

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090603 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.10

(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.08.28

(54) АНТИ-LAG-3 АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/551,927; 62/588,475; 62/626,310

(32) 2017.08.30; 2017.11.20; 2018.02.05

(33) US

(86) PCT/US2018/048221

(87) WO 2019/046225 2019.03.07

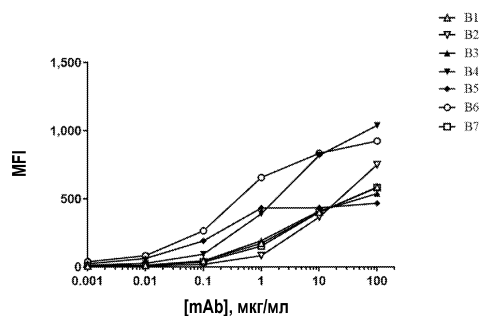
(71) Заявитель:
ФЕЙНЗ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ван Минхань, Цзоу Хой, Цзя Хайцюнь
(US)

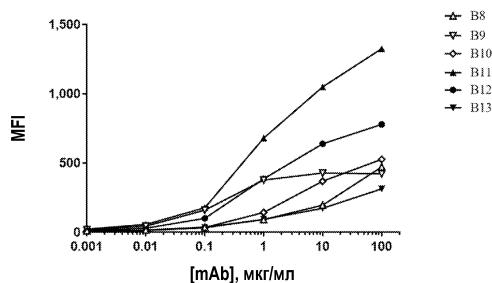
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны анти-LAG-3 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Также описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие эти антитела, композиции, содержащие эти антитела, и способы получения указанных антител и применения этих антител для лечения или профилактики заболеваний, таких как рак, воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание, диабет типа I и/или инфекционные заболевания.

A



B



A1

202090603

202090603

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561413EA/025

АНТИ-LAG-3 АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США 62/551,927, поданной 30 августа 2017 года, предварительной заявке на патент США 62/588,475, поданной 20 ноября 2017 года, и предварительной заявке на патент США 62/626,310, поданной 5 февраля 2018 года, раскрытие каждой из них включено в настоящее описание во всей полноте посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение относится к моноклональным анти-LAG-3 антителам, нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим эти антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим эти векторы, и композициям, содержащим указанные антитела. Также предложены способы получения антител и способы применения этих антител для лечения заболеваний, включая рак, воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, инфекционные заболевания, диабет типа 1 и/или и связанные с ними осложнения.

ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОЙ ВЕРСИИ

[0003] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде через EFS-Web в виде списка последовательностей в формате ASCII с названием файла «689204.4WO Sequence Listing» и датой создания файла 7 августа 2018 года размером 89 кБ. Список последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Иммунная супрессия давно признана одной из важных причин развития рака. Не так давно была продемонстрирована длительная эффективность стимуляции иммунного ответа на раковые клетки при раковой терапии. Это подтверждается огромным успехом терапевтических средств, которые нацелены на белки иммунных контрольных точек, такие как PD-1, PD-L1 и CTLA-4. Тем не менее, только у небольшой части пациентов наблюдается ответ на эти терапевтические агенты иммунных контрольных точек. Возникает вопрос, подавляется ли иммунный ответ на раковые клетки дополнительными механизмами и позволит ли блокирование этих механизмов подавления излечить большее количество пациентов (обзор см. Hahn et al., Immunotherapy 2017; 9:681-692).

[0005] В дополнение к PD-1, PD-L1 и CTLA-4, эффекторные Т-клетки негативно модулируются множеством белков, коингибирующих контрольные точки, таких как B7-Н3, BTLA, LAG-3 (ген 3 активации лимфоцитов; CD223), TIM-3 и TIGIT. Среди них LAG-3 экспрессируется на поверхности активированных Т-клеток (Triebl et al., J. Exp. Med.

1990; 171:1393-1405) и проявляет уникальную коингибирующую активность. Ко-рецептор как LAG-3, так и CD4 Т-клеток связывается с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II на одном и том же участке, но связывание с LAG-3 происходит с гораздо более высоким сродством, чем с CD4 (Huard et al., *Immunogenetics* 1994; 39:213-217). Следовательно, экспрессия LAG-3 на Т-клетках предотвращает связывание CD4 с молекулами МНС класса II на антигенпрезентирующих клетках (АРС), ингибирует костимулирующую активность молекул МНС класса II и негативно модулирует поддержание активности Т-клеток.

[0006] Дополнительно к ингибирующему сигналу, поступающему в предварительно активированные LAG-3+ клетки, стимулированные связыванием молекул МНС класса II с LAG-3, также имеются сообщения о том, что LAG-3 на поверхности Т-регуляторных (Treg) клеток также подавляет активность дендритных клеток (DC) посредством связывания с молекулами МНС класса II (Huang, et al., *Immunity* 2004; 21:503-513; Liang, et al., *J Immunol* 2008; 180:5916-5926). Такая обратная передача сигналов имеет потенциал для дальнейшего подавления иммунного ответа путем подавления активности DC и, следовательно, подавления активации наивных Т-клеток и других LAG-3-негативных иммунных клеток, чья активация и/или активность зависят от DC.

[0007] LAG-3 также экспрессируется на поверхности естественных клеток-киллеров (Baixeras, et al., *J. Exp. Med* 1992; 176:327-337), В-клеток (Kisielow, et al., *Eur. J. Immunol.* 2005; 35:2081-2088) и плазмцитоидных дендритных клеток (Workman et al., *J. Immunol* 2009; 182:1885-1891). По сравнению с ингибирующей активностью в Т-клетках, его функция в других иммунных клетках недостаточно изучена. В дополнение к связыванию с молекулами МНС класса II, LAG-3 также связывается с LSECtin (Xu, et al., *Cancer Res* 2014; 74:3418-3428), лектином семейства молекул межклеточной адгезии дендритных клеток 3-захватывающего неинтегрин (DC-SIGN) на поверхности дендритных клеток, и предполагается, что связывание негативно регулирует пролиферацию Т-клеток. Терапевтическое моноклональное антитело (mAb), которое блокирует эти функции LAG-3, может обеспечить дополнительные терапевтические преимущества.

[0008] Для связывания молекул МНС класса II с Т-клеточным рецептором (TCR) и последующей активации Т-клеток требуется антиген. Следовательно, LAG-3 специфически ингибирует антиген-активированные Т-клетки, что является уникальным среди других механизмов ингибирования контрольных точек. В совокупности ось LAG-3/МНС класса II играет важную роль в преодолении врожденного и адаптивного иммунитета. Терапевтическое моноклональное антитело, которое блокирует связывание LAG-3/МНС класса II, потенциально может самостоятельно активировать иммунный ответ на рак, вводимое в качестве монотерапии или в комбинации с другими иммуноонкологическими терапевтическими средствами, такими как анти-PD1, анти-PD-L1, анти-CTLA-4, анти-TIM-3 и анти-CD47 антитела.

[0009] LAG-3 ограничивает пролиферацию и функцию Treg и может способствовать недостаточности Treg при аутоиммунных заболеваниях, таких как диабет 1 типа (Zhang et al., Sci Immunol. 2017; 31:2(9)). Анти-LAG-3 mAb, которое улучшает активность Treg, обладает терапевтическим потенциалом для лечения диабета 1 типа.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] Согласно одному общему аспекту, изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с LAG-3.

[0011] Предлагаются выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- a. SEQ ID NO: 35, 36, 37, 86, 87 и 88, соответственно;
- b. SEQ ID NO: 38, 39, 40, 89, 90 и 91, соответственно;
- c. SEQ ID NO: 41, 42, 137, 138, 93 и 94, соответственно;
- d. SEQ ID NO: 139, 140, 141, 142, 99 и 143, соответственно;
- e. SEQ ID NO: 144, 145, 146, 147, 148 и 149, соответственно;
- f. SEQ ID NO: 65, 66, 67, 116, 117 и 118, соответственно;
- g. SEQ ID NO: 68, 69, 70, 119, 120 и 121, соответственно;
- h. SEQ ID NO: 71, 72, 73, 122, 123 и 124, соответственно;
- i. SEQ ID NO: 74, 75, 76, 125, 126 и 127, соответственно;
- j. SEQ ID NO: 77, 78, 79, 128, 129 и 130, соответственно; или
- k. SEQ ID NO: 80, 150, 151, 131, 132 и 133, соответственно;

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с LAG-3, предпочтительно человеческим LAG-3.

