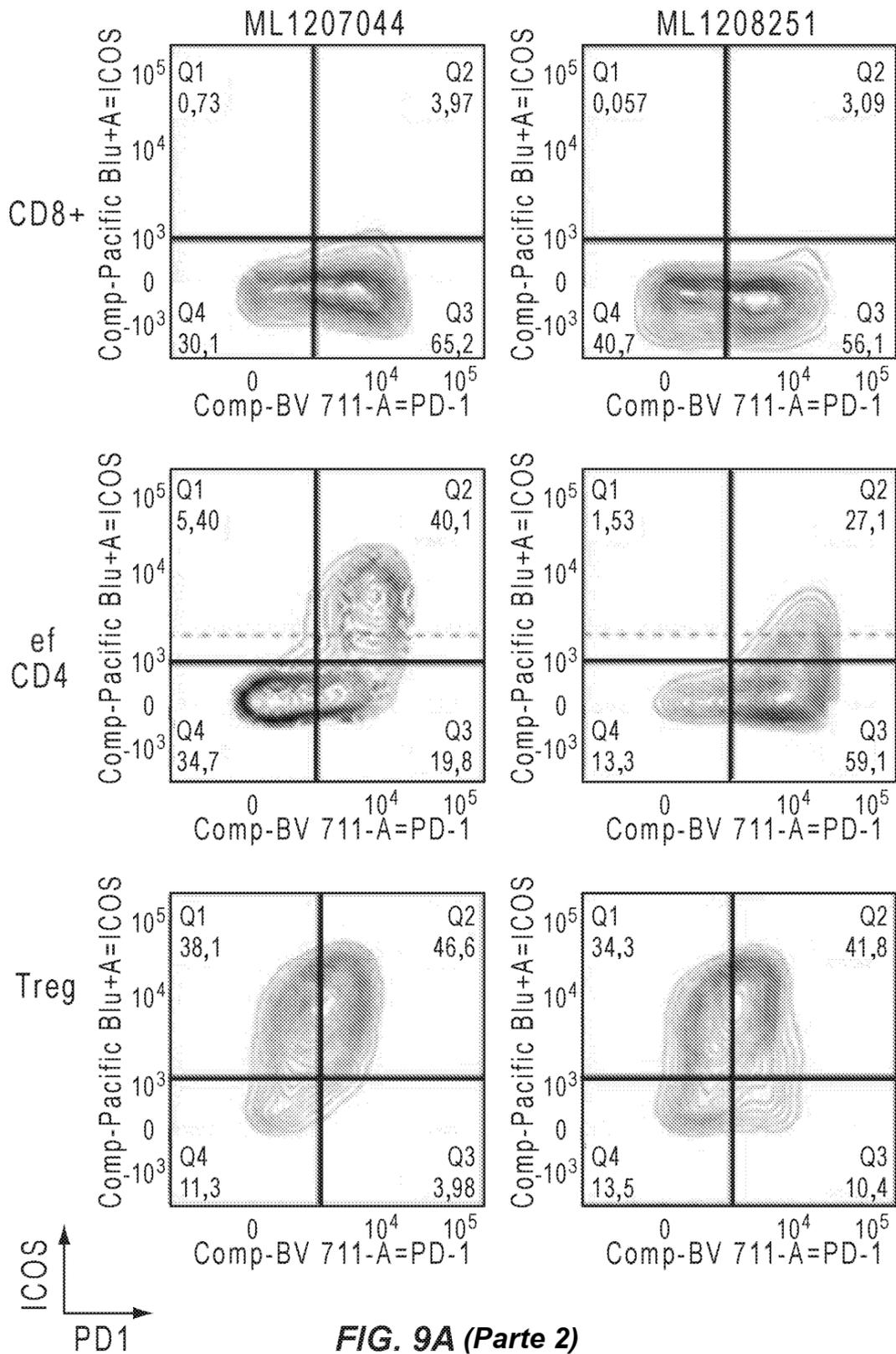


FIG. 9A (Parte 2)

