

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201590138** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2015.07.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/28 (2006.01)**

(22) Дата подачи заявки
2013.07.02

**(54) ОПТИМИЗАЦИЯ АНТИТЕЛ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ ГЕН АКТИВАЦИИ
ЛИМФОЦИТОВ 3 (LAG-3), И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **61/667,058**

(32) **2012.07.02**

(33) **US**

(86) **PCT/US2013/048999**

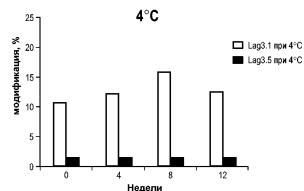
(87) **WO 2014/008218 2014.01.09**

(71) Заявитель:
**БРИСТОЛ-МАЙЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:
**Лонберг Нилс, Сринивасан Мохан
(US)**

(74) Представитель:
Лыу Т.Н., Угрюмов В.М. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится в выделенным моноклональным антителам, которые специфично связывают LAG-3 и обладают оптимизированными функциональными свойствами по сравнению с ранее описанными анти-LAG-3 антителами, такими как антитело 25F7 (заявка на изобретение США 2011/0150892 A1). Данные антитела включают удаленные сайты деамидирования и в то же время сохраняют высокую аффинность связывания LAG-3 человека и физическую (то есть термическую и химическую) стабильность. Также описаны молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела по изобретению, векторы экспрессии, клетки-хозяева и способы экспрессии антител по изобретению, а также иммуоконъюгаты, биспецифические молекулы и фармацевтические композиции, включающие данные антитела. Настоящее изобретение также относится к способам детектирования LAG-3, а также к способам лечения на основе стимулирования иммунных реакций с применением анти-LAG-3 антитела по изобретению. Также описана комбинированная терапия, при которой антитела вводят совместно по меньшей мере с одним дополнительным иммуностимулирующим антителом.



A1

201590138

201590138

A1

ОПТИМИЗАЦИЯ АНТИТЕЛ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ ГЕН АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ 3 (LAG-3), И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Уровень техники

Терапевтические антитела представляют собой один из наиболее быстрорастущих сегментов фармацевтической индустрии. Для поддержки эффективности (то есть активности) и минимизации иммуногенности антитела и другие белковые лекарства должны быть защищены от физического и химического распада при производстве и хранении. Действительно, одна из основных трудностей при разработке лекарственных средств на основе антител представляет собой потенциальный иммуногенный ответ при введении субъекту, что может приводить к быстрому клиренсу или даже вызывать угрожающие жизни побочные эффекты, включая анафилактический шок. На иммуногенность антитела оказывают влияние различные факторы, такие как его физикохимические свойства (например, чистота, стабильность или растворимость), клинические факторы (например, доза, способ введения, гетерогенность заболевания или характеристики пациента) и сопутствующее лечение другими средствами (Swann et al. (2008) *Curr Opin Immunol* 20:493-499).

Иммуногенность антител и/или потеря активности антителами часто связана с деамидированием. Деамидирование представляет собой процесс химического распада, который спонтанно возникает в белках (например, антителах). Деамидирование удаляет амидную функциональную группу из аминокислотного остатка, такого как аспарагин и глутамин, таким образом повреждая его амидсодержащие боковые цепи. Это, в свою очередь, вызывает структурные и биологические изменения по всему белку, таким образом создавая гетерогенные формы антитела. Деамидирование представляет собой одну из наиболее распространенных посттрансляционных модификаций, которые возникают в полученных рекомбинантными способами терапевтических антителах.

Например, гетерогенность в тяжелой цепи моноклонального антитела h1B4 (гуманизированное анти-CD18 антитело) вследствие деамидирования при культивировании клеток была отмечена Tsai et al. (*Pharm Res* 10(11):1580 (1993)). Кроме того, снижение/потеря биологической активности вследствие деамидирования являлась известной проблемой и ранее. Например, Kroon et al. характеризовали различные сайты деамидирования в терапевтическом антителе ОКТ3 и сообщали, что образцы из партии ОКТ3 (возрастом от 14 месяцев до 3 лет) имели активность менее

75% (*Pharm Res* 9(11):1386 (1992), стр.1389, вторая колонка). Кроме того, образцы ОКТЗ с большими количествами окисленных пептидов в их картах имели значительно сниженную активность при проведении анализа эффективности связывания антигена (стр.1390, первая колонка). Авторы сделали вывод о том, что определенные сайты химической модификации, которая происходит при хранении ОКТЗ, были идентифицированы с помощью пептидного картирования и коррелировали с наблюдаемыми изменениями при химических анализах и биологических анализах антитела (стр.1392, первая колонка). Потеря биологической активности также была отмечена в отношении ряда других деамидированных терапевтических белков, включая рекомбинантную ДНазу человека (Cacia et al. (1993) *J. Chromatogr.* 634:229-239) и рекомбинантный растворимый CD4 (Teshima et al. (1991) *Biochemistry* 30:3916-3922).

В целом, деамидирование представляет значительную и непредсказуемую проблему для фармацевтической индустрии. Усилия, связанные с мониторингом вариабельности, вызываемой деамидированием в лекарственных средствах на основе антител, в частности, как и связанные с FDA опасения, связанные с данной вариабельностью, увеличивают затраты и задерживают проведение клинических испытаний. Более того, связанные с данной проблемой модификации, включая изменяющиеся условия (например, температуру, pH и тип клеток), связанные с рекомбинантным получением и/или изменением аминокислот, которые подвержены деамидированию (например, сайт-направленному мутагенезу), могут негативно влиять на стабильность и активность, особенно при внесении изменений в определяющие комплементарность участки (CDR) антитела. Соответственно, существует потребность в более стабильных версиях терапевтических антител.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам (например, моноклональным антителам человека), которые связывают LAG-3 (например, LAG-3 человека) и обладают оптимизированной физической стабильностью по сравнению с описанными ранее анти-LAG-3 антителами. В частности, изобретение относится к модифицированной форме антитела 25F7 (US 2011/0150892 A1), которое обладает значительно увеличенной термической и химической стабильностью по сравнению с немодифицированным антителом. В частности, с помощью изменения критического связывающего участка домена CDR2 тяжелой цепи антитела 25F7 было показано, что модифицированное антитело демонстрировало значительно более

высокую физическую и термическую стабильность, сниженный уровень деамидирования, более высокую термическую обратимость и более низкую агрегацию. В то же время неожиданно было обнаружено, что модифицированное антитело сохраняет ту же высокую аффинность связывания с LAG-3 человека и функциональную активность немодифицированного антитела, включая способность ингибировать связывание LAG-3 с молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса и стимулировать антигенспецифичные Т-клеточные ответы. Совместное существенное повышение стабильности и сохранение эффективности связывания / биологической активности модифицированного антитела являлось неожиданным, особенно в свете критичности CDR участков для функционирования антител.

Антитела по изобретению могут применяться для различных целей, включая детектирование LAG-3 белка и стимулирования антигенспецифичных Т-клеточных ответов у субъектов с опухолями или вирусами.

Соответственно, в одном аспекте изобретение относится к выделенному моноклональному антителу (например, антителу человека) или его антигенсвязывающей части с варибельным участком тяжелой цепи, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12. В другом варианте осуществления антитело также включает варибельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть включает CDR1, CDR2 и CDR3 участки варибельного участка тяжелой цепи, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12 (например, SEQ ID NO: 15, 16 и 17, соответственно). В другом варианте осуществления антитело также включает CDR1, CDR2 и CDR3 участки варибельного участка легкой цепи, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12 (например, SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно). В предпочтительном варианте осуществления антитело обладает повышенными физическими свойствами (т.е. термической и химической стабильностью) по сравнению с антителом 25F7, в то же время сохраняя, по меньшей мере, ту же аффинность связывания LAG-3 человека, что и 25F7. Например, антитело обладает сниженной варибельностью последовательности в участке CDR2 тяжелой цепи вследствие деамидирования по сравнению с антителом 25F7, например приблизительно 2,5% или менее модификацией аминокислотной последовательности спустя 12 недель при 4°C (то есть при анализах стабильности "в реальном времени", как описано здесь) и/или приблизительно 12,0% или менее модификацией аминокислотной

последовательности спустя 12 недель при 40°C (то есть при ускоренных стрессовых условиях, как описано здесь), в то же время сохраняя аффинность связывания LAG-3 человека на уровне, по меньшей мере, K_D около 1×10^{-7} М или менее (более предпочтительно K_D 1×10^{-8} М или менее, K_D 5×10^{-9} М или менее или K_D 1×10^{-9} М или менее). В другом варианте осуществления антитело обладает термической обратимостью около 40% в PBS при pH 8,0.

В другом варианте осуществления антитело обладает более высокой температурой плавления (что свидетельствует о более высокой общей стабильности *in vivo*) по сравнению с немодифицированным антителом (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). В одном варианте осуществления антитело обладает значением T_M (температура первоначального анфолдинга) более 60°C, например более 65°C или более 70°C. Точка плавления антитела может быть определена с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (Chen *et al* (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al* (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) или методом кругового дихроизма (Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

В другом варианте осуществления антитело характеризуется его сопротивляемостью быстрому распаду. Распад антител можно определить способом капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS (Alexander AJ and Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

В другом варианте осуществления антитело обладает минимальными агрегационными свойствами, например агрегацией 25% или менее, например 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 4% или менее. Агрегация может приводить к запуску нежелательного иммунного ответа и/или измененным или нежелательным фармакокинетическим свойствам. Агрегация может быть измерена с помощью различных способов, включая эксклюзионную колонку (SEC), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и рассеяние света.

В другом варианте осуществления антитело также обладает, по меньшей мере, одним из следующих свойств:

- (a) связывание с LAG-3 обезьяны;
- (b) отсутствие связывания с LAG-3 мыши;
- (c) ингибирование связывания LAG-3 с молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса; и
- (d) стимулирование иммунных ответов, в частности антигенспецифичных Т-клеточных ответов.

Предпочтительно, антитело обладает, по меньшей мере, двумя свойствами из (a), (b), (c) и (d). Более предпочтительно антитело обладает, по меньшей мере, тремя из свойств (a), (b), (c) и (d). Еще более предпочтительно, антитело обладает всеми четырьмя из свойств (a), (b), (c) и (d).

В другом варианте осуществления антитело стимулирует антигенспецифичный Т-клеточный ответ, такой как продуцирование интерлейкина-2 (IL-2) при антигенспецифичном Т-клеточном ответе. В других вариантах осуществления антитело стимулирует иммунный ответ, такой как противоопухолевый ответ (например, ингибирование роста опухоли в *in vivo* модели опухоли с ксенотрансплантатом) или аутоиммунный ответ (например, развитие диабета у NOD мышей).

В другом варианте осуществления антитело связывает эпитоп LAG-3 человека, включающий аминокислотную последовательность PGHPLAPG (SEQ ID NO: 21). В другом варианте осуществления антитело связывает эпитоп LAG-3 человека, включающий аминокислотную последовательность HPAAPSSW (SEQ ID NO: 22) или PAAPSSWG (SEQ ID NO: 23).

В других вариантах осуществления антитело окрашивает гипофизную ткань с помощью иммуногистохимии или не окрашивает гипофизную ткань с помощью иммуногистохимии. Антитела по изобретению могут представлять собой полноразмерные антитела, например изотипа IgG1, IgG2 или IgG4, необязательно с мутацией с заменой серина на пролин в шарнирном участке константного участка тяжелой цепи (в положении, соответствующем положению 241, как описано у Angal *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-108), так что гетерогенность дисульфидного мостика между тяжелыми цепями снижена или устранена. В одном аспекте изотипом константного участка является IgG4 с мутацией в аминокислотных остатках 228, например S228P. Альтернативно, антитела могут представлять собой фрагменты антител, такие как Fab, Fab' или Fab'2 фрагменты или одноцепочечные антитела.

В другом аспекте изобретения антитело (или его антигенсвязывающая часть) представляет собой часть иммуноконъюгата, который включает терапевтический агент, например цитотоксин или радиоактивный изотоп, связанный с антителом. В другом аспекте антитело представляет собой часть биспецифичной молекулы, которая включает вторую функциональную группу (например, второе антитело), обладающую иной специфичностью связывания, чем указанное антитело или его антигенсвязывающая часть.

Также в объем изобретения включены композиции, включающие антитела или их антигенсвязывающие части, иммуноконъюгаты или биспецифичные молекулы по изобретению, необязательно соединенные с фармацевтически приемлемым носителем. Также в объем изобретения включены молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие части (например, переменные участки и/или CDR), а также векторы экспрессии, включающие данные нуклеиновые кислоты и клетки-хозяева, включающие данные векторы экспрессии. Также в объем изобретения включены способы получения анти-LAG-3 антител с помощью клеток-хозяев, включающих данные векторы экспрессии, которые могут включать следующие этапы: (i) экспрессию антитела в клетке-хозяине и (ii) выделение антитела из клетки-хозяина.

В другом аспекте изобретение относится к способам стимулирования иммунных ответов с помощью анти-LAG-3 антител по изобретению. В одном варианте осуществления способ включает стимулирование антигенспецифичного Т-клеточного ответа путем контактирования Т-клеток с антителом по изобретению, таким образом, что осуществляется стимулирование антигенспецифичного Т-клеточного ответа. В предпочтительном варианте осуществления стимулируется продуцирование интерлейкина-2 с помощью антигенспецифичной Т-клетки. В другом варианте осуществления субъект представляет собой субъект с опухолью, при этом стимулируется иммунный ответ против опухоли. В другом варианте осуществления субъект представляет собой субъект с вирусом, при этом стимулируется иммунный ответ против вируса.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающему введение субъекту антитела или его антигенсвязывающей части по изобретению, так что ингибируется рост опухоли у субъекта. В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения вирусной инфекции у субъекта, включающему введение субъекту антитела или его антигенсвязывающей части по изобретению, так что вирусная инфекция подвергается лечению у субъекта. В другом варианте осуществления данные способы включают введение композиции, биспецифичного антитела или иммуноконъюгата по изобретению.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу стимулирования иммунного ответа у субъекта, включающему введение субъекту антитела или его антигенсвязывающей части по изобретению и, по меньшей мере, одного

дополнительного иммуностимулирующего антитела, такого как анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело и/или анти-CTLA-4 антитело, так что у субъекта стимулируется иммунный ответ, например для ингибирования роста опухоли или стимулирования противовирусного ответа. В одном варианте осуществления дополнительное иммуностимулирующее антитело представляет собой анти-PD-1 антитело. В другом варианте осуществления дополнительный иммуностимулирующий агент представляет собой анти-PD-L1 антитело. В другом варианте осуществления дополнительный иммуностимулирующий агент представляет собой анти-CTLA-4 антитело. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть по изобретению вводится с цитокином (например, IL-2 и/или IL-21) или костимулирующим антителом (например, анти-CD137 и/или анти-GITR антителом). Антитела могут представлять собой, например, антитела человека, химерные или гуманизированные антитела.

В другом аспекте изобретение относится к анти-LAG-3 антителам и композициям по изобретению для применения в рамках вышеуказанных способов или для производства лекарственного средства для применения в рамках вышеуказанных способов (например, для лечения).

Другие особенности и преимущества настоящего описания будут понятны из следующего подробного описания и примеров, которые не должны рассматриваться в качестве ограничивающих. Содержание всех ссылок, баз данных Genbank, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в настоящей заявке, полностью приведено здесь для ссылки.

Краткое описание чертежей

На Фиг.1А показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO:1) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:2) варибельного участка тяжелой цепи моноклонального антитела 25F7 человека. CDR1 (SEQ ID NO:5), CDR2 (SEQ ID NO:6) и CDR3 (SEQ ID NO:7) участки показаны прерывистой линией и указаны деривации зародышевой линии V, D и J. CDR участки показаны прерывистой линией с использованием системы Kabat (Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

На Фиг.1В показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 3) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 4) варибельного участка каппа легкой цепи моноклонального антитела 25F7 человека. CDR1 (SEQ ID NO:8), CDR2

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

(SEQ ID NO:9) и CDR3 (SEQ ID NO:10) участки показаны прерывистой линией и указаны деривации зародышевой линии V и J. Полноразмерные аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи антитела 25F7 показаны в SEQ ID NO: 32 и 34, соответственно.

На Фиг.2А показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 12) переменного участка тяжелой цепи моноклонального антитела LAG-3.5. CDR1 (SEQ ID NO: 15), CDR2 (SEQ ID NO: 16) и CDR3 (SEQ ID NO: 17) участки выделены контуром. Полноразмерные аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи антитела LAG3.5 показаны в SEQ ID NO: 35 и 37, соответственно.

На Фиг.2В показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 13) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 14) переменного участка легкой цепи моноклонального антитела LAG3.5. CDR1 (SEQ ID NO: 18), CDR2 (SEQ ID NO: 19) и CDR3 (SEQ ID NO: 20) участки выделены контуром.

На Фиг.3 показаны аминокислотные последовательности CDR2 переменного участка тяжелой цепи вариантов LAG-3 LAG3.5 (SEQ ID NO: 42), LAG3.6 (SEQ ID NO: 43), LAG3.7 (SEQ ID NO: 44) и LAG3.8 (SEQ ID NO: 45) по сравнению с аминокислотной последовательностью CDR2 переменного участка тяжелой цепи антитела 25F7 (LAG3.1) (SEQ ID NO: 41) и соответствующей последовательностью зародышевой линии человека (SEQ ID NO: 27). CDR2 переменный участок тяжелой цепи LAG3.5 отличается от CDR2 переменного участка тяжелой цепи 25F7 аргинином (R) в положении 54 (против аспарагина (N)) и серина (S) в положении 56 (против аспарагина (N)). Остальные CDR LAG3.5 25F7 являются идентичными. На Фиг.3 также показана SEQ ID NO: 40.

Фиг.4А и 4В представляют собой графики, показывающие активность связывания (EC_{50} и аффинность, соответственно) антител LAG3.1 (25F7), LAG3.2, LAG3.5, LAG3.6, LAG3.7 и LAG3.8 с активированными CD4⁺ Т-клетками человека. На Фиг.4В показаны SEQ ID NOS 41, 42, 45, 44 и 43, соответственно, в порядке следования.

Фиг.5А, В, С, D и Е представляют собой графики, показывающие кривые термического плавления (то есть термической стабильности) антител LAG3.1 (25F7), LAG3.5, LAG3.6, LAG3.7 и LAG3.8, соответственно.

Фиг.6А, В, С, D и Е представляют собой графики, показывающие кривые термической обратимости (то есть термической стабильности) антител LAG3.1 (25F7), LAG3.5, LAG3.6, LAG3.7 and LAG3.8, соответственно.

Фиг.7 представляет собой график, показывающий активность связывания антител LAG3.1 (25F7) и LAG3.5 с активированными CD4+ Т-клетками человека и связывание антигена (Biacore).

На Фиг.8 показаны результаты пептидного картирования с применением масс-спектрометрии (химические модификации / молекулярная стабильность) для антител LAG3.1 (25F7) и LAG3.5, отражающие деамидирование и изомеризацию после культивирования в течение 5 дней при ускоренных стрессовых условиях, как описано здесь. На Фиг.8 показаны SEQ ID NO 46-52, соответственно, в порядке следования.

Фиг.9 представляет собой график сравнения профилей гидрофобности антител LAG3.1 (25F7) и LAG3.5.

Фиг.10 A, B, C и D представляют собой графики сравнения аффинности и физической стабильности (то есть термической и химической стабильности) антител LAG3.1 и LAG3.5 при 4C° и 40C°, то есть обоих ускоренных стрессовых условиях и анализы стабильности "в реальном времени", как описано здесь.

Фиг.11 A и B представляют собой графики сравнения доли модифицирования аминокислотных последовательностей антител LAG3.1 и LAG3.5 при 4C° и 40C°.

Подробное описание изобретения

Для лучшего понимания настоящего описания ниже приводится определение некоторых терминов. Дополнительные определения приведены по тексту подробного описания.

Термины "25F7," "антитело 25F7", "антитело LAG3.1" и "LAG3.1" означают специфичное к LAG-3 человека антитело, описанное в US2011/0150892 A1. Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 1), кодирующая вариабельный участок тяжелой цепи 25F7 (LAG3.1) и соответствующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 2), показана на Фиг.1A (с CDR последовательностями, обозначенными как SEQ ID NO: 4, 5 и 7, соответственно). Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 3), кодирующая вариабельный участок легкой цепи 25F7 (LAG3.1) и соответствующая аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 4) показаны на Фиг.1B (с CDR последовательностями, обозначенными как SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно).

Термин "LAG-3" означает ген активации лимфоцитов 3. Термин "LAG-3" включает варианты, изоформы, гомологи, ортологи и паралоги. Например, антитела, специфичные к белку LAG-3 человека, могут, в некоторых случаях вступать в перекрестную реакцию с белком LAG-3 видов, отличных от человека. В других

вариантах осуществления антитела, специфичные к белку LAG-3 человека, могут быть полностью специфичными к белку LAG-3 человека и могут не обладать видовой или иными типами перекрестной реактивности или могут вступать в перекрестную реакцию с LAG-3 некоторых других видов, но не всех других видов (например, вступать в перекрестную реакцию с LAG-3 обезьяны, но не LAG-3 мыши). Термин "LAG-3 человека" означает последовательность LAG-3 человека, такую как полная аминокислотная последовательность LAG-3 человека, имеющая номер NP_002277 в базе данных Genbank (SEQ ID NO: 29). Термин "LAG-3 мыши" означает последовательность LAG-3 мыши, такую как полная аминокислотная последовательность LAG-3 мыши, имеющая номер NP_032505 в базе данных Genbank. LAG-3 также известен из уровня техники как, например, CD223. Последовательность LAG-3 человека может отличаться от LAG-3 человека, имеющего номер NP_002277 в базе данных Genbank, за счет наличия, например, сохраненных мутаций или мутаций в несохраненных участках, при этом LAG-3 обладает в значительной степени той же биологической функцией, что и LAG-3, имеющий номер NP_002277 в базе данных Genbank. Например, биологическая функция LAG-3 человека заключается в наличии эпитопа во внеклеточном домене LAG-3, который специфично связана антителом по настоящему описанию или биологическая функция LAG-3 человека заключается в связывании с МНС молекулами II класса.

Термин "LAG-3 обезьяны" предназначен для описания LAG-3 белков, экспрессируемых обезьянами Старого и Нового Света, включая, без ограничения, LAG-3 обезьяны циномолгус и LAG-3 макаки резус. Соответствующая аминокислотная последовательность LAG-3 обезьяны представляет собой аминокислотную последовательность LAG-3 макаки резус, которая также депонирована в Genbank под номером XM_001108923. Другая соответствующая аминокислотная последовательность LAG-3 обезьяны представляет собой альтернативную последовательность макаки резус клона ra23-5, как описано в US 2011/0150892 A1. Альтернативная последовательность резус обладает одним отличием в аминокислоте в положении 419 по сравнению с депонированной в Genbank последовательностью.

Конкретная последовательность LAG-3 человека в целом будет, по меньшей мере, на 90% идентична аминокислотной последовательности LAG-3 человека Genbank NP_002277 и содержит аминокислотные остатки, которые позволяют идентифицировать аминокислотную последовательность как относящуюся к человеку при сравнении с аминокислотными последовательностями LAG-3 других видов

(например, мыши). В определенных случаях LAG-3 человека может быть, по меньшей мере, на 95% или даже, по меньшей мере, на 96%, 97%, 98% или 99% идентичен по аминокислотной последовательности LAG-3 Genbank NP_002277. В определенных вариантах осуществления последовательность LAG-3 человека будет демонстрировать разницу не более чем 10 аминокислот от последовательности LAG-3 Genbank NP_002277. В определенных вариантах осуществления LAG-3 человека может демонстрировать не более 5 или даже не более 4, 3, 2 и 1 отличий по аминокислотам от последовательности LAG-3 Genbank NP_002277. Доля идентичности может быть определена как описано здесь.

Термин "иммунный ответ" означает действие, например, лимфоцитов, антиген-презентирующих клеток, фагоцитарных клеток, гранулоцитов и растворимых макромолекул, продуцируемых вышеуказанными клетками или печенью (включая антитела, цитокины и комплемент), что приводит к селективному поражению, деструкции или удалению из организма человека инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых клеток или, в случае аутоиммунного или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека.

"Антигенспецифичный Т-клеточный ответ" означает ответы, опосредуемые Т-клетками, которые возникают вследствие стимулирования Т-клетки антигеном, по отношению к которому Т-клетка обладает специфичностью. Неограничивающие примеры ответов Т-клетки при антигенспецифичном стимулировании включают пролиферацию и продуцирование цитокинов (например, продуцирование IL-2).

В соответствии с используемым здесь значением термин "антитело" означает цельные антитела и их любой антигенсвязывающий фрагмент (то есть "антигенсвязывающую часть") или их отдельные цепи. Цельные антитела представляют собой гликопротеины, включающие, по меньшей мере, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного участка тяжелой цепи (обозначаемого здесь как V_H) и константного участка тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи состоит из трех доменов, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь состоит из переменного участка легкой цепи (обозначаемого здесь как V_L) и константного участка легкой цепи. Константный участок легкой цепи состоит из одного домена, C_L . V_H и V_L участки могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), разбросанные между участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками (FR). Каждый

V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные участки легкой и тяжелой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные участки антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями хозяина или факторами, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки), и первым компонентом (C1q) классической системы комплемента.