[0012] SEQ ID NO: 137 представлена аминокислотной последовательностью ARGGYX₁DYVWFPY, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Y и F.

[0013] SEQ ID NO: 138 представлена аминокислотной последовательностью QSIX₁YSNGYTY, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из L и V.

[0014] SEQ ID NO: 139 представлена аминокислотной последовательностью GYTX₁X₂X₃YY, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F и L; X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из T и S; X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из G и N.

[0015] SEQ ID NO: 140 представлена аминокислотной последовательностью INPYNGDTX₁, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из T и I.

[0016] SEQ ID NO: 141 представлена аминокислотной последовательностью $X_1RDDGYX_2VX_3X_4FDX_5$, где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из V и A; X_2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из H и Y; X_3 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из R и Y; X_4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F и Y; и X_5 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из V, Y и C.

[0017] SEQ ID NO: 142 представлена аминокислотной последовательностью $QDIX_1X_2X_3$, где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из S и G; X_2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D и G; X_3 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Y, S и R.

[0018] SEQ ID NO: 143 представлена аминокислотной последовательностью $LX_1X_2X_3SPPT$, где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Y, C и N; X_2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из V и A; X_3 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из S и N.

[0019] SEQ ID NO: 144 представлена аминокислотной последовательностью $GYSFX_1DYN$, где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из S и T.

[0020] SEQ ID NO: 145 представлена аминокислотной последовательностью $IX_1LDX_2X_3X_4T$, где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из N и T; X_2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из S и Y; X_3 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A и G; и X_4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A и T.

[0021] SEQ ID NO: 146 представлена аминокислотной последовательностью AX_1YDY , где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из S и C.

[0022] SEQ ID NO: 147 представлена аминокислотной последовательностью $QDISX_1Y$, где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из H и N.

[0023] SEQ ID NO: 148 представлена аминокислотной последовательностью X_1TS , где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E и A.

[0024] SEQ ID NO: 149 представлена аминокислотной последовательностью $LQYAX_1YPLT$, где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из T и S.

[0025] SEQ ID NO: 150 представлена аминокислотной последовательностью $IYPGRGX_1P$, где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D и N.

[0026] SEQ ID NO: 151 представлена аминокислотной последовательностью

EIYYGN_YX₁DY, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I и L.

[0027] В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 или 33, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 или 34.

[0028] В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2;

(b) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4;

(c) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6;

(d) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8;

(e) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;

(f) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12;

(g) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;

(h) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16;

(i) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18;

(j) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи, имеющую

полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20;

(k) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22;

(l) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 24;

(m) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 25, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26;

(n) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28;

(o) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 30;

(p) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 32; или

(q) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 33, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34.

[0029] Также предоставляются выделенные моноклональные анти-LAG-3 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 192. Также предоставляются выделенные моноклональные анти-LAG-3 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193. Также предоставляются выделенные моноклональные анти-LAG-3 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158. Также предоставляются выделенные моноклональные анти-LAG-3 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180. Также предоставляются выделенные моноклональные анти-LAG-3 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194. Выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут, например, ингибировать активность LAG-3.

[0030] В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно блокировать связывание LAG-3 с молекулами МНС класса II.

[0031] В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно блокировать связывание LAG-3 с LSECtin.

[0032] В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

[0033] В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 195, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 208;

b. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 196, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 206;

c. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 197, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 205;

d. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 197, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 206;

e. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 197, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 207;

f. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 198, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 205;

g. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 199, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 209;

h. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 209;

i. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 201, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 209;

j. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 202, и вариабельную область легкой цепи, имеющую

полипептидную последовательность SEQ ID NO: 209;

k. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 203, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 209;

l. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 204, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 209;

m. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 199, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 210;

n. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 210;

o. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 201, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 210;

p. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 202, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 210;

q. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 203, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 210; или

r. варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 204, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 210.

[0034] Также предлагаются выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, раскрытые в настоящем описании.

[0035] Также предлагаются векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

[0036] Также предлагаются клетки-хозяева, содержащие векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

[0037] В некоторых вариантах осуществления предлагается фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

[0038] Также предлагаются способы блокирования связывания LAG-3 с молекулами МНС класса II у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение

субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0039] Также предлагаются способы блокирования связывания LAG-3 с LSECtin у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0040] Также предлагаются способы лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению. Рак может представлять собой любой вид гемобластоза или солидного рака, например, он может быть выбран, без ограничения, из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточного рака, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического лимфобластного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других видов гемобластоза.

[0041] Также предлагаются способы лечения инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0042] Также предлагаются способы лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0043] Также предлагаются способы лечения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0044] Также предлагаются способы лечения диабета типа I у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению.

[0045] Также предлагаются способы получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающие культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продуцирования моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

[0046] Также предлагаются способы получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающие объединение моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

[0047] Также предлагаются способы определения уровня LAG-3 у субъекта. Способы включают (a) получение образца от субъекта; (b) приведение образца в контакт с

антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (с) определение уровня LAG-3 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец ткани. Образец ткани может представлять собой, например, образец раковой ткани. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец крови.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0048] Приведенная выше сущность изобретения, а также приведенное ниже подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки будет лучше понято при изучении со ссылкой на прилагаемые чертежи. Однако следует понимать, что применение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

[0049] На фиг. 1A-1B показано определенное с помощью анализа FACS связывание очищенных мышинных анти-LAG-3 mAb с клетками CHO-S, стабильно трансфицированными полноразмерным человеческим LAG-3.

[0050] На фиг.2 показано определенное с помощью анализа FACS связывание очищенных мышинных анти-LAG-3 mAb (BG27, BG29 и BG33) с клетками CHO-S, стабильно трансфицированными полноразмерным человеческим LAG-3 (B7 использовали в качестве контроля).

[0051] На фиг. 3A-3B показано определенное с помощью анализа FACS связывание химерных анти-LAG-3 mAb (области VH и VL мышинных mAb, слитые с человеческими константными областями тяжелой цепи и легкой каппа-цепи, соответственно) с клетками CHO-S, стабильно трансфицированными полноразмерным человеческим LAG-3. В том же эксперименте тестировали mAb и контроли, которые показаны для ясности на двух отдельных фигурах (фиг.3A и 3B). B1C, химерная версия мышинового mAb B1; B2C, химерная версия мышинового mAb B2; B3C, химерная версия мышинового mAb B3; B4C, химерная версия мышинового mAb B4; B5C, химерная версия мышинового mAb B5; B7C, химерная версия мышинового mAb B7; B9C, химерная версия мышинового mAb B9; B10C, химерная версия мышинового mAb B10; B11C, химерная версия мышинового mAb B11. Neg, не обработанные первичные mAb, PI (йодид пропидия) или PE-конъюгированный анти-человеческий IgG; PI, обработанные PI, а не первичные mAb, или PE-конъюгированный анти-человеческий IgG; группы «анти-hu» и «анти-mu» не обрабатывали первичными антителами, но обрабатывали PE-конъюгированными вторичными Ab к человеческому IgG и мышинному IgG, соответственно.