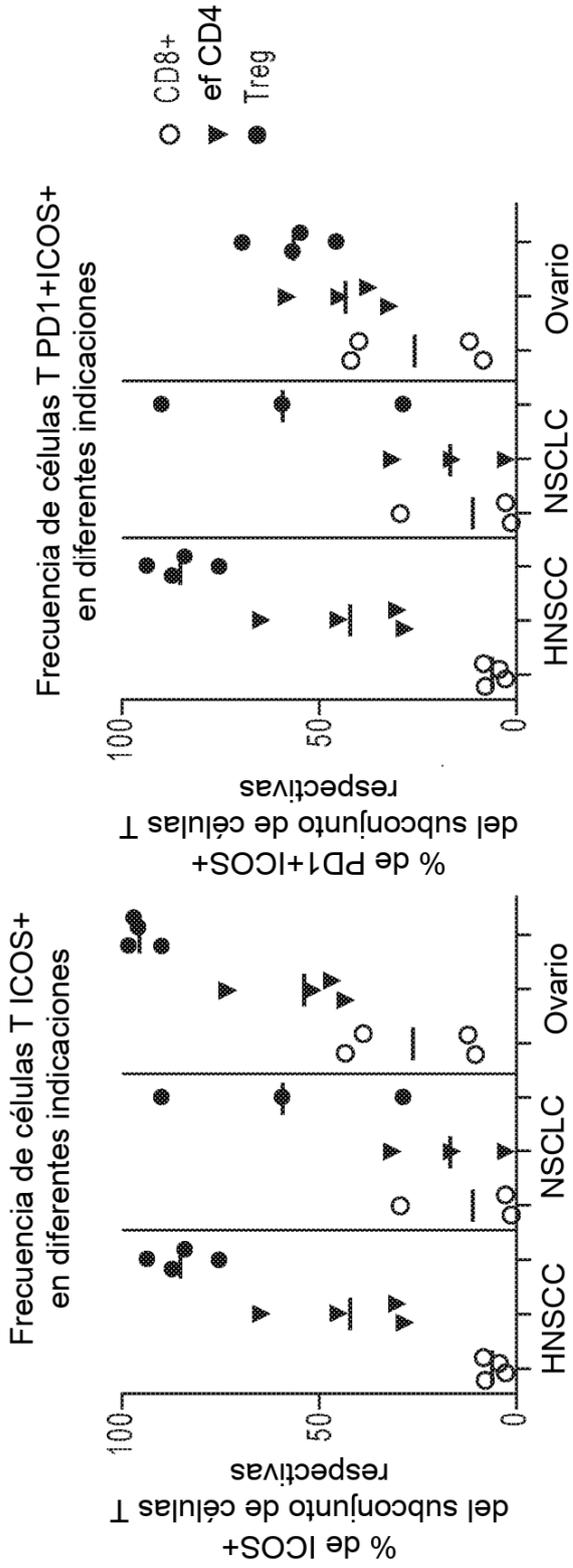


FIG. 9B

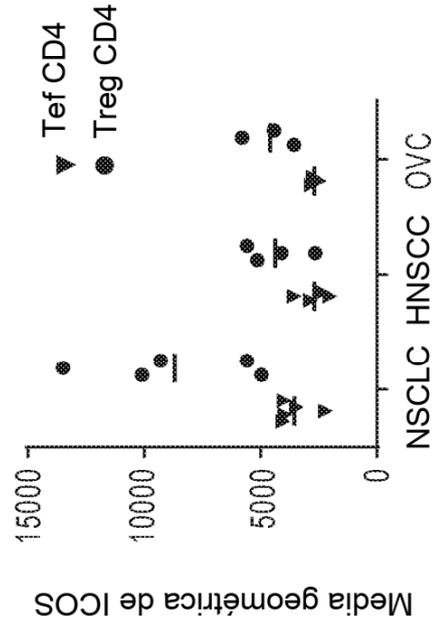


FIG. 9C

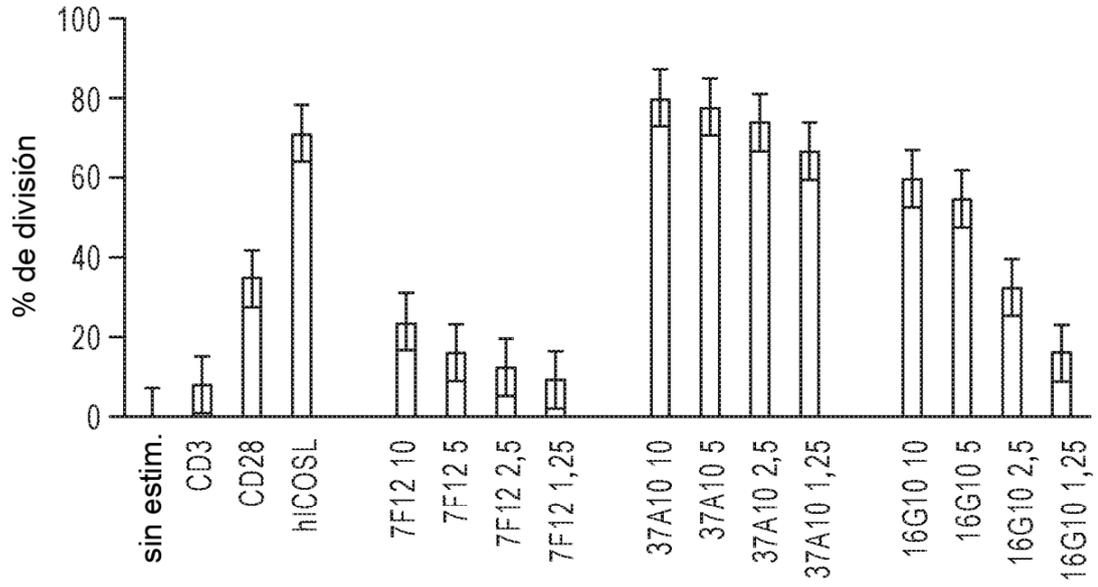


FIG. 10A

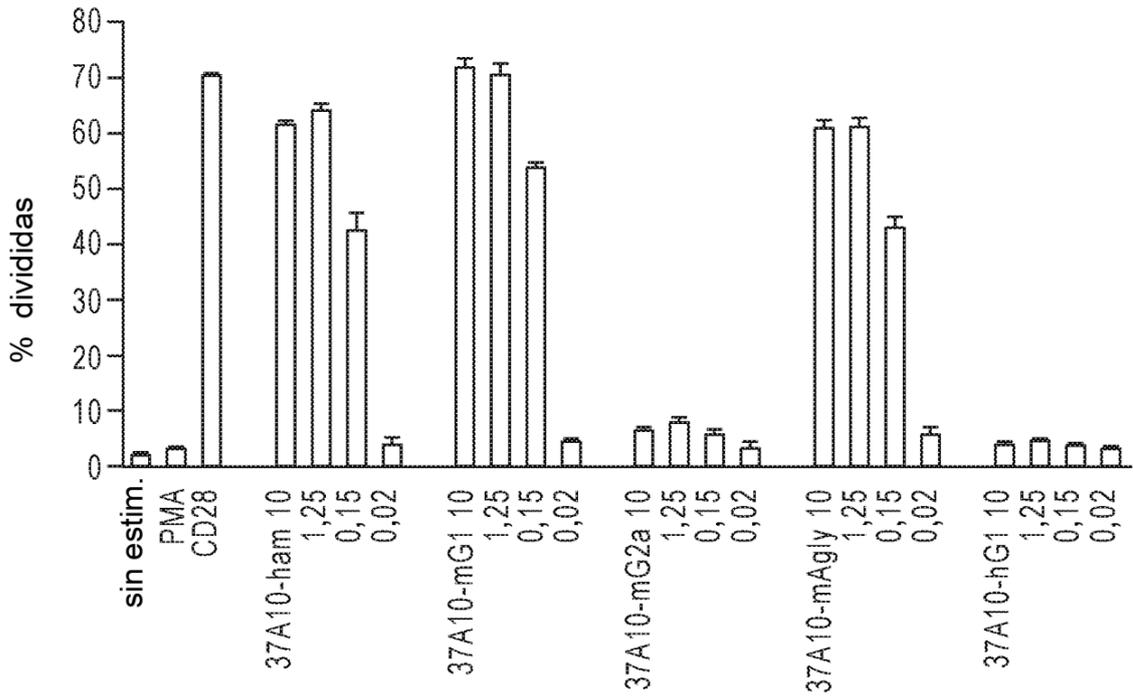


FIG. 10B

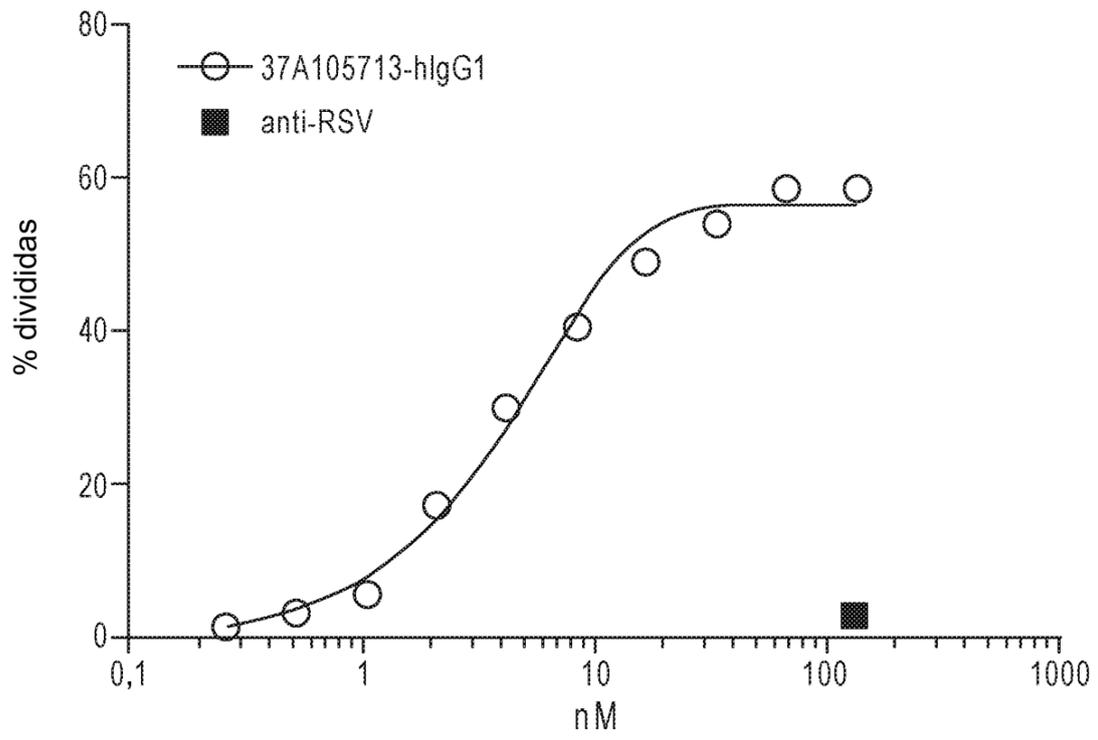


FIG. 10C