Термин "антигенсвязывающая часть" антитела (или просто "часть антитела") в соответствии с используемым здесь значением означает один или несколько фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, белком LAG-3). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающая часть" антитела, включают (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из V_L , V_H , C_L и C_{H1} доменов; (ii) F(ab')₂-фрагмент, бивалентный фрагмент, включающий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из V_H и C_{H1} доменов; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из V_H и C_{H1} доменов; (v) Fv-фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела; (vi) dAb-фрагмент (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), который состоит из V_H домена; (vii) выделенный определяющий комплементарность участок (CDR); и (viii) нанотело, вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий один вариабельный домен и два константных домена. Более того, несмотря на то, что два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , кодируются разными генами, они могут быть соединены с применением рекомбинантных способов с использованием синтетического линкера, который дает возможность получать их в виде единой белковой цепи, в которой V_L и V_H участки спариваются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv); см, например, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; и Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Данные одноцепочечные антитела также охватываются термином "антигенсвязывающая часть" антитела. Данные фрагменты антител получают с применением общепринятых способов, известных специалистам в данной области, при этом данные фрагменты подвергают скринингу для оценки применимости таким же образом, что и интактные антитела.

В соответствии с используемым здесь значением "выделенное антитело" означает антитело, являющееся практически свободным от других антител, обладающих

другими антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывает белок LAG-3, является практически свободным от антител, которые специфически связывают антигены, отличные от белков LAG-3). Однако выделенное антитело, которое специфически связывает белок LAG-3 человека, может обладать перекрестной реактивностью по отношению к другим антигенам, таким как белки LAG-3 других видов. Более того, выделенное антитело может являться практически свободным от иного клеточного материала и/или химических соединений. В соответствии с используемым здесь значением термины "моноклональное антитело" или "композиция моноклональных антител" означают препарат молекул антитела, имеющих один и тот же молекулярный состав. Композиция моноклонального антитела проявляет единственную специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа.

В соответствии с используемым здесь значением термин "антитело человека" включает антитела, имеющие переменные участки, в которых каркасные и CDR участки образованы из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии человека. Более того, если антитело содержит константный участок, то константный участок также происходит из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии человека. Антитела человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые иммуноглобулиновыми последовательностями зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro*, или соматическая мутация *in vivo*). Однако термин "антитело человека", в соответствии с используемым здесь значением, не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были пересажены в каркасные последовательности человека.

Термин "моноклональное антитело человека" означает антитела, проявляющие единственную специфичность связывания, которые имеют переменные участки, в которых каркасные участки и участки CDR получены из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии человека. В одном варианте осуществления моноклональные антитела человека получают с применением гибридомы, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного не являющегося человеком животного, например трансгенной мыши, имеющей геном, включающий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека, слитые с иммортализованной клеткой.

Термин "рекомбинантное антитело человека", в соответствии с используемым здесь значением, включает все антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как (а) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным в отношении генов иммуноглобулинов человека, или из гибридомы, полученной на основе этого (описано ниже), (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела человека, например из трансфектомы, (с) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг генных последовательностей иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Данные рекомбинантные антитела человека включают переменные участки, в которых каркасные и CDR участки получены из последовательностей зародышевой линии иммуноглобулина человека. Однако в определенных вариантах осуществления данные рекомбинантные антитела человека могут быть подвергнуты *in vitro* мутагенезу (или, когда применяют животное, трансгенное в отношении последовательностей Ig человека, *in vivo* соматическому мутагенезу), и, таким образом, аминокислотные последовательности V_H и V_L участков рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека или являются родственными им, могут не существовать в природе в репертуаре зародышевой линии антител человека *in vivo*.

Термин "изотип" означает класс антител (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константного участка тяжелой цепи.

Выражения "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфическое к антигену" применяются здесь взаимозаменяемо с выражением "антитело, которое специфически связывается с антигеном".

Термин "производные антител человека" означает любую модифицированную форму антитела человека, например конъюгат антитела и другого агента или антитела.

Термин "гуманизированное антитело" предназначен для обозначения антител, в которых в CDR последовательности, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были трансплантированы в каркасные последовательности человека. В каркасных последовательностях человека могут быть произведены дополнительные модификации каркасного участка.

Термин "химерное антитело" предназначен для обозначения антител, в которых последовательности переменного участка получены от одного вида, а последовательности константного участка получены от другого вида, такие как антитело, у которого последовательности переменного участка получены из антитела мыши, а последовательности константного участка получены от антитела человека.

В соответствии с используемым здесь значением, антитело, которое "специфически связывает LAG-3 человека" означает антитело, которое связывает белок LAG-3 человека (и, возможно, белок LAG-3 одного или нескольких не являющихся человеком видов), но по существу не связывается с не являющимися LAG-3 белками. Предпочтительно, антитело связывается с белком LAG-3 человека с "высокой аффинностью", более конкретно со значением K_D 1×10^{-7} М или менее, более предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 5×10^{-9} М или менее, более предпочтительно 1×10^{-9} М или менее.

Термин "по существу не связывается" с белком или клетками, в соответствии с используемым здесь значением, означает "не связывается или не связывается с высокой аффинностью с белком или клетками", то есть связывается с белком или клетками с K_D 1×10^{-6} М или выше, более предпочтительно 1×10^{-5} М или выше, более предпочтительно 1×10^{-4} М или выше, более предпочтительно 1×10^{-3} М или выше и еще более предпочтительно 1×10^{-2} М или выше.

Термин " $K_{ассоц}$ " или " K_a ", в соответствии с используемым здесь значением, предназначен для обозначения скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин " $K_{дис}$ " или " K_d ", в соответствии с используемым здесь значением, предназначен для обозначения скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин " K_D ", в соответствии с используемым здесь значением, предназначен для обозначения константы диссоциации, которую вычисляют исходя из отношения K_d к K_a (то есть K_d/K_a) и выражают в виде молярной концентрации (М). Значения K_D для антител могут быть определены с применением способов, хорошо известных из уровня техники. Предпочтительный способ определения K_D антитела представляет собой поверхностный плазменный резонанс, предпочтительно с применением биосенсорной системы, такой как система Biacore®.

Термин "высокая аффинность" в отношении антитела IgG означает антитело, обладающее K_D в отношении антигена-мишени 1×10^{-7} М или менее, более предпочтительно 5×10^{-8} М или менее, еще более предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, еще более предпочтительно 5×10^{-9} М или менее и еще более предпочтительно 1×10^{-9}

М или менее. Однако "высокая аффинность" связывания может отличаться для антител других изотипов. Например, "высокая аффинность" связывания изотипа IgM означает антитело с K_D 10^{-6} М или менее, более предпочтительно 10^{-7} М или менее, более предпочтительно 10^{-8} М или менее.

Термин "деамидирование" означает процесс химического распада, который спонтанно возникает в белках (например, антителах). Деамидирование удаляет амидную функциональную группу из аминокислотного остатка, такого как аспарагин и глутамин, таким образом повреждая его амидсодержащие боковые цепи. В частности, боковая цепь аспарагина атакует близлежащую пептидную группу, образуя симметричное сукцинимидное производное. Симметрия производного приводит к получению двух продуктов гидролиза, аспартата или изоаспартата. Аналогичная реакция может возникать в боковых цепях аспартата, приводя к частичному переходу в изоаспартат. В случае глутамина скорость деамидирования в целом составляет в десять раз менее, чем в случае аспарагина, однако механизм по существу является аналогичным и требующим только молекул воды.

Термин "субъект" включает любое животное, являющееся или не являющееся человеком. Термин "не являющееся человеком животное" включает всех позвоночных, например, млекопитающих и немлекопитающих, таких как не являющиеся человеком приматы, овцы, собаки, кошки, коровы, лошади, куры, земноводные и пресмыкающиеся, хотя млекопитающие являются предпочтительными, например не являющиеся человеком приматы, овцы, собаки, кошки, коровы и лошади.

Различные аспекты изобретения описаны более подробно в нижеследующих подразделах.

Анти-LAG-3 антитела с повышенной стабильностью и полезными функциональными свойствами

Антитела по изобретению специфически связываются с LAG-3 человека и обладают оптимизированной стабильностью по сравнению с описанными ранее анти-LAG-3 антителами, в частности по сравнению с антителом 25F7 (LAG3.1). Данная оптимизация включает пониженное деамидирование (например, повышенную химическую стабильность) и повышенный термический рефолдинг (например, повышенную физическую стабильность), при сохранении в то же время высокой аффинности связывания LAG-3 человека.

Способы идентификации сайтов деамидирования известны из уровня техники (см., например хроматографию на основе ионного обмена, обратной фазы и гидрофобного взаимодействия и пептидное картирование протеолитического расщепления (ВЭЖХ-МС)). Подходящие анализы для измерения физической стабильности включают, например, анализ точек плавления и/или рефолдинга структуры антитела после денатурации (например, долевая обратимость, как описано, например, в Примере 3, Раздел 3).

Связывание с LAG-3 человека может быть проанализировано с применением одного или нескольких способов, хорошо известных из уровня техники. Например, антитело может быть протестировано с применением анализа на основе проточной цитометрии, при котором антитело реагирует с клеточной линией, которая экспрессирует LAG-3 человека, такой как СНО клетки, которые были трансфицированы для экспрессии LAG-3 (например, LAG-3 человека или LAG-3 обезьяны (например, резус или циномолгус) или LAG-3 мыши) на их клеточной поверхности. Другие подходящие клетки для применения в рамках анализа на основе проточной цитометрии включают анти-CD3-стимулируемые $CD4^+$ активированные Т-клетки, которые экспрессируют нативный LAG-3. Дополнительно или альтернативно, связывание антитела, включая кинетические показатели связывания (например, значение K_D), могут быть протестированы с помощью анализов BIAcore. Другие подходящие анализы связывания включают анализы ELISA, например с применением рекомбинантного белка LAG-3.

Антитела по изобретению предпочтительно связываются с белком LAG-3 человека со значением K_D 1×10^{-7} М или менее, более предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, 5×10^{-9} М или менее или 1×10^{-9} М или менее.

Как правило, антитело связывается с LAG-3 в лимфоидных тканях, таких как миндалина, селезенка или тимус, что может быть детектировано с помощью иммуногистохимического анализа. В одном варианте осуществления антитело окрашивает гипофизную ткань (например, накапливается в гипофизе), что выявляется с помощью иммуногистохимического анализа. В другом варианте осуществления антитело не окрашивает гипофизную ткань (то есть не накапливается в гипофизе), что выявляется с помощью иммуногистохимического анализа.

Дополнительные функциональные свойства включают перекрестную реактивность с LAG-3 других видов. Например, антитело может связываться с LAG-3 обезьяны (например, обезьяны циномолгус, макаки резус), но практически не связывается с LAG-

3 мыши. Предпочтительно, антитело по изобретению связывается с LAG-3 человека с высокой аффинностью.

Другие функциональные свойства включают способность антитела стимулировать иммунный ответ, такой как антигенспецифичный Т-клеточный ответ. Это может быть определено, например, с помощью анализа способности антитела стимулировать продуцирование интерлейкина-2 (IL-2) при антигенспецифичном Т-клеточном ответе. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с LAG-3 человека и стимулирует антигенспецифичный Т-клеточный ответ. В других вариантах осуществления антитело связывается с LAG-3 человека, но не стимулирует антигенспецифичный Т-клеточный ответ. Другие средства для оценки способности антитела стимулировать иммунный ответ включают тестирование его способности ингибировать рост опухоли, такой как *in vivo* модель опухоли с ксенотрансплантатом (см., например, Пример 6) или способности стимулировать аутоиммунный ответ, такой как способность промотировать развитие аутоиммунного заболевания в аутоиммунной модели, например способность промотировать развитие диабета в модели с NOD мышами.

Предпочтительные антитела по изобретению представляют собой моноклональные антитела человека. Дополнительно или альтернативно, антитела могут представлять собой, например, химерные или гуманизированные моноклональные антитела.

Моноклональное антитело LAG3.5

Предпочтительное антитело по изобретению представляет собой моноклональное антитело человека, LAG3.5, структурно и химически характеризуемое как описано ниже в нижеприведенных Примерах. Аминокислотная последовательность V_H LAG3.5 показана в SEQ ID NO:12 (Фиг.2A). Аминокислотная последовательность V_L LAG3.5 показана в SEQ ID NO:14 (Фиг.2B).

V_H и V_L последовательности (или CDR последовательности) других анти-LAG—антител, которые связывают LAG-3 человека, могут быть "смешаны и спарены" с V_H и V_L последовательностями (или CDR последовательностями) антитела LAG3.5. Предпочтительно, при смешивании и спаривании V_H и V_L цепей (или CDR в данных цепях) V_H последовательность из конкретного V_H/V_L -спаривания замещается структурно сходной V_H последовательностью. Аналогичным образом, V_L последовательность из конкретного V_H/V_L -спаривания замещается структурно сходной V_L последовательностью.

Соответственно, в одном варианте осуществления антитела по изобретению или их антигенсвязывающие части включают:

- (a) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 (то есть V_H LAG3.5); и
- (b) вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 (то есть V_L LAG3.5) или V_L другого анти-LAG3 антитела (то есть отличного от LAG3.5);

при этом антитело специфично связывает LAG-3 человека.

В другом варианте осуществления антитела по изобретению или их антигенсвязывающие части включают:

- (a) CDR1, CDR2 и CDR3 участки вариабельного участка тяжелой цепи, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 (то есть CDR последовательности LAG3.5, SEQ ID NO:15, 16 и 17, соответственно); и
- (b) CDR1, CDR2 и CDR3 участки вариабельного участка легкой цепи, включающего аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 (то есть CDR последовательности LAG3.5, SEQ ID NO:18, 19 и 20, соответственно) или CDR другого анти-LAG3 антитела (то есть отличного от LAG3.5);

при этом антитело специфично связывает LAG-3 человека.

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть включает вариабельный CDR2 участок тяжелой цепи LAG3.5, объединенный с CDR других антител, которые связывают LAG-3 человека, например CDR1 и/или CDR3 из вариабельного участка тяжелой цепи и/или CDR1, CDR2 и/или CDR3 из вариабельного участка легкой цепи другого анти-LAG-3 антитела.

Кроме того, из уровня техники хорошо известно, что CDR3 домен независимо от CDR1 и/или CDR2 домена(нов) самостоятельно может определять специфичность связывания антитела в отношении его антигена и что множество антител с одной и той же специфичностью связывания могут быть прогнозируемо получены на основе общей CDR3 последовательности. См., например, Klimka *et al.*, *British J. of Cancer* **83**(2):252-260 (2000); Beiboer *et al.*, *J. Mol. Biol.* **296**:833-849 (2000); Rader *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:8910-8915 (1998); Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **116**:2161-2162 (1994); Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:2529-2533 (1995); Ditzel *et al.*, *J. Immunol.* **157**:739-749 (1996); Berezov *et al.*, *BLAjournal* **8**:Scientific Review 8 (2001); Igarashi *et al.*, *J. Biochem (Tokyo)* **117**:452-7 (1995); Bourgeois *et al.*, *J. Virol* **72**:807-10 (1998); Levi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:4374-8 (1993); Polymenis and Stoller, *J. Immunol.* **152**:5218-

5329 (1994) и Xu and Davis, *Immunity* 13:37-45 (2000). См. также патенты США 6951646; 6914128; 6090382; 6818216; 6156313; 6827925; 5833943; 5762905 и 5760185. Каждая из этих публикаций полностью приведена здесь для ссылки.

Соответственно, в другом варианте осуществления антитела по изобретению включают CDR2 переменного участка тяжелой цепи LAG3.5 и, по меньшей мере, CDR3 переменного участка тяжелой и/или легкой цепи LAG3.5 (SEQ ID NO: 17 и/или 20) или CDR3 переменного участка тяжелой и/или легкой цепи другого LAG-3 антитела, при этом антитело способно специфично связываться с LAG-3 человека. Данные антитела предпочтительно (а) конкурируют за связывание; (б) сохраняют функциональные характеристики; (с) связываются с одним эпитопом; и/или (d) обладают той же аффинностью связывания, что и LAG3.5. В другом варианте осуществления антитела также могут включать CDR2 переменного участка легкой цепи LAG3.5 (SEQ ID NO: 17 и/или 20) или CDR2 переменного участка легкой цепи другого LAG-3 антитела, при этом антитело способно специфично связываться с LAG-3 человека. В другом варианте осуществления антитела по изобретению также могут включать CDR1 переменного участка тяжелой и/или легкой цепи LAG3.5 (SEQ ID NO: 17 и/или 20) или CDR1 переменного участка тяжелой/или легкой цепи другого LAG-3 антитела, при этом антитело способно специфично связываться с LAG-3 человека.

Консервативные модификации

В другом варианте осуществления антитела по изобретению включают последовательности переменного участка тяжелой и/или легкой цепи CDR1, CDR2 и CDR3 последовательностей, которые отличаются от данных последовательностей LAG3.5 одной или несколькими консервативными модификациями. Однако в предпочтительном варианте осуществления остатки 54 и 56 CDR2 V_H сохраняются в виде аргинина и серина, соответственно (то есть не подвергаются мутации). Очевидно, что могут быть осуществлены такие консервативные модификации последовательностей, которые не приводят к потере способности связывать антиген. См., например, Brummell *et al.* (1993) *Biochem* 32:1180-8; de Wildt *et al.* (1997) *Prot. Eng.* 10:835-41; Komissarov *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:26864-26870; Hall *et al.* (1992) *J. Immunol.* 149:1605-12; Kelley and O'Connell (1993) *Biochem.* 32:6862-35; Adib-Conquy *et al.* (1998) *Int. Immunol.* 10:341-6 and Beers *et al.* (2000) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43. Соответственно, в одном варианте осуществления антитело включает переменный

участок тяжелой цепи, включающий CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности и/или переменный участок легкой цепи, включающий CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности, при этом:

- (a) CDR1 последовательность переменного участка тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 15 и/или ее консервативные модификации, за исключением положений 54 и 56; и/или
- (b) CDR3 последовательность переменного участка тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 17 и ее консервативные модификации; и/или
- (c) CDR1 и/или CDR2 и/или CDR3 последовательности переменного участка легкой цепи включают SEQ ID NO: 18 и/или SEQ ID NO: 19 и/или SEQ ID NO: 20 и/или их консервативные модификации; и
- (d) антитело специфически связывает LAG-3 человека.

Дополнительно или альтернативно, антитело может обладать одной или несколькими из следующих функциональных свойств, описанных выше, таких как связывание LAG-3 человека с высокой аффинностью, связывание LAG-3 обезьяны, отсутствие связывания LAG-3 мыши, способность ингибировать связывание LAG-3 с МНС молекулами II класса и/или способности стимулировать антигенспецифичные Т-клеточные ответы.

В различных вариантах осуществления антитело может представлять собой, например, антитело человека, гуманизированное антитело или химерное антитело.

В соответствии с используемым здесь значением термин "консервативные модификации последовательности" означает аминокислотные модификации, которые незначительно влияют или изменяют характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Данные консервативные модификации включают аминокислотные замещения, добавления или делеции. Модификации могут быть введены в антитело по изобретению стандартными способами, известными из уровня техники, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замещения представляют собой замещения, при которых аминокислотный остаток замещается другим аминокислотным остатком с аналогичной боковой цепью. В уровне техники определены семейства аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи. Такие семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями

(например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или несколько аминокислотных остатков в CDR участках антитела по изобретению могут быть заменены на другие аминокислотные остатки семейства с теми же боковыми цепями, при этом изменённое антитело может быть проверено на предмет сохранения функции (а именно функций, указанных выше) с применением описанных здесь функциональных анализов.

Сконструированные и модифицированные антитела

Антитела по изобретению могут быть получены с применением антитела, имеющего одну или несколько V_H и/или V_L последовательностей LAG3.5 в качестве исходного материала для конструирования модифицированного антитела. Антитело может быть сконструировано с помощью модификации одного или нескольких остатков в одном или обоих переменных участках (то есть V_H и/или V_L), например в одном или нескольких CDR участках и/или в одном или нескольких каркасных участках. Дополнительно или альтернативно, антитело может быть сконструировано путем модификации остатков в константном участке(ах), например для изменения эффекторной функции(й) антитела.

В определенных вариантах осуществления может применяться трансплантирование CDR для конструирования переменных участков антител. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно через аминокислотные остатки, которые расположены в шести определяющих комплементарность участках (CDR) тяжелой и легкой цепи. По этой причине аминокислотные последовательности в CDR являются более разнообразными между отдельными антителами, чем последовательности вне CDR. Поскольку CDR последовательности отвечают за большинство взаимодействий антитело-антиген, является возможным экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства специфических встречающихся в природе антител, конструированием экспрессирующих векторов, которые включают CDR последовательности из специфического встречающегося в природе антитела, трансплантированные в каркасные последовательности из другого антитела с иными свойствами (см., например, Riechmann *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones *et al.*

(1986) *Nature* 321:522-525; Queen *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; патенты США 5225539; 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370).

Соответственно, другой вариант осуществления изобретения относится к выделенному моноклональному антителу, его антигенсвязывающей части, включающей переменный участок тяжелой цепи, включающий CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности, включающие SEQ ID NO: 15, 16, 17, соответственно, и/или переменный участок легкой цепи, включающий CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности, включающие SEQ ID NO: 18, 19, 20, соответственно (то есть CDR LAG3.5). В то время как данные антитела содержат CDR последовательности V_H и V_L моноклонального антитела LAG3.5, они могут содержать иные каркасные последовательности.

Данные каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных источников, которые включают последовательности генов антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК зародышевой линии для генов переменного участка тяжелой и легкой цепей человека можно найти в базе данных последовательностей зародышевой линии человека "VBase" (на сайте в www.mrc-sre.cam.ac.uk/vbase), а также в публикациях Kabat *et al.* (1991), цитированных выше; Tomlinson *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; and Cox *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; содержание каждой из которых полностью приведено здесь для ссылки. В качестве другого примера, ДНК последовательности зародышевой линии генов переменных участков тяжелой и легкой цепей человека могут быть найдены в базе данных Genbank. Например, следующие последовательности тяжелой цепи зародышевой линии, входящие в состав HCo7 HuMAb мыши, доступны в базе Genbank под номерами: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 & BC070333), 3-33 (NG_0010109 & NT_024637) и 3-7 (NG_0010109 & NT_024637). В качестве другого примера, следующие последовательности зародышевой линии тяжелой цепи, входящие в состав HCo12 HuMAb мыши, доступны в GenBank под номерами: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 & BC070333), 5-51 (NG_0010109 & NT_024637), 4-34 (NG_0010109 & NT_024637), 3-30.3 (CAJ556644) & 3-23 (AJ406678).

Белковые последовательности антитела сравниваются с последовательностями белков, имеющихся в компилированной базе данных, с применением одного из способов

поиска сходства последовательностей, называемых Gapped BLAST (Altschul *et al.* (1997), *выше*), которые хорошо известны из уровня техники.

Предпочтительные каркасные последовательности для применения в антителах по изобретению представляет собой антитела, которые структурно сходны с каркасными последовательностями, применяемыми в выбранных антителах по изобретению, например, сходные с V_H 4-34 каркасными последовательностями и/или V_K L6 каркасными последовательностями, применяемыми в предпочтительных моноклональных антителах по изобретению. CDR1, CDR2 и CDR3 V_H последовательности и CDR1, CDR2 и CDR3 V_K последовательности могут быть трансплантированы в каркасные участки, которые имеют последовательность, идентичную последовательности, обнаруженной в гене иммуноглобулина зародышевой линии, из которой получена указанная каркасная последовательность, или такие CDR последовательности могут быть трансплантированы в каркасные участки, которые содержат одну или несколько мутаций в сравнении с последовательностями зародышевой линии. Например, было обнаружено, что в некоторых случаях предпочтительно осуществить мутацию остатков в каркасных участках для сохранения или повышения антигенсвязывающей способности антитела (см., например, патенты США 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370).

Другой тип модификации варибельного участка представляет собой мутирование аминокислотных остатков в CDR1, CDR2 и/или CDR3 V_H и/или V_L участках для обеспечения, таким образом, улучшения одного или нескольких свойств связывания (например, аффинности) представляющего интерес антитела. Для введения мутации(й) может быть осуществлен сайт-специфический мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез, при этом влияние на связывание антитела или другое интересующее функциональное свойство может быть оценено в *in vitro* или *in vivo* анализах, описанных здесь и указанных в разделе Примеры. Предпочтительно вводятся консервативные модификации (обсуждаемые выше). Мутации могут представлять собой аминокислотные замещения, добавления или делеции, но предпочтительно они представляют собой замещения. Более того, обычно не более чем один, два, три, четыре или пять остатков в CDR участке являются модифицированными.

Соответственно, в другом варианте осуществления изобретение относится к выделенным анти-LAG-3 моноклональным антителам или их антигенсвязывающим частям, включающим варибельный участок тяжелой цепи, включающий: (а) V_H CDR1 участок, включающий SEQ ID NO: 15 или аминокислотную последовательность,

имеющую одно, два, три, четыре или пять аминокислотных замещений, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 15; (b) V_H CDR2 участок, включающий SEQ ID NO: 16 или аминокислотную последовательность, имеющую одно, два, три, четыре или пять аминокислотных замещений, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 16 (предпочтительно где положения 54 и 56 такие же, что и в SEQ ID NO: 16); (c) V_H CDR3 участок, включающий SEQ ID NO: 17 или аминокислотную последовательность, имеющую одно, два, три, четыре или пять аминокислотных замещений, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 17; (d) V_L CDR1 участок, включающий SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, имеющую одно, два, три, четыре или пять аминокислотных замещений, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 18; (e) V_L CDR2 участок, включающий SEQ ID NO: 19 или аминокислотную последовательность, имеющую одно, два, три, четыре или пять аминокислотных замещений, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 19; и (f) V_L CDR3 участок, включающий SEQ ID NO: 20 или аминокислотную последовательность, имеющую одно, два, три, четыре или пять аминокислотных замещений, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 20.