[0052] На фиг.4A-4D показано ингибирование связывания человеческого LAG-3 с молекулами МНС класса II путем выбора анти-LAG-3 mAb. Анализ связывания *in vitro* выполняли с использованием рекомбинантного белка LAG-3(ECD)-mFc и клеток Дауди (Daudi), которые экспрессируют молекулы МНС класса II человека. В отдельном эксперименте LAG-3 не связывался с другой клеточной линией, которая не экспрессирует молекулы МНС класса II. Связывание LAG-3(ECD)-mFc с клетками Дауди в присутствии анти-LAG-3 mAb или контрольного mAb анализировали с помощью FACS. На фиг.4A

показан график ингибирования связывания человеческого LAG-3 с клетками Дауди химерными анти-LAG-3 антителами B2C, B7C и B10C. На фиг.4B показан график ингибирования связывания человеческого LAG-3 с клетками Дауди химерными анти-LAG-3 антителами B1C, B3C, B4C, B5C, B9C и B11C. На фиг.4C показан график ингибирования связывания человеческого LAG-3 с клетками Дауди мышинными анти-LAG-3 антителами B6, B12 и B15. На фиг.4D показан график ингибирования связывания человеческого LAG-3 с клетками Дауди, обусловленного анти-LAG-3 mAb BG29 (химерным антителом с тяжелой цепью и легкой каппа-цепью человеческого IgG4).

[0053] На фиг. 5A-5D показано влияние конкурентных пептидов на связывание LAG-3 с анти-LAG-3 mAb. На фиг.5A показано влияние конкурентных пептидов (см. таблицу 6) на связывание человеческого LAG-3 с анти-LAG-3 mAb B5 (химерное антитело с тяжелой цепью и легкой каппа-цепью человеческого IgG4; B5/IgG4), измеренное с помощью ELISA. B5/IgG4 предварительно инкубировали с конкурентным пептидом в течение 30 минут. Затем добавляли слитый с мышинным Fc (hLAG3-mFc) внеклеточный домен (ECD) человеческого LAG-3 (конечная концентрация пептида была в 600 раз выше концентрации hLAG3-mFc), и смесь инкубировали в течение 60 минут перед добавлением в планшет для ELISA, покрытый античеловеческим IgG. Инкубацию проводили при 4°C в течение ночи. После промывки детектировали hLAG3-mFc, связанный с B5/IgG4, иммобилизованным на планшете для ELISA, путем добавления анти-мышинного IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP), и инкубировали в течение 60 минут. Затем, после промывки, выполняли окраску планшета ELISA с использованием раствора для одноэтапного детектирования и измеряли поглощение при 450 нм. На фиг. 5B показан график зависимости доза-ответ для пептида B5/IgG4 в тех же условиях, что на фиг. 5A. На фиг. 5C показано влияние конкурентных пептидов на связывание человеческого LAG-3 с B6 (химерное антитело с тяжелой цепью и легкой каппа-цепью человеческого IgG4; B6/IgG4) в условиях, описанных на фиг. 5A. На фиг. 5D показан график зависимости доза-ответ для пептида B6/IgG4 в тех же условиях, что на фиг. 5A.

[0054] На фиг. 6 показано влияние конкурентных пептидов на связывание человеческого LAG-3 с анти-LAG-3 mAb B7 (химерное антитело с тяжелой цепью и легкой каппа-цепью человеческого IgG4; B7/IgG4), измеренное методом ELISA, как описано для фиг. 5A. Условия анализа такие же, как на фиг.5A, за исключением того, что заключительную инкубацию mAb, конкурентного пептида и hLAG3-mFc на планшете для ELISA проводили при комнатной температуре в течение 60 минут вместо инкубации при 4°C в течение ночи.

[0055] На фиг. 7 показано влияние конкурентных пептидов на связывание человеческого LAG-3 с анти-LAG-3 mAb B12 (химерное антитело с тяжелой цепью и легкой каппа-цепью человеческого IgG1), измеренное методом ELISA, как описано для фиг. 5A.

[0056] На фиг. 8 показано влияние конкурентных пептидов на связывание человеческого LAG-3 с анти-LAG-3 mAb BG29 (химерное антитело с тяжелой цепью и

легкой каппа-цепью человеческого IgG4), измеренное методом ELISA, как описано на фиг. 5А, за исключением того, что конечная концентрация пептида при инкубации была в 200 раз выше концентрации hLAG3-mFc.

[0057] На фиг. 9А-9В показано влияние конкурентных пептидов на связывание LAG-3 с анти-LAG-3 mAb. На фиг. 9А показано влияние конкурентных пептидов на связывание человеческого LAG-3 с анти-LAG-3 mAb В3 (химерное антитело с тяжелой цепью и легкой каппа-цепью человеческого IgG1), измеренное методом ELISA, как описано для фиг. 5А, за исключением того, что конечные концентрации пептидов являются такими, как показано на графике. На фиг. 9В показано влияние конкурентных пептидов на связывание человеческого LAG-3 с анти-LAG-3 mAb В4 (химерное антитело с тяжелой цепью и легкой каппа-цепью человеческого IgG1) в условиях, как на фиг. 9А.

[0058] На фиг. 10А-10С показано ингибирование связывания LAG-3 с молекулами МНС класса II на клетках, обусловленное анти-LAG3 mAb. На фиг. 10А показана кривая IC₅₀ для В5 (H1L4) при ингибировании связывания LAG-3 с молекулами МНС класса II на клетках Дауди. На фиг. 10В показана кривая IC₅₀ для В7 (H1L5) при ингибировании связывания LAG-3 с молекулами МНС класса II на клетках Дауди. На фиг. 10С показана кривая IC₅₀ для В7 (H1L8) при ингибировании связывания LAG-3 с молекулами МНС класса II на клетках Дауди.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0059] В разделе «Уровень техники» и в описании приведены ссылки и описаны различные публикации, статьи и патенты; каждый из этих документов включен в настоящее описание во всей своей полноте посредством ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей или т.п., включено в настоящее описание для раскрытия контекста настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что каждый из обсуждаемых вопросов являются частью предшествующего уровня техники, относящегося к любому раскрытому или заявленному изобретению.

[0060] Если не указано иное, все технические и научные термины, которые используются в настоящем описании, имеют те же самые значения, как их обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В противном случае определенные термины, используемые в настоящей заявке, имеют значения, указанные в описании.

[0061] Следует отметить, что используемые в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если из контекста в явном виде не следует иное.

[0062] Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящей заявке, во всех случаях следует рассматривать как модифицированные термином «примерно». Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 до 1,1 мг/мл. Аналогично, диапазон концентраций от 1% до 10% (мас./об.) включает от 0,9% (мас./об.) до 11% (мас./об.). В контексте настоящего описания,

использование числового диапазона в явном виде включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в этом диапазоне, включая целые числа и дробные значения в таких диапазонах, если из контекста в явном виде не следует иное.

[0063] Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий серии элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу серии. Специалистам в данной области будет понятно, или они смогут определить путем проведения обычных общепринятых экспериментов множество вариантов осуществления изобретения, эквивалентных раскрытым в настоящем описании. Такие эквиваленты входят в объем настоящего изобретения.

[0064] Используемые в настоящем описании термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «имеет в составе» или «имеющий в составе» или любой другой их вариант, означают включение указанного целого числа или группы целых чисел, а не исключение какого-либо другого целого числа или группы целых чисел, и их следует понимать как неисключающие или открытые. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которое содержит список элементов, не обязательно ограничено только этими элементами, но могут включать другие элементы, не перечисленные в явном виде или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если в явном виде не указано иное, союз «или» относится к включающему «или», а не исключающему «или». Например, условие А или В удовлетворяется любым из следующих условий: А является истинным (или присутствует), а В является ложным (или не присутствует), А является ложным (или не присутствует), а В является истинным (или присутствует), и оба А и В верны (или присутствуют).

[0065] Используемый в настоящем описании термин «и/или» между несколькими перечисленными элементами следует понимать как охватывающий как отдельные, так и объединенные варианты. Например, когда два элемента соединены союзом «и/или», первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности применения первого и второго элементов вместе. Все эти варианты входят в объем указанного значения и, следовательно, удовлетворяют требованию термина «и/или», используемого в настоящем описании. Понятно, что возможность одновременного применения более чем одного из указанных вариантов соответствует указанному значению и, следовательно, удовлетворяет требованию термина «и/или».

[0066] В контексте настоящей заявки, термин «состоит из» или его варианты, такие как «состоят из» или «состоящий из», используемые в описании и формуле изобретения, указывает на включение любого приведенного целого числа или группы целых чисел, но при этом никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не может быть добавлена в указанный метод, структуру или композицию.