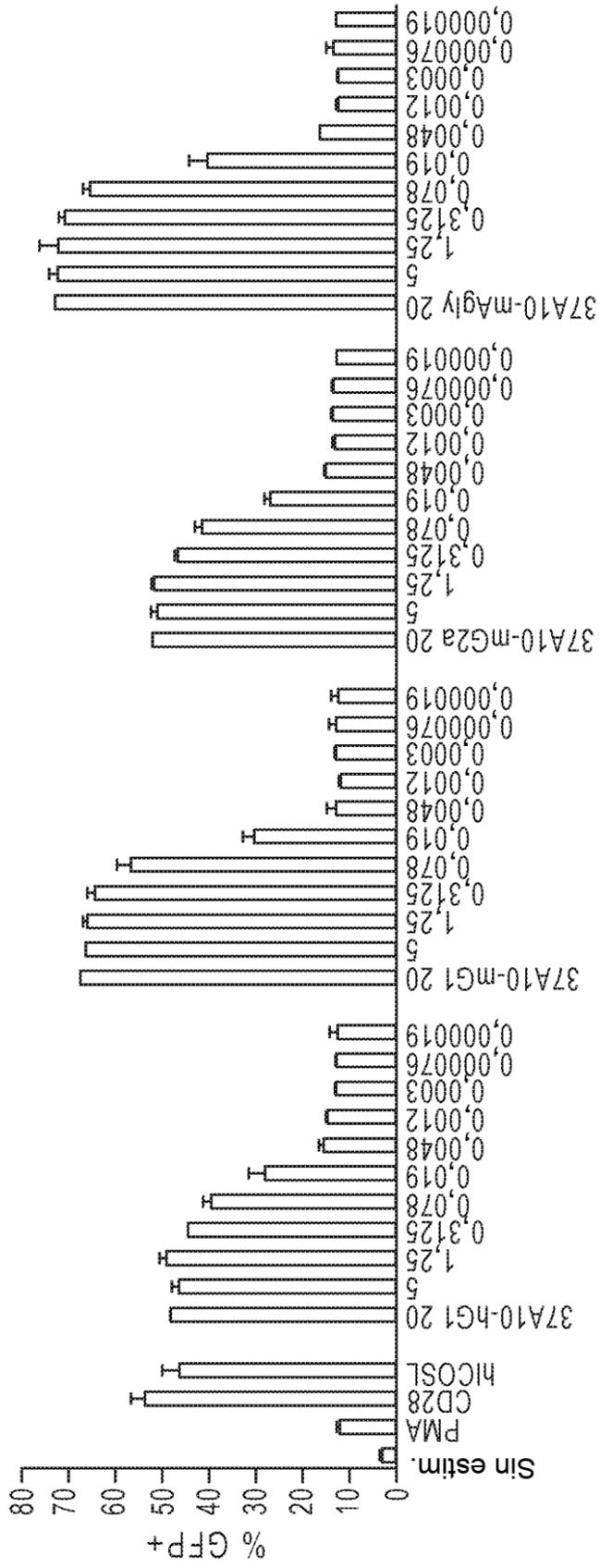


FIG. 11A

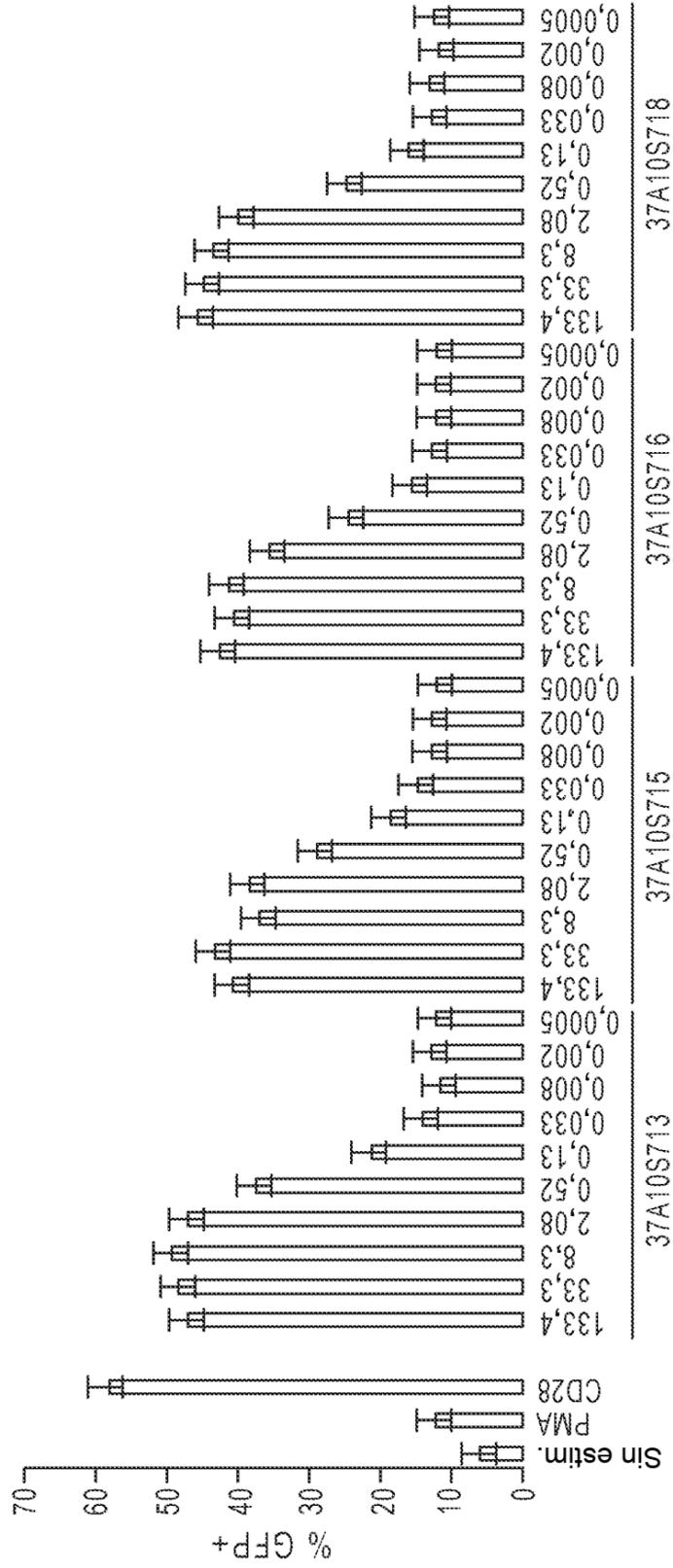


FIG. 11B

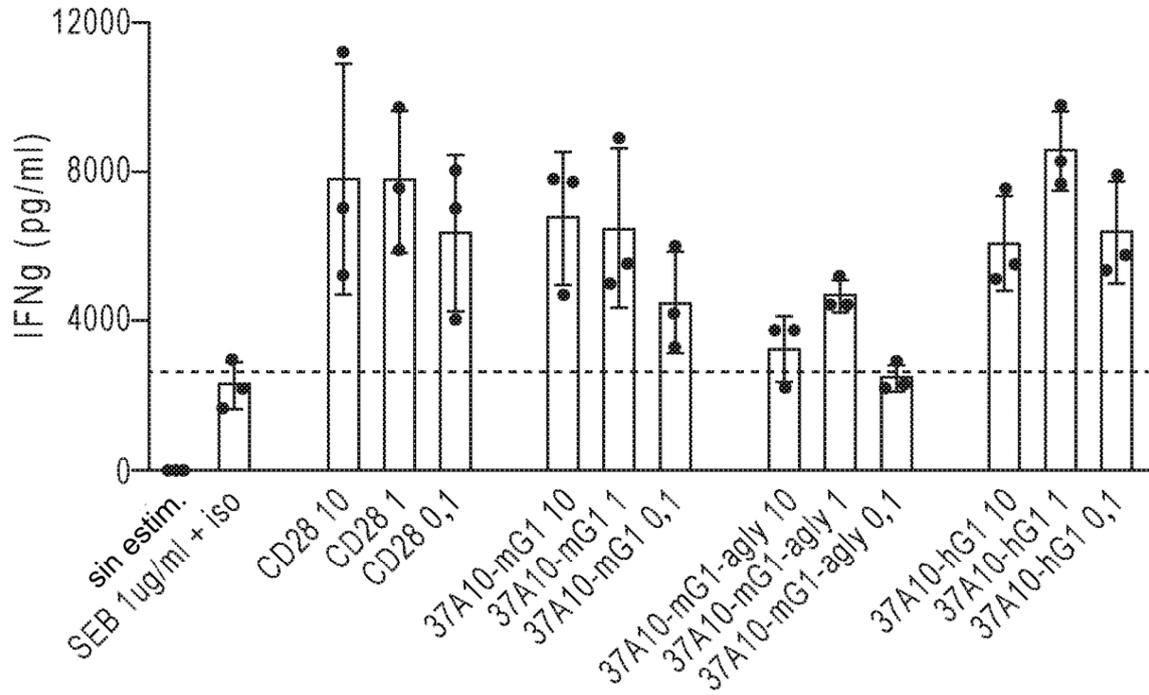


FIG. 12

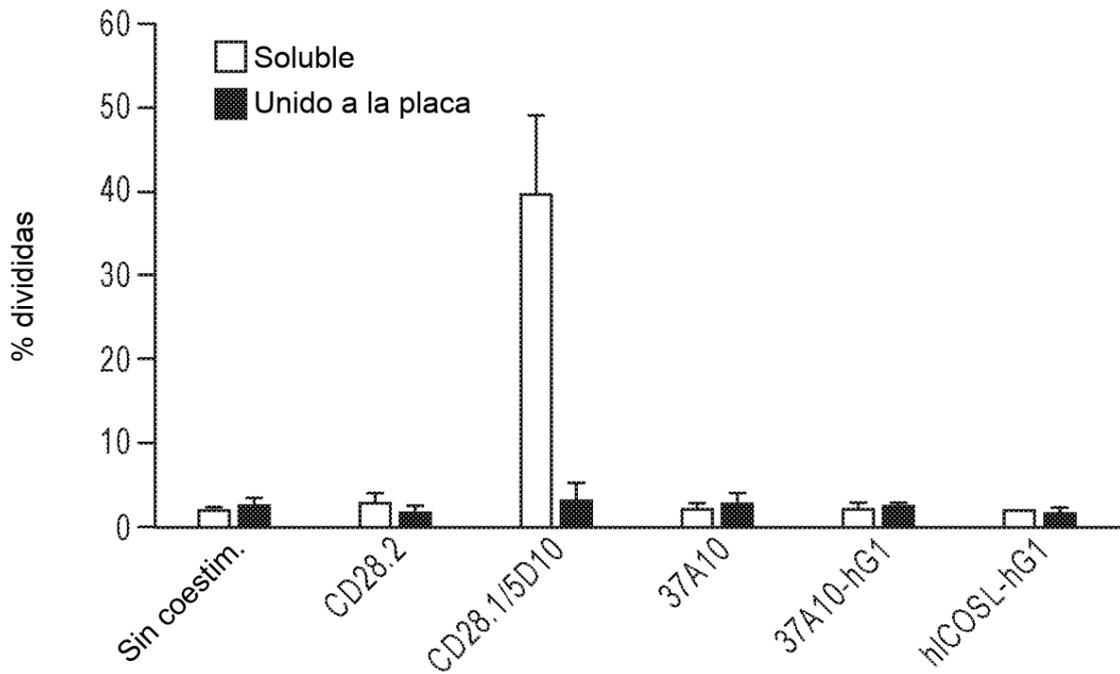


FIG. 13

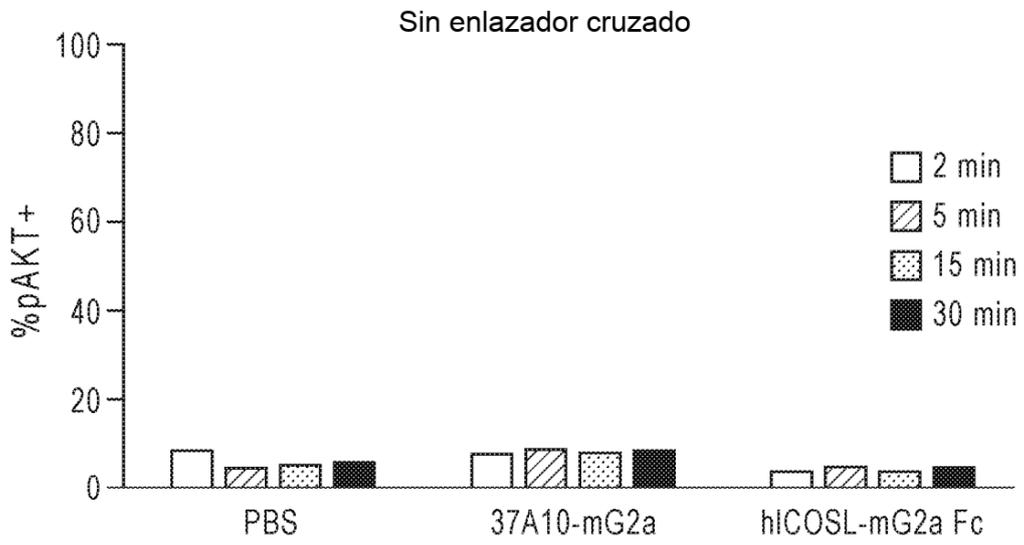


FIG. 14A