Сконструированные антитела по изобретению включают антитела, в которых были сделаны модификации в каркасных остатках в V_H и/или V_L , например для улучшения свойств антитела. Как правило, такие модификации в каркасном участке осуществляют для снижения иммуногенности антитела. Например, один подход заключается в том, чтобы "мутировать обратно" один или несколько каркасных остатков в соответствующие остатки последовательности зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое было подвергнуто соматической мутации, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой получено данное антитело. Такие остатки могут быть идентифицированы сравнением каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевой линии, из которой получено данное антитело.

Другой тип каркасной модификации включает мутацию одного или нескольких остатков в каркасном участке или даже в одном или нескольких CDR участках для удаления Т-клеточных эпитопов, чтобы тем самым понизить потенциальную иммуногенность антитела. Данный подход также обозначают как "деиммунизация", и он более подробно описан в патентной публикации США 20030153043.

В качестве дополнения или альтернативы модификациям, производимым в каркасных или CDR участках, антитела по изобретению могут быть сконструированы таким

образом, что они включают модификации в Fc участке, обычно для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как период полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc рецептора и/или антиген-зависимая клеточная цитотоксичность. Более того, антитело по изобретению может быть также химически модифицировано (например, к антителу могут быть присоединены одна или несколько химических групп) или может быть модифицировано для изменения его гликозилирования, опять для изменения одного или нескольких функциональных свойств данного антитела. Каждый из данных вариантов описан более подробно ниже. Нумерация остатков в Fc участке соответствует нумерации по EU-индексу Kabat.

В предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой антитело изотипа IgG4, включающее мутацию с замещением серина на пролин в положении, соответствующем положению 228 (S228P; EU индекс) в шарнирном участке константного участка тяжелой цепи. Было отмечено, что данная мутация устраняет гетерогенность дисульфидных мостиков между тяжелыми цепями в шарнирном участке (Angal *et al. выше*; положение 241 на основе системы нумерации Kabat).

В одном варианте осуществления шарнирный участок CH1 модифицирован таким образом, что количество остатков цистеина в шарнирном участке изменено, например увеличено или уменьшено. Данный подход также описан в патенте США 5677425. Количество остатков цистеина в шарнирном участке CH1 изменяют, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей или для увеличения или уменьшения стабильности антитела.

В другом варианте осуществления мутация в Fc шарнирном участке антитела понижает биологический период полужизни антитела. Более конкретно, одну или несколько мутаций аминокислот вводят в участок контакта CH2-CH3 домена Fc-шарнирного фрагмента таким образом, чтобы ослаблялось связывание антитела с Staphylococcus белком A (SpA) по сравнению со связыванием нативного Fc-шарнирного домена SpA. Данный подход также описан в патенте США 6165745.

В другом варианте осуществления антитело модифицируют для повышения его биологического периода полужизни. Возможны различные подходы. Например, могут быть введены одна или несколько следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США 6277375. Альтернативно, для увеличения биологического периода полужизни антитело может быть изменено в CH1 или CH2 участке таким образом, что оно содержит эпитоп связывания рецептора реутилизации, образованного

из двух петель СН2 домена Fc участка IgG, как описано в патентах США 5869046 и 6121022.

В других вариантах осуществления Fc участок изменяют, заменяя, по меньшей мере, один аминокислотный остаток на другой аминокислотный остаток для изменения эффекторной функции(й) антитела. Например, одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, могут быть заменены другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененную аффинность в отношении эффекторного лиганда, но сохраняет антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторным лигандом, в отношении которого аффинность изменяется, может представлять собой, например, Fc рецептор или C1-компонент комплемента. Данный подход также описан в патентах США 5624821 и 5648260.

В другом примере одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322, могут быть заменены другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененное связывание C1q и/или уменьшенную или устраненную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Данный подход также описан в патенте США 6194551.

В другом примере изменяют один или несколько аминокислотных остатков в положениях аминокислот 231 и 239, таким образом изменяя способность антитела фиксировать комплемент. Данный подход также описан в публикации PCT WO 94/29351.

В другом примере Fc участок модифицируют для повышения способности антитела опосредовать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для повышения аффинности антитела по отношению к Fcγ рецептору путем модификации одной или нескольких аминокислот в следующих положениях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439. Данный подход также описан в публикации PCT WO 00/42072. Более того, сайты связывания на IgG1 человека для FcγR1, FcγR2, FcγR3 и FcRn были картированы, при этом были описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Было показано, что определенные мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 улучшают связывание с FcγR3. Кроме того, было показано, что следующие сочетанные мутации

улучшают связывание FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A.

В другом варианте осуществления гликозилирование антитела является модифицированным. Например, может быть получено агликозилированное антитело (то есть антитело без гликозилирования). Гликозилирование может быть изменено с целью, например, увеличения аффинности антитела к антигену. Такие модификации углеводов могут быть осуществлены, например, путем изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, могут быть осуществлены одно или несколько аминокислотных замещений, которые приводят к устранению одного или нескольких сайтов гликозилирования каркасного участка варибельного участка, благодаря чему устраняется гликозилирование в данном сайте. Данное агликозилирование может увеличивать аффинность антитела в отношении антигена. См., например, патенты США 5714350 и 6350861.

Дополнительно или альтернативно, антитело может быть получено таким образом, чтобы оно имело измененный тип гликозилирования, например гипофукозилированное антитело, содержащее сниженное количество остатков фукозы, или антитело, содержащее повышенное количество двухантенных GlcNac структур. Было показано, что такие измененные паттерны гликозилирования повышают ADCC-способность антител. Данные модификации углеводов могут быть выполнены, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования были описаны в уровне техники и могут применяться в качестве клеток-хозяев для экспрессии в них рекомбинантных антител по изобретению, чтобы таким образом получить антитело с измененным гликозилированием. Например, в линиях клеток Ms704, Ms705 и Ms709 отсутствует ген фукозилтрансферазы, FUT8 (α (1,6)-фукозилтрансфераза), так что в антителах, экспрессируемых в Ms704, Ms705 и Ms709 клеточных линиях, отсутствует фукоза в углеводах. FUT8^{-/-} клеточные линии Ms704, Ms705 и Ms709 были созданы таргетированным разрушением гена FUT8 в CHO/DG44 клетках с применением двух замещающих векторов (см. публикацию патента США 20040110704 и Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). В качестве другого примера, в EP 1176195 описана клеточная линия с функционально разрушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, так что у антител, экспрессируемых в такой клеточной линии, наблюдается гипофукозилирование за счет снижения или устранения фермента, имеющего отношение к α -1,6-связи. В EP 1176195 также описаны клеточные линии,

которые имеют низкую ферментативную активность в отношении присоединения фукозы к N-ацетилглюкозамину, который связывается с Fc участком антитела или не имеет ферментативной активности, например клеточная линия миеломы крысы YB2/0 (ATCC CRL 1662). В публикации PCT WO 03/035835 описан вариант клеточной линии CHO, Lec13 клетки, с уменьшенной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в данной клетке-хозяине (см. также Shields *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Антитела с модифицированным профилем гликозилирования могут быть получены в яйцах кур, как описано в PCT публикации WO 06/089231. Альтернативно, антитела с модифицированным профилем гликозилирования могут быть получены в клетках растений, таких как *Lemna*. Способы получения антител в растительной системе описаны в заявке США, соответствующей номеру дела в книге записей поверенного Alston & Bird LLP 040989/314911, поданной 11 августа 2006. В публикации PCT WO 99/54342 описаны клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)) таким образом, что антитела, экспрессируемые в таких сконструированных клеточных линиях, проявляют увеличенное разделение на две половины GlcNac структур, что приводит к увеличенной ADCC активности антител (см. также Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Альтернативно, остатки фукозы антитела могут быть отщеплены с помощью фермента фукозидазы, например фукозидаза α -L-фукозидаза удаляет фукозильные остатки из антител (Tarentino *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Другая модификация антител по изобретению представляет собой пэгилирование. Антитело может быть пэгилировано, например, для повышения биологического периода полужизни антитела (например, в сыворотке). Для пэгилирования антитела антитело или его фрагмент, как правило, подвергают реакции с полиэтиленгликолем (ПЭГ), таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, при которых одна или несколько ПЭГ групп присоединяются к антителу или фрагменту антитела. Предпочтительно пэгилирование осуществляют посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или с аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). В соответствии с используемым здесь значением термин "полиэтиленгликоль" охватывает любую из форм ПЭГ, которые применялись для дериватизации других белков, такую как моно(C1-C10)алкокси- или

арилоксиполиэтиленгликоль или малеимид полиэтиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления пэгиллируемое антитело представляет собой агликозилированное антитело. Способы пэгиллирования белков известны из уровня техники и могут применяться к антителам по изобретению. См., например, EP 0154316 и EP 0401384.

Физические свойства антител

Антитела по изобретению могут быть охарактеризованы их различными физическими свойствами для детектирования и/или различения их классов.

Например, антитела могут содержать один или несколько сайтов гликозилирования в переменном участке тяжелой или легкой цепи. Данные сайты гликозилирования могут обеспечивать повышенную иммуногенность антитела или изменение pK антитела вследствие изменения связывания антигена (Marshall *et al* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Было показано, что гликозилирование происходит в мотивах, содержащих N-X-S/T последовательность. В некоторых случаях предпочтительно иметь анти-LAG-3 антитело без гликозилирования переменного участка. Это может быть достигнуто либо путем отбора антител, которые не содержат мотив гликозилирования в переменном участке, либо путем осуществления мутаций остатков в участке гликозилирования.

В предпочтительном варианте осуществления антитела не содержат сайтов изомерии аспарагина. Деамидирование аспарагина может возникать в N-G или D-G последовательностях и приводить к образованию остатка изоаспарагиновой кислоты, который вызывает образование петли полипептидной цепи или снижение ее стабильности (эффект изаспарагиновой кислоты).

Каждое антитело обладает уникальной изоэлектрической точкой (pI), которая обычно лежит в диапазоне pH от 6 до 9,5. pI антитела IgG1 обычно лежит в диапазоне pH 7-9,5, а pI антитела IgG4 обычно лежит в диапазоне pH 6-8. Существует предположение, что антитела, pI которых находится за пределами нормального диапазона, могут обладать некоторым нарушением фолдинга и нестабильностью при *in vivo* условиях. Таким образом, предпочтительно получать анти-LAG-3 антитела, значение pI которых лежит в нормальном диапазоне. Это может быть достигнуто либо путем отбора антитела с pI в

нормальном диапазоне, либо путем осуществления мутаций заряженных поверхностных остатков.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела изобретения

В другом аспекте изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют переменные участки тяжелой и/или легкой цепи, или CDR, антител по изобретению. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в цельных клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "по существу чистой", если она очищена от других клеточных компонентов или других примесей, например от других клеточных нуклеиновых кислот или белков, стандартными способами, включая обработку щелочью/ДСН, центрифугирование в градиенте плотности CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез на агарозном геле и другие способы, хорошо известные из уровня техники. См., Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Нуклеиновая кислота по изобретению может представлять собой, например, ДНК или РНК, и может содержать или не содержать интронные последовательности. В предпочтительном варианте осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть получены с применением стандартных способов молекулярной биологии. В случае антител, экспрессированных в гибридомах (например, гибридомах, полученных от трансгенных мышей, имеющих гены иммуноглобулина человека, как более подробно описано ниже), кДНК, кодирующие легкую и тяжелую цепи антитела, полученного с применением гибридомы, могут быть получены обычными способами ПЦР-амплификации или кДНК клонирования. В случае антител, полученных из библиотеки генов иммуноглобулинов (например, с применением способов фагового дисплея), кодирующая такие антитела нуклеиновая кислота может быть получена из библиотеки генов.

Предпочтительные нуклеиновые кислоты по изобретению включают нуклеиновые кислоты, которые кодируют V_H и V_L последовательности моноклонального антитела LAG3.5 (SEQ ID NO: 12 и 14, соответственно) или CDR. После получения фрагментов ДНК, кодирующих V_H и V_L сегменты, данные фрагменты ДНК могут быть далее обработаны стандартными способами рекомбинантных ДНК, например для превращения генов переменного участка в полноразмерные гены цепи антитела, в гены Fab фрагмента или в ген scFv. При данных манипуляциях фрагмент ДНК,

кодирующий V_L или V_H , функционально связывают с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой как константный участок антитела или гибкий линкер. Термин "оперативно связан", используемый в данном контексте, предназначен для обозначения того, что два фрагмента ДНК связаны так, что аминокислотные последовательности, кодируемые двумя фрагментами ДНК, остаются в рамке считывания.

Выделенная ДНК, кодирующая V_H -участок, может быть превращена в полноразмерный ген тяжелой цепи функциональным связыванием V_H -кодирующей ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константные участки тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3). Последовательности генов константных участков тяжелой цепи человека известны из уровня техники (см., Kabat *et al.* (1991), *выше*), а фрагменты ДНК, включающие такие участки, могут быть получены с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константный участок тяжелой цепи может представлять собой константный участок IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, но наиболее предпочтительно представляет собой константный участок IgG1 или IgG4. Для гена Fab фрагмента тяжелой цепи V_H -кодирующая ДНК может быть оперативно связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только константный участок CH1 тяжелой цепи.

Выделенная ДНК, кодирующая V_L участок, может быть превращена в полноразмерный ген легкой цепи (а также ген легкой цепи Fab) путем функционального связывания V_L -кодирующей ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константный участок легкой цепи CL. Последовательности генов константных участков легкой цепи человека известны из уровня техники (см., например, Kabat *et al.*, *выше*), а фрагменты ДНК, включающие такие участки, могут быть получены путем стандартной ПЦР-амплификации. В предпочтительных вариантах осуществления константный участок легкой цепи может представлять собой константный участок каппа или лямбда. Для создания гена scFv V_H - и V_L -кодирующие фрагменты ДНК функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly₄-Ser)₃ (SEQ ID NO: 28), так что V_H и V_L последовательности могут быть экспрессированы в виде непрерывного одноцепочечного белка с V_H и V_L участками, соединенными гибким линкером (см., например, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

Получение моноклональных антител по изобретению

Моноклональные антитела (mAb) по настоящему изобретению могут быть получены с применением хорошо известного способа на основе гибридизации соматических клеток (гибридом) по Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Другие варианты получения моноклональных антител включают способы на основе вирусной или онкогенной трансформации В-лимфоцитов и фаговый дисплей. Химерные или гуманизированные антитела также хорошо известны из уровня техники. См., например, патенты США 4816567; 5225539; 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, содержание которых полностью приведено здесь для ссылки.

В предпочтительном варианте осуществления антитела по изобретению представляют собой моноклональные антитела человека. Такие моноклональные антитела человека, направленные против LAG-3 человека, могут быть получены с применением трансгенных или трансхромосомных мышей, имеющих части иммунной системы человека вместо системы мыши. Данные трансгенные или трансхромосомные мыши включают мышей, обозначаемых здесь как HuMAb Mouse® и KM Mouse®, соответственно, и совместно обозначаются здесь как "мыши с Ig человека".

HuMAb Mouse® (Medarex®, Inc.) содержит минилокусы гена иммуноглобулина человека, которые кодируют переаранжированные последовательности тяжелой (μ и γ) и легкой к цепей иммуноглобулина человека, вместе с таргетированными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы μ и κ цепей (см., например, Lonberg, (1994) *Nature* 368(6474): 856-859).

Таким образом, данные мыши обнаруживают сниженную экспрессию IgM мыши или κ , при этом в ответ на иммунизацию введенные трансгены тяжелой и легкой цепей человека подвергаются переключению класса и соматической мутации с продуцированием моноклонального IgGк человека с высокой аффинностью (Lonberg *et al.* (1994), *выше*; описано у Lonberg (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, и Harding and Lonberg (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Получение и применение HuMAb Mouse®, а также геномные модификации, имеющиеся у таких мышей, также описаны у Taylor *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailleon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailleon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; и Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851,

содержание которых полностью приведено здесь для ссылки. См. также патенты США 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; 5770429; и 5545807; PCT публикации WO 92/03918; WO 93/12227; WO 94/25585; WO 97/13852; WO 98/24884; WO 99/45962 и WO 01/14424, содержание которых полностью приведено здесь для ссылки.

В другом варианте осуществления антитела человека по изобретению могут быть продуцированы с применением мышей, имеющих последовательности иммуноглобулина человека в трансгенах и трансхромосомах, например мышей, имеющих трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Данные мыши обозначаются здесь как "KM mouse[®]" и подробно описаны в PCT публикации WO 02/43478. Модифицированная форма такой мыши, которая также характеризуется гомозиготным нарушением эндогенного FcγRIIB рецепторного гена, также описана в PCT публикации WO 02/43478 и обозначается здесь как "KM/FCGR2D mouse[®]". Кроме того, могут применяться мыши с HCo7 или HCo12 трансгенами тяжелой цепи или ими обоими.

Дополнительные варианты трансгенных животных включают Xenomouse (Abgenix, Inc., патенты США 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963). Другие варианты включают "TC мышей" (Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727) и коров, имеющих трансхромосомы тяжелой и легкой цепи человека (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894; PCT публикация WO 02/092812). Содержание данных патентов и публикаций полностью приведено здесь для ссылки.

В одном варианте осуществления моноклональные антитела человека по изобретению получают с применением способов фагового дисплея для скрининга библиотек генов иммуноглобулинов человека. См., например, патенты США 5223409; 5403484; 5571698; 5427908; 5580717; 5969108; 6172197; 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915; и 6593081, содержание которых полностью приведено здесь для ссылки.

Моноклональные антитела человека по изобретению могут быть также получены с применением SCID мышей, в которых иммунные клетки человека были реконструированы таким образом, что после иммунизации могла быть получена реакция антител человека. См., например, патенты США 5476,996 и 5698767, содержание которых полностью приведено здесь для ссылки.

В другом варианте осуществления анти-LAG-3 антитела человека получают с применением фагового дисплея, при котором фаги включают нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, продуцируемые в трансгенных животных, ранее

иммунизированных LAG-3. В предпочтительном варианте осуществления трансгенное животное представляет собой HuMab, KM или Kіpin мышь. См., например, патент США 6794132, содержание которого полностью приведено здесь для ссылки.

Иммунизация мышей Ig человека

В одном варианте осуществления изобретения мышей с Ig человека иммунизируют очищенным или обогащенным препаратом на основе LAG-3 антигена, рекомбинантного LAG-3 белка или клеток, экспрессирующих LAG-3 белок. См., например, Lonberg *et al.* (1994), *выше*; Fishwild *et al.* (1996), *выше*; PCT публикации WO 98/24884 или WO 01/14424, содержание которых полностью приведено здесь для ссылки. В предпочтительном варианте осуществления мышей возрастом 6-16 недель иммунизируют 5-50 мкг LAG-3 белка. Альтернативно, применяют слитый полипептид из части LAG-3 и части, не являющейся LAG-3.

В одном варианте осуществления трансгенных мышей иммунизируют интраперитонеально (I/P) или внутривенно (I/V) LAG-3 антигеном в полном адъюванте Фрейнда с последующими I/P или I/V иммунизациями антигеном в неполном адъюванте Фрейнда. В других вариантах осуществления применяют адъюванты, не являющиеся адъювантом Фрейнда, или цельные клетки без адъюванта. Плазма может быть подвергнута скринингу с применением ELISA, при этом клетки мышей с достаточными уровнями титра анти-LAG-3 иммуноглобулина человека могут применяться для получения слитых конструков.

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела человека по изобретению.

Для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела человека по изобретению, спленоциты и/или клетки лимфатических узлов иммунизированных мышей могут быть выделены и слиты с подходящей иммортализованной клеточной линией, такой как линия миеломных клеток мыши. Полученные гибридомы могут быть подвергнуты скринингу на продуцирование антигенспецифичных антител. Получение гибридом хорошо известно из уровня техники. См., например, Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York.

Получение трансфектом, продуцирующих моноклональные антитела по изобретению

Антитела по изобретению могут быть также получены в трансфектоме клетки-хозяина, например с применением комбинирования способов рекомбинантных ДНК и способов трансфекции генов, как хорошо известно из уровня техники (например, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202). В одном варианте ДНК, кодирующую части или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, полученную стандартными молекулярно-биологическими способами, вставляют в один или несколько векторов экспрессии, так что гены являются функционально связанными с транскрипционными и трансляционными регуляторными последовательностями. В данном контексте термин "функционально связан" означает, что ген антитела лигирован в вектор таким образом, что последовательности контроля транскрипции и трансляции в векторе осуществляют свою функцию, заключающуюся в регулировании транскрипции и трансляции гена антитела.

Термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепей антитела. Данные регуляторные последовательности описаны, например, у Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего включают вирусные элементы, которые приводят к высоким уровням экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, полученные из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян 40 (SV40), аденовируса (например, основной поздний промотор аденовируса (AdMLP)) и вируса полиомы. Альтернативно, могут применяться невирусные регуляторные последовательности, такие как промотор убиквитина или промотор β -глобина. Кроме того, могут применяться регуляторные элементы, составленные из последовательностей из разных источников, такие как промоторная система $SR\alpha$, которая содержит последовательности из раннего промотора SV40, и длинный концевой повтор вируса Т-клеточного лейкоза человека типа 1 (Takebe *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472). Вектор экспрессии и контрольные последовательности экспрессии выбирают таким образом, чтобы они были совместимы с применяемой клеткой-хозяином.

Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела могут быть вставлены в один или различные векторы экспрессии. В предпочтительных вариантах осуществления применяют переменные участки для создания полноразмерных генов антитела

любого изотипа путем их встраивания в векторы экспрессии, которые уже кодируют константный участок тяжелой цепи и константный участок легкой цепи требуемого изотипа, так что V_H сегмент функционально связан с C_H сегментом(ами) в векторе, а V_L сегмент функционально связан с C_L сегментом в векторе. Дополнительно или альтернативно, рекомбинантный вектор экспрессии может кодировать сигнальный пептид, обеспечивающий секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепей антитела может быть клонирован в вектор, так что сигнальный пептид связан в рамке считывания с аминоконцом гена цепей антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (то есть сигнальный пептид из неиммуноглобулинового белка).

В дополнение к генам цепей антитела и регуляторным последовательностям рекомбинантные векторы экспрессии по изобретению могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, ориджины репликации) и селективируемые маркерные гены. Селективируемый маркерный ген обеспечивает отбор клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США 4399216, 4634665 и 5179017). Например, в типичном случае селективируемый маркерный ген обуславливает устойчивость к лекарственным веществам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетки-хозяина, в которую был введен вектор. Предпочтительные селективируемые маркерные гены включают в ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в dhfr-клетках-хозяевах с отбором/амплификацией в присутствии метотрексата) и ген нео (для отбора в присутствии G418).

Для экспрессии легких и тяжелых цепей экспрессирующий вектор(ы), кодирующие тяжелые и легкие цепи, трансфицируют в клетку-хозяина с помощью стандартных способов. Различные формы термина "трансфекция" охватывают широкий спектр способов, широко применяемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например электропорацию, кальций-фосфатную преципитацию, ДЭАЭ-декстрановую трансфекцию и им подобные. Хотя теоретически возможно экспрессировать антитела по изобретению в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, наиболее предпочтительной является экспрессия антител в эукариотических клетках и, наиболее предпочтительно, в клетках-хозяевах млекопитающих, поскольку такие эукариотические клетки, и в особенности клетки млекопитающих, скорее чем прокариотические, подходят для сборки и секретирования соответствующим образом сложенного и иммунологически активного антитела.

Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител по изобретению включают клетки яичника китайского хомячка (CHO клетки) (включая dhfr⁻ CHO клетки, описанные у Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, применяемые с селектируемым маркером DHFR, например как описано у R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621), NSO клетки миеломы, COS клетки и SP2 клетки. В частности, для применения с NSO клетками миеломы другая предпочтительная система экспрессии представляет собой систему экспрессии на основе GS генов, описанную в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338,841. Если рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие гены антитела, вводят в клетки-хозяева млекопитающего, антитела продуцируют путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения экспрессии антитела в клетках-хозяевах, или, более предпочтительно секретируют антитела в культуральную среду, в которой выращиваются клетки-хозяева. Антитела могут быть выделены из культуральной среды с применением стандартных способов очистки белков.

Иммуноконъюгаты

Антитела по изобретению могут быть конъюгированы с терапевтическим агентом для образования иммуноконъюгата, такого как конъюгат антитело-лекарство (ADC). Подходящие терапевтические агенты включают антиметаболиты, алкилированные агенты, связывающие малую бороздку ДНК агенты, ДНК интеркалаты, агенты для поперечного связывания ДНК, ингибиторы гистонацетилазы, ингибиторы ядерного экспорта, ингибиторы протеасомы, ингибиторы топоизомеразы I или II, ингибиторы белков теплового шока, ингибиторы тирозинкиназы, антибиотики и антимиотические агенты. В ADC антитела и терапевтический агент предпочтительно конъюгированы через расщепляемый линкер, такой как пептидильный, дисульфидный или гидразонный линкер. Более предпочтительно, линкер представляет собой пептидильный линкер, такой как Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 39), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser или Glu. ADC могут быть получены как описано в патентах США 7087600; 6989452 и 7129261; PCT публикациях WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312 и WO 08/103693; патентных публикациях США 20060024317; 20060004081 и 20060247295, описание которых приведено здесь для ссылки.

Биспецифические молекулы

В другом аспекте настоящее описание раскрывает биспецифические молекулы, включающие одно или несколько антител по изобретению, связанные, по меньшей мере, с одной другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом для рецептора) для получения биспецифической молекулы, которая связывается, по меньшей мере, с двумя различными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Таким образом, в соответствии с используемым здесь значением, термин "биспецифическая молекула" включает молекулы, обладающие тремя или более специфичностями. В предпочтительном варианте осуществления биспецифическая молекула включает первую специфичность связывания по отношению к LAG-3 и вторую специфичность связывания для инициации молекулы, которая захватывает цитотоксические эффекторные клетки, которые могут уничтожать экспрессирующую LAG-3 клетку-мишень. Примеры подходящих иницирующих молекул представляют собой CD64, CD89, CD16 и CD3. См., например, Kufer *et al.*, *TRENDS in Biotechnology*, 22 (5), 238-244 (2004).