[0067] В контексте настоящей заявки, термин «по существу состоит из» или его

варианты, такие как «по существу состоят из» или «по существу состоящий из», используемый в описании и формуле изобретения, указывает на включение любого приведенного целого числа или группы целых чисел, и необязательное включение любого приведенного целого числа или группы целых чисел, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного метода, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

[0068] В контексте настоящего описания, термин «субъект» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека. Используемый в настоящем описании термин «млекопитающее» включает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, без ограничения, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т.д., более предпочтительно человека.

[0069] Слова «вправо», «влево», «ниже» и «выше» обозначают направления на чертежах, на которые дается ссылка.

[0070] Следует также понимать, что термины «примерно», «приблизительно», «в целом», «по существу» и аналогичные термины, используемые в настоящем описании при ссылке на размер или характеристику компонента предпочтительного варианта изобретения, указывают на то, что описанный размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительных отклонений от указанных значений, которые являются функционально одинаковыми или аналогичными, что является понятным специалисту в данной области техники. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовой параметр, включают разброс значений, который с точки зрения математических и производственных принципов, принятых в данной области техники (например, округление, измерение или другие систематические ошибки, производственные допуски и т.д.), не приведет к изменению наименее значащей цифры.

[0071] Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, анти-LAG-3 антител, полипептидов LAG-3 и полинуклеотидов LAG-3, которые их кодируют), относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для определения максимального соответствия, измеренного с помощью одного из приведенных ниже алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального контроля.

[0072] Для сравнения последовательностей одна последовательность обычно используется как эталонная последовательность, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, при необходимости, обозначают координаты подпоследовательности, и назначают параметры программы для алгоритма сравнения последовательностей. Затем с помощью алгоритма сравнения

последовательностей вычисляют процент идентичности последовательности для тестируемых последовательностей относительно эталонной последовательности на основе параметров программы.

[0073] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть выполнено, например, при помощи алгоритма локальной гомологии Смита-Уотермана (Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)), алгоритма парного выравнивания Нидлмана-Вунша (Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)), методом поиска подобия Липмана-Пирсона, (Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988)), путем реализации этих алгоритмов в виде компьютерных программ (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете Wisconsin Genetics Software, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или путем визуальной оценки (см., например, *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

[0074] Примерами алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны у Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для анализа BLAST доступно через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высоким количеством очков (HSP) путем идентификации коротких слов длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо соответствуют, либо удовлетворяют некоторому пороговому положительному количеству очков T при выравнивании со словом той же длины в последовательности из базы данных. T называют порогом количества очков для слов в определенной окрестности (Altschul et al., выше). Указанные исходные совпадения соседних слов в окрестности действуют как начало для инициации поиска для нахождения содержащих их HSP. Поиск совпадения слов продолжают в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока можно увеличивать суммарное количество очков выравнивания.

[0075] Суммарное количество очков для нуклеотидных последовательностей вычисляют с помощью параметров M (очки вознаграждения за пару совпадающих остатков; всегда > 0) и N (штрафные очки за несовпадающие остатки; всегда < 0). Для аминокислотных последовательностей для подсчета суммарного количества очков используется матрица подсчета очков. Продолжение поиска совпадения слов в каждом направлении прекращают, когда: суммарное количество очков выравнивания уменьшается на количество X по сравнению с его достигнутым максимальным значением; суммарное количество очков опускается до нуля или ниже в результате суммирования одного или нескольких отрицательно оцениваемых выравниваний остатков; или достигается конец какой-либо последовательности. Параметры W , T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLAST (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию используется длина слов (W), равная 11, ожидание

(E) - 10, M=5, N = -4, и сравнение обоих нитей. Для аминокислотных последовательностей в программе BLAST по умолчанию используется длина слов (W), равная 3, ожидание (E) - 10 и матрица подсчета очков BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

[0076] Дополнительно к вычислению процента идентичности последовательности алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Одной из мер сходства, предусмотренных алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность (P(N)), которая является показателем вероятности, с которой случайно может иметь место совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями. Например, последовательность нуклеиновой кислоты считается сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой последовательности нуклеиновой кислоты со второй эталонной нуклеиновой кислотой составляет меньше примерно 0,1, более предпочтительно, меньше примерно 0,01, и наиболее предпочтительно, меньше примерно 0,001.

[0077] Дополнительным указанием на то, что две последовательности нуклеиновых кислот или полипептидов являются по существу идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, является иммунологически перекрестно реактивным с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно является по существу идентичным второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим указанием на то, что две последовательности нуклеиновых кислот являются по существу идентичными, является то, что две молекулы гибридизуются друг с другом в жестких условиях.

[0078] Используемые в настоящем описании термины «ингибировать», «ингибирующий» и «ингибирование» означают уменьшение активности, ответа, состояния, заболевания или другого биологического параметра. Эти термины могут включать, без ограничения, полное подавление активности, реакции, состояния или заболевания. Они также могут включать, например, снижение активности, ответа, состояния или заболевания на 10% по сравнению с нативным или контрольным уровнем. Таким образом, снижение может составлять 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%, или снижение может быть любым промежуточным значением между указанными относительно нативного или контрольного уровня. В качестве неограничивающего примера антитело по изобретению может ингибировать активность белка LAG-3. Активность белка LAG-3 может быть снижена или уменьшена относительно нативной активности нативного белка LAG-3. В качестве другого неограничивающего примера антитело по изобретению может ингибировать связывание белка LAG-3 с молекулой МНС класса II и/или LSECtin. Связывание LAG-3 с молекулой МНС класса II и/или LSECtin может быть уменьшено или полностью подавлено по сравнению со связыванием

нативного LAG-3 с молекулой МНС класса II и/или LSECtin.

[0079] Антитела

[0080] Изобретение в общем относится к выделенным анти-LAG-3 антителам, нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим эти антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и композициям, содержащим указанные антитела. Также предлагаются способы получения антител, и способы применения этих антител для лечения заболеваний, включая рак, воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, диабет типа I и/или инфекционные заболевания. Антитела по изобретению имеют одно или более требуемых функциональных свойств, включая, без ограничения, высокоаффинное связывание с LAG-3, высокую специфичность к LAG-3, способность блокировать связывание LAG-3 с молекулами МНС класса II и/или LSECtin, способность стимулировать выработку цитокинов, таких как, без ограничения, IL-2 и IFN- γ , и способность ингибировать рост опухоли на животных моделях и у субъектов при введении отдельно или в комбинации с другими противораковыми терапевтическими агентами.

[0081] В общем аспекте настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с LAG-3.

[0082] В контексте настоящего описания термин «антитело» используется в широком смысле и включает молекулы иммуноглобулина или антитела, включая человеческие, гуманизированные, составные и химерные антитела и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. Обычно антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые проявляют специфичность связывания к конкретному антигену. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины могут быть отнесены к пяти основным классам (т.е., IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG, дополнительно подразделяют на изотипы IGA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела по изобретению могут быть любым антителом из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Предпочтительно антитело по изобретению представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител видов позвоночных можно отнести к одному из двух четко различимых типов, а именно каппа и лямбда, на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов. Соответственно, антитела по изобретению могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитела по изобретению включают константные области тяжелой и/или легкой цепи, полученные от крысы или человеческих антител. В дополнение к тяжелым и легким константным доменам, антитела содержат антигенсвязывающую область, которая состоит из вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т.е. определяющие комплементарность области 1-3; CDR1, CDR2 и CDR3). Домены вариабельной области легкой цепи альтернативно

обозначают как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а домены вариабельной области тяжелой цепи альтернативно обозначают как HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

[0083] В контексте настоящего описания термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих разными антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с LAG-3, по существу не содержит антител, которые не связываются с LAG-3). Кроме того, выделенное антитело по существу не содержит других клеточных материалов и/или химических веществ.

[0084] В контексте настоящего описания термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены методом гибридомы, с помощью фагового дисплея, методом клонирования гена одного лимфоцита или методами рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного нечеловеческого животного, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющую геном, содержащий трансген человеческой тяжелой цепи и трансген легкой цепи.