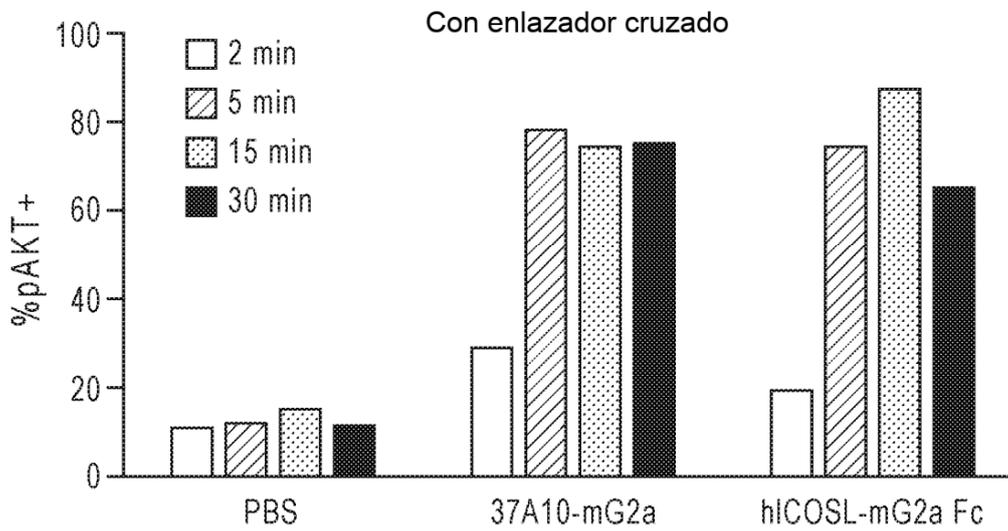


FIG. 14B

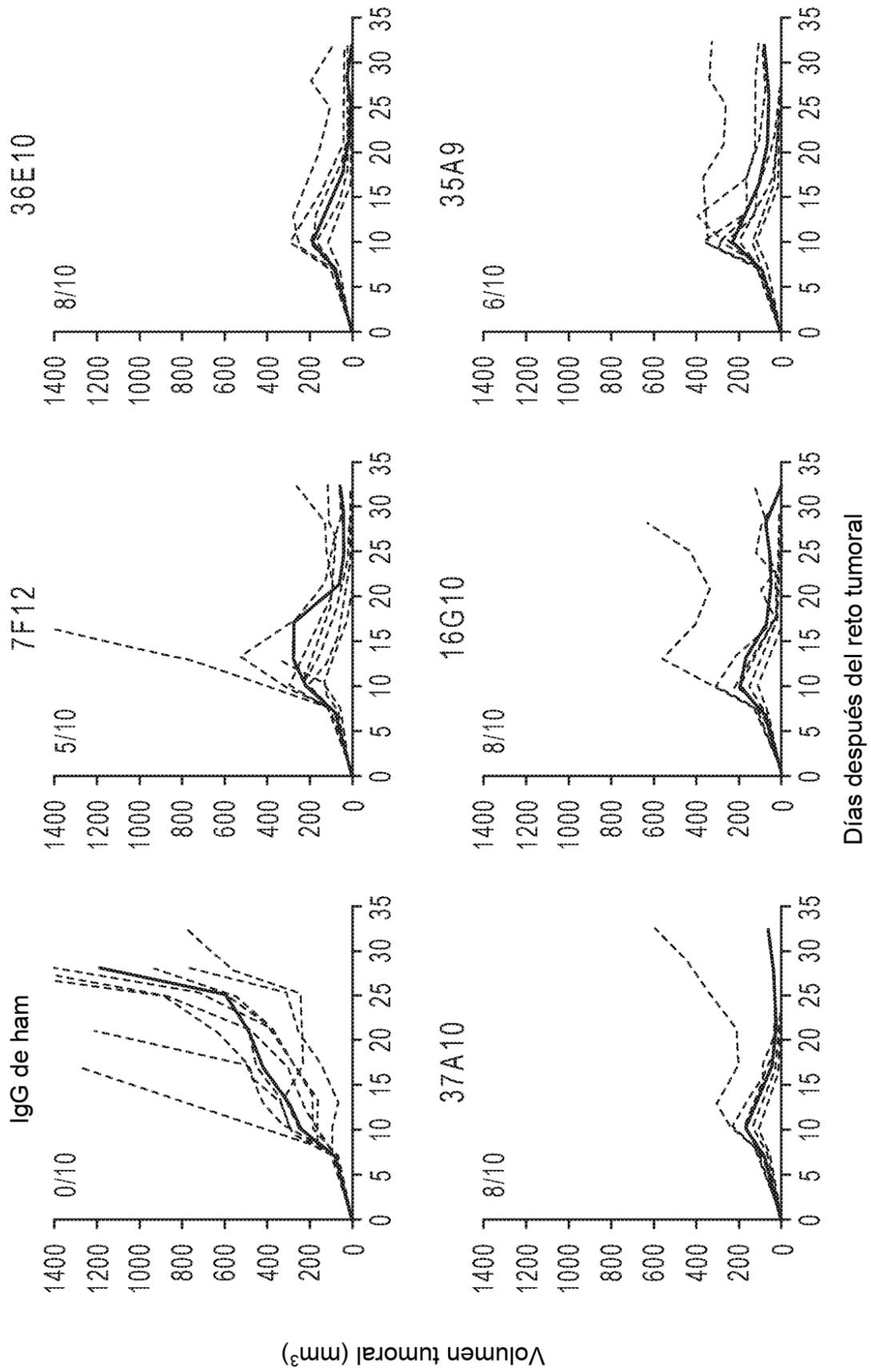


FIG. 15A

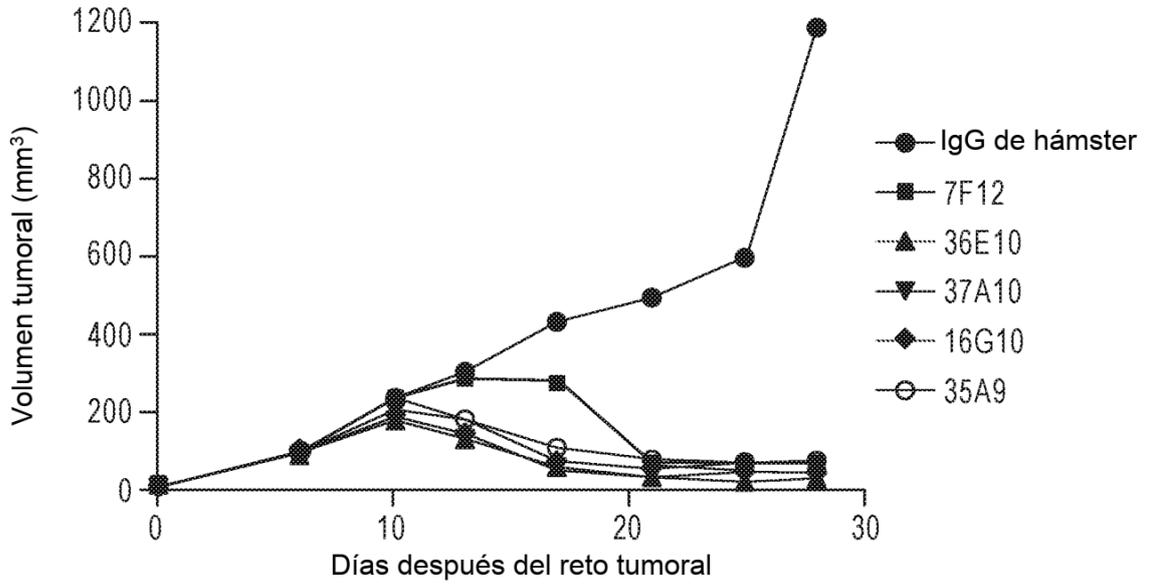


FIG. 15B

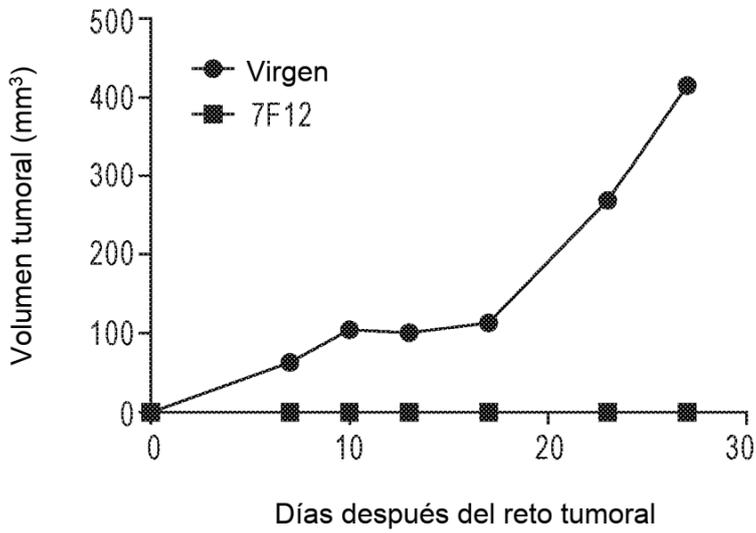


FIG. 16

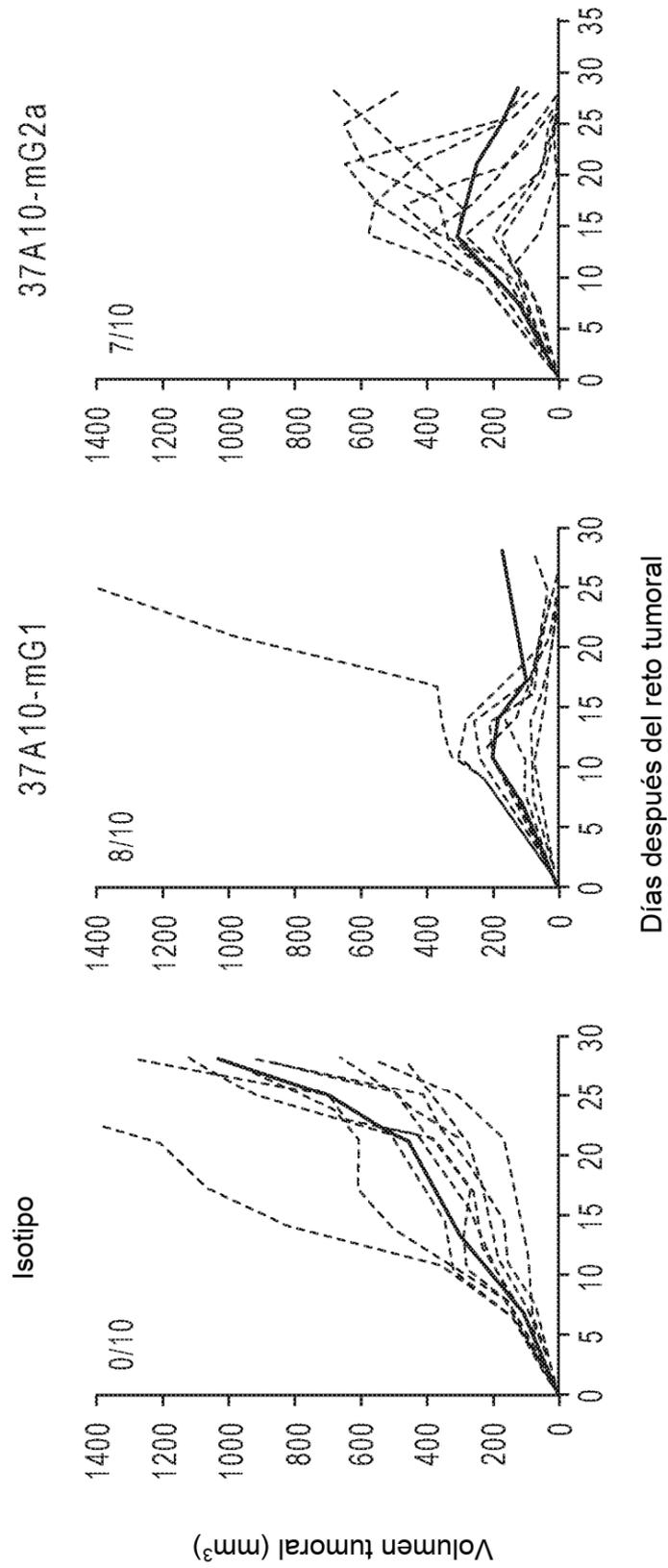
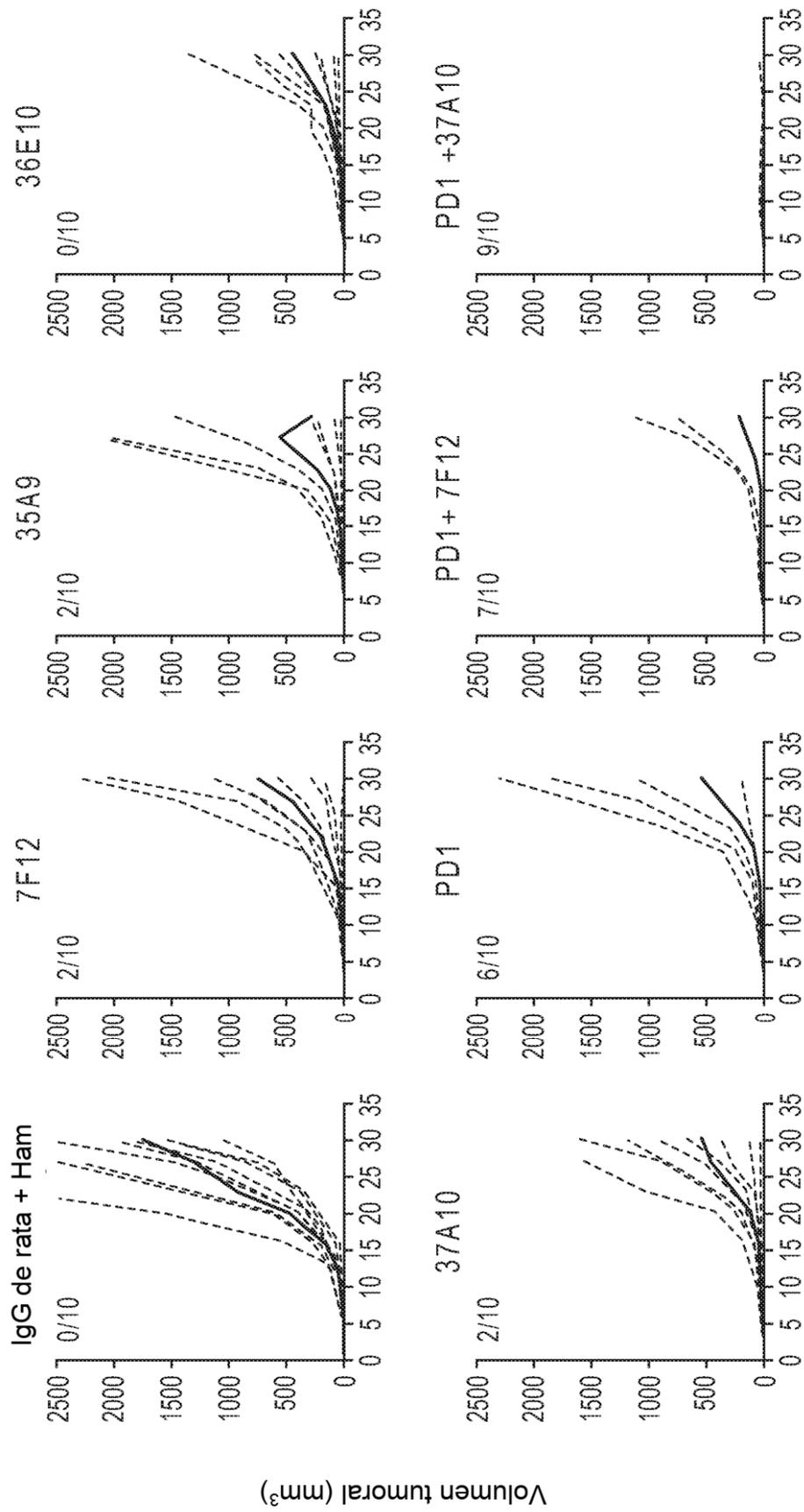