В одном варианте осуществления биспецифическая молекула обладает, помимо анти-Fc специфичности связывания и анти-LAG-3 специфичности связывания, третьей специфичностью. Третья специфичность может быть направлена в отношении фактора усиления (EF), например, молекула, которая связывается с поверхностным белком, вовлеченным в цитотоксическую активность, и за счет этого повышает иммунный ответ против клетки-мишени. Например, фактор против усиления может связывать цитотоксическую Т-клетку (например, через CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40 или ICAM-1) или другую иммунную клетку, что приводит к увеличенному иммунному ответу против клетки-мишени.

Биспецифические молекулы могут иметь различные формат и размер. На одной границе спектра размеров биспецифическая молекула сохраняет традиционный формат антитела за исключением того, что вместо обладания двумя участками связывания с идентичной специфичностью, оно обладает двумя участками связывания, каждый из которых имеет различную специфичность.

На другой границе находятся биспецифические молекулы, состоящие из двух одноцепочечных фрагментов антитела (scFv's), связанных пептидной цепью — так называемый Bs(scFv)₂ конструктор. Биспецифические молекулы с промежуточным размером включают два различных F(ab) фрагмента, связанных пептидным линкером.

Биспецифические молекулы этого и иных форматов могут быть получены с помощью генетической модификации, соматической гибридизации или химическим способом. См., например, Kufer *et al.*, cited *supra*; Cao and Suresh, *Bioconjugate Chemistry*, 9 (6), 635-644 (1998); и van Spriël *et al.*, *Immunology Today*, 21 (8), 391-397 (2000), и приведенные здесь ссылки.

Фармацевтические композиции

В другом аспекте настоящее описание включает фармацевтическую композицию, включающую одно или несколько антител по настоящему изобретению, соединенные вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Композиция может необязательно содержать один или несколько дополнительных фармацевтически активных ингредиентов, таких как другое антитело или лекарство. Фармацевтические композиции по изобретению также могут быть введены в рамках комбинационной терапии, например, с другим иммуностимулирующим агентом, противораковым агентом, противовирусным агентом или вакциной, так что анти-LAG-3 антитело стимулирует иммунный ответ против вакцины.

Фармацевтическая композиция может включать любое количество эксципиентов. Эксципиенты, которые могут применяться, включают носители, поверхностно-активные агенты, загустители или эмульгирующие агенты, твердые связующие, средства для диспергирования или суспендирования, растворители, красители, отдушки, оболочки, распадающиеся агенты, смазки, подсластители, консерванты, изотонические агенты и их комбинации. Отбор и применение подходящих эксципиентов описан у Gennaro, ed., Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003), описание которого приведено здесь для ссылки.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция является подходящей для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинномозгового или эпидермального введения (например, с помощью инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активное соединение может быть покрыто материалом для его защиты от воздействия кислот и других естественных условий, которые могут привести к его инактивации. Выражение "парентеральное введение" в соответствии с используемым здесь значением означает способы введения, отличные от энтерального и топического введения, обычно с помощью инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную,

внутрикапсульную, внутриглазничную, внутрисердечную, интрадермальную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, внутрикожную, внутрисуставную, подкапсульную, субарахноидальную, интракапсульную, эпидуральную и надчревную инъекцию и инфузию. Альтернативно, антитело по изобретению может вводиться непарентеральным способом, таким как топический, эпидермальный способ или способ введения через слизистую оболочку, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Фармацевтические композиции по изобретению могут включать фармацевтически приемлемые соли. Термин "фармацевтически приемлемая соль" означает соль, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходного соединения и не приносит никаких нежелательных токсикологических эффектов. Примеры таких солей включают кислотно-аддитивные соли и основно-аддитивные соли. Кислотно-аддитивные соли включают соли, полученные из нетоксичных неорганических кислот, таких как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая и им подобные, а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенил-замещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и им подобные. Основно-аддитивные соли включают соли, полученные на основе щелочно-земельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и им подобных, а также на основе нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и им подобных.

Фармацевтические композиции могут быть в форме стерильных водных растворов или дисперсий. Они также могут быть получены в форме микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства.

Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом-носителем для приготовления отдельной лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от подвергаемого лечению субъекта и конкретного способа введения и в целом будет соответствовать количеству композиции, оказывающему терапевтический эффект. Обычно в расчете на сто процентов это количество будет находиться в диапазоне от около 0,01% до около девяносто девяти процентов активного ингредиента, предпочтительно от около 0,1% до около 70%, наиболее предпочтительно от около 1%

до около 30% активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Режимы дозирования подбирают для обеспечения оптимального желаемого отклика (например, реакции на терапию). Например, может быть введен один болюс или могут быть введены несколько отдельных доз с течением времени или доза может быть пропорционально снижена или увеличена в зависимости от терапевтической ситуации. Особенно предпочтительным является составление парентеральных композиций в виде дозированной лекарственной формы для облегчения введения и единообразия дозировки. Термин "дозированная лекарственная форма" в соответствии с используемым здесь значением означает физически дискретные единицы, подходящие в качестве единичных дозированных форм для подвергаемых лечению субъектов; каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, подсчитанное таким образом, чтобы обеспечивать достижение желаемого терапевтического эффекта вместе с требуемым фармацевтическим носителем. Альтернативно, антитело может быть введено в виде состава с замедленным высвобождением, в случае которого требуется менее частое введение.

Для введения антитела доза находится в диапазоне от около 0,0001 до 100 мг/кг и чаще от 0,01 до 5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозы могут составлять 0,3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или находится в диапазоне 1-10 мг/кг. Примерная схема лечения включает введение один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз каждые четыре недели, один раз в месяц, один раз каждые 3 месяца или один раз каждые 3-6 месяцев. Предпочтительные схемы введения доз анти-LAG-3 антитела по изобретению включают 1 мг/кг массы тела или 3 мг/кг массы тела при внутривенном введении, причем данное антитело вводят с применением одной из следующих схем введения доз: (i) каждые четыре недели первые шесть доз, далее каждые три месяца; (ii) каждые три недели; (iii) 3 мг/кг массы тела однократно и далее 1 мг/кг массы тела каждые три недели. В некоторых способах дозировку корректируют для достижения концентрации антитела в плазме около 1-1000 мкг/мл, а в некоторых способах – около 25-300 мкг/мл.

"Терапевтически эффективная доза" анти-LAG-3 антитела по изобретению предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждению ухудшения или нетрудоспособности вследствие заболевания.

Например, для лечения субъектов с опухолью "терапевтически эффективная дозировка" предпочтительно ингибирует рост опухоли, по меньшей мере, на 20%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 40%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 60% и более предпочтительно, по меньшей мере, на 80% относительно субъекта в отсутствие лечения. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может снижать размер опухоли или иным способом облегчать симптомы у субъекта, который, как правило, представляет собой человека или другое млекопитающее.

Фармацевтическая композиция может представлять собой состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, чрескожные пластыри и микроинкапсулированные системы для доставки. Могут применяться биodeградируемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции могут вводиться с помощью медицинских устройств, таких как устройства для подкожных инъекций без иглы (например, патенты США 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824; и 4596556); (2) помпы для микроинфузий (патент США 4487603); (3) чрескожные устройства (патент США 4486194); (4) инфузионные аппараты (патенты США 4447233 и 4447224); и (5) осмотические устройства (патенты США 4439196 и 4475196); описание которых приведено здесь для ссылки.

В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела человека по изобретению могут быть получены так, чтобы обеспечивалось правильное распределение *in vivo*. Например, для обеспечения преодоления гематоэнцефалического барьера терапевтическими соединениями по изобретению они могут входить в состав липосом, которые могут дополнительно включать таргетирующие остатки для обеспечения селективного транспорта в определенные клетки или органы. См., например, патенты США 4522811; 5374548; 5416016; и 5399331; V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* **29**:685; Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**:1038; Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* **357**:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:180; Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* **1233**:134; Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* **269**:9090; Keinänen and Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* **346**:123; и Killion and Fidler (1994) *Immunomethods* **4**:273.

Варианты применения и способы по изобретению

Антитела (композиции, биспецифические антитела и иммуноконъюгаты) по настоящему изобретению обладают множеством *in vitro* и *in vivo* вариантов применения, включая, например, детектирование LAG-3 или стимулирование иммунных ответов за счет блокады LAG-3. В предпочтительном варианте осуществления антитела представляют собой антитела человека. Такие антитела могут вводиться в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или представляющих собой людей субъектам, например, *in vivo* для стимулирования иммунитета в различных ситуациях. В соответствии с этим в одном аспекте изобретение относится к способу модификации иммунного ответа у субъекта, включающему введение субъекту антитела или его антигенсвязывающей части по изобретению для модификации иммунного ответа у субъекта. Предпочтительно, ответ усиливается, стимулируется или подвергается ап-регуливанию.

Предпочтительные субъекты включают представляющих собой людей пациентов, нуждающихся в усилении иммунного ответа. Данные способы предпочтительно являются подходящими для лечения представляющих собой людей пациентов, имеющих нарушение, которое может подвергаться лечению за счет усиления иммунного ответа (например, опосредованного Т-клетками иммунного ответа). В конкретном варианте осуществления указанные методы являются особенно подходящими для лечения рака *in vivo*. Для достижения антигенспецифического стимулирования иммунитета анти-LAG-3 антитела могут вводиться совместно с представляющим интерес антигеном или антиген может уже присутствовать у подвергаемого лечению субъекта (например, субъекта с опухолью или вирусом). При введении антител к LAG-3 совместно с другим агентом указанные два агента могут вводиться в любом порядке или одновременно.

Изобретение также относится к способам детектирования присутствия антигена в образце или измерения количества антигена LAG-3 человека, включающим контактирование образца и контрольного образца с моноклональным антителом человеком или его антигенсвязывающей частью, которая специфично связывается с LAG-3 человека при условиях, которые обеспечивают образования комплекса между антителом или его частью и LAG-3 человека. Образование комплекса далее подвергается детектированию, при этом различие между образованием комплекса между образцом и контрольным образцом указывает на присутствие антигена LAG-3

человека в образце. Более того, анти-LAG-3 антитела по изобретению могут применяться для очистки LAG-3 человека за счет иммуноаффинной очистки.

С учетом способности анти-LAG-3 антител по изобретению ингибировать связывание LAG-3 с МНС молекулами II класса и стимулировать антигенспецифичные Т-клеточные ответы, изобретение также относится к *in vitro* и *in vivo* способам применения антител для стимулирования, усиления или ап-регулирования антигенспецифичных Т-клеточных ответов. Например изобретение относится к способу стимулирования антигенспецифичного Т-клеточного ответа, включающему контактирование указанной Т-клетки с антителом по изобретению таким образом, что антигенспецифичный Т-клеточный ответ подвергается стимулированию. Для измерения антигенспецифичного Т-клеточного ответа может применяться любой подходящий индикатор антигенспецифичного Т-клеточного ответа. Неограничивающие примеры данных подходящих индикаторов включают увеличенную Т-клеточную пролиферацию в присутствии антитела и/или увеличение продуцирования цитокинов в присутствии антитела. В предпочтительно варианте осуществления стимулируется продуцирование интерлейкина-2 с помощью антигенспецифичной Т-клетки.

Изобретение также относится к способу стимулирования иммунного ответа (например, антигенспецифичного Т-клеточного ответа) у субъекта, включающему введение антитела по изобретению субъекту таким образом, что иммунный ответ (например, антигенспецифичный Т-клеточный ответ) субъекта подвергается стимулированию. В предпочтительном варианте осуществления субъект представляет собой субъект с опухолью, при этом стимулируется иммунный ответ против опухоли. В другом предпочтительном варианте осуществления субъект представляет собой субъект с вирусом, при этом стимулируется иммунный ответ против вируса.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающему введение субъекту антитела по изобретению, так что рост опухоли у субъекта подвергается ингибированию. В другом варианте осуществления изобретение относится к способам лечения вирусной инфекции у субъекта, включающим введение субъекту антитела по изобретению, так что вирусная инфекция у субъекта подвергается лечению.

Эти и другие способы по изобретению описаны более подробно ниже.

Рак

Блокада LAG-3 антителами может усиливать иммунный ответ пациента на раковые клетки. В одном аспекте настоящее изобретение относится к лечению субъекта *in vivo* с применением анти-LAG-3 антитела таким образом, что рост раковых опухолей подвергается ингибированию. Анти-LAG-3 антитело может применяться самостоятельно для ингибирования роста раковых опухолей. Альтернативно, анти-LAG-3 антитело может применяться совместно с другими иммуногенными агентами, стандартными способами лечения рака или другими антителами, как описано ниже.

В соответствии с этим в одном варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества анти-LAG-3 антитела или его антигенсвязывающей части. Предпочтительно, антитело представляет собой анти-LAG-3 антитело человека (такое как любое из описанных здесь антител человека против LAG-3 человека). Дополнительно или альтернативно, данное антитело может представлять собой химерное или гуманизированное анти-LAG-3 антитело.

Предпочтительные виды раковых опухолей, рост которых может быть ингибирован с применением антител по изобретению, включают опухоли, обычно восприимчивые к иммунотерапии. Неограничивающие примеры предпочтительных типов рака для лечения включают меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), рак почки (например, гипернефрому), рак предстательной железы (например, не отвечающую на гормоны аденокарциному предстательной железы), рак молочной железы, рак ободочной кишки и рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого). Кроме того, изобретение включает трудноизлечимые или рецидивирующие злокачественные опухоли, рост которых может быть ингибирован с применением антител по изобретению.

Примеры других видов рака, которые могут быть подвергнуты лечению с применением способов по изобретению, включают рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы и шеи, злокачественную меланому кожи или внутриглазную меланому, рак матки, рак яичника, рак прямой кишки, рак заднего прохода, рак желудка, рак яичка, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак парашитовидной железы, рак коры надпочечника, саркому мягких тканей, рак уретры, рак пениса, хронический или острый лейкоз, включая

острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, солидные опухоли у детей, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почек или мочеточника, карциному почечной лоханки, опухоль центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, злокачественные опухоли, индуцированные влиянием окружающей среды, включая злокачественные опухоли, индуцированные асбестом, и комбинации указанных видов рака. Настоящее изобретение также может применяться для лечения метастатических видов рака, в частности метастатических видов рака, сопровождающихся экспрессией PD-L1 (Iwai *et al.* (2005) *Int. Immunol.* 17:133-144).

Антитела к LAG-3 могут быть необязательно объединены с иммуногенным агентом, таким как раковые клетки, очищенные опухолевые антигены (включая рекомбинантные белки, пептиды и углеводные молекулы), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые могут применяться, включают пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, MAGE антигены, Trp-2, MART1 и/или тирозиназу, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (описаны дополнительно ниже).

Было обнаружено, что некоторые опухоли человека, такие как меланомы, являются иммуногенными. Ответы против опухоли у хозяина могут быть активированы за счет повышения порога Т-клеточной активации с помощью блокады LAG-3.

Блокада LAG-3 является, по-видимому, более эффективной при комбинировании с протоколом вакцинации. Были разработаны многие экспериментальные стратегии противоопухолевого вакцинирования (см. Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; см. также Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, стр. 3023-3043 в DeVita *et al.* (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, 5-е изд.). В одной из таких стратегий вакцину готовят с применением аутологичных или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что такие клеточные вакцины являются наиболее эффективными при трансдукции опухолевых клеток для экспрессии GM-CSF. Было показано, что GM-CSF является сильным

активатором презентации антигена для опухолевой вакцинации (Dranoff *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43).

Исследование экспрессии генов и паттернов широкомасштабной экспрессии генов при различных опухолях позволило идентифицировать так называемые опухоль-специфичные антигены (Rosenberg, SA (1999) *Immunity* 10: 281-7). Во многих случаях опухоль-специфичные антигены представляют собой антигены дифференцировки, экспрессируемые в опухолях и в клетке, из которой возникла данная опухоль, например антигены меланоцитов gp100, антигены MAGE и Trp-2. Особенно важно, что было показано, что многие из данных антигенов представляют собой мишени опухоль-специфичных Т-клеток, обнаруженных в хозяине. Блокада LAG-3 может применяться совместно с набором рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессируемых в опухоли, для продуцирования иммунного ответа на данные белки. Данные белки в норме рассматриваются иммунной системой как аутоантигены и, следовательно, являются толерантными к ней. Опухолевый антиген может также включать белок теломеразу, который необходим для синтеза теломеров хромосом и который экспрессируется при более чем 85% типов рака человека и только в ограниченном количестве соматических тканей (Kim *et al.* (1994) *Science* 266: 2011-2013). (Данные соматические ткани могут быть защищены от иммунной атаки различными способами). Опухолевый антиген также может представлять собой "неоантигены", экспрессируемые в раковых клетках вследствие соматических мутаций, которые изменяют последовательность белка или создают слитые белки между двумя неродственными последовательностями (например, bcr-abl в хромосоме Philadelphia) или идиотип из В-клеточных опухолей.

Другие опухолевые вакцины могут включать белки из вирусов, участвующих в раковых заболеваниях человека, таких как папилломавирусы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус саркомы Капоши (KHSV). Другая форма опухолеспецифического антигена, которая может применяться совместно с блокадой LAG-3, представляет собой очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные из самой опухолевой ткани. Белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток, при этом данные HSP являются высокоэффективными в доставке антигенпрезентирующих клеток для индукции противоопухолевого иммунитета (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura *et al.* (1997) *Science* 278:117-120).

Дендритные клетки (DC) являются сильными антигенпрезентирующими клетками, которые могут применяться для прайминга антигенспецифических ответов. DC могут

продуцироваться *ex vivo* и загружаться различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). DC могут также быть подвергнуты генетической трансдукции для экспрессии данных опухолевых антигенов. DC были также слиты непосредственно с опухолевыми клетками для целей иммунизации (Kugler *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). В качестве способа вакцинации, DC иммунизация может быть эффективно объединена с блокадой LAG-3 для активации более сильных противоопухолевых ответов.

Блокада LAG-3 быть объединена со стандартными способами лечения рака. Блокада LAG-3 может быть эффективно объединена с курсами химиотерапевтического лечения. В этих случаях является возможным уменьшить дозу вводимого химиотерапевтического реагента (Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Пример такой комбинации представлять собой анти-LAG-3 антитело в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. Другой пример данной комбинации представляет собой анти-LAG-3 антитело в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научным обоснованием комбинированного применения блокады LAG-3 и химиотерапии является то, что гибель клеток, которая является следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить к повышенным уровням опухолевого антигена в пути презентации антигена. Другие комбинированные способы лечения, которые могут приводить к синергизму с блокадой LAG-3 посредством гибели клеток, представляют собой облучение, хирургию и выключение эндокринной функции. Каждый из этих протоколов позволяет создавать источник опухолевого антигена у хозяина. Ингибиторы ангиогенеза могут также комбинироваться с блокадой LAG-3. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, которые могут подавать опухолевый антиген в пути презентации антигенов хозяина.

Блокирующие LAG-3 антитела могут также применяться в комбинации с биспецифическими антителами, которые таргетируют экспрессирующие Fc α или Fc γ рецептор эффекторные клетки на опухолевые клетки (см., например, патенты США 5922845 и 5837243). Биспецифические антитела могут применяться для таргетирования двух отдельных антигенов. Например, биспецифические антитела против рецептора Fc/опухолевого антигена (например, Her-2/neu) применяли для таргетирования макрофагов на участки опухоли. Такое таргетирование может более эффективно активировать опухоль-специфичные ответы. Т-клеточная ветвь данных

ответов может увеличиваться благодаря применению блокады LAG-3. Альтернативно, антиген может доставляться непосредственно к DC с применением биспецифичных антител, которые связываются с опухолевым антигеном и специфическим в отношении дендритных клеток маркером поверхности клеток.

Опухоли избегают иммунного контроля благодаря большому количеству механизмов. Многие из таких механизмов могут быть преодолены инактивацией белков, которые экспрессируются опухолями и которые являются иммуносупрессивными. Они включают, среди прочего, TGF- β (Kehrl *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), и Fas лиганд (Hahne *et al.* (1996) *Science* 274: 1363-1365). Антитела к каждому из указанных агентов могут применяться в комбинации с анти-LAG-3 антителом для противодействия эффектам иммуносупрессивного агента и содействия иммунным ответам хозяина против опухоли. Другие антитела, которые активируют иммунный ответ хозяина, могут применяться в комбинации с анти-LAG-3 антителом. Они включают молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентацию антигена. Анти-CD40-антитела способны эффективно заменять активность Т-клеток-хелперов (Ridge *et al.* (1998) *Nature* 393: 474-478) и могут применяться совместно с анти-LAG-3 антителами (Ito *et al.* (2000) *Immunobiology* 201 (5) 527-40). Активация антител к костимулирующим Т-клетки молекулам, таким как CTLA-4 (например, патент США 5811097), OX-40 (Weinberg *et al.* (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997), и ICOS (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397: 262-266) может также обеспечивать повышенные уровни активации Т-клеток.

В настоящее время для лечения различных опухолей гемопозитического происхождения применяется трансплантация костного мозга. В то время как реакция отторжения трансплантата является следствием такого лечения, благоприятное терапевтическое воздействие может быть достигнуто за счет реакции трансплантат против опухоли. Блокада LAG-3 может применяться для повышения эффективности пересаженных опухоль-специфичных Т-клеток донора.

Также существует несколько экспериментальных протоколов лечения, которые предусматривают *ex vivo* активацию и экспансию антигенспецифичных Т-клеток и адаптивный перенос этих клеток реципиентам для стимулирования антигенспецифичных Т-клеток против опухоли (Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546-51). Такие способы могут быть также применяться для активации Т-клеточных ответов на инфекционные агенты, такие как CMV. *Ex vivo* активация в присутствии

анти-LAG-3 антител может увеличивать встречаемость и активность адоптивно перенесенных Т-клеток.

Инфекционные болезни

Для лечения пациентов, инфицированных конкретными токсинами или патогенами, применяются другие способы по изобретению. Таким образом, другой аспект изобретения относится к способу лечения инфекционного заболевания у субъекта, включающему введение субъекту анти-LAG-3 антитела или его антигенсвязывающей части таким образом, что субъект подвергается лечению в отношении указанного инфекционного заболевания. Предпочтительно, антитело представляет собой анти-LAG-3 антитело человека (например, любое из описанных здесь анти-LAG-3 антител человека). Дополнительно или альтернативно, данное антитело может представлять собой химерное или гуманизированное антитело.

Подобно ее применению в отношении опухолей, как обсуждалось выше, опосредованная антителом блокада LAG-3 может применяться самостоятельно или в качестве дополнения в комбинации с вакцинами для стимулирования иммунного ответа на патогены, токсины и аутоантигены. Примеры патогенов, против которых применение указанного терапевтического подхода может быть особенно эффективным, включают патогены, которые не поддаются уничтожению с применением существующих в настоящее время вакцин, или патогены, против которых действие стандартных вакцин не является достаточно эффективным. Они включают, без ограничения, ВИЧ, вирусы гепатита (А, В и С), вирусы гриппа, герпесвирусы, возбудителей гиардиоза, возбудителей малярии, лейшманиоза, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Блокада LAG-3 особенно полезна против распространенных инфекций с агентами, такими как ВИЧ, которые презентруют измененные антигены в течение периода инфицирования. Данные новые эпитопы распознаются как чужеродные в момент введения анти-LAG-3 антител, таким образом провоцируя сильный Т-клеточный ответ, который не заглушается негативными сигналами через LAG-3.

Некоторые примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, которые могут подвергаться лечению способами по изобретению, включают ВИЧ, вирус гепатита (А, В или С), герпесвирус (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV, вирус Эпштейна-Барра), аденовирус, вирус гриппа, флавивирусы, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, коронавирус, респираторно-синцитиальный вирус, вирус эпидемического паротита, ротавирус, вирус кори, вирус коревой краснухи, парвовирус, вирус коровьей

оспы, HTLV-вирус, вирус Денге, папилломавирус, вирус контагиозного моллюска, полиовирус, вирус бешенства, JC-вирус и вирус арбовирусного энцефалита.

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

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

Некоторые примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, которые могут подвергаться лечению способами по изобретению, включают *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

Во всех вышеуказанных способах блокада LAG-3 может комбинироваться с другими формами иммунотерапии, такими как лечение цитокинами (например, интерферонами, GM-CSF, G-CSF, IL-2) или терапия с применением биспецифических антител, которая обеспечивает усиленную презентацию опухолевых антигенов (см., например, Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Аутоиммунные реакции

Анти-LAG-3 антитела могут провоцировать и усиливать аутоиммунные ответы. Действительно, индукция противоопухолевых ответов с применением вакцин на основе опухолевых клеток и пептидов выявила, что многие противоопухолевые реакции включают реактивности против собственных антигенов (van Elsas *et al.* (2001) *J. Exp. Med.* 194:481-489; Overwijk, *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 2982-2987; Hurwitz, (2000) *выше*; Rosenberg & White (1996) *J. Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19 (1): 81-4). Таким образом, можно рассматривать применение блокады против LAG-3 совместно с различными аутологичными белками для создания протоколов вакцинации для эффективного продуцирования иммунных ответов против данных аутологичных

белков для лечения заболеваний. Например, болезнь Альцгеймера включает нежелательное накопление A β пептида в амилоидных отложениях в головном мозге; реакции антител против амилоида способны очищать данные амилоидные отложения (Schenk *et al.*, (1999) *Nature* 400: 173-177).