[0085] В контексте настоящего описания термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fv-фрагмент, стабилизированный дисульфидными связями (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями ди-антитело (ds-антитело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), scFv-димер (двухвалентное диатело), полиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или более CDR, однодоменное антитело верблюда, нанотело, доменное антитело, бивалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент способен связываться с тем же антигеном, с которым связывается родительское антитело или фрагмент родительского антитела. Согласно конкретным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, константную область легкой цепи и Fd-сегмент тяжелой цепи. Согласно другим конкретным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

[0086] В контексте настоящего описания термин «одноцепочечное антитело» относится к обычному в данной области одноцепочечному антителу, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, соединенную коротким пептидом длиной от примерно 15 до примерно 20 аминокислот. Используемый в настоящем описании термин «однодоменное антитело» относится к обычному в данной области однодоменному антителу, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи

и константную область тяжелой цепи или которое содержит только переменную область тяжелой цепи.

[0087] В контексте настоящего описания термин «человеческое антитело» относится к антителу, продуцируемому человеческим организмом, или антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеческим организмом, полученному с помощью любого метода, известного в данной области. Это определение человеческого антитела включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид тяжелой и/или легкой цепи человека.

[0088] В контексте настоящего описания термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, не являющемуся человеческим, которое модифицировано для увеличения гомологии последовательности с последовательностью человеческого антитела с сохранением антигенсвязывающих свойств антитела, но с уменьшенной антигенностью в организме человека.

[0089] В контексте настоящего описания термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина получена из двух или более видов. Переменные области как легкой, так и тяжелой цепей часто соответствуют переменным областям антитела, полученного из одного вида млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и т.д.), имеющим требуемые специфичность, сродство и характеристики, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела, полученного от другого вида млекопитающего (например, человека), чтобы избежать инициации иммунного ответа у этого вида.

[0090] В контексте настоящего описания термин «полиспецифическое антитело» относится к антителу, которое содержит множество последовательностей переменного домена иммуноглобулина, причем первая последовательность переменного домена иммуноглобулина из этого множества обладает специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу, а вторая последовательность переменного домена иммуноглобулина из этого множества обладает специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы не перекрываются или по существу не перекрываются. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, например на разных белках (или разных субъединицах мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления полиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый переменный домен иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления полиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, молекулу триспецифического антитела или

молекулу тетраспецифического антитела.

[0091] В контексте настоящего описания термин «биспецифическое антитело» относится к полиспецифическому антителу, которое связывается с не более чем двумя эпитопами или двумя антигенами. Биспецифическое антитело характеризуется первой последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу, и второй последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, например на разных белках (или разных субъединицах мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления биспецифическое антитело содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу, и последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые имеют специфичность связывания по отношению ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления биспецифическое антитело содержит половинное антитело или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу, и половинное антитело или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления биспецифическое антитело содержит scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу, и scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления первый эпитоп расположен на LAG-3, а второй эпитоп расположен на PD-1, PD-L1, TIM-3, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, DLL-3, CD73, апелине, CD3, CD47, TIP-1, CLDN18.2, FOLR1 и/или других ассоциированных с опухолью иммуносупрессорах или поверхностных антигенах.

[0092] В контексте настоящего описания термин «LAG-3» относится к гену 3 активации лимфоцитов (также известному как CD223), который принадлежит к суперсемейству Ig и содержит 4 внеклеточных Ig-подобных домена. LAG-3 экспрессируется на поверхности активированных Т-клеток (Triebel, et al., J. Exp. Med. 1990; 171:1393-1405) и проявляет уникальную ингибирующую активность на Т-клетках. LAG-3 способен связываться с молекулами МНС класса II. Ко-рецептор как LAG-3, так и CD4 Т-клеток связывается с молекулами МНС класса II на одном и том же участке, но связывание с LAG-3 происходит с гораздо более высоким сродством, чем с CD4 (Huard et al., Immunogenetics 1994; 39:213-217). Следовательно, экспрессия LAG-3 на Т-клетках предотвращает связывание CD4 с молекулами МНС класса II на антигенпрезентирующих

клетках (APC), ингибирует костимулирующую активность молекул МНС класса II и негативно модулирует поддержание Т клеточной активности. При блокировании связывания молекул МНС класса II с LAG-3 специфическими антителами большее количество молекул МНС класса II становится доступным для связывания CD4, что приводит к активации Т-клеток (Sierro et al., *Expert Opin Ther Targets*. 2011; 15(1):91-101). LAG-3 на поверхности Т-регуляторных (Treg) клеток также подавляет активность дендритных клеток (DC) путем связывания с молекулами МНС класса II (Huang, et al., *Immunity* 2004; 21:503-513; Liang, et al. *J Immunol* 2008; 180:5916-5926). Такая обратная передача сигналов имеет потенциал для дальнейшего подавления иммунного ответа путем подавления активности DC и, следовательно, подавления активации наивных Т-клеток и других LAG-3 негативных иммунных клеток, активация и/или активность которых зависят от DC. LAG-3 также экспрессируется на поверхности естественных клеток-киллеров (Baixeras, et al., *J. Exp. Med* 1992; 176:327-337), В-клеток (Kisielow, et al., *Eur. J. Immunol.* 2005; 35:2081-2088) и плазматоидных дендритных клеток (Workman et al., *J. Immunol.* 2009; 182:1885-1891). Термин «человеческий LAG-3» относится к LAG-3, полученному от человека. Примерная аминокислотная последовательность человеческого LAG-3 представлена в GenBank под номером NP_002277.4 (SEQ ID NO: 152).

[0093] В контексте настоящего описания, антитело, которое «специфически связывается с LAG-3», относится к антителу, которое связывается с LAG-3, предпочтительно человеческим LAG-3, с KD 1×10^{-7} М или менее, предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 5×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 5×10^{-10} М или менее или 1×10^{-10} М или менее. Термин «KD» относится к константе диссоциации, которую получают из отношения Kd к Ka (т.е., Kd/Ka) и выражают в виде молярной концентрации (М). Значения KD для антител могут быть определены с помощью способов, известных в данной области техники с учетом настоящего раскрытия. Например, KD антитела можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с помощью биосенсорной системы, такой как система Biacore®, или с помощью технологии интерферометрии биослоя, например с помощью системы Octet RED96.

[0094] Чем меньше значение KD антитела, тем выше сродство связывания антитела с целевым антигеном.

[0095] Согласно конкретному аспекту изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- a. SEQ ID NO:35, 36, 37, 86, 87 и 88, соответственно;
- b. SEQ ID NO:38, 39, 40, 89, 90 и 91, соответственно;
- c. SEQ ID NO:41, 42, 137, 138, 93 и 94, соответственно;
- d. SEQ ID NO:139, 140, 141, 142, 99 и 143, соответственно;

- e. SEQ ID NO:144, 145, 146, 147, 148 и 149, соответственно;
- f. SEQ ID NO:65, 66, 67, 116, 117 и 118, соответственно;
- g. SEQ ID NO:68, 69, 70, 119, 120 и 121, соответственно;
- h. SEQ ID NO:71, 72, 73, 122, 123 и 124, соответственно;
- i. SEQ ID NO:74, 75, 76, 125, 126 и 127, соответственно;
- j. SEQ ID NO:77, 78, 79, 128, 129 и 130, соответственно; или
- k. SEQ ID NO:80, 150, 151, 131, 132 и 133, соответственно;

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с LAG-3, предпочтительно человеческим LAG-3.

[0096] SEQ ID NO: 137 представлена аминокислотной последовательностью ARGGYX₁DYVWFPY, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Y и F.

[0097] SEQ ID NO: 138 представлена аминокислотной последовательностью QSIX₁YSNGYTY, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из L и V.

[0098] SEQ ID NO: 139 представлена аминокислотной последовательностью GYTX₁X₂X₃YY, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F и L; X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из T и S; и X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из G и N.

[0099] SEQ ID NO: 140 представлена аминокислотной последовательностью INPYNGDTX₁, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из T и I.