FIG. 17



Días después del reto tumoral

FIG. 18

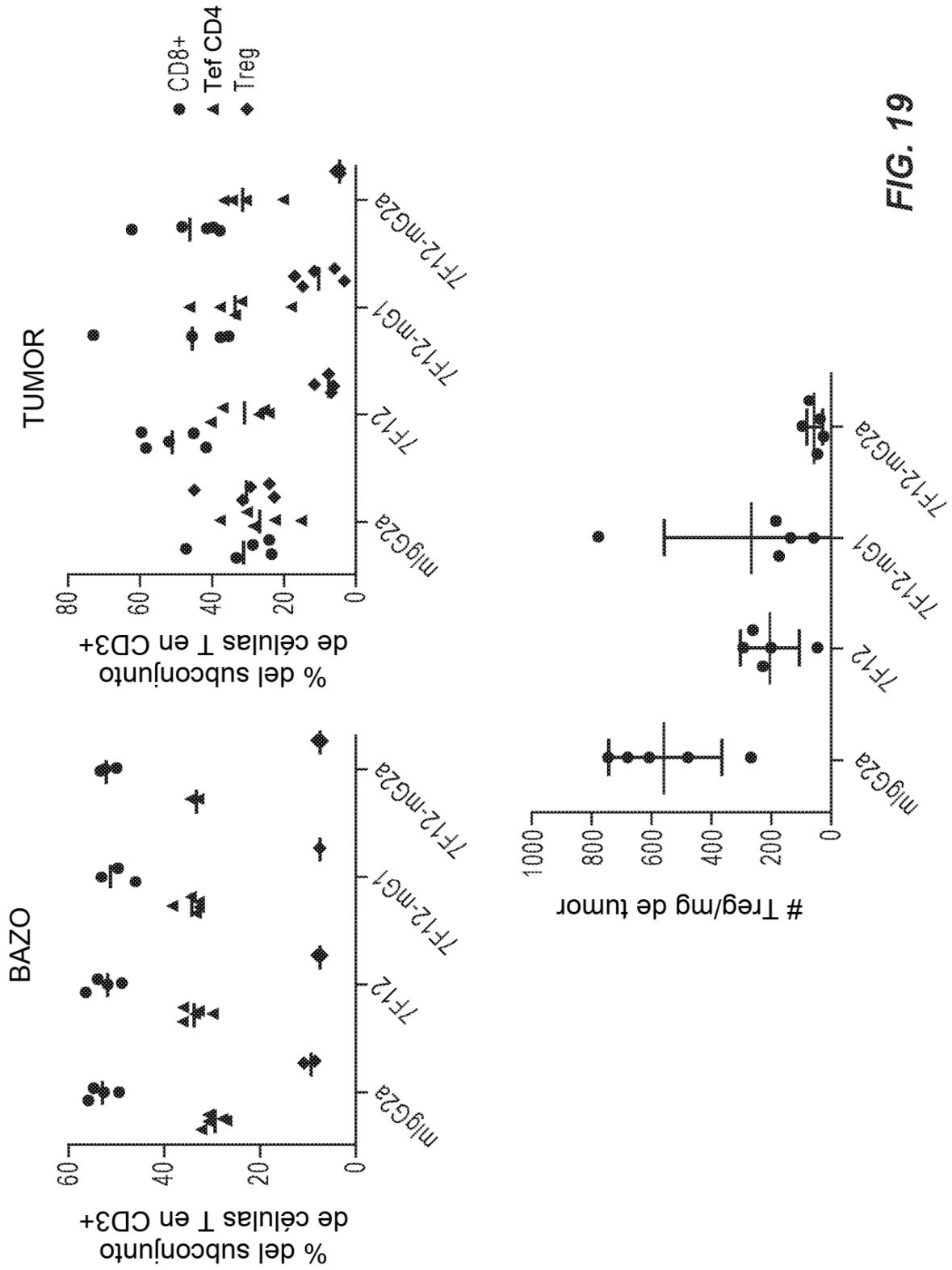
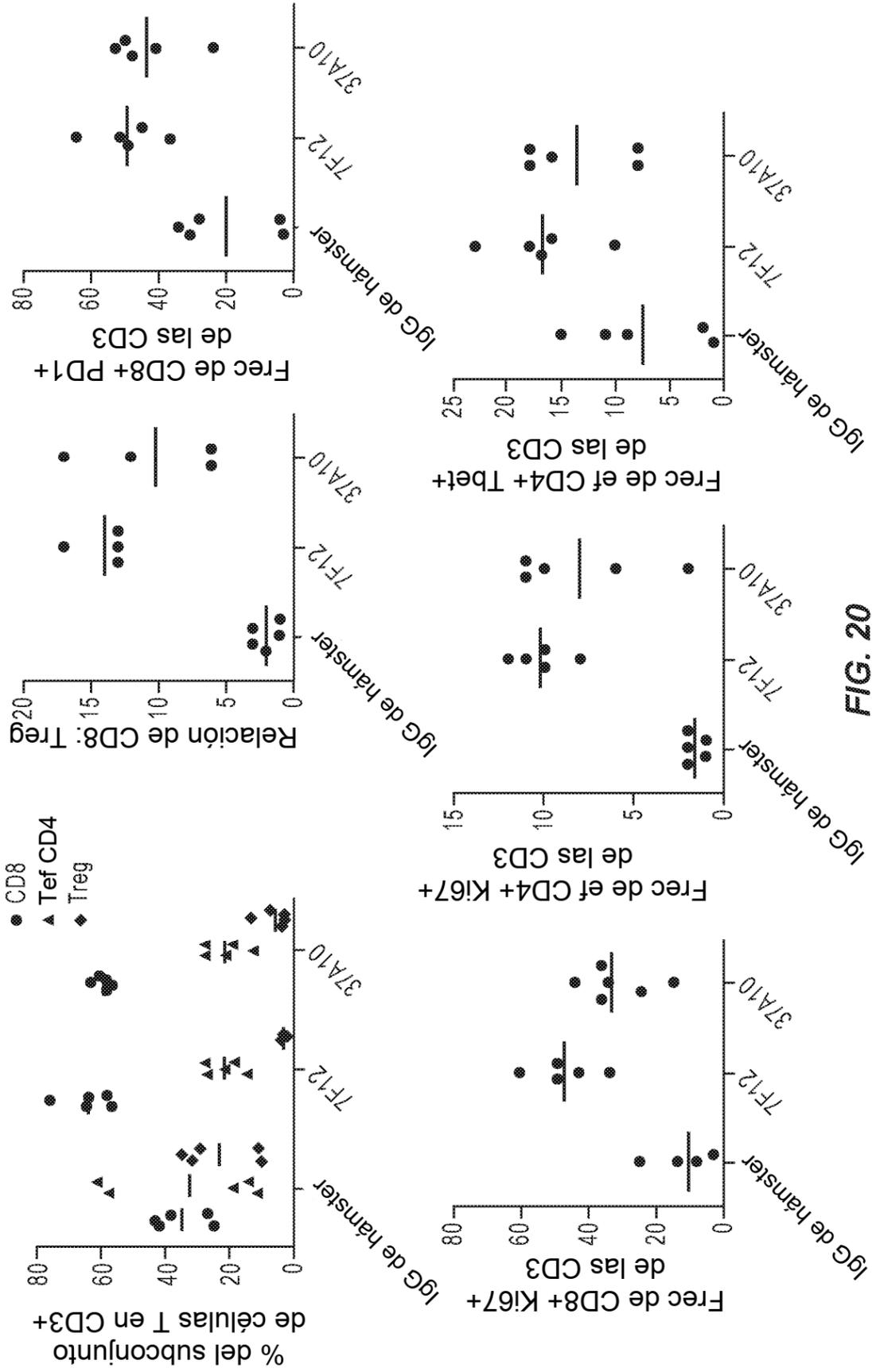