Другие аутологичные белки, такие как IgE, также могут применяться в качестве мишеней для лечения аллергии и астмы, а TNF α могут применяться для лечения ревматоидного артрита. Наконец, реакции антител на различные гормоны могут быть индуцированы применением анти-LAG-3 антитела. Нейтрализующие реакции антител против репродуктивных гормонов могут применяться для контрацепции. Нейтрализующая реакция антител против гормонов и других растворимых факторов, необходимых для роста определенных видов опухолей, также может рассматриваться в качестве возможных мишеней вакцинации.

Способы, аналогичные описанным выше способам, для применения анти-LAG-3 антитела, могут применяться для индуцирования терапевтических аутоиммунных реакций для лечения пациентов, имеющих нежелательное накопление других аутоантигенов, таких как амилоидные отложения, включая A β при болезни Альцгеймера, цитокинов, таких как TNF α , и IgE.

Вакцины

Анти-LAG-3 антитела могут применяться для стимулирования антигенспецифических иммунных реакций путем совместного введения анти-LAG-3 антитела с представляющим интерес антигеном (например, вакциной). Таким образом, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способу стимулирования иммунной реакции на антиген у субъекта, включающему введение указанному субъекту: (i) антигена; и (ii) анти-LAG-3 антитела или его антигенсвязывающей части таким образом, что иммунная реакция на данный антиген у субъекта усиливается. Предпочтительно, антитело представляет собой анти-LAG-3 антитело человека (например, любое из описанных здесь анти-LAG-3 антител человека). Дополнительно или альтернативно, данное антитело может представлять собой химерное или гуманизированное антитело. Антиген может представлять собой, например, опухолевый антиген, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген из патогена. Неограничивающие примеры таких антигенов включают антигены, описанные в вышеприведенных разделах, такие как опухолевые антигены (или

противоопухолевые вакцины), описанные выше, или антигены из вирусов, бактерий или других патогенов, описанных выше.

Подходящие пути введения композиций антител (например, моноклональных антител человека, полиспецифических и биспецифических молекул или иммуноконъюгатов) по изобретению *in vivo* и *in vitro* хорошо известны из уровня техники и могут быть выбраны специалистами в данной области. Например, композиции антител могут быть введены с помощью инъекции (например, внутривенной или подкожной). Подходящие дозы применяемых молекул будут зависеть от возраста и массы тела субъекта и концентрации и/или состава композиции антител.

Как описано выше, анти-LAG-3 антитела человека по изобретению могут вводиться совместно с одним или несколькими другими терапевтическими агентами, например цитотоксическим агентом, радиотоксическим агентом или иммуносупрессивным агентом. Антитело может быть связано с агентом (в виде иммунокомплекса) или оно может быть введено отдельно от агента. В последнем случае (в случае отдельного введения) антитело может вводиться до, после или совместно с указанным агентом или может вводиться совместно с другими известными видами терапиями, например противораковой терапией, например, облучением. Такие терапевтические агенты включают, среди прочего, противоопухолевые агенты, такие как доксорубин (адриамицин), цисплатин, блеомицин сульфат, кармустин, хлорамбуцил, дакарбазин и циклофосфамидгидроксимочевину, которые сами по себе эффективны только при уровнях, являющихся токсичными или субтоксичными для пациента. Цисплатин вводят внутривенно в виде 100 мг/мл дозы один раз каждые четыре недели, а адриамицин вводят внутривенно в виде 60-75 мг/мл дозы один раз каждые 21 день. Совместное введение анти-LAG-3 антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению с химиотерапевтическими агентами обеспечивает два противораковых агента, которые действуют посредством различных механизмов, которые оказывают цитотоксическое действие в отношении опухолевых клеток человека. Такое совместное введение может решить проблемы, вызванные развитием резистентности к лекарствам или изменением антигенности опухолевых клеток, что делает их неактивными в отношении антитела.

В объем настоящего изобретения входят также наборы, включающие композиции антител по изобретению (например, антител человека, биспецифических или полиспецифических молекул или иммуноконъюгатов) и инструкции по применению. Набор также может содержать, по меньшей мере, один дополнительный реагент или

один или несколько дополнительных антител человека по изобретению (например, антитело человека, имеющее комплементарную активность, которое связывается с эпитопом в антигене LAG-3, отличающимся от эпитопа первого антитела человека). Наборы обычно включают этикетку, указывающую предполагаемое применение содержимого данного набора. Термин "этикетка" включает любой текст или отпечатанный материал, наклеенный на упаковку или вложенный в упаковку данного набора, или прилагаемый к данному набору в какой-либо иной форме.

Комбинированная терапия

В другом аспекте изобретение относится к способам комбинированной терапии, при которых анти-LAG-3 антитело (или его антигенсвязывающая часть) по настоящему изобретению вводится совместно с одним или несколькими дополнительными антителами, которые являются эффективными при стимулировании иммунных реакций для дополнительного усиления, стимулирования или ап-регулирования таким образом иммунных реакций у субъекта. В одном варианте осуществления изобретение относится к способу стимулирования иммунного ответа у субъекта, включающему введение субъекту анти-LAG-3 антитела и одного или нескольких дополнительных иммуностимулирующих антител, таких как анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело и/или анти-CTLA-4 антитело, так что у субъекта стимулируется иммунный ответ, например для ингибирования роста опухоли или стимулирования противовирусного ответа. В другом варианте осуществления субъекту вводят анти-LAG-3 антитело и анти-PD-1 антитело. В другом варианте осуществления субъекту вводят анти-LAG-3 антитело и анти-PD-L1 антитело. В другом варианте осуществления субъекту вводят анти-LAG-3 антитело и анти-CTLA-4 антитело. В одном варианте осуществления анти-LAG-3 антитело представляет собой антитело человека, такое как описанное антитело. Альтернативно, анти-LAG-3 антитело может представлять собой, например, химерное или гуманизированное антитело (например, полученное из анти-LAG-3 mAb мыши). В другом варианте осуществления, по меньшей мере, одно дополнительное иммуностимулирующее антитело (например, анти-PD-1, анти-PD-L1 и/или анти-CTLA-4 антитело) представляет собой антитело человека. Альтернативно, по меньшей мере, одно дополнительное иммуностимулирующее антитело может представлять собой, например, химерное или гуманизированное антитело (например, полученное из анти-PD-1, анти-PD-L1 и/или анти-CTLA-4 антитела мыши).

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), предусматривающему введение

антитела против LAG-3 и антитела против CTLA-4. В других вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело вводят в субтерапевтической дозе, анти-CTLA-4-антитело вводят в субтерапевтической дозе или оба из них вводят в субтерапевтической дозе. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу изменения побочного эффекта, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим агентом, включающему введение анти-LAG-3 антитела и субтерапевтической дозы анти-CTLA-4 антитела субъекту. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В других вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитело представляет собой моноклональное антитело с последовательностью человека 10D1 (описанное в РСТ публикации WO 01/14424), а анти-LAG-3 антитело представляет собой моноклональное антитело с последовательностью человека, такое как описанное здесь LAG3.5. Другие анти-CTLA-4 антитела в рамках способов по настоящему изобретению включают, например, способы, описанные в: WO 98/42752; WO 00/37504; патенте США 6207156; Hurwitz *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17):10067-10071; Camacho *et al.* (2004) *J. Clin. Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (антитело CP-675206); и у Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58:5301-5304. В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитело связывается с CTLA-4 человека при значении K_D 5×10^{-8} М или менее, связывается с CTLA-4 человека при значении K_D 1×10^{-8} М или менее, связывается с CTLA-4 человека при значении K_D 5×10^{-9} М или менее или связывается с CTLA-4 человека при значении K_D от 1×10^{-8} М до 1×10^{-10} М или менее.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), включающему введение LAG-3 антитела и PD-1 антитела субъекту. В других вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело вводят в субтерапевтической дозе, анти-PD-1 антитело вводят в субтерапевтической дозе или оба из них вводят в субтерапевтической дозе. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу изменения побочного эффекта, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим агентом, включающему введение анти-LAG-3 антитела и субтерапевтической дозы анти-PD-1 антитела субъекту. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой моноклональное антитело с последовательностью человека и анти-LAG-3 антитело представляет собой моноклональное антитело с последовательностью человека, такое как описанное здесь

LAG3.5. Примеры анти-PD-1 антител с последовательностью человека включают 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 и 4A11, которые описаны в РСТ публикации WO 06/121168. Другие анти-PD-1 антитела включают, например, ламбролизумаб (WO2008/156712) и AMP514 (WO2010/027423, WO2010/027827, WO2010/027828, WO2010/098788). В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело связывается с PD-1 человека при значении K_D 5×10^{-8} М или менее, связывается с PD-1 человека при значении K_D 1×10^{-8} М или менее, связывается с PD-1 человека при значении K_D 5×10^{-9} М или менее или связывается с PD-1 человека при значении K_D от 1×10^{-8} М до 1×10^{-10} М или менее.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), включающему введение LAG-3 антитела и PD-L1 антитела субъекту. В дополнительных вариантах осуществления анти-PD-1-антитело вводят в субтерапевтической дозе, анти-PD-L1 антитело вводят в субтерапевтической дозе или оба из них вводят в субтерапевтической дозе. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу изменения побочного эффекта, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим агентом, предусматривающему введение анти-LAG-3 антитела и субтерапевтической дозы анти-PD-L1 антитела субъекту. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В других вариантах осуществления анти-PD-L1 антитело представляет собой моноклональное антитело с последовательностью человека и анти-LAG-3 антитело представляет собой моноклональное антитело с последовательностью человека, такое как описанное здесь LAG3.5. Примеры анти-PD-L1 антител с последовательностью человека включают 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4, которые описаны в РСТ публикации WO 07/005874. Другие анти-PD-L1 антитела включают, например MPDL3280A (RG7446) (WO2010/077634), MEDI4736 (WO2011/066389) и MDX1105 (WO2007/005874). В некоторых вариантах осуществления анти-PD-L1 антитело связывается с PD-L1 человека при значении K_D 5×10^{-8} М или менее, связывается с PD-L1 человека при значении K_D 1×10^{-8} М или менее, связывается с PD-L1 человека при значении K_D 5×10^{-9} М или менее или связывается с PD-L1 человека при значении K_D от 1×10^{-8} М до 1×10^{-10} М или менее.

Блокада LAG-3 и одного или нескольких вторых антигенов-мишеней, таких как CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1, антителами может стимулировать иммунный ответ против раковых клеток у пациента. Типы рака, рост которых может быть ингибирован антителами по настоящему изобретению, включают типы рака, являющиеся обычно

чувствительными к иммунотерапии. Соответствующие примеры видов рака для лечения с применением комбинированной терапии по настоящему изобретению включают виды рака, перечисленные выше при описании монотерапии анти-LAG-3 антителами.

В некоторых вариантах осуществления комбинация описанных здесь терапевтических антител может вводиться одновременно в виде единой композиции в фармацевтически приемлемом носителе или одновременно в виде отдельных композиций, при этом каждое антитело находится в фармацевтически приемлемом носителе. В другом варианте осуществления комбинация терапевтических антител может вводиться последовательно. Например, анти-CTLA-4 антитело и анти-LAG-3 антитело могут вводиться последовательно, так что анти-CTLA-4 антитело вводится первым, а анти-LAG-3 антитело вводится вторым или анти-LAG-3 антитело вводится первым, а анти-CTLA-4 антитело вводится вторым. Дополнительно или альтернативно, анти-PD-1 антитело и анти-LAG-3 антитело могут быть введены последовательно, так что анти-PD-1 антитело вводится первым, а анти-LAG-3 антитело вводится вторым или анти-LAG-3 антитело вводится первым, а анти-PD-1 антитело вводится вторым. Дополнительно или альтернативно, анти-PD-L1 антитело и анти-LAG-3 антитело могут быть введены последовательно, так что анти-PD-L1 антитело вводится первым, а анти-LAG-3 антитело вводится вторым или анти-LAG-3 антитело вводится первым, а анти-PD-L1 антитело вводится вторым.

Кроме того, если вводят последовательно более чем одну дозу комбинированной терапии, порядок последовательного введения может быть обратным или может сохраняться один и тот же порядок введения в каждой временной точке введения, последовательные введения могут комбинироваться с совместными введениями или любой их комбинацией. Например, первое введение комбинации анти-CTLA-4 антитела и анти-LAG-3 антитела может быть одновременным, второе введение может быть последовательным с введением анти-CTLA-4 и далее анти-LAG-3, а третье введение может быть последовательным с введением анти-LAG-3 и далее анти-CTLA-4 и т.д. Дополнительно или альтернативно, первое введение комбинации анти-PD-1 антитела и анти-LAG-3 антитела может быть одновременным, второе введение может быть последовательным с введением анти-PD-1 и далее анти-LAG-3, а третье введение может быть последовательным с введением анти-LAG-3 и далее анти-PD-1 и т.д. Дополнительно или альтернативно, первое введение комбинации анти-PD-L1 антитела и анти-LAG-3 антитела может быть одновременным, второе введение может быть

последовательным с введением анти-PD-L1 и далее анти-LAG-3, а третье введение может быть последовательным с введением анти-LAG-3 и далее анти-PD-L1 и т.д. Другая репрезентативная схема введения доз может включать первое введение, которое является последовательным, с введением анти-LAG-3 первым и анти-CTLA-4 антителом (и/или анти-PD-1 и/или анти-PD-L1) вторым, при этом последующие введения могут быть одновременными.

Необязательно, комбинация анти-LAG-3 и одного или нескольких дополнительных антител (например, анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 антител) может дополнительно комбинироваться с иммуногенным агентом, таким как раковые клетки, очищенные опухолевые антигены (включая рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые могут применяться, включают пептиды антигенов меланомы, например пептиды gp100, антигены MAGE, Тгр-2, MART1 и/или тирозиназу или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (описаны дополнительно ниже). Комбинированная блокада LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 может также комбинироваться с протоколом вакцинирования, таким как любой из подробно описанных выше протоколов вакцинирования с учетом монотерапии анти-LAG-3 антителами.

Комбинированная блокада LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 может также комбинироваться со стандартными видами терапии рака. Например, комбинированная блокада LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 может эффективно комбинироваться с химиотерапевтическими схемами лечения. В этих случаях является возможным снизить дозировку другого химиотерапевтического агента, вводимого с комбинацией по настоящему изобретению (Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Пример такой комбинации представляет собой комбинацию анти-LAG-3 и анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 антител также в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. Другой пример представляет собой комбинацию анти-LAG-3 и анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 антител также в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научным обоснованием комбинированного применения блокады LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 с химиотерапией является то, что гибель клеток, которая является следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить к увеличенным уровням опухолевого антигена в пути презентации антигена.

Другими комбинированными видами терапии, которые могут приводить к синергизму с комбинированной блокадой LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 посредством смерти клеток, являются облучение, хирургия и выключение эндокринной функции. Каждый из этих протоколов позволяет создавать источник опухолевого антигена у хозяина. Ингибиторы ангиогенеза могут также комбинироваться с комбинированной блокадой LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, которые могут представлять собой источник опухолевого антигена, подаваемого в пути презентации антигенов хозяина.

Комбинация блокирующих LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 антител может также применяться в комбинации с биспецифическими антителами, которые таргетируют экспрессирующие Fc α или Fc γ рецептор эффекторные клетки на опухолевые клетки (см., например, патенты США 5922845 и 5837243). Биспецифические антитела могут применяться для таргетирования двух отдельных антигенов. Эффективность Т-клеток при данных реакциях будет увеличена за счет применения комбинированной блокады LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1.

Как другой пример, комбинации анти-LAG-3 и анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 антител и /или анти-PD-L1 антител могут применяться в комбинации с противораковыми антителами, такими как Rituxan[®] (ритуксимаб), Herceptin[®] (трастузумаб), Bexxar[®] (тоситумомаб), Zevalin[®] (ибритумомаб), Campath[®] (алемтузумаб), Lymphocide[®] (эпртузумаб), Avastin[®] (бевацизумаб) и Tarceva[®] (эрлотиниб) и им подобными. В качестве примера и без связи с теорией, лечение противораковым антителом и противораковым антителом, конъюгированным с токсином, может приводить к гибели раковых клеток (например, опухолевых клеток), которые могут усиливать иммунную реакцию, опосредованную CTLA-4, PD-1, PD-L1 или LAG-3. В другом варианте осуществления изобретения лечение гиперпролиферативного заболевания (например, раковой опухоли) может включать противораковое антитело в комбинации с анти-LAG-3 и анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 антителами, одновременно или последовательно или в любой их комбинации, которые могут усиливать противоопухолевые иммунные реакции хозяина.

Опухоли избегают иммунного контроля благодаря большому количеству механизмов. Многие из таких механизмов могут быть преодолены инактивацией белков, которые экспрессируются опухолями и которые являются иммуносупрессивными. Они включают, среди прочего, TGF- β (Kehrl *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) и Fas лиганд (Hahne *et al.*

(1996) *Science* 274: 1363-1365). В другом примере антитела к каждому из указанных агентов могут быть также комбинированы с комбинацией анти-LAG-3 и анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 антител для противодействия эффектам иммуносупрессивных агентов и содействия иммунным реакциям хозяина против опухоли.

Другие антитела, которые могут быть применяться для активации иммунологической откликаемости хозяина, могут дополнительно применяться в комбинации с комбинацией анти-LAG-3 и анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 антител. Они включают молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентацию антигена. Анти-CD40 антитела (Ridge et al., *выше*) могут применяться в комбинации с комбинацией анти-LAG-3 и анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 антител (Ito et al., *выше*). Другие активирующие антитела против Т-клеточных костимулирующих молекул (Weinberg et al., *выше*, Melero et al. *supra*, Hutmoff et al., *выше*) также могут обеспечивать увеличенные уровни Т-клеточной активации.

Как описано выше, в настоящее время для лечения различных опухолей гемопозитического происхождения применяется трансплантация костного мозга. Комбинированная блокада LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 может применяться для увеличения эффективности пересаженных опухоль-специфических Т-клеток донора.

Несколько экспериментальных протоколов лечения включают *ex vivo* активацию и экспансию антигенспецифичных Т-клеток и адаптивный перенос этих клеток реципиентам для стимулирования антигенспецифичных Т-клеток против опухоли (Greenberg & Riddell, *выше*). Такие способы могут применяться для активации Т-клеточных ответов на инфекционные агенты, такие как CMV. Ожидается, что *ex vivo* активация в присутствии анти-LAG-3 и анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 антител увеличивает встречаемость и активность адаптивно перенесенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу изменения побочного эффекта, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим агентом, включающему введение субъекту анти-LAG-3 антитела и субтерапевтической дозы анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 антител. Например, способы по настоящему изобретению относятся к способам уменьшения встречаемости индуцированного иммуностимулирующим антителом колита или диареи с помощью введения неабсорбируемого стероида пациенту.

Поскольку любой пациент, который будет получать иммуностимулирующее терапевтическое антитело, имеет риск развития колита или диареи, индуцированной таким антителом, вся популяция пациентов подходит для терапии в соответствии со способами по настоящему изобретению. Хотя стероиды вводили для лечения воспалительного заболевания пищеварительного тракта (IBD) и предотвращения обострений IBD, их не применяли для профилактики (уменьшения встречаемости) IBD у пациентов, которые не имели диагноза IBD. Существенные побочные эффекты, связанные со стероидами, даже неабсорбируемыми стероидами, считались препятствием для профилактического применения.

В других вариантах осуществления комбинированная блокада LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 (т.е. иммуностимулирующих терапевтических антител анти-LAG-3 и анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 антител и/или анти-PD-L1 антител) может дополнительно комбинироваться с применением любого неабсорбируемого стероида. В соответствии с используемым здесь значением, термин "неабсорбируемый стероид" означает глюкокортикоид, который демонстрирует экстенсивный метаболизм первого прохождения, так что по завершении метаболизма в печени биодоступность стероида является низкой, т.е. менее чем около 20%. В одном варианте осуществления изобретения неабсорбируемый стероид представляет собой будесонид. Будесонид представляет собой локально действующий глюкокортикостероид, который экстенсивно метаболизируется, прежде всего печенью, после перорального введения. ENTOCORT EC[®] (Astra-Zeneca) представляет собой зависимую от pH и времени пероральную форму будесонида, разработанную для оптимизации доставки лекарственного средства в подвздошную кишку и через ободочную кишку. ENTOCORT EC[®] одобрен в США для лечения от мягкой до умеренной болезни Крона, затрагивающей подвздошную и/или восходящую ободочную кишку. Обычная пероральная доза ENTOCORT EC[®] для лечения болезни Крона составляет 6-9 мг/день. ENTOCORT EC[®] высвобождается в кишечнике перед абсорбцией и сохраняется в слизистой оболочке кишечника. После прохождения через ткань-мишень слизистой оболочки кишечника ENTOCORT EC[®] экстенсивно метаболизируется системой цитохрома P450 в печени до метаболитов с незначительной глюкокортикоидной активностью. Таким образом, биодоступность является низкой (приблизительно 10%). Такая низкая биодоступность будесонида приводит к улучшенному терапевтическому индексу по сравнению с другими глюкокортикоидами с менее экстенсивным метаболизмом первого прохождения. Будесонид приводит к меньшим побочным

эффектам, включая меньшую гипоталамическую-гипофизарную супрессию, чем системно действующие кортикостероиды. Однако продолжительное введение ENTOCORT EC[®] может приводить к системным глюкокортикоидным эффектам, таким как гиперкортицизм и супрессия надпочечников. См. PDR 58-е изд. 2004; 608-610.

В других вариантах осуществления комбинированная блокада LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 (т.е. иммуностимулирующих терапевтических антител анти-LAG-3 и анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 антител) в комбинации с неабсорбируемым стероидом может дополнительно комбинироваться с салицилатом. Салицилаты включают 5-ASA агенты, такие как, например: сульфасалазин (AZULFIDINE[®], Pharmacia & UpJohn); олсалазин (DIPENTUM[®], Pharmacia & UpJohn); балсалазид (COLAZAL[®], Salix Pharmaceuticals, Inc.); и месаламин (ASACOL[®], Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA[®], Shire US; CANASA[®], Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA[®], Solvay).

В соответствии со способами по настоящему изобретению, салицилат, вводимый в комбинации с анти-LAG-3 и анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 антителами и неабсорбируемым стероидом, может включать любое перекрывающееся или последовательное введение салицилата и неабсорбируемого стероида с целью уменьшения заболеваемости колитом, индуцируемой иммуностимулирующими антителами. Таким образом, например, способы уменьшения заболеваемости колитом, индуцируемой иммуностимулирующими антителами по настоящему изобретению, включают введение салицилата и неабсорбируемого стероида одновременно или последовательно (например, салицилат вводят спустя 6 часов после введения неабсорбируемого стероида) или любой их комбинации. Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением, салицилат и неабсорбируемый стероид могут вводиться одним и тем же способом (например, оба вводят перорально) или различными способами (например, салицилат вводят перорально, и неабсорбируемый стероид вводят ректально), которые могут отличаться от способа(ов), применяемых для введения анти-LAG-3 и анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 антител.

Данное описание далее проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны рассматриваться в качестве ограничивающих. Содержание всех фигур и ссылок, последовательность из базы данных Genbank, патенты и опубликованные заявки на изобретение, ссылки на которые содержатся в настоящем описании, полностью включены здесь для ссылки. В частности, описания РСТ публикаций WO

09/045957, WO 09/073533, WO 09/073546 и WO 09/054863 полностью включены здесь для ссылки.

Примеры

Пример 1: Дизайн вариантов LAG3.1 (антитело 25F7)

Варианты описанного выше анти-LAG-3 антитела, 25F7, обозначаемые здесь как LAG3.1, были созданы на основе первоначального анализа аминокислотной последовательности антитела на потенциальные сайты распада. Экспрессию сайт-направленного мутагенеза V_H участка LAG3.1 осуществляли с помощью набора для сайт-направленного мутагенеза QuikChange II XL® (Agilent Technologies). Измененные V_H участки затем субклонировали в векторы UCOE® (EMD Millipore), которые содержат константный участок IgG4-S228P человека. Каждый из различных векторов тяжелой цепи котрансфицировали вектором, экспрессирующим каппа-цепь LAG3.1, в CHO-S клетки, при этом отбирали стабильные пулы на предмет экспрессии.

Идентифицировали пять потенциальных мотивов деамидирования в переменном участке тяжелой цепи CDR2. Данные сайты находились в положениях 52, 54, 56, 58 и 60 переменного участка тяжелой цепи LAG3.1 (SEQ ID NO: 2) (см. Фиг.1А). В частности, деамидирование "NG" последовательности в CDR2 V_H (SEQ ID NO: 6) наблюдалось при любых условиях, как и дополнительная изомеризация последовательности. Деамидирование исходного материала составляло около 10%. Кроме того, было обнаружено, что данная "NG" последовательность не соответствует последовательности зародышевой линии (см. Фиг.3). Однако, консенсусная последовательность зародышевой линии представляла собой потенциальный сайт гликозилирования и, таким образом, не присутствовала среди вариантов антител.

Были получены четыре варианта (обозначаемые здесь как LAG3.5, LAG3.6, LAG3.7 и LAG3.8), которые соответствовали двум потенциальным мотивам деамидирования (положения 54 и 56), как показано на Фиг.3. Данные варианты были подвергнуты матрице состояний, как указано в Таблице 1 ниже, при этом анализировали следующие характеристики: химическая и термическая стабильность (физическая стабильность); (b) эксклюзионная хроматография (агрегирование); (c) гель для изоэлектрического фокусирования (IEF) (гетерогенность зарядов); (d) активность в рамках анализа Вiascore (связывание и функциональная активность); и (e) картирование пептидов с помощью масс-спектрометрии (химические модификации/молекулярная стабильность).