[00100] SEQ ID NO: 141 представлена аминокислотной последовательностью X₁RDDGYX₂VX₃X₄FDX₅, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из V и A; X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из H и Y; X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из R и Y; X₄ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F и Y; и X₅ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из V, Y и C.

[00101] SEQ ID NO: 142 представлена аминокислотной последовательностью QDIX₁X₂X₃, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из S и G; X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D и G; и X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Y, S и R.

[00102] SEQ ID NO: 143 представлена аминокислотной последовательностью LX₁X₂X₃SPPT, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Y, C и N; X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из V и A; и X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из S и N.

[00103] SEQ ID NO: 144 представлена аминокислотной последовательностью

GYSFX₁DYN, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из S и T.

[00104] SEQ ID NO: 145 представлена аминокислотной последовательностью IX₁LDX₂X₃X₄T, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из N и T; X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из S и Y; X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A и G; и X₄ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A и T.

[00105] SEQ ID NO: 146 представлена аминокислотной последовательностью AX₁YDY, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из S и C.

[00106] SEQ ID NO: 147 представлена аминокислотной последовательностью QDISX₁Y, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из H и N.

[00107] SEQ ID NO: 148 представлена аминокислотной последовательностью X₁TS, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E и A.

[00108] SEQ ID NO: 149 представлена аминокислотной последовательностью LQYAX₁YPLT, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из T и S.

[00109] SEQ ID NO: 150 представлена аминокислотной последовательностью IYPGRGX₁P, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D и N.

[00110] SEQ ID NO: 151 представлена аминокислотной последовательностью EIYYGNYSX₁DY, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I и L.

[00111] Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную одной из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 или 33, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную одной из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 или 34. Согласно одному из предпочтительных вариантов осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13,

15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 или 33, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 или 34, соответственно.

[00112] Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, содержащему:

a. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:2;

b. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:4;

c. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:5, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:6;

d. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:8;

e. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:9, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:10;

f. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:12;

g. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:14;

h. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:16;

i. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:18;

j. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:19, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:20;

k. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую

полипептидную последовательность SEQ ID NO:22;

l. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:23, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:24;

m. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:25, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:26;

n. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:27, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:28;

o. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:29, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:30;

p. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:31, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:32; или

q. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:33, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:34.

[00113] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 35, 36, 37, 86, 87 и 88, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2.

[00114] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 38, 39, 40, 89, 90 и 91, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую

полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 4. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4.

[00115] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 41, 42, 43, 92, 93 и 94, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 6. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6.

[00116] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 44, 45, 46, 95, 96 и 97, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 8. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8.

[00117] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к

выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 47, 48, 49, 98, 99 и 100, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 10. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10.

[00118] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 50, 51, 52, 101, 102 и 103, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 12. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12.

[00119] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 53, 54, 55, 104, 105 и 106, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%,

предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 14. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14.

[00120] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 56, 57, 58, 107, 108 и 109, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 16. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16.

[00121] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 59, 60, 61, 110, 111 и 112, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 18. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18.

[00122] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту,

содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 62, 63, 64, 113, 114 и 115, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 20. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20.

[00123] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 65, 66, 67, 116, 117 и 118, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 22. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22.

[00124] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 68, 69, 70, 119, 120 и 121, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%,

предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 24. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 24.

[00125] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 71, 72, 73, 122, 123 и 124, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 25, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 26. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 25; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26.

[00126] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 74, 75, 76, 125, 126 и 127, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 27, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 28. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 27; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28.

[00127] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту,

содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 77, 78, 79, 128, 129 и 130, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 30. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 29; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 30.

[00128] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 80, 81, 82, 131, 132 и 133, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 31, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 32. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 32.

[00129] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющим полипептидные последовательности SEQ ID NO: 83, 84, 85, 134, 135 и 136, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 33, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%,

предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 34. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 33; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34.

[00130] Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному анти-LAG-3 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 192. Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному анти-LAG-3 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193. Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному анти-LAG-3 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158. Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному анти-LAG-3 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180. Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному анти-LAG-3 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194. Выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут, например, ингибировать активность LAG-3.

[00131] Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно блокировать связывание LAG-3 с молекулами MHC класса II.

[00132] Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно блокировать связывание LAG-3 с LSECtin.

[00133] Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

[00134] Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

[00135] Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному гуманизованному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:195, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:208;

b. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:196, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:206;

c. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:197, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:205;

d. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:197, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:206;

e. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:197, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:207;

f. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:198, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:205;

g. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:199, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:209;

h. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:200, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:209;

i. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:201, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:209;

j. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:202, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:209;

k. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:203, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:209;

l. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:204, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:209;

m. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:199, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:210;

n. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:200, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:210;

o. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:201, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:210;

p. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:202, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:210;

q. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:203, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:210; или

г. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:204, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:210.

[00136] В другом общем аспекте изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Специалистам в данной области будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, путем замены, делеции, вставки и т.д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области техники будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков.

[00137] В другом общем аспекте изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области с учетом настоящего изобретения, такой как плазмидный, космидный, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный вектор экспрессии, такой как плазида. Вектор может включать любой элемент для обеспечения обычной функции вектора экспрессии, например, промотор, элемент связывания рибосомы, терминатор, энхансер, селективный маркер и точку начала репликации. Промотор может быть конститутивным, индуцибельным или репрессируемым промотором. Ряд векторов экспрессии, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, известны в данной области и могут быть использованы согласно изобретению для продуцирования клеткой антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Для создания рекомбинантного

вектора экспрессии в соответствии с вариантами осуществления изобретения могут быть использованы традиционные методы клонирования или искусственного синтеза генов.

[00138] В другом общем аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Любая клетка-хозяин, известная специалистам в данной области, может быть использована для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению с учетом настоящего раскрытия. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки *E.coli* TG1 или BL21 (для экспрессии, например, антитела scFv или Fab), клетки CHO-DG44 или CHO-K1 или клетки HEK293 (для экспрессии, например, полноразмерного антитела IgG). Согласно конкретным вариантам осуществления рекомбинантный вектор экспрессии трансформируют в клетки-хозяева обычными способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, в которой он стабильно интегрируется в геном клетки-хозяина таким образом, чтобы обеспечивалась эффективная экспрессия рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

[00139] В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продуцирования моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать в соответствии с общепринятыми методами, известными в данной области техники и описанными в настоящей заявке.

[00140] **Фармацевтические композиции**

[00141] В другом общем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В контексте настоящего изобретения термин «фармацевтическая композиция» означает продукт, содержащий антитело по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Антитела по изобретению и композиции, содержащие их, также полезны при изготовлении лекарственного средства для терапевтических применений, упомянутых в настоящем описании.

[00142] В контексте настоящего описания термин «носитель» относится к любому формообразующему агенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, липидсодержащей везикуле, микросфере, липосомальной оболочке для инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для использования в фармацевтических составах. Понятно, что характеристики

носителя, формообразующего агента или разбавителя будут зависеть от пути введения, используемого для конкретного применения. Используемый в настоящем описании термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, который не влияет на эффективность композиции по изобретению или биологическую активность композиции по изобретению. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, с учетом настоящего изобретения, в изобретении может быть использован любой фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для использования в фармацевтической композиции антитела.

[00143] Состав фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известен в данной области, см. например, *The Science and Practice of Pharmacy* (например, 21-е издание (2005) и любые более поздние издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают: буферы, разбавители, растворители, агенты, регулирующие тоничность, консерванты, стабилизаторы и хелатообразующие агенты. При приготовлении состава фармацевтических композиций по изобретению могут быть использованы один или более фармацевтически приемлемых носителей.

[00144] В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой жидкую композицию. Предпочтительным примером жидкого состава является водный состав, т.е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может содержать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и т.п. Водный состав обычно содержит по меньшей мере 50% мас./мас. воды или по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или по меньшей мере 95% мас./мас. воды.

[00145] В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция может быть составлена в виде инъекционного раствора, который можно вводить, например, с помощью устройства для инъекции (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекция может быть, например, подкожной, внутримышечной, внутривенной, интравитреальной или внутривенной.