FIG. 19



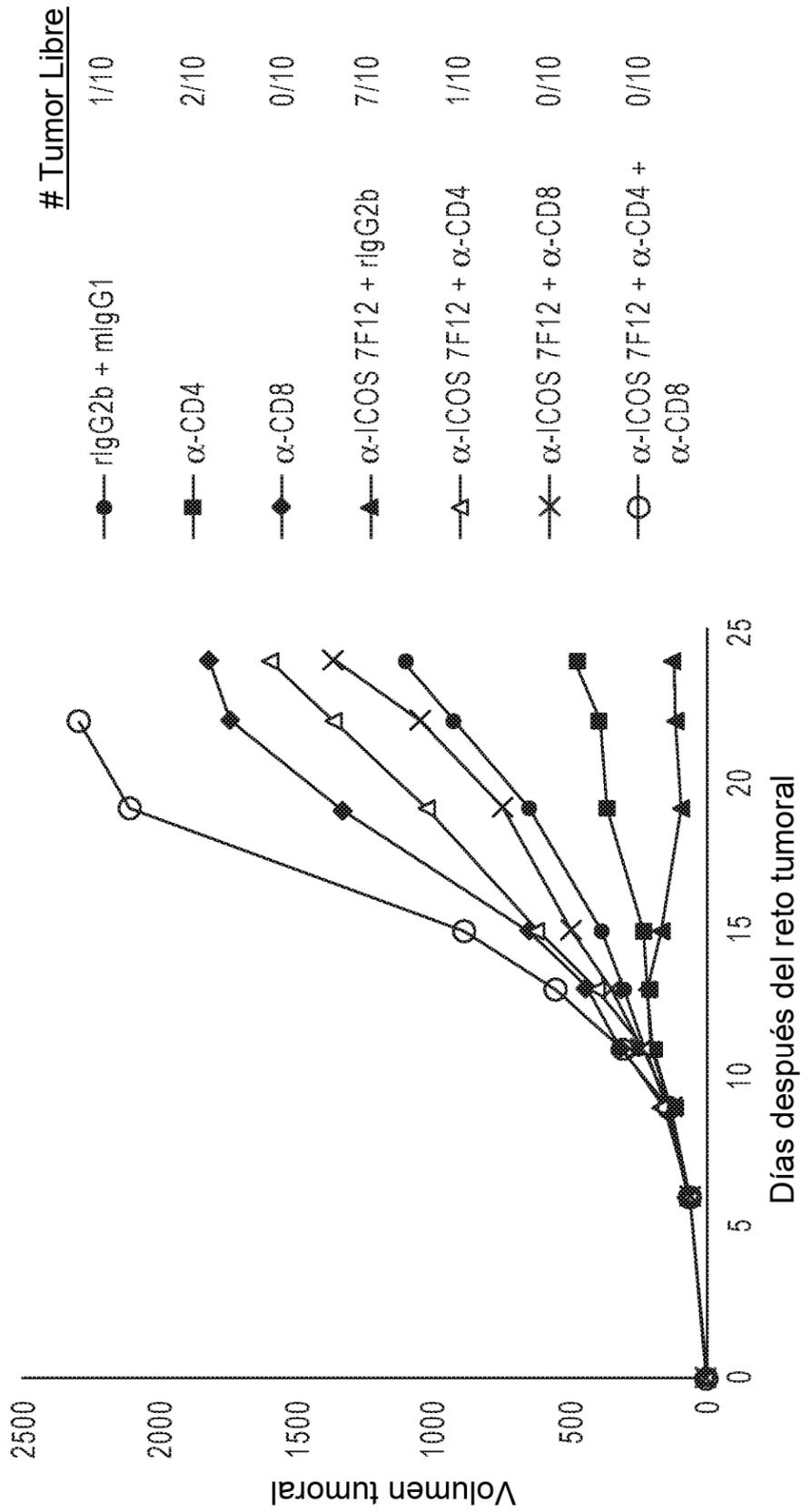


FIG. 21

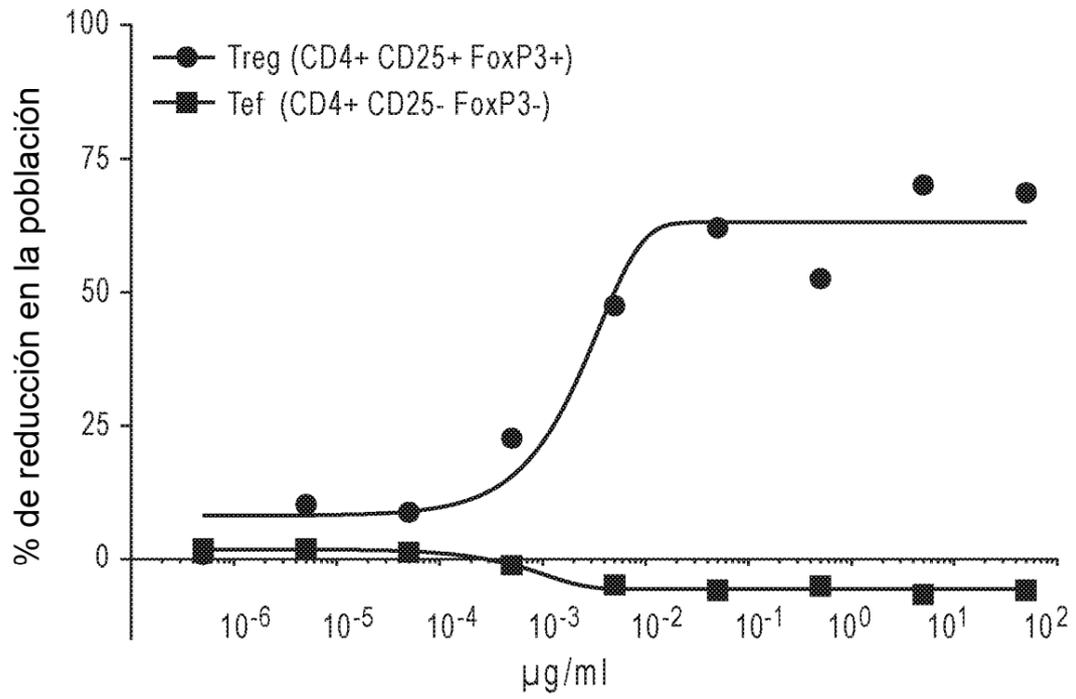


FIG. 22A

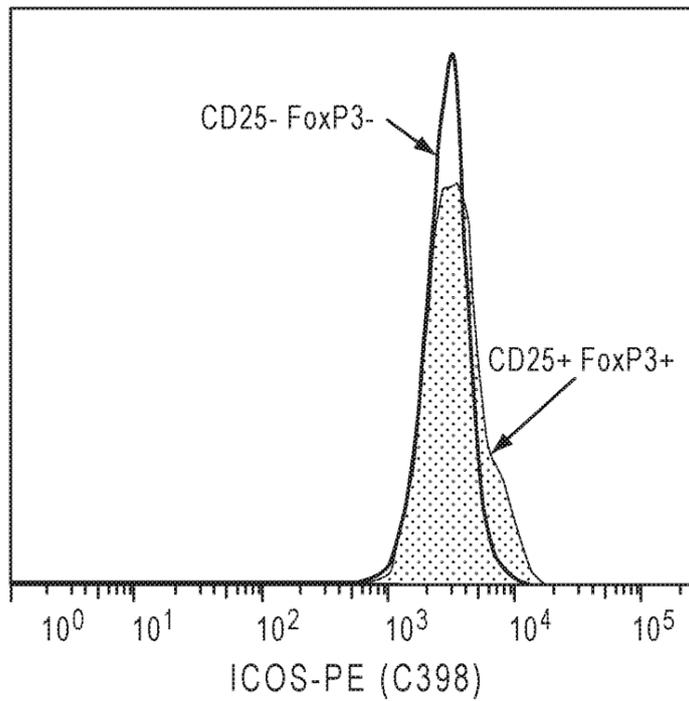


FIG. 22B