Таблица 1

Буфер	Ацетат (100 нМ NaCl, 3% масса/объем маннитола, 0,03% Твин-20)	Цитрат (100 нМ NaCl, 3% масса/объем маннитола, 0,03% Твин-20)
pH	5,5, 6,0, 6,5, 7,0	5,5, 6,0, 6,5, 7,0
Температура	4°C и 37°C	4°C и 37°C
Время	0, 4, 8, 12 недель	0, 4, 8, 12 недель

Пример 2: Характеристика вариантов LAG-3**1. Связывание активированных CD4⁺ Т-клеток человека**

Для тестирования способности вариантов антител связываться с нативным LAG-3 человека на поверхности активированных Т-клеток человека мононуклеарные клетки из периферической крови нормального здорового донора стимулировали на 15 см планшетах для культивации ткани при плотности 2×10^6 клеток/мл с комбинацией анти-CD3 (eBioscience, каталожный номер 16-0037-85) и анти-CD28 (BD Bioscience, каталожный номер 555725) антителами, присутствующими в растворе при 5 мкг/мл и 3 мкг/мл, соответственно. Спустя трое суток стимулирования клетки собирали, промывали 1 раз 1х PFAE буфером (1х PBS + 2% FBS, 0,02% азид натрия, 2 мМ Na ЭДТА) и ресуспендировали в 1х PFAE буфере для окрашивания.

Для реакции связывания варианты LAG3.1 подвергали серийному разбавлению холодным 1х PFAE буфером, затем смешивали 50 мкл разбавленного раствора с антителами с 50 мкл меченого Fitc CD4 против антител человека (BD Bioscience, каталожный номер 555346), разбавленного 1:16 в 1х PFAE буфере. Для реакции связывания 100 мкл этой разбавленной смеси антител добавляли в 2×10^5 клеток, при этом смесь культивировали при 4°C в течение 30 минут. Затем клетки промывали два раза 1х PFAE буфером. Добавляли 1:200 раствор меченого PE Fcy-специфичного антитела козы против антител человека (Jackson ImmunoResearch, каталожный номер 109-116-170) и культивировали смесь в течение 30 минут при 4°C с последующим промыванием два раза холодным 1х PFAE буфером. После последнего промывания добавляли 150 мкл холодного 1х PFAE в каждый раствор и проводили анализ связывания антител с помощью проточной цитометрии с применением проточного цитометра FACSCanto (BD Bioscience).

Результаты анализа с применением проточной цитометрии обобщены на Фиг.4А, которая представляет собой график, показывающий значение EC_{50} для связывания антител с активированными CD4⁺ Т-клетками человека. Фиг.4В представляет собой график, показывающий связывание антител с растворимым LAG-3/Fc антигеном человека с применением BIACORE. Как показано, значения аффинности связывания LAG3.5 и LAG3.8 являются немного более низкими по сравнению с LAG3.1, в то время как их константы диссоциации немного выше по сравнению с LAG3.1.

2. Физическая стабильность

Термическую стабильность и термическую денатурацию вариантов определяли с помощью Microcal VP-DSC. В частности, каждый вариант разбавляли PBS (Mediatech, каталожный номер 21-040-CV, лот 21040139). Итоговая концентрация образца составляла 250 мкг/мл после разбавления PBS. Образец нагревали до 74°C, охлаждали до 25°C и подвергали повторному нагреву до 74°C. PBS буфер применяли в качестве нулевого контроля. Данные подвели под модель без 2 состояний и осуществляли аппроксимацию кривую с помощью программного обеспечения Origin.

Как указано в Таблице 2 и показано на Фиг.5, LAG3.5 обладал более высокой температурой плавления $Tm2$, чем LAG3.1, что свидетельствует о более высокой общей стабильности.

Таблица 2

MAb	$Tm1$ (°C) Соответствует CH2 и/или Fab доменам	$Tm2$ (°C) Соответствует CH3 и/или Fab доменам
LAG3.1	70,7	75,7
LAG3.5	70,5	76,3
LAG3.6	67,8	70,8
LAG3.7	69,4	73,5
LAG3.8	70,3	75,4

Рефолдинг антител после денатурирования является обратной величиной долговременного потенциала агрегации. Таким образом, варианты LAG-3 также тестировали и сравнивали в плане термической обратимости. В частности, антитела

нагревали до 74° С и охлаждали до комнатной температуры перед повторным нагревом до 74° С. Соотношение площади под кривыми второй и первой термограммы позволяет оценить термическую обратимость, которая прямо пропорциональна конформационной обратимости.

Как указано в Таблице 3 и показано на Фиг.6, LAG3.5 обладал значительно более высокой термической обратимостью, чем все другие варианты. Следует отметить, что процентная обратимости LAG3.5 (47%) была более чем в два раза выше, чем процентная обратимость LAG3.1 (20%). Термическая обратимость строго коррелировала с долговременным потенциалом агрегации. Более низкая обратимость соответствует более высокой потенциальной агрегации. На основании данного наблюдения LAG3.1 потенциально будет обладать значительно более высокой агрегацией с течением времени по сравнению с LAG3.5. Аналогичным образом, все другие варианты могут потенциально обладать более высокой агрегацией с течением времени по сравнению с LAG3.5.

Таблица 3

MAb	Термическая обратимость (%)
LAG3.1	20
LAG3.5	47
LAG3.6	0
LAG3.7	11
LAG3.8	26

3. Агрегация

Варианты также тестировали на стабильность в виде величины агрегации белка с применением стандартной эксклюзионной ВЭЖХ (SEC-HPLC) в соответствии со следующим протоколом: тестируемые образцы антител разбавляли до 1,0 мг/мл фосфатно-солевым буфером (PBS) и подвергали 10 мкл ВЭЖХ (Waters, model 2795). Сепарацию осуществляли на колонке с гель-фильтрацией (TOSOH Bioscience, TSKgel G3000 SWxl, 7,8 мм x 300 мм, продукт 08541) с применением мобильной фазы 0,1 М фосфата натрия, 0,15 М хлорида натрия, 0,1 М сульфата натрия, pH 7,2. Определяемое в рамках анализа вещество детектировали с помощью мониторинга УФ абсорбции при

280 нм, а процентную площадь пика композиции антител определяли с помощью программного обеспечения Empower. Как показано в Таблице 4, LAG3.5 обладал существенно сниженной агрегацией по сравнению с LAG3.1.

Таблица 4

Образец	IgG мономер (% площади пика)	IgG агрегат (% площади пика)
LAG3.1	90	10
LAG3.5	96	4
LAG3.6	96	4
LAG3.7	95	5
LAG3.8	95	5

Пример 3: Отбор вариантов

На основе описанных выше исследований вариант антитела LAG3.5 был отобран для проведения дальнейшего анализа в свете его значительно увеличенной физической и химической стабильности по сравнению с его немодифицированной формой (LAG3.1), в частности его высокой способности в плане конформационного рефолдинга (термической обратимости). Данный анализ включал двухэтапный подход с (а) усиленной нагрузкой, (b) и оценкой стабильности в реальном времени в течение 12 недель. В частности, LAG3.5 культивировали при 1,0 мг/мл в pH 8,0, 50 mM бикарбонате аммония в течение 5 дней при 40°C. Анализировали степень модификаций спустя 5 дней, а также влияние на активность и стабильность. Затем вариант LAG3.5 подвергали анализу стабильности в реальном времени в PBS в течение 12 недель и дальнейшему анализу. Результаты данных исследований описаны ниже.

1. Связывание антигена

Как показано на Фиг.7 (и в Таблице 5), изменение связывания антигена спустя 5 дней не наблюдалось. Как также показано на Фиг.10А и В, LAG3.5 демонстрировал отсутствие изменения связывания антигена или физической стабильности спустя 12 недель. В частности, LAG3.5 сохраняет более высокую аффинность, чем LAG3.8, в течение всего периода продолжительностью 12 недель при 4°C и 40°C.

Таблица 5

ID клона	Антиген	$K_D \times 10^{-9}$ (M)	$k_{on} \times 10^4$ (1/Ms)	$K_{off} \times 10^{-4}$ (1/s)
Lag3.1	PBS	0,21	166	3,44
	pH8	0,20	184	3,61
Lag3.5	PBS	0,25	130	3,22
	pH8	0,20	148	2,98
Lag3.8	PBS	0,25	147	3,68
	pH8	0,25	162	4,02

2. Химические модификации / Молекулярная стабильность

Пептидное картирование с помощью масс-спектрометрии применяли для анализа химической / молекулярной стабильности LAG3.5 по сравнению с LAG3.1. В частности, очищенное тело фрагментировали, алкилировали, диализировали и расщепляли трипсином (Promega кат. V5111) и GluC (Roche Кат. 11047817001). Продукты расщепления анализировали с помощью нано-ЖХ с tandemной масс-спектрометрией (Thermo Fisher LTQ Orbitrap).

Как показано на Фиг.8, LAG3.1 обладал повышенной гетерогенностью в V_H по сравнению с LAG3.5 при анализе повышения стабильности стабильности при более высоком значении pH, что приводит к деамидированию аспарагиновых остатков (этап 1). Изменение массы вследствие изомеризации не могло быть определено при текущих экспериментальных условиях. Процентная доля изменения выражена в виде соотношения всех изменений и исходного пика.

Кроме того, как показано на Фиг.11, LAG3.1 обладал увеличенной гетерогенностью в V_H по сравнению с LAG3.5 при продолжительном анализе стабильности в реальном времени в течение 12 недель при 4°C и 40°C (этап 2).

3. Физическая стабильность

Термическую обратимость измеряли в PBS и при pH 8,0. При обоих условиях LAG3.5 снова демонстрировал примерно вдвое увеличенный уровень фолдинга по сравнению с LAG3.1. В частности, как показано в Таблицах 6-8, LAG3.5 демонстрировал уровень рефолдинга 43% по сравнению с 18% в случае LAG3.1 в PBS. LAG3.5 также

демонстрировал уровень рефолдинга 48% по сравнению с уровнем рефолдинга 29% в случае LAG3.1 при pH 8,0.

Таблица 6 – ДСК:плавление

MAb	Условие	Tm1	Tm2
Lag3.1	PBS	70,7	75,7
Lag3.1	pH8	70,4	75,6
Lag3.5	PBS	70,8	76,4
Lag3.5	pH8	70,5	76,3

Таблица 7 – Fluorolog-2:анфолдинг

Mab/мутанты	Средняя точка (M)	Агрегация (M)
Lag3.1 PBS	1,99	—
Lag3.1 pH8	2,08	—
Lag3.5 PBS	1,86	—
Lag3.5 pH8	2,00	—

Таблица 8: ДСК:рефолдинг

MAb	% обратимости, PBS	% обратимости, pH 8
Lag3.1	18	29
Lag3.5	43	48

4. Гетерогенность зарядов

Для анализа гетерогенности зарядов варианты анализировали с применением изоэлектрофокусирования (ИЭФ) со стандартными маркерами со значением изоэлектрической точки белка 5,5 и 10,0 по сравнению с LAG3.1. Кратко, растворы антител наносили на предварительно изготовленный гель для изоэлектрофокусирования толщиной 1 мм со значением изоэлектрической точки белка 3-7 (Invitrogen, каталожный номер EC6648BOX) вместе с маркерами со значением изоэлектрической точки белка 3-10 (SERVA, каталожный номер 39212). Электрофорез осуществляли с применением ИЭФ 3-7 катодного буфера (Invitrogen, каталожный номер LC5370) и ИЭФ анодного буфера (Invitrogen, каталожный номер LC5370) и с применением электрического тока с постоянным значением напряжения 100 В в

течение 1 часа, постоянным значением напряжения 200 В в течение 1 часа и постоянным значением напряжения 500 В в течение 30 минут. ИЭФ гели окрашивали кумасси синим для детектирования полосок белка и устраняли окраску раствором метанола и уксусной кислоты. Затем ИЭФ гели анализировали с помощью программного обеспечения ImageQuant TL. На основе данного анализа (данные не показаны) LAG3.5 демонстрировал значительно меньшую гетерогенность по сравнению с LAG3.1.

5. ХГВ-ВЭЖХ

Для анализа растворимости варианты анализировали с применением стандартной хроматографии гидрофобного взаимодействия (ХГВ-ВЭЖХ) в соответствии со следующим протоколом: 50 мкл 2 М сульфата аммония добавляли в 50 мкл тестируемого образца антител при 1 мг/мл. затем 80 мкл тестируемого образца наносили на ВЭЖХ колонку (Waters, модель 2795), последовательно соединенную с ХГВ колонкой (TOSOH Bioscience, эфир-5PW TSK-гель, 7,5 мм x 75 мм, номер продукта 07573). Образец элюировали при скорости потока 1,0 мл/мин градиентом из 100% буфера А (2М сульфат аммония, 0,1М фосфат натрия, pH 7,0) до 100% буфера В (0,1М фосфата натрия, pH 7,0) в течение 50 минут. Антитело детектировали путем отслеживания УФ абсорбции при 280 нм и анализировали данные с помощью программного обеспечения Empower. Как показано на Фиг.9, гидрофильность LAG3.5 обеспечивала растворимость при высоких концентрациях сульфата аммония.

Пример 4: Обращение ингибирования иммунной реакции, опосредованного Т-клетками

Активность LAG3.5 определяли с помощью функционального анализа, в рамках которого применяли антигенспецифичную Т-клеточную гибридому мыши (3А9). Гибридома 3А9 экспрессирует Т-клеточный рецептор, специфичный в отношении пептида из лизозима яйца курицы (HEL48-62) и секретирует IL-2 при совместном культивировании с культивированными с пептидами совпадающими по МНС антиген-презентирующими клетками (LK35.2). Поскольку huLAG-3-Fc способен связывать с линиями МНС В-клеток класса II мышей, экспрессия huLAG-3 в 3А9 линии может оказывать ингибирующий эффект благодаря взаимодействию с классом II на презентирющей линии мышей. Сравнение пептидного профиля реакции источника 3А9 с профилем трансдуцированных LAG-3 3А9 клеток, совместно культивируемых с

совпадающими по МНС антиген-презентирующими клетками, показало, что экспрессия LAG-3 человека ингибировала пептидные реакции по сравнению с контрольными 3A9 клетками. Данное ингибирование обращалось с помощью блокады LAG-3 с применением LAG3.5. Таким образом, в отношении LAG3.5 была показана блокада опосредованного LAG-3 ингибирования.

Пример 5: Активация Т-клеток с помощью LAG3.5

Функциональное влияние LAG3.5 на первичные Т-клетки анализировали с применением

культур мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека, стимулируемых суперантигеном SEB. Весь объем PBMC выделяли из крови восемнадцати доноров, представляющих собой людей, и стимулировали в течение 72 часов в рамках любого из двух форматов анализа:

(i) фиксированное количество антитела (20 мкг/мл) и последовательные разбавления SEB или (ii)

фиксированное количество SEB (85 нг/мл) и последовательные разбавления антитела. Уровень секретируемого IL-2, в качестве

меры активности Т-клеток, отслеживали с помощью ELISA. Анти-PD-1 антитело и ипилимумаб применяли в качестве положительных контролей, при этом также оценивали активность LAG3.5 в комбинации с анти-PD-1 или анти-CTLA-4 для подмножества доноров.

Повышенную секрецию IL-2 наблюдали в рамках диапазона концентраций SEB у пятнадцати из восемнадцати доноров, подвергаемых лечению только LAG3.5, по сравнению с лечением антителом с контрольным изотипом.

В большинстве случаев уровень стимулирования был меньшим, чем уровень, наблюдаемый при лечении анти-PD-1 или ипилимумабом. С учетом LAG3.5 результаты двух форматов анализа (описаны выше) соответствовали друг другу. Более того, у 5 из 6 исследованных доноров комбинирование LAG3.5 с анти-PD-1 или ипилимумабом приводило к более высоким уровням стимулирования, чем уровни, наблюдаемые для антитела с контрольным изотипом, комбинированного с анти-PD-1 или ипилимумабом. Эти данные показали, что LAG3.5 может функционировать в рамках анализов нормальных Т-клеток человека и может также активировать реакции, опосредованные ингибированием функции PD-1 и CTLA-4.

КРАТКИЙ ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>ОПИСАНИЕ</u>	<u>ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ</u>
1	V _H n.a. 25F7 (LAG3.1)	

>1408_LAG-3_403_25F7.1_VH1_NT

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGT
CCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGATTACTACTGGAACCTGGATC
CGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAATGGA
AACACCAACTCCAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCCTATCACTAGACACGT
CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGT
GTATTACTGTGCGTTTGGATATAGTGACTACGAGTACAACCTGGTTCGACCCCTGG
GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTCTCA

2	V _H a.a. 25F7	
---	--------------------------	--

>1408_LAG-3_403_25F7.1_VH1_AA

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHNGN
TNSNPSLKSRLVTLSDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYSDYEYNWFDPWGQ
GTLVTVSS

3	V _K n.a. 25F7	
---	--------------------------	--

>1408_LAG-3_403_25F7.1_VK1_NT

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCA
ACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC
ACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCA
CCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAG
CAACTGGCCTCTCACTTTTGGCCAGGGGACCAACCTGGAGATCAAA

4	V _K a.a. 25F7	
---	--------------------------	--

>1408_LAG-3_403_25F7.1_VK1_AA

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAQYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP
ARFSGSGSGTDFTLTISPLEPDAFVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIK

5	V _H CDR1 a.a. 25F7	DYYWN
6	V _H CDR2 a.a. 25F7	EINHNGNTNSNPSLKS
7	V _H CDR3 a.a. 25F7	GYSDYEYNWFDP
8	V _K CDR1 a.a. 25F7	RASQSISSYLA
9	V _K CDR2 a.a. 25F7	DASNRAT

10	V _K CDR3 a.a. 25F7	QQRSNWPLT
11	V _H n.a. LAG3.5	

V_H n.a. LAG3.5

caggtgcagctacagcagtgggggcgaggactgtgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcgctgtctatggtgggtccttcag
tgattactactggaactggatccgccagccccaggggaaggggctggagtgattggggaaatcaatcatcgtggaagcaccaactc
caaccgcctcctcaagagtcgagtcaccctatcactagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgaggtctgtgaccgccgcg
gacacggctgtgtattactgtgcgtttggatagtagtactacgagtacaactgggtcgaccctggggccagggaaaccctggtcaccgtc
tcctca

12	V _H a.a. LAG3.5	
----	----------------------------	--

V_H a.a. LAG3.5

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGE
INHRGSTNSNPSLKSRLTSLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYS
DYEYNWFDPWGQGLTVTVSS

13	V _K n.a. LAG3.5	
----	----------------------------	--

V_K n.a. LAG3.5

gaaattgtgtgacacagctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtattagc
agctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggtcccaggctcctcatgatgatccaacagggccactggcatccag
ccaggttcagtggtggtctgggacagacttactctcaccatcagcagcctagagcctgaagatttgcagttattactgtcagca
gcgtagcaactggcctctcacttttggccaggggaccaacctggagatcaaa

14	V _K a.a. LAG3.5	
----	----------------------------	--

V_K a.a. LAG3.5

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ
GTNLEIK

15	V _H CDR1 a.a. LAG3.5	DYYWN
16	V _H CDR2 a.a. LAG3.5	EINHRGSTNSNPSLKS
17	V _H CDR3 a.a. LAG3.5	GYSDYEYNWFDP
18	V _K CDR1 a.a. LAG3.5	RASQSISSYLA
19	V _K CDR2 a.a. LAG3.5	DASNRAT
20	V _K CDR3 a.a. LAG3.5	QQRSNWPLT
21	LAG-3 эпитоп	PGHPLAPG
22	LAG-3 эпитоп	HPAAPSSW
23	LAG-3 эпитоп	PAAPSSWG

24	V _H CDR2 a.a. LAG3.6	EIIHSGSTNSNPSLKS
25	V _H CDR2 a.a. LAG3.7	EINHGGGTNSNPSLKS
26	V _H CDR2 a.a. LAG3.8	EINHIGNTNSNPSLKS
27	V _H CDR2 a.a.HUMAN GERMLINE	GEINHSGSTNY
28		(Gly ₄ -Ser) ₃
29	LAG-3 человека a.a.	

последовательность LAG-3 человека a.a.

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEPVWVAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLR
RAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGLRSGRL
PLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQAS
MTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAESFLFL
PQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPA
GVGTRSFLLAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVSQAQAGTYTCHIHLEQQNLN
ATVTLAIITVTPKSFSGPSLGLKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQE
AQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLFLTLGVL
SLLLLVTGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPE
PEPEQL*

30	V _H CDR2 a.a. LAG3.2	VIWYDGSNKYYADSVKG
31	V _H LAG3.1 n.a.	

LAG3.1HC

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGT
CCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGATTACTACTGGAACCTGGATC
CGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAATGGA
AACACCAACTCCAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCCTATCACTAGACACGT
CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGT
GTATTACTGTGCGTTTGGATATAGTGACTACGAGTACAACTGGTTCGACCCCTGG
GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCT
TCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCC
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC
CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACC
TGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCC

AAATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCAT
 CAGTCTTCCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCT
 GAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTC
 AACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
 GAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGG
 ACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGT
 CCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGG
 TGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC
 CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
 GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
 TCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGA
 ATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAA
 GAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

32	V _H LAG3.1 a.a.	
----	----------------------------	--

TRANSLATION OF LAG3.1HC

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHNGN
 TNSNPSLKS RVTL SLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYSDYEYNWFDPWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPP
 CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK*

33	V _L LAG3.1 n.a.	
----	----------------------------	--

LAG3.1LC

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
 CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCA
 ACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC
 ACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCA
 CCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAG
 CAACTGGCCTCTCACTTTTGGCCAGGGGACCAACCTGGAGATCAAACGTACGGTG
 GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC
 TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT

GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGC
 AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAG
 CAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA
 GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

34	V _L LAG3.1 a.a.	
----	----------------------------	--

TRANSLATION OF LAG3.1LC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP
 ARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKRTVAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

35	V _H LAG3.5 a.a.	
----	----------------------------	--

LAG3.5 последовательность тяжелой цепи - полностью

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGE
 INHRGSTNSNP SLKSRVTLSLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYS
 DYEYNWFDPWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKT
 YTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
 LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
 DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK*

36	V _H LAG3.5 n.a.	
----	----------------------------	--

LAG3.5 последовательность тяжелой цепи - полностью

cagggtgcagctacagcagtggggcgcaggactgtgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcgctgtctatggtgggtccttcag
 tgattactactggaactggatccgcccagccccaggaaggggctggagtggattggggaatcaatcatcgtggaagcacaactc
 caaccgctccctcaagagtcgagtcacccatcactagacagtcacaagaaccagttctccctgaagctgaggtctgtgaccgccgcg
 gacacggctgtgtattactgtgcgttggatatagtactacagtagtaactgggtcgaccctggggccaggaaccctggtcaccgtc
 tctcagctagcaccaagggcccatccgtcttccccctggcgccctgtccaggagcacctccgagagcacagccgcctgggctgc
 ctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacgggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcgcggtgcacaccttccgggtgtcc
 tacagtcctcaggacttactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagat
 cacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtgtagtccaaatatggtccccatgccaccatgccagcacctgagttcctg
 gggggaccatcagtcctcgtgtcccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgcgtggtggtgga
 cgtgagccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggag
 gagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaag

gtctccaacaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagagccacaggtgtacacctg
 ccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtaaaaggcttctacccagcgacatcgccgtgga
 gtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctacagcag
 gctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacag
 aagagcctctccctgtctctgggtaaatga

37	V _L LAG3.5 a.a.	
----	----------------------------	--

LAG3.5 последовательность каппа цепи - полностью

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
 ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ
 GTNLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
 DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
 LSSPVTKSFNRGEC*

38	V _L LAG3.5 n.a.	
----	----------------------------	--

LAG3.5 - последовательность каппа цепи - полностью

gaaattgtgtgacacagtcctccagccaccctgtctttgtctccagggaaagagccaccctctctgcagggccagtcagagtattagc
 agctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcccag
 ccaggttcagtggtgagtggtctgggacagacttactctcaccatcagcagcctagagcctgaagatttgcagtttactgtcagca
 gcgtagcaactggcctctcacttttggccaggggaccaacctggagatcaaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatctccgcc
 atctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggagggtg
 gataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacct
 gacgtgagcaaagcagactacgagaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgtcacaaaga
 gcttcaacaggggagagtgttag

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> БРИСТОЛ-МАЙЕРС СКВИББ КОМПАНИ

<120> ОПТИМИЗАЦИЯ АНТИТЕЛ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ ГЕН АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ 3 (LAG-3), И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

<130> 11911-WO-PCT

<140> PCT/US2013/048999

<141> 2013-07-02

<150> 61/667,058

<151> 2012-07-02

<160> 52

<170> PatentIn version 3.5

 $\langle 210 \rangle$ 1 $\langle 211 \rangle$ 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

 $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

 $\langle 222 \rangle \quad (1) \dots (360)$ $\langle 400 \rangle$ 1

cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag 48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt gat tac 96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

tac tgg aac tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att 144
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

ggg gaa atc aat cat aat gga aac acc aac tcc aac ccg tcc ctc aag 192
Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

agt cga gtc acc cta tca cta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg 240
 Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

aag ctg agg tct gtg acc gcc gcg gac acg gct gtg tat tac tgt gcg 288
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

ttt gga tat agt gac tac gag tac aac tgg ttc gac ccc tgg ggc cag 336
Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 360

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 2

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

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

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 3

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
1				5					10					15			
gaa	aga	gcc	acc	ctc	tcc	tgc	agg	gcc	agt	cag	agt	att	agc	agc	tac		96
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr		
			20					25					30				
tta	gcc	tg	tac	caa	cag	aaa	cct	ggc	cag	gct	ccc	agg	ctc	ctc	atc		144
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile		
		35					40					45					
tat	gat	gca	tcc	aac	agg	gcc	act	ggc	atc	cca	gcc	agg	ttc	agt	ggc		192
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly		
	50					55					60						
agt	ggg	tct	ggg	aca	gac	ttc	act	ctc	acc	atc	agc	agc	cta	gag	cct		240
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro		
65					70					75					80		
gaa	gat	ttt	gca	gtt	tat	tac	tgt	cag	cag	cgt	agc	aac	tg	cct	ctc		288
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Leu		
				85					90					95			
act	ttt	ggc	cag	ggg	acc	aac	ctg	gag	atc	aaa							321
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Asn	Leu	Glu	Ile	Lys							
			100					105									