[00146] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой твердый состав, например лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно использовать как есть, или в которую врач или пациент перед использованием добавляет растворители и/или разбавители. Твердые лекарственные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки и/или таблетки с покрытием и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Фармацевтическая композиция также может быть, например, в форме саше, драже, порошков, гранул, пастилок или порошков, предназначенных для разбавления.

[00147] Лекарственные формы могут быть с немедленным высвобождением, и в этом случае они могут содержать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут иметь отсроченное высвобождение, замедленное высвобождение или модифицированное высвобождение, и в этом случае они могут содержать нерастворимые в воде полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в

желудочно-кишечном тракте или под кожей.

[00148] В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть доставлена интраназально, внутривенно или сублингвально.

[00149] Значение pH водной композиции может составлять от 3 до 10. В одном из вариантов осуществления изобретения pH композиции составляет от примерно 7,0 до примерно 9,5. В другом варианте осуществления изобретения pH композиции составляет от примерно 3,0 до примерно 7,0.

[00150] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит буфер. Неограничивающие примеры буферов включают: аргинин, аспарагиновую кислоту, бицин, цитрат, динатрия гидрофосфат, фумаровую кислоту, глицин, глицилглицин, гистидин, лизин, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, ацетат натрия, карбонат натрия, дигидрофосфат натрия, фосфат натрия, сукцинат, винную кислоту, трицин и трис(гидроксиметил)аминометан и их смеси. Буфер может присутствовать отдельно или в виде смеси в концентрации от примерно 0,01 до примерно 50 мг/мл, например от примерно 0,1 до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных буферов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00151] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит консервант. Неограничивающие примеры консервантов включают: бензетония хлорид, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил-4-гидроксibenзоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенезин, о-крезол, м-крезол, п-крезол, этил-4-гидроксibenзоат, имидомочевину, метил 4-гидроксibenзоат, фенол, 2-феноксietанол, 2-фенилэтанол, пропил 4-гидроксibenзоат, дегидроацетат натрия, тиомеросал и их смеси. Консервант может присутствовать отдельно или в виде смеси в концентрации от примерно 0,01 до примерно 50 мг/мл, например от примерно 0,1 до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных консервантов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00152] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит регулирующий тоничность агент. Неограничивающие примеры агента, регулирующего тоничность, включают соль (такую как хлорид натрия), аминокислоту (такую как глицин, гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновая кислота, триптофан и треонин), альдит (такой как глицерин 1,2-пропандиол, пропиленгликоль, 1,3-пропандиол и 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, ПЭГ400) и их смеси. Другой пример регулирующего тоничность агента включает сахар. Неограничивающими примерами сахаров могут быть моно-, ди- или полисахариды или водорастворимые глюканы, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, альфа- и бета-HPCD, растворимый крахмал, гидроксietилкрахмал и натрий карбоксиметилцеллюлозу. Другим примером регулирующего тоничность агента

является сахарный спирт, причем термин «сахарный спирт» определяется как C(4-8)углеводород, имеющий по меньшей мере одну группу -ОН. Неограничивающие примеры сахарных спиртов включают маннит, сорбит, инозит, галактит, дульцит, ксилит и арабит. Фармацевтические композиции, каждая из которых содержит регулирующий тоничность агент, указанный в этом параграфе, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения. Регулирующий тоничность агент может присутствовать отдельно или в смеси в концентрации от примерно 0,01 до примерно 50 мг/мл, например от примерно 0,1 до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных регулирующих тоничность агентов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00153] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит хелатообразующий агент. Неограничивающие примеры хелатообразующих агентов включают лимонную кислоту, аспарагиновую кислоту, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и их смеси. Хелатообразующий агент может присутствовать отдельно или в смеси в концентрации от примерно 0,01 до примерно 50 мг/мл, например от примерно 0,1 до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных хелатообразующих агентов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00154] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Неограничивающие примеры стабилизаторов включают один или более ингибиторов агрегации, один или более ингибиторов окисления, одно или более поверхностно-активных веществ и/или один или более ингибиторов протеаз.

[00155] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор, причем указанный стабилизатор представляет собой карбокси/гидроксицеллюлозу и ее производные (такие как НРС, НРС-SL, НРС-L и НРМС), циклодекстрины, 2-метилтиоэтанол, полиэтиленгликоль (такой как ПЭГ 3350), поливиниловый спирт (PVA), поливинилпирролидон, соли (такие как хлорид натрия), серосодержащие вещества, такие как монотиоглицерин, или тиогликолевую кислоту. Стабилизатор может присутствовать отдельно или в смеси в концентрации от примерно 0,01 до примерно 50 мг/мл, например от примерно 0,1 до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных стабилизаторов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00156] В других вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит одно или более поверхностно-активных веществ, предпочтительно поверхностно-активное вещество, по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество или два разных поверхностно-активных вещества. Термин «поверхностно-активное вещество» относится к любым молекулам или ионам, которые состоят из водорастворимой (гидрофильной) части и жирорастворимой (липофильной) части. Поверхностно-активное вещество может быть выбрано, например, из группы, состоящей

из анионных поверхностно-активных веществ, катионных поверхностно-активных веществ, неионогенных поверхностно-активных веществ и/или цвиттерионных поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может присутствовать отдельно или в смеси в концентрации от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных поверхностно-активных веществ, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00157] В дополнительном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит один или более ингибиторов протеаз, таких как, например, ЭДТА, и/или солянокислый бензамидин (HCl). Ингибитор протеаз может присутствовать отдельно или в смеси в концентрации от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических ингибиторов протеаз, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00158] В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающему объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

[00159] Способы применения

[00160] В другом общем аспекте изобретение относится к способу блокирования связывания LAG-3 с молекулами МНС класса II у субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с LAG-3, или фармацевтической композиции по изобретению.

[00161] В другом общем аспекте изобретение относится к способу блокирования связывания LAG-3 с LSECtin у субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с LAG-3, или фармацевтической композиции по изобретению.

[00162] Функциональную активность антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с LAG-3, можно охарактеризовать способами, известными в данной области техники и описанными в настоящей заявке. Способы определения характеристик антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с LAG-3, включают, без ограничения, анализы сродства и специфичности, включая анализ Biacore, ELISA и OctetRed; анализы связывания лигандов с рецепторами для детектирования с помощью FACS блокирования связывания LAG-3 с молекулами МНС класса II на клетках Дауди; анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR) для определения взаимодействия между LSECtin и LAG-3 (Xu, et al., Cancer Res 2014; 74:3418-3428) и эффекта блокирования анти-LAG-3 mAb; функциональную активность анти-LAG-3 mAb также можно оценить с помощью анализа реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR), в котором дендритные клетки и моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) от разных доноров смешивают в присутствии mAb и

измеряют стимуляцию секреции цитокинов. Согласно конкретным вариантам осуществления способы определения характеристик антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих LAG-3, включают описанные ниже методы.

[00163] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с LAG-3, или фармацевтической композиции по изобретению. Рак может быть выбран, без ограничения, например, из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточного рака, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического лимфобластного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других видов гемобластоза.

[00164] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с LAG-3, или фармацевтической композиции по изобретению.

[00165] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с LAG-3, или фармацевтической композиции по изобретению.

[00166] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с LAG-3, или фармацевтической композиции по изобретению.

[00167] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения диабета типа I у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с LAG-3, или фармацевтической композиции по изобретению.

[00168] Согласно вариантам осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество анти-LAG-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Используемый в настоящем описании термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает требуемый биологический или лекарственный ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть

определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели.

[00169] Используемое в настоящем описании терапевтически эффективное количество в отношении анти-LAG-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента означает количество анти-LAG-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое модулирует иммунный ответ у нуждающегося в этом субъекта. Также, используемое в настоящем описании терапевтически эффективное количество в отношении анти-LAG-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента означает количество анти-LAG-3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое приводит к лечению заболевания, расстройства или состояния; предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, расстройства или состояния; или уменьшает или полностью облегчает симптомы, связанные с заболеванием, расстройством или состоянием.