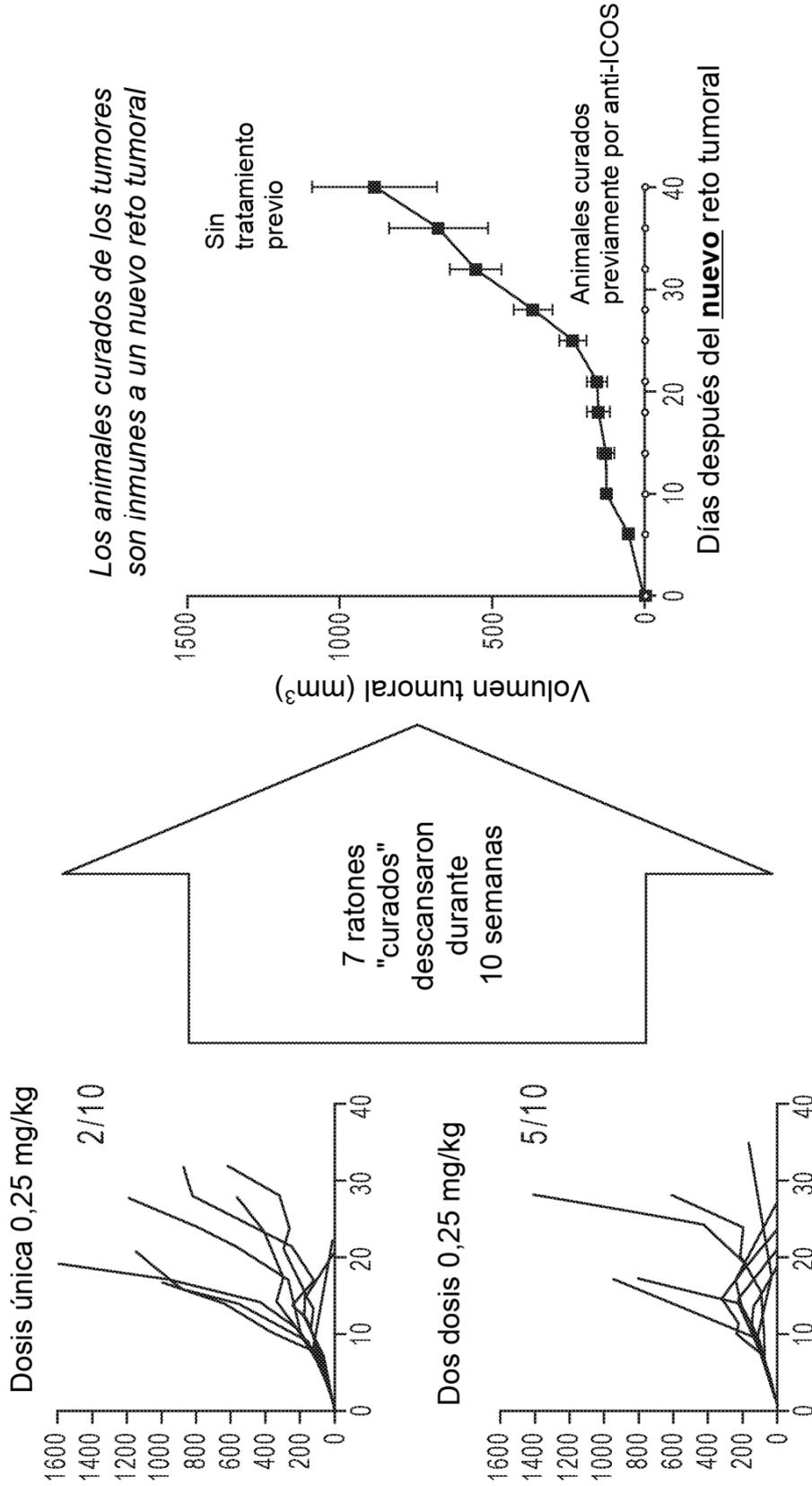


FIG. 23

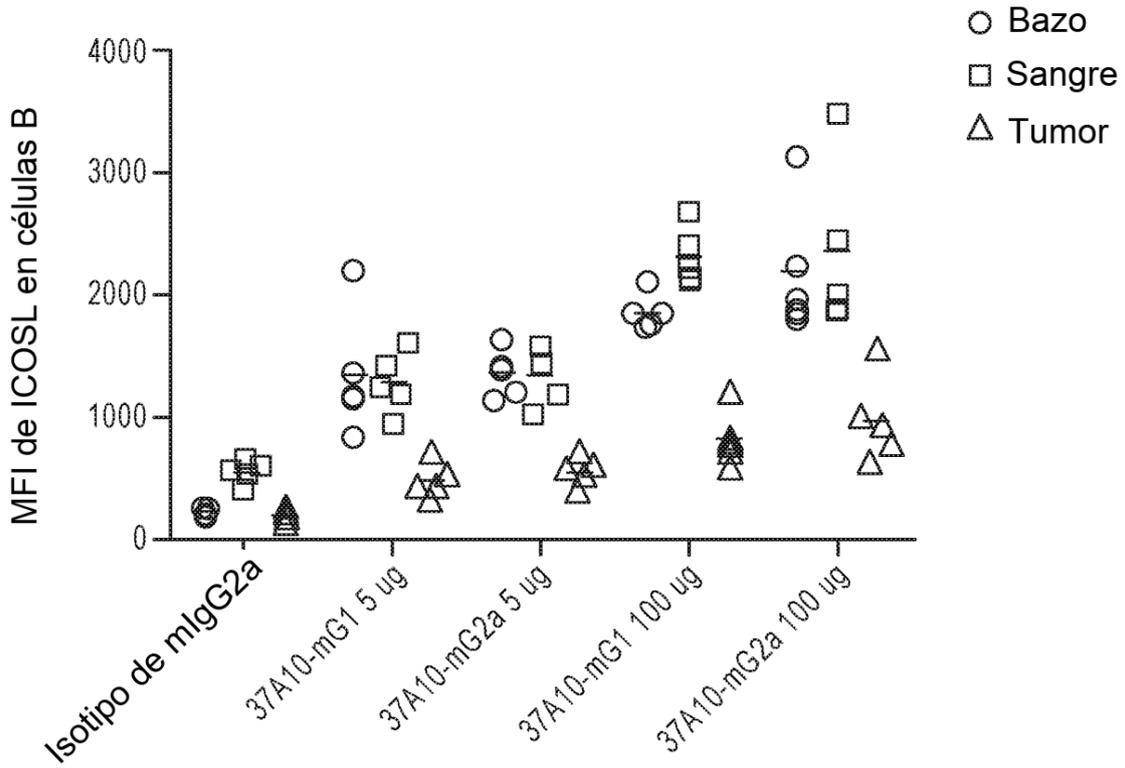


FIG. 24A

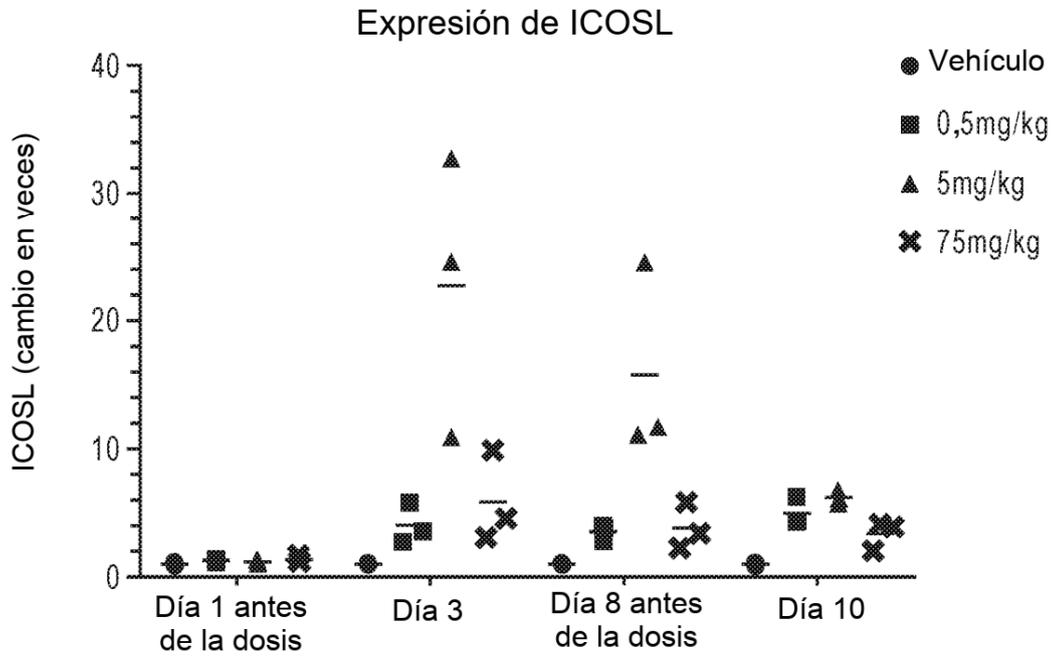
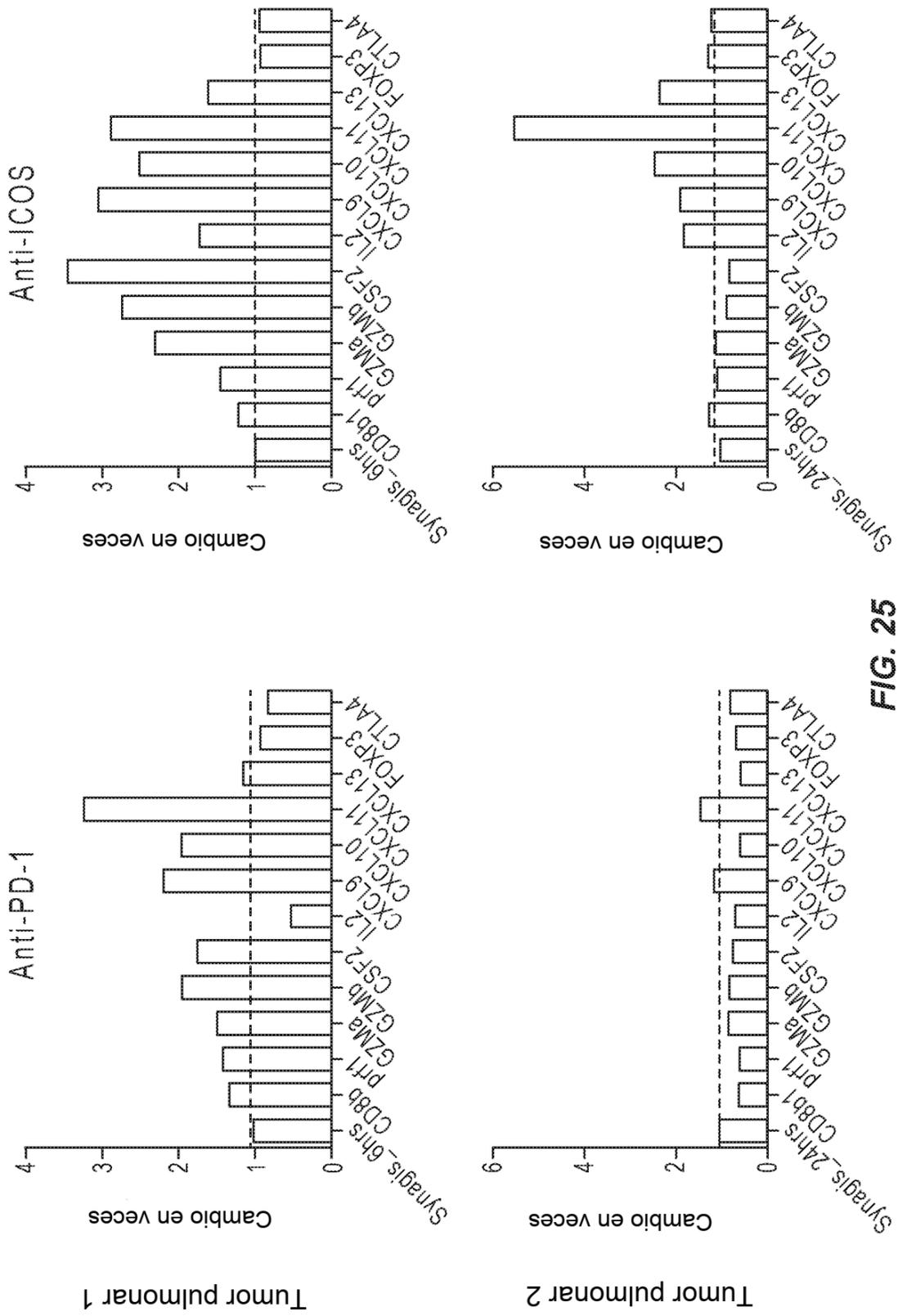