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

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

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 5
 Asp Tyr Tyr Trp Asn
 1 5

<210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 6
 Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 7
 Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 8
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 9

<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 9
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 10
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 11
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 11
caggtgcagc tacagcagt gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc 120
ccagggaagg ggctggagt gattggggaa atcaatcatc gtggaagcac caactccaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccctatca ctagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcggt tggatatagt 300
gactacgagt acaactggtt cgaccctgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 12
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 12

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

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

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 13
gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt att agc agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

act ttt ggc cag ggg acc aac ctg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

```
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide"
```

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

```
<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
```

```
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"
```

<400> 15
Asp Tyr Tyr Trp Asn

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 16
Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 17
Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 18
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 19
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 20

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 20
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly
1 5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
1 5

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly
1 5

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 24
Glu Ile Ile His Ser Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 25
Glu Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 26
Glu Ile Asn His Ile Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr
1 5 10

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 28
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 29
<211> 525
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
1 5 10 15

Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
20 25 30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
 35 40 45

Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
 50 55 60

His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
 65 70 75 80

Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
 85 90 95

Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
 100 105 110

Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
 115 120 125

Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
 130 135 140

Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
 145 150 155 160

Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
 165 170 175

Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
 180 185 190

Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
 195 200 205

Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
 210 215 220

Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
 225 230 235 240

Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
 245 250 255

Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
 260 265 270

Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val
 275 280 285

Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
 305 310 315 320
 Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His
 325 330 335
 Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr
 340 345 350
 Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu
 355 360 365
 Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser
 370 375 380
 Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala
 385 390 395 400
 Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln
 405 410 415
 Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser
 420 425 430
 Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly
 435 440 445
 His Leu Leu Leu Phe Leu Thr Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu
 450 455 460
 Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
 465 470 475 480
 Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
 485 490 495
 Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
 500 505 510
 Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
 515 520 525

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 30
Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 31
<211> 1344
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 31
caggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc 120
ccaggaagg ggctggagt gattggggaa atcaatcata atggaaacac caactccaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccctatca ctagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgaggt ctgtgaccgc cgcgacacg gctgtgtatt actgtgcgtt tggatatagt 300
gactacgagt acaactggtt cgacccttg ggccaggga cctgggtcac cgtctcctca 360
gctagacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 420
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 600
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 660
aaatatggtc ccccatgccc accatgccc gcacctgagt tcttgggggg accatcagtc 720
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 780
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgaggag agcagttcaa cagcacgtac 900
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat ccaggagga gatgaccaag 1080
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc	1200
gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg	1260
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc	1320
ctctccctgt ctctgggtaa atga	1344

<210> 32

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 32

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys	
50 55 60	

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu	
65 70 75 80	

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

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln	
100 105 110	

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val	
115 120 125	

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala	
130 135 140	

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser	
145 150 155 160	

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val	
165 170 175	

Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	180	185	190	
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	195	200	205	
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	210	215	220	
Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	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	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	260	265	270	
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	275	280	285	
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	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	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	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	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	355	360	365	
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	370	375	380	
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	385	390	395	400
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	405	410	415	
Trp	Gln	Glu	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 Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 33
<211> 645
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 33
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctctcac ttttggccag 300
gggaccaacc tggagatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 34
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 34
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 35

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 35

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly	Glu	Ile	Asn	His	Arg	Gly	Ser	Thr	Asn	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	50	55	60	
Ser	Arg	Val	Thr	Leu	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	65	70	75	80
Lys	Leu	Arg	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85	90	95	
Phe	Gly	Tyr	Ser	Asp	Tyr	Glu	Tyr	Asn	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	100	105	110	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	115	120	125	
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	130	135	140	
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	145	150	155	160
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	165	170	175	
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	180	185	190	
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	195	200	205	
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	210	215	220	
Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	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	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	260	265	270	
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	275	280	285	
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	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 Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu 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 Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 36
<211> 1344
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 36
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc 120
ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaagcac caactccaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccctatca ctagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggaacac gctgtgtatt actgtgcggt tggatatagt 300
gactacgagt acaactggtt cgacccttg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360
gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 420
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggtgtcct acagtctcctca 540

```

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc      600
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc      660
aaatatggtc ccccatgccc accatgcccga gcacctgagt tcctggggggg accatcagtc      720
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg      780
tgcggtggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat      840
ggcggtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac      900
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag      960
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa     1020
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag     1080
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag     1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc     1200
gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg     1260
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc     1320
ctctccctgt ctctgggtaa atga                                             1344

```

<210> 37

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 37

```

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

```

```

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20          25          30

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
          85          90          95

```

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 38
<211> 645
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 38
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctctcac ttttggccag 300
gggaccaacc tggagatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 39

Pro Val Gly Val Val

1 5

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 40

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro

1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 41

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser

1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 42

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser

1 5 10

<210> 43

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

 <400> 43
 Gly Glu Ile Ile His Ser Gly Ser Thr Asn Ser
 1 5 10

 <210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

 <400> 44
 Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Ser
 1 5 10

 <210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

 <400> 45
 Gly Glu Ile Asn His Ile Gly Asn Thr Asn Ser
 1 5 10

 <210> 46
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Isomerized residue

 <400> 46
 Ile Asn His Asp Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
 1 5 10

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 47
Ile Asn His Asp Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 48
Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asp Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 49
Ile Asp His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10

<210> 50
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Isomerized residue

<400> 50
Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asp Ser Asn Pro Ser Leu Lys

<210> 51
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 51
Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10

<210> 52
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Isomerized residue

<400> 52
Ile Asp His Arg Gly Ser Thr Asp Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывает LAG-3 человека, включающее переменные участки тяжелой и легкой цепи, при этом переменный участок тяжелой цепи включает CDR1, CDR2 и CDR3 участки из переменного участка тяжелой цепи SEQ ID NO: 12.
2. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, отличающееся тем, что CDR1, CDR2 и CDR3 участки тяжелой цепи включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15, 16 и 17, соответственно.
3. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, отличающееся тем, что переменный участок легкой цепи включает CDR1, CDR2 и CDR3 участки переменного участка легкой цепи SEQ ID NO: 14.
4. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.3, отличающееся тем, что CDR1, CDR2 и CDR3 участки легкой цепи включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно.
5. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1 или п.3, отличающееся тем, что переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
6. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что переменный участок легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.
7. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывает LAG-3 человека, включающее CDR1, CDR2 и CDR3 участки тяжелой и легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15, 16, 17 и SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно.

8. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывает LAG-3 человека, включающее вариабельные участки тяжелой и легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и 14, соответственно.

9. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих пунктов, обладающее одним или комбинацией следующих свойств:

- (a) связывание LAG-3 обезьяны;
- (b) отсутствие связывания LAG-3 мыши;
- (c) связывание LAG-3 с молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса;
- (d) ингибирование связывания LAG-3 с молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса; или
- (e) стимулирование иммунной реакции.

10. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих пунктов, которое стимулирует продуцирование интерлейкина-2 ((IL-2) при антигенспецифичной Т-клеточной реакции.

11. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих пунктов, которое стимулирует противоопухолевую иммунную реакцию.

12. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих пунктов, которое связывает эпитоп LAG-3 человека, включающий аминокислотную последовательность PGHPLAPG (SEQ ID NO: 21).

13. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих пунктов, которое связывает эпитоп LAG-3 человека, включающий аминокислотную последовательность HPAAPSSW (SEQ ID NO: 22) или PAAPSSWG (SEQ ID NO: 23).

14. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих пунктов, которое связывает LAG-3 человека при значении K_D $0,27 \times 10^{-9}$ М или менее.
15. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой относящееся к человеку, гуманизированное или химерное антитело.
16. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих пунктов, которое относится к изотипу IgG1, IgG2 или IgG4.
17. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой фрагмент антитела или одноцепочечное антитело.
18. Биспецифическая молекула, включающая антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из предыдущих пунктов и второе антитело или его антигенсвязывающую часть.
19. Иммуноконъюгат, включающий антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из п.п. 1-17, связанное с терапевтическим агентом.
20. Иммуноконъюгат по п.19, отличающийся тем, что терапевтический агент представляет собой цитотоксин или радиоактивный изотоп.
21. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из п.п. 1-17, биспецифическую молекулу по п.18 или иммуноконъюгат по п.19 или п.20, и фармацевтически приемлемый носитель.
22. Композиция по п.21, дополнительно содержащая противораковый агент.

23. Композиция по п.22, отличающаяся тем, что агент представляет собой антитело или химиотерапевтический агент.
24. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая переменный участок тяжелой и/или легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей части по любому из п.п.1-8.
25. Вектор экспрессии, включающий нуклеиновую кислоту по п.24.
26. Клетка-хозяин, включающая вектор экспрессии по п.25.
27. Способ получения анти-LAG-3 антитела, включающий экспрессию антитела в клетке-хозяине по п.26 и выделение антитела из клетки-хозяина.
28. Способ стимулирования иммунной реакции у субъекта, включающий введение антитела или его антигенсвязывающей части по любому из п.п.1-17, биспецифической молекулы по п.18 или иммуноконъюгата по п.19 или п.20 субъекту таким образом, что осуществляется стимулирование иммунной реакции у субъекта.
29. Способ по п.28, отличающийся тем, что субъект представляет собой субъект с опухолью, при этом стимулируется иммунный ответ против опухоли.
30. Способ по п.28, отличающийся тем, что субъект представляет собой субъект с вирусом, при этом стимулируется иммунный ответ против вируса.
31. Способ по п.28, отличающийся тем, что иммунная реакция представляет собой антигенспецифичную Т-клеточную реакцию таким образом, что осуществляется стимулирование антигенспецифичной Т-клеточной реакции.
32. Способ по п.31, отличающийся тем, что осуществляется стимулирование продуцирования интерлейкина-2 антигенспецифичной Т-клеткой.

33. Способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающий введение субъекту антитела или его антигенсвязывающей части по любому из п.п.1-17, биспецифической молекулы по п.18 или иммуноконъюгата по п.19 или п.20 таким образом, что ингибируется рост опухоли у субъекта.

34. Способ лечения вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту антитела или его антигенсвязывающей части по любому из п.п.1-17, биспецифической молекулы по п.18 или иммуноконъюгата по п.19 или п.20 таким образом, что осуществляется лечение вирусной инфекции у субъекта.

35. Способ по п.30, также включающий введение, по меньшей мере, одного дополнительного иммуностимулирующего антитела.

36. Способ по п.35, отличающийся тем, что, по меньшей мере, одно иммуностимулирующее дополнительное антитело представляет собой анти-PD-1 антитело.

37. Способ по п.36, отличающийся тем, что, по меньшей мере, одно дополнительное иммуностимулирующее антитело представляет собой анти-PD-L1 антитело.

38. Способ по п.36, отличающийся тем, что, по меньшей мере, одно дополнительное иммуностимулирующее антитело представляет собой анти-CTLA-4 антитело.

39. Применение антитела или его антигенсвязывающей части по любому из п.п.1-17, биспецифической молекулы по п.18 или иммуноконъюгата по п.19 или п.20 для стимулирования иммунной реакции, необязательно антигенспецифичной Т-клеточной реакции, или ингибирования роста опухолевых клеток или лечения вирусной инфекции у субъекта.

40. Применение антитела или его антигенсвязывающей части по любому из п.п.1-17, биспецифической молекулы по п.18 или иммуноконъюгата по п.19 или п.20 при производстве лекарственного средства для стимулирования иммунной реакции, необязательно антигенспецифичной Т-клеточной реакции, или ингибирования роста опухолевых клеток или лечения вирусной инфекции у субъекта.

LAG3.1 - Анти-LAG3 25F7 VH

V сегмент: 4-34

D сегмент: 5-12

J сегмент: JH5b

1 Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L
CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

CDR1

55 S L T C A V Y G G S F S D Y Y W N W
TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GAT TAC TAC TGG AAC TGG

CDR2

109 I R Q P P G K G L E W I G E I N H N
ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AAT

CDR2

163 G N T N S N P S L K S R V T L S L D
GGA AAC ACC AAC TCC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC CTA TCA CTA GAC

217 T S K N Q F S L K L R S V T A A D T
ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGG TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

CDR3

271 A V Y Y C A F G Y S D Y E Y N W F D
GCT GTG TAT TAC TGT GCG TTT GGA TAT AGT GAC TAC GAG TAC AAC TGG TTC GAC

CDR3

325 P W G Q G T L V T V S S
CCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

Фиг.1А

LAG3.1 - Анти-LAG3 25F7 VK

V сегмент: L6
J сегмент: JK2

1 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

~~~~~  
55 A T L S C R A S Q S I S S Y L A W Y  
GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT ATT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

**CDR2**

~~~~~  
109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

CDR2

~~~~~  
163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T  
GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

**CDR3**

~~~~~  
217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

CDR3

~~~~~  
271 R S N W P L T F G Q G T N L E I K  
CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAC CTG GAG ATC AAA

**Фиг.1В**



**LAG3.5 - Анти-LAG VH**

Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L

CDR1

S L T C A V Y G G S F S D Y Y W N W

CDR2

I R Q P P G K G L E W I G E I N H R

CDR2

G S T N S N P S L K S R V T L S L D

T S K N Q F S L K L R S V T A A D T

CDR3

A V Y Y C A F G Y S D Y E Y N W F D

CDR3

P W G Q G T L V T V S S

**Фиг.2А**

**LAG3.5 - Анти- LAG3 VK**

V сегмент: L6  
J сегмент: JK2

1 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R  
GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

**CDR1**

~~~~~  
55 A T L S C R A S Q S I S S Y L A W Y
GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT ATT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

CDR2

~~~~~  
109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R  
CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

**CDR2**

~~~~~  
163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

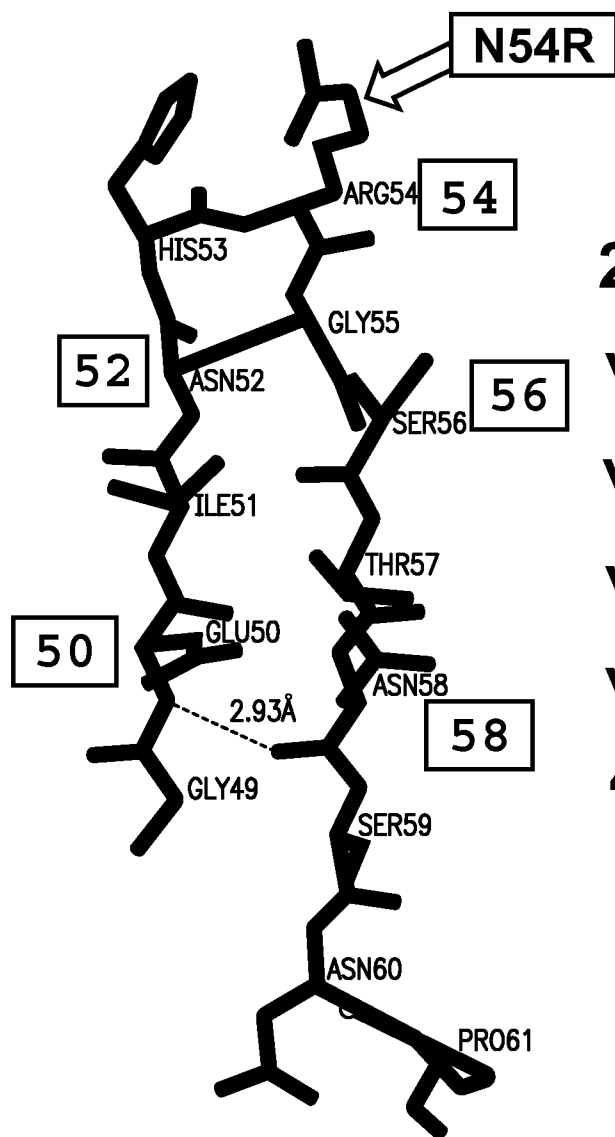
CDR3

~~~~~  
217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q  
CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

**CDR3**

~~~~~  
271 R S N W P L T F G Q G T N L E I K
CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAC CTG GAG ATC AAA

Фиг.2В



50 52 54 56 58
25F7 ...GEINHNGNTNS...

var1 ...GEINHRG**STNS...** LAG3.5

var2 ...GEII**H**S**GSTNS...** LAG3.6

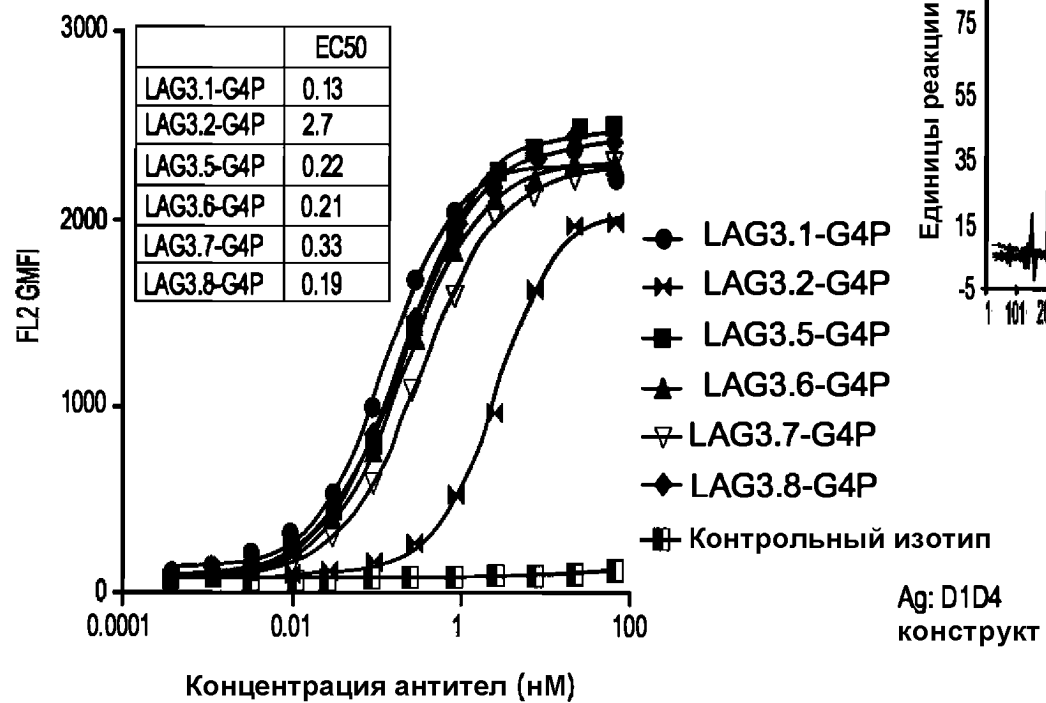
var3 ...GEINHG****G**GTNS...** LAG3.7

var4 ...GEINHI**GTNS...** LAG3.8

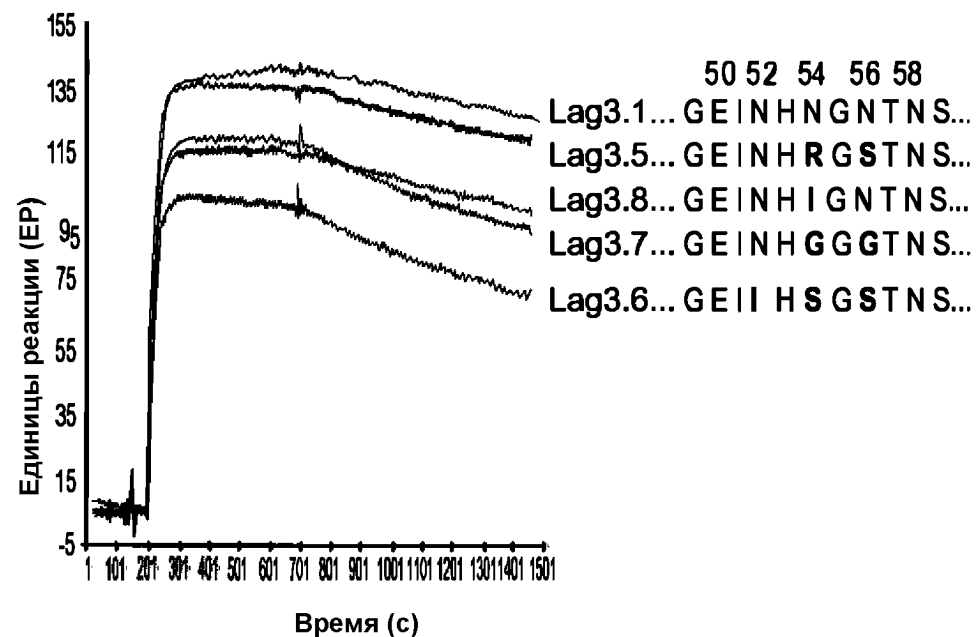
4-34 GEINHS**GSTNY** ← Последовательность зародышевой линии

Фиг.3

Связывание активированных CD4+ T-клеток человека

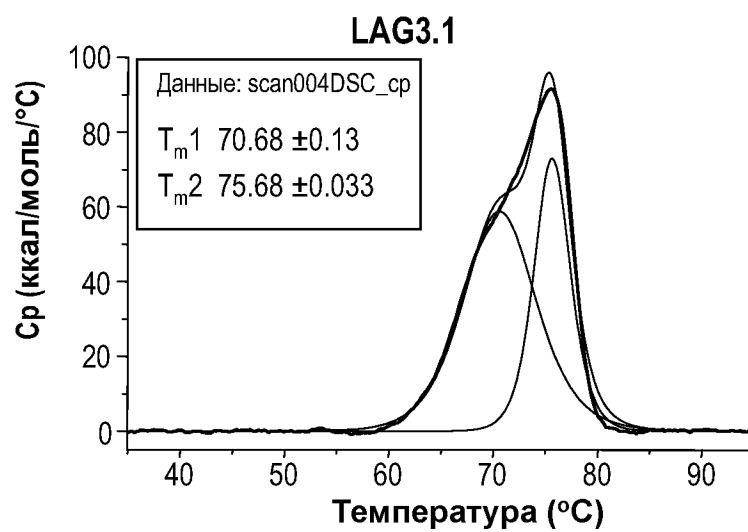
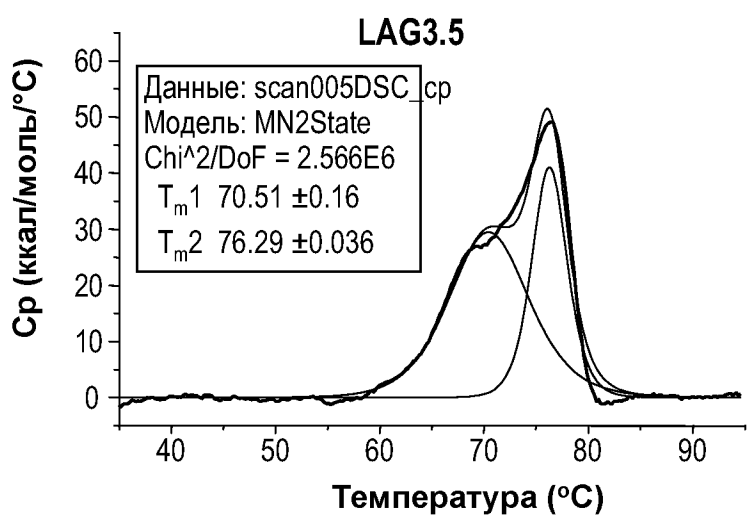
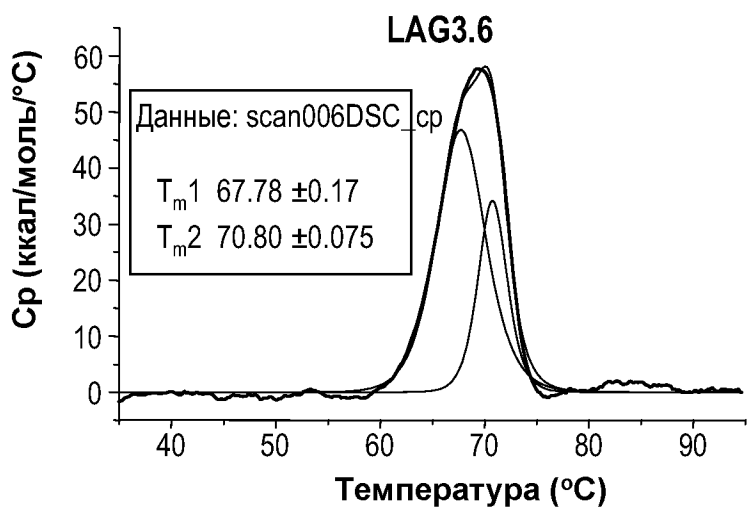