[00170] Согласно конкретным вариантам осуществления, заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, представляет собой рак, предпочтительно рак, выбранный из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточного рака, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического лимфобластного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других видов гемобластоза. Согласно другим конкретным вариантам осуществления заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, представляет собой инфекционное заболевание, воспалительное заболевание, иммунное заболевание, аутоиммунное заболевание и/или диабет типа I.

[00171] Согласно конкретным вариантам осуществления терапевтически эффективное количество относится к количеству терапевтического агента, которое является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) уменьшения или облегчения тяжести заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) сокращения длительности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iii) предотвращения прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) индуцирования регрессии заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (v) предотвращения развития или начала заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) предотвращения рецидива заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшения частоты госпитализации субъекта, страдающего от заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (viii) уменьшения

продолжительности госпитализации субъекта, страдающего от заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ix) увеличения выживаемости субъекта, страдающего от заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (xi) ингибирования или облегчения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома у субъекта; и/или (xii) усиления или улучшения профилактического или терапевтического эффекта(ов) другой терапии.

[00172] Терапевтически эффективное количество или доза может меняться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, способа введения, целевого сайта, физиологического состояния субъекта (включая, например, возраст, массу тела, состояние здоровья), от того, является ли субъект человеком или животным, других вводимых лекарственных средств, и типа лечения: является ли оно профилактическим или терапевтическим. Терапевтические дозы подбирают так, чтобы были достигнуты оптимальные уровни безопасности и эффективности.

[00173] Согласно конкретным вариантам осуществления, описанные в настоящей заявке композиции готовят в виде лекарственных форм, подходящих для предполагаемого пути введения субъекту. Например, описанные в настоящей заявке композиции могут быть приготовлены в виде лекарственной формы, подходящей для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

[00174] В контексте настоящего описания термины «лечить» и «лечение» обозначают улучшение или реверсию по меньшей мере одного измеримого физического параметра, связанного с раком, инфекционным заболеванием, расстройством или состоянием, иммунным заболеванием, расстройством или состоянием, аутоиммунным заболеванием, расстройством или состоянием, воспалительным заболеванием, расстройством или состоянием и/или диабетом типа I, связанным с ним расстройством или состоянием, которые не обязательно проявлены, но могут быть проявлены у субъекта. Термины «лечить» и «лечение» также могут относиться к регрессии, предотвращению прогрессированию или, по меньшей мере, замедлению прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления «лечить» и «лечение» относятся к облегчению, предотвращению развития или появления, или уменьшению продолжительности одного или более симптомов, связанных с заболеванием, расстройством или состоянием, таким как опухоль или более предпочтительно рак. В конкретном варианте осуществления «лечить» и «лечение» относятся к предотвращению рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления «лечить» и «лечение» относятся к увеличению выживаемости субъекта, страдающего от заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления «лечить» и «лечение» относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

[00175] Согласно конкретным вариантам осуществления, композицию,

используемую при лечении рака, инфекционного заболевания, расстройства или состояния, иммунного заболевания, расстройства или состояния, аутоиммунного заболевания, расстройства или состояния, диабета типа I, связанного с ним расстройства или состояния, и/или воспалительного заболевания, расстройства или состояния можно использовать в комбинации с другим видом лечения. Для терапии рака композицию можно использовать в комбинации с другим видом лечения, включая, без ограничения, химиотерапию, терапию с помощью анти-CD20 mAb, анти-TIM-3 mAb, анти-CTLA-4 антитела, анти-EGFR mAb, анти-HER-2 mAb, анти-CD19 mAb, анти-CD33 mAb, анти-CD73 mAb, анти-CD47 mAb, анти-DLL-3 mAb, mAb к апелину, анти-TIP-1 mAb, анти-CLDN18.2 mAb, анти-FOLR1 mAb, анти-PD-L1 антитела, анти-PD-1 антитела, PD-1/PD-L1 терапию, терапию с помощью других иммуноонкологических лекарственных веществ, антиангиогенных средств, лучевую терапию, терапию с помощью конъюгата антитело-лекарственное вещество (ADC), таргетную терапию или терапию с помощью других противораковых лекарственных веществ. Анти-LAG-3 антитела можно использовать для конструирования биспецифических антител с mAb-партнерами к PD-1, PD-L1, CD47, TIM-3, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD73, апелину, DLL-3, клаудину 18.2, TIP-1, CD3, фолатному альфа-рецептору (FOLR1) и/или другими поверхностными опухолевыми антигенами для лечения видов рака/опухолей, которые экспрессируют как LAG-3, так и специфический антиген, ассоциированный с опухолью.

[00176] Используемый в настоящем описании термин «в комбинации» в контексте введения субъекту двух или более терапевтических агентов относится к применению более чем одного вида терапии. Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок введения терапевтических агентов субъекту. Например, первый терапевтический агент (например, описанную в настоящей заявке композицию) можно вводить до (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 часа, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часов, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно или после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения субъекту второго терапевтического агента.

[00177] В другом общем аспекте изобретение относится к способу определения уровня LAG-3 у субъекта. Способ включает (a) получение образца от субъекта; (b) приведение образца в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (c) определение уровня LAG-3 у субъекта.

[00178] В контексте настоящего описания «образец» относится к биологическому образцу, полученному от субъекта, и может включать, без ограничения, цельную кровь, сыворотку, плазму, клетки крови, эндотелиальные клетки, биопсию ткани (например, раковую ткань, печеночную ткань и т.д.), лимфатическую жидкость, асцитную жидкость, интерстициальную жидкость, костный мозг, спинномозговую жидкость, слюну,

слизистую, мокроту, пот, мочу или любые другие выделения, экскрецию или другие жидкости организма. «Образец крови» относится к цельной крови или любой ее фракции, включая клетки крови, сыворотку и плазму. «Образец крови» может, например, содержать раковые клетки.

[00179] В некоторых вариантах осуществления уровень LAG-3 у субъекта может быть определен с помощью анализов, выбранных, без ограничения, из вестерн-блот анализа, анализа ELISA, анализа FACS и/или радиоиммунологического анализа (RIA). Относительные уровни белка могут быть определены с помощью вестерн-блот анализа, анализа FACS и иммуногистохимии (ИHC), а абсолютные уровни белка могут быть определены с помощью анализа ELISA. При определении относительных уровней LAG-3 уровни LAG-3 могут быть определены по меньшей мере между двумя образцами, например, между образцами, полученными от одного и того же субъекта в разные моменты времени, между образцами, полученными из разных тканей одного и того же субъекта, и/или между образцами, полученными от разных субъектов. Альтернативно, при определении абсолютных уровней LAG-3, например с помощью анализа ELISA, абсолютный уровень LAG-3 в образце может быть определен путем создания перед тестированием образца стандарта для анализа ELISA. Специалист в данной области поймет, какие аналитические методы использовать для определения уровня LAG-3 в полученном от субъекта образце с помощью антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению.

[00180] Использование способов определения уровня LAG-3 в образце от субъекта позволяет диагностировать аномальные (повышенные, пониженные или недостаточные) уровни LAG-3 при заболевании и принять соответствующие решения относительно терапии. Такое заболевание может быть выбрано, без ограничения, из рака, инфекционного заболевания, воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания и/или диабета типа I. Кроме того, благодаря мониторингу уровней LAG-3 у субъекта может быть определен риск развития указанного выше заболевания на основании знания уровня LAG-3 при конкретном заболевании и/или во время прогрессирования конкретного болезни.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00181] Изобретение также предусматривает следующие неограничивающие варианты осуществления.

[00182] Вариант осуществления 1 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности

- a. SEQ ID NO:35, 36, 37, 86, 87 и 88, соответственно;
- b. SEQ ID NO:38, 39, 40, 89, 90 и 91, соответственно;
- c. SEQ ID NO:41, 42, 137, 138, 93 и 94, соответственно;

- d. SEQ ID NO:139, 140, 141, 142, 99 и 143, соответственно;
- e. SEQ ID NO:144, 145, 146, 147