FIG. 24B



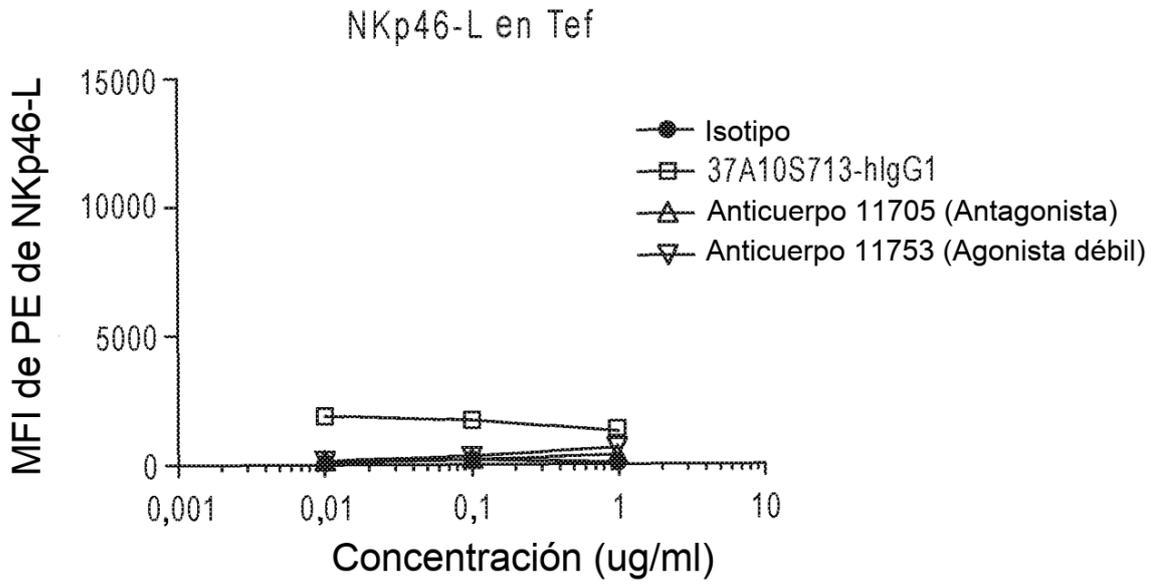


FIG. 26A

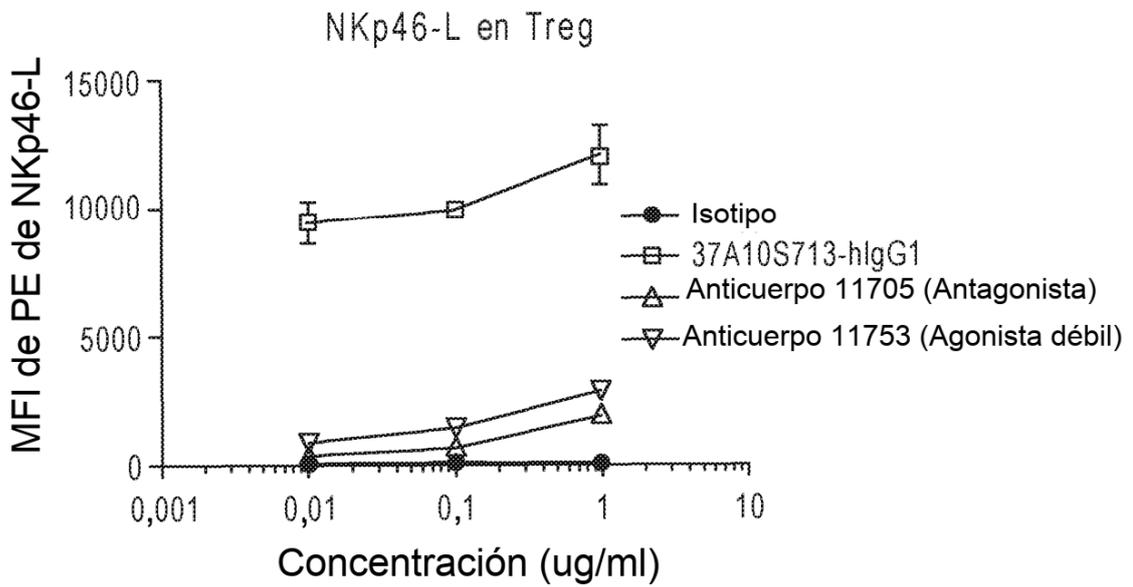


FIG. 26B

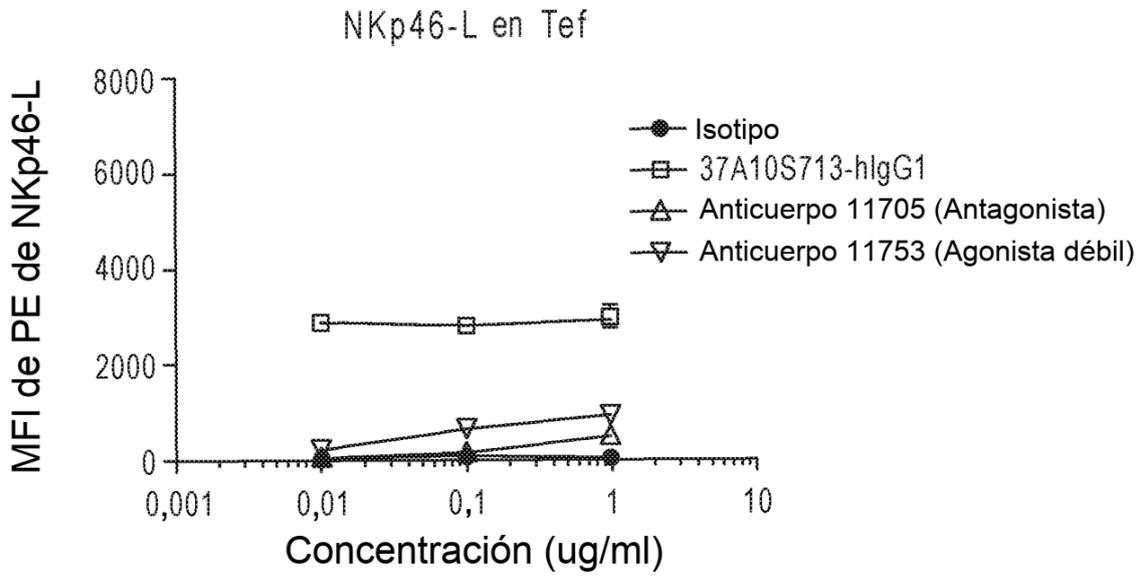


FIG. 26C

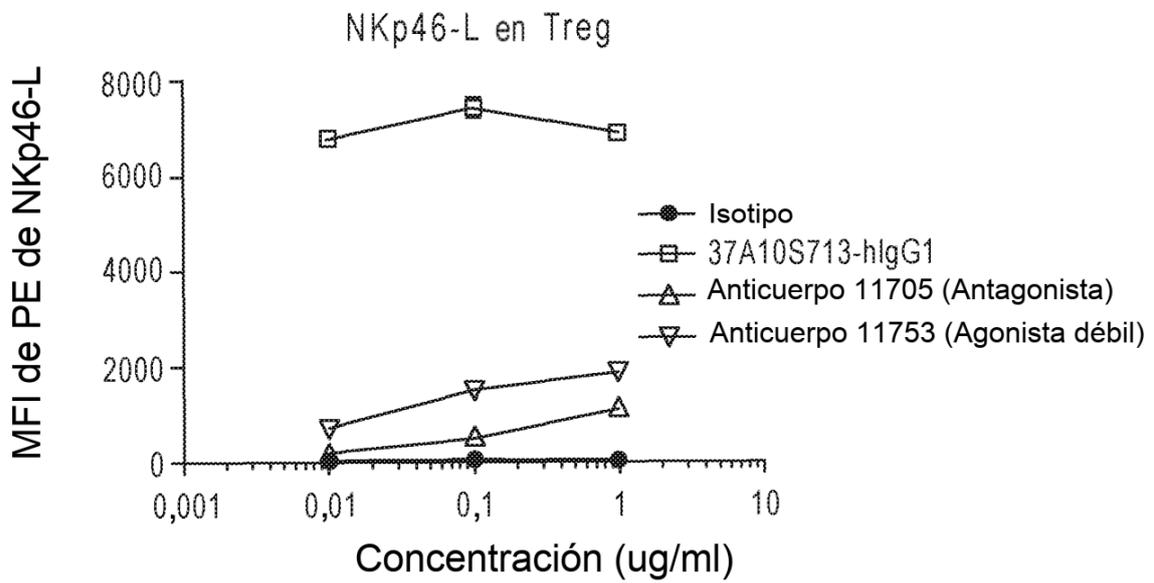


FIG. 26D

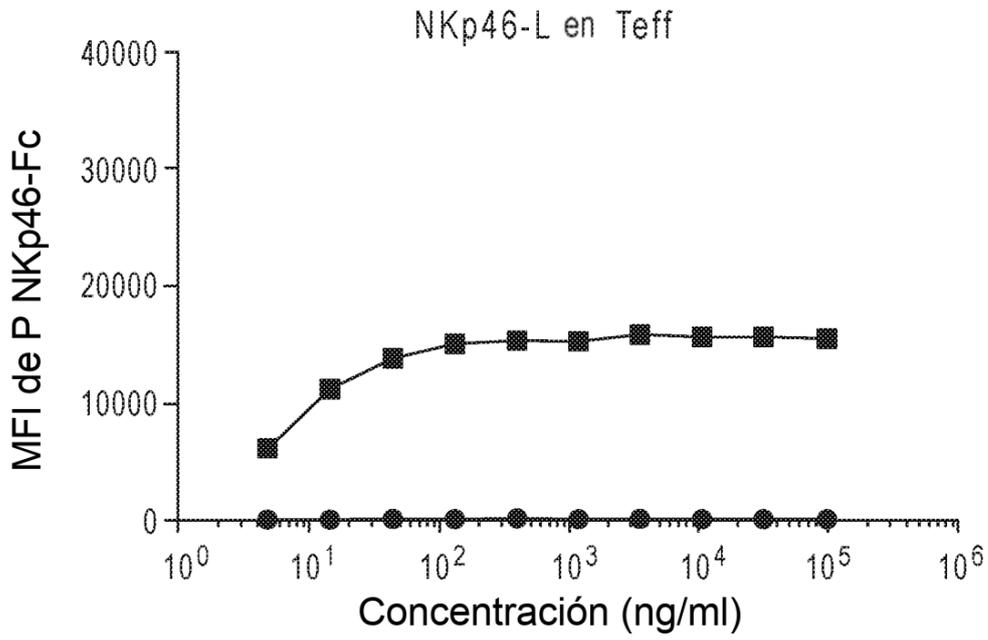


FIG. 26E

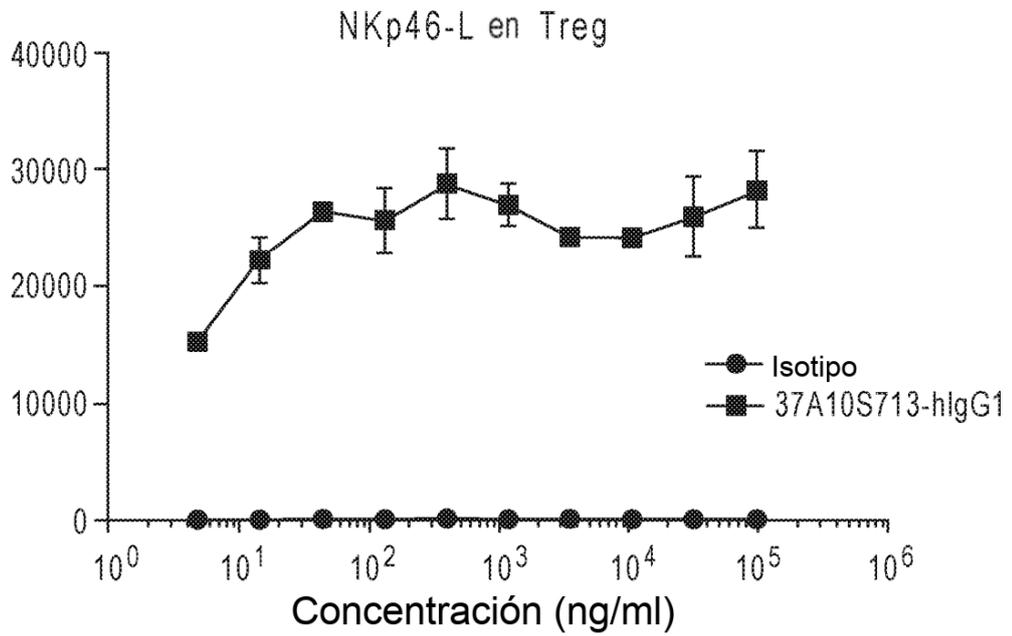


FIG. 26F

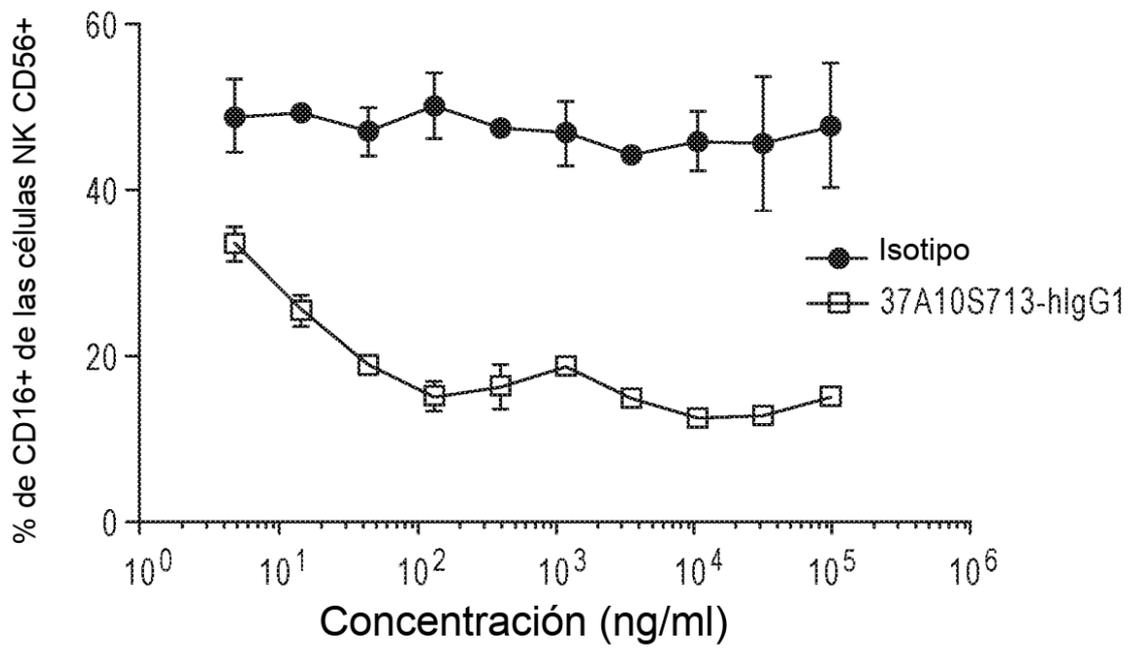


FIG. 27