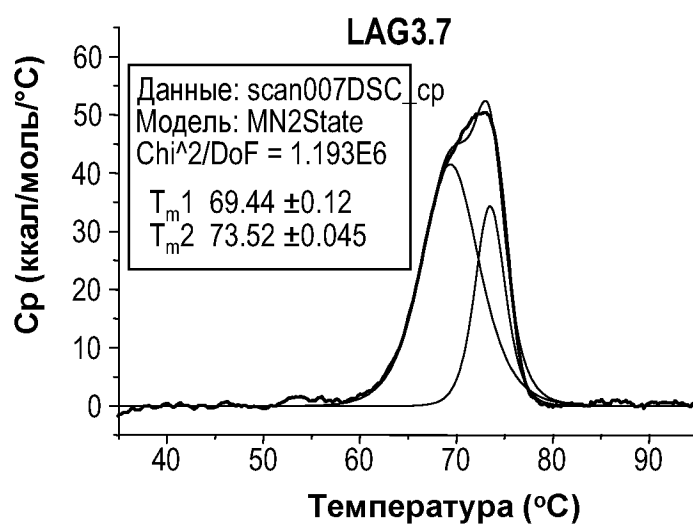
Фиг.4А



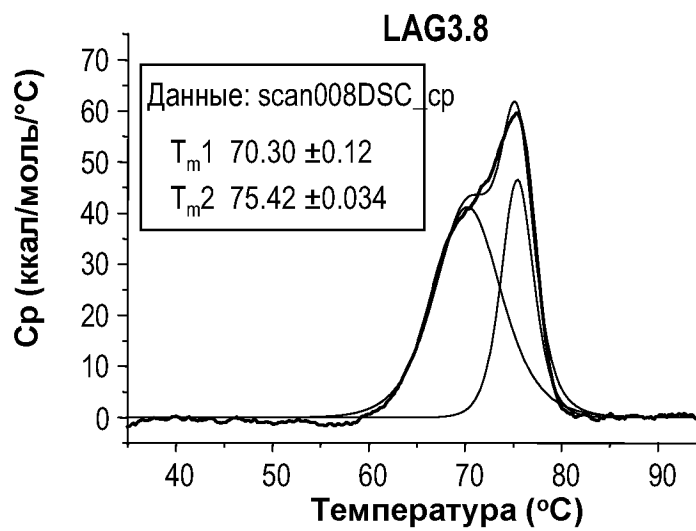
ID клона	$K_D \times 10^{-9}$ (M)	$k_{on} \times 10^4$ (1/Mc)	$k_{off} \times 10^{-4}$ (1/c)
LAG3.1	0.27	102	2.79
LAG3.5	0.27	122	3.27
LAG3.6	0.66	118	7.77
LAG3.7	0.61	104	6.36
LAG3.8	0.30	130	3.36

Фиг.4В

**Фиг.5А****Фиг.5В****Фиг.5С**

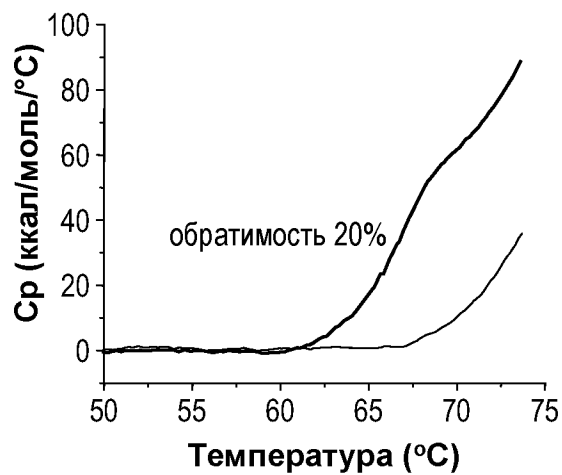
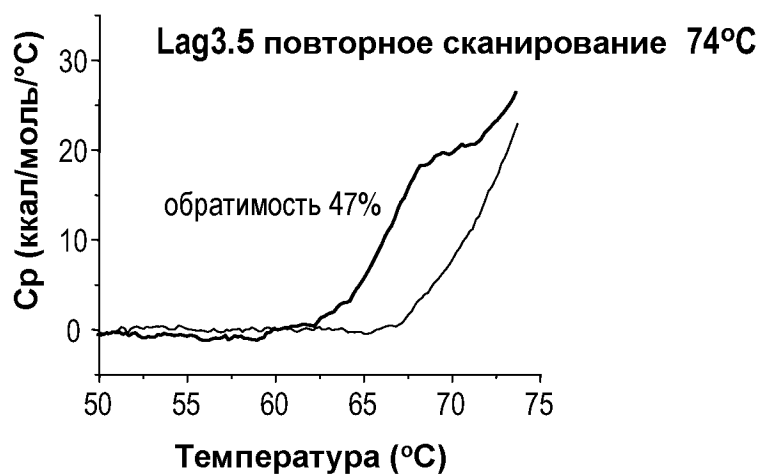
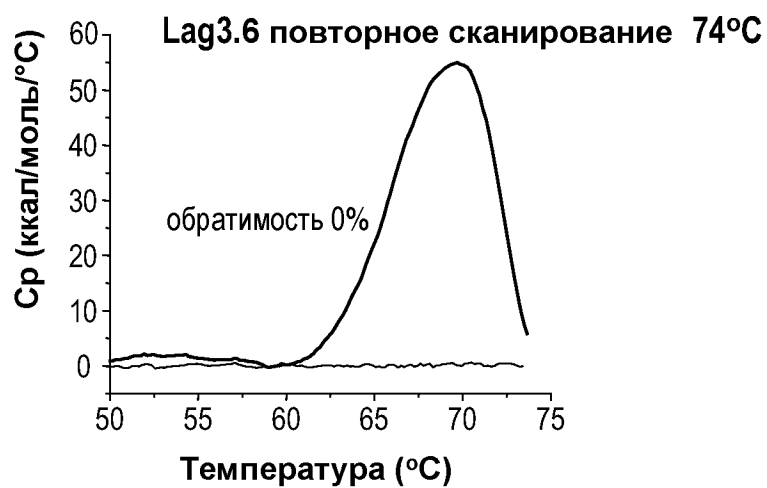


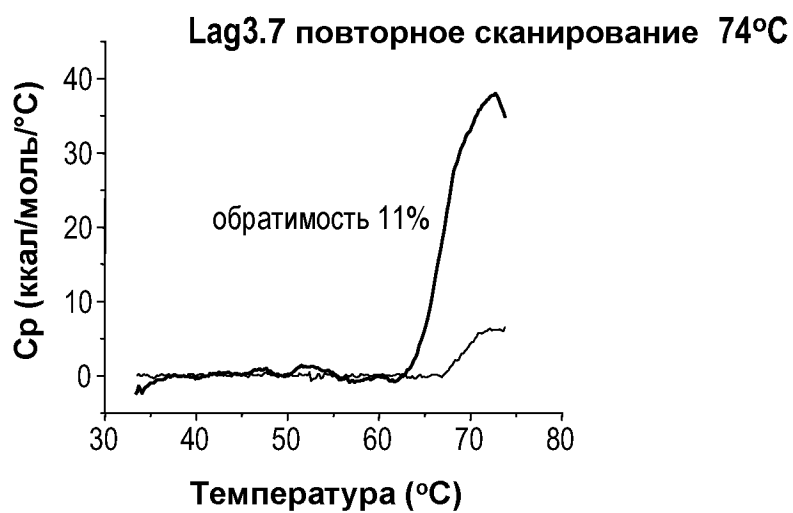
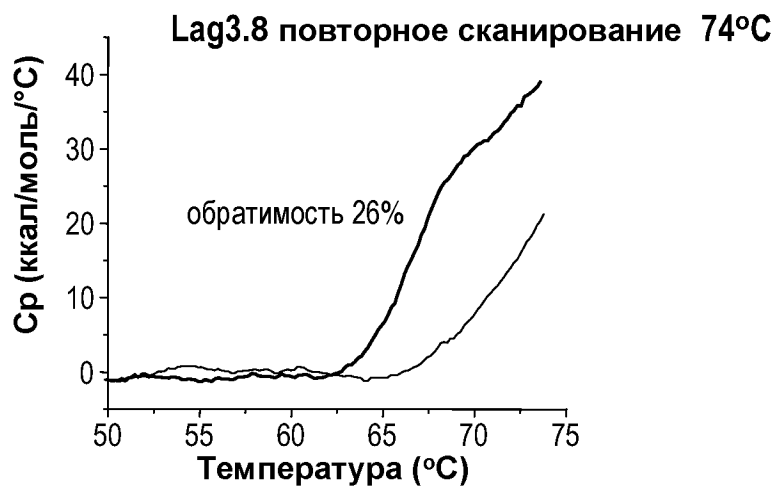
Фиг.5D

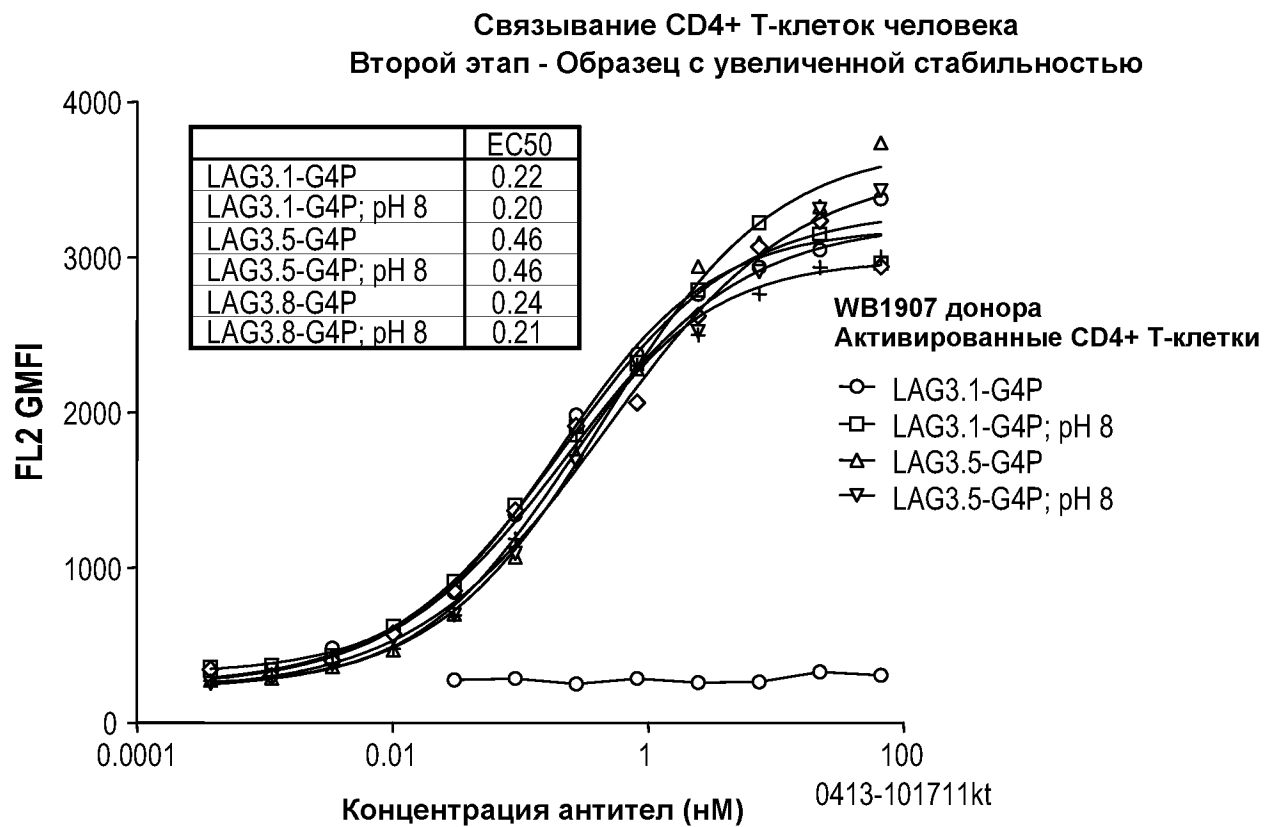


Фиг.5E

Lag3.1 повторное сканирование 74°C

**Фиг.6А****Фиг.6В****Фиг.6С**

**Фиг.6D****Фиг.6E**

**Фиг.7**

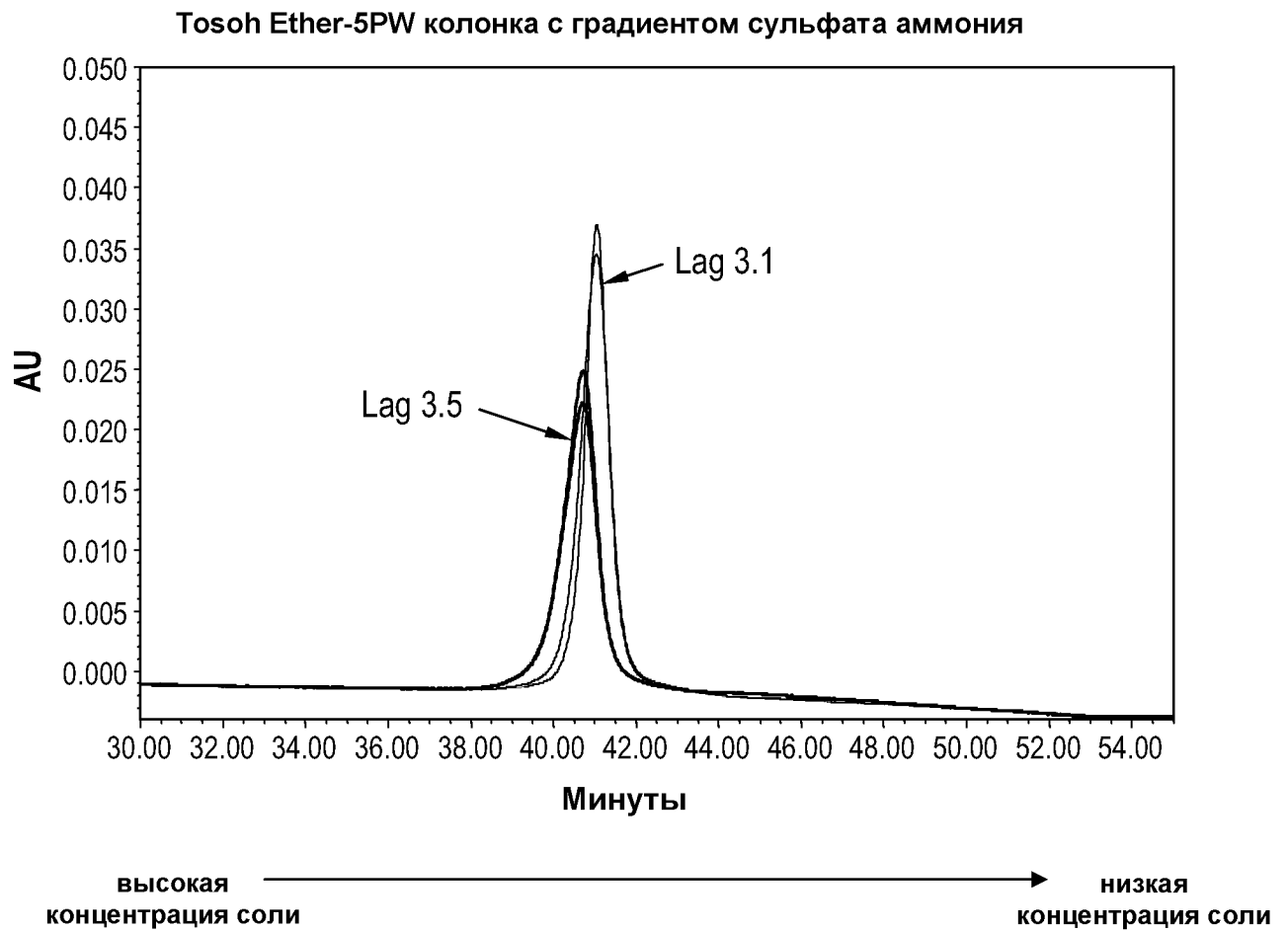
Моноклональное антитело -
культивирование в течение 5 дней

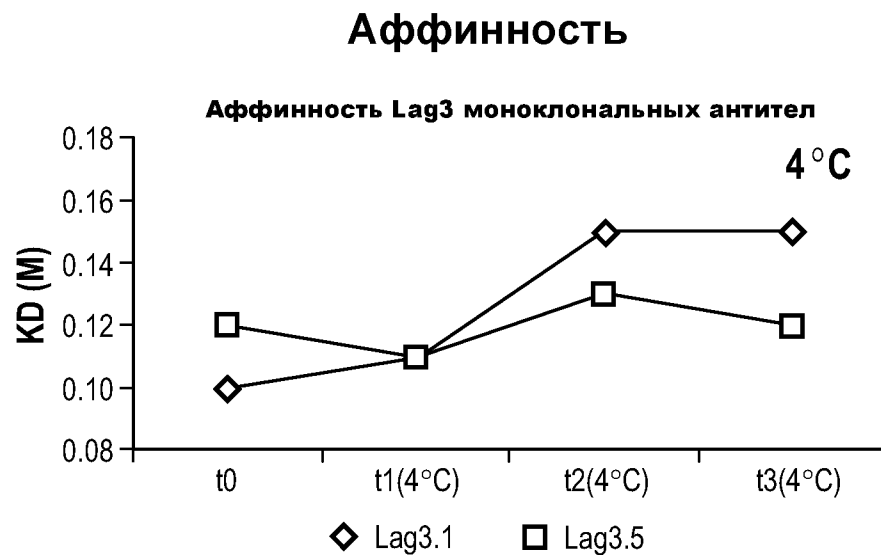
Показан только CDR2 пептид

	INHD*GNTNSNPSLK	INH DGNTNSNPSLK		CDR2 деамидирование
	INHNGNTDSNPSLK		IDHNGNTNSNPSLK	Всего
3.1	2.5%	5.1%	1.5%	9%
3.1 pH8	10.0%	15.3%	4.9%	30%

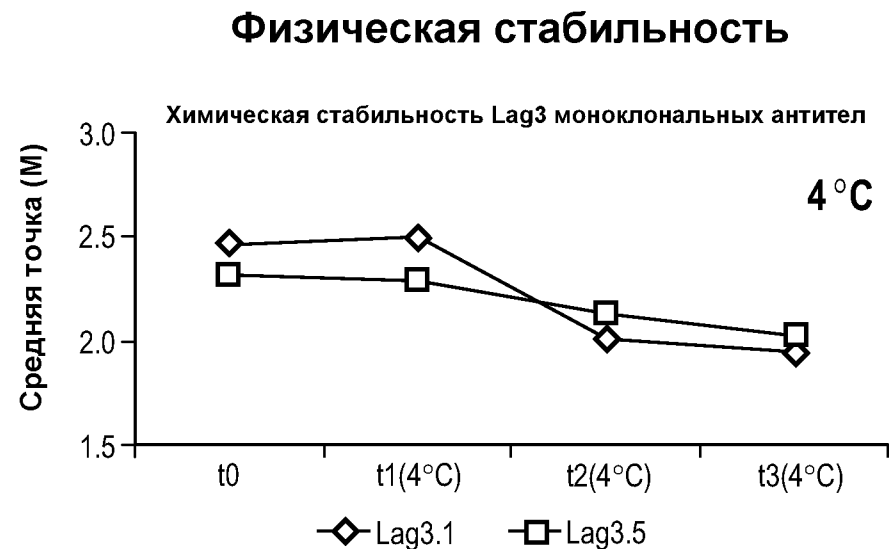
	INHRGSTD?SNPSLK	INHRGSTNSNPSLK	ID?HRGSTDSNPSLK	
3.5	2.3%	-	1.5%	4%
3.5 pH8	3.1%	-	1.7%	5%

Фиг.8

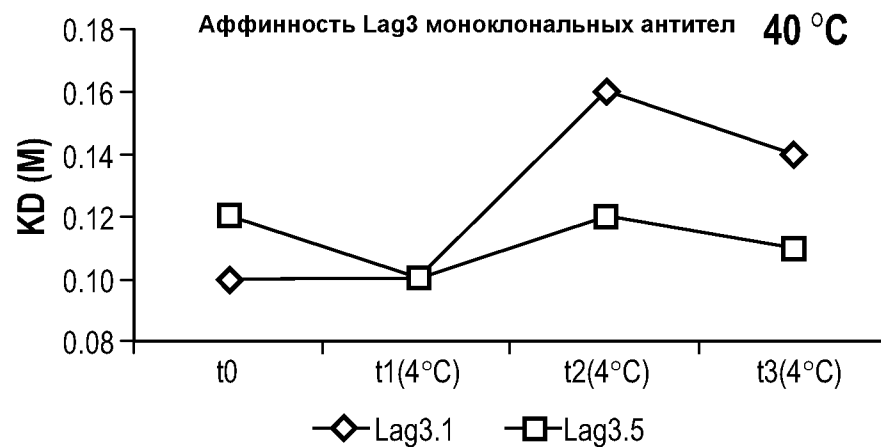
**Фиг.9**



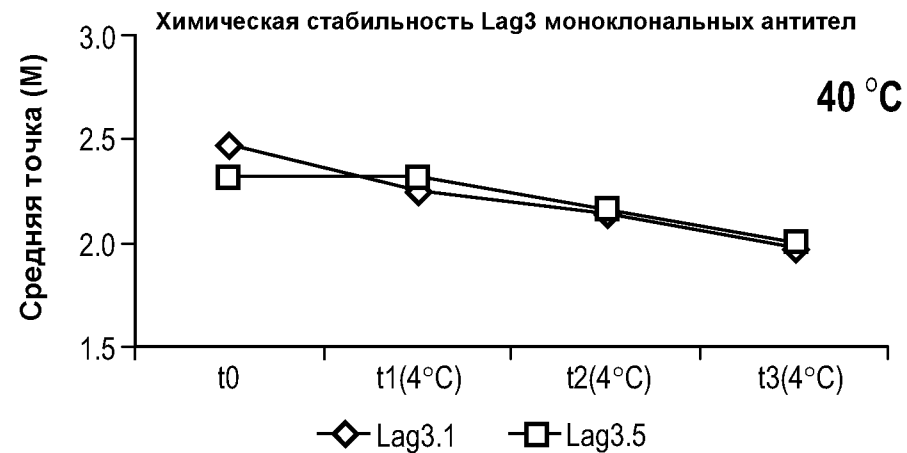
Фиг.10А



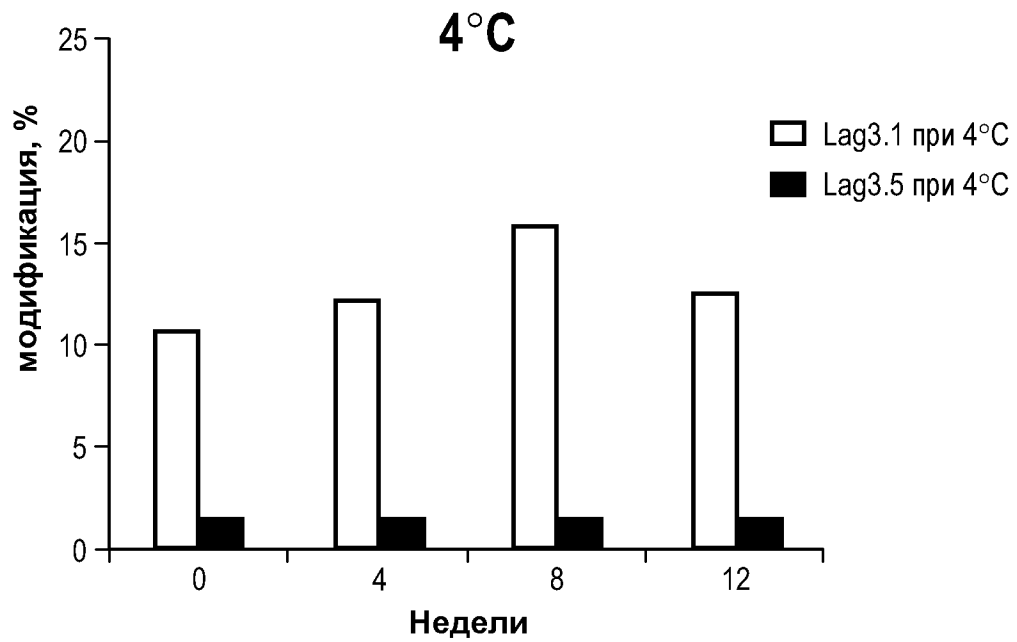
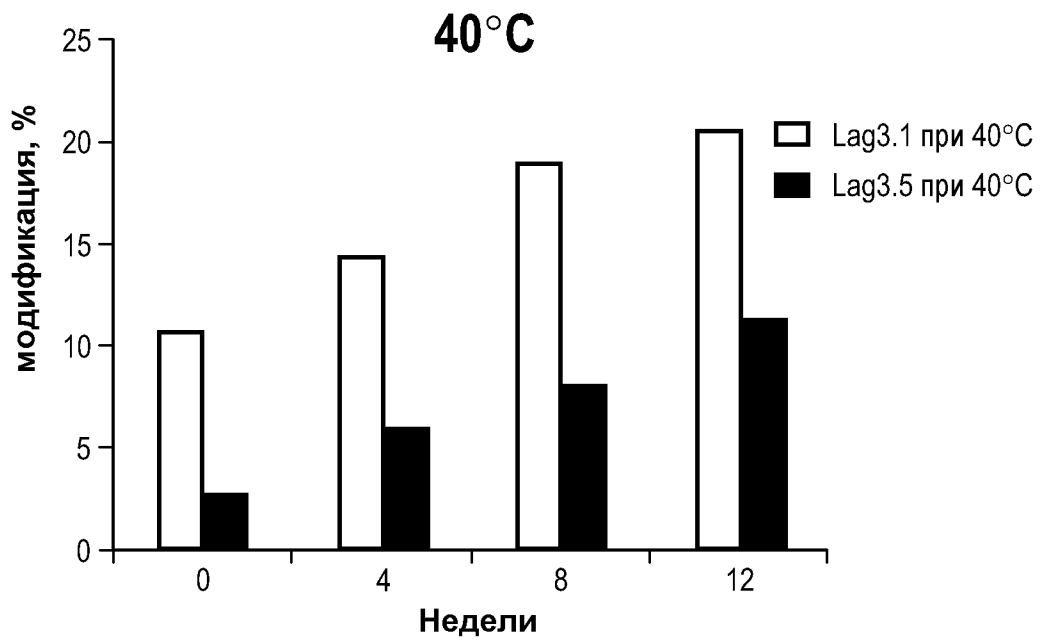
Фиг.10С



Фиг.10В



Фиг.10D

**Фиг.11А****Фиг.11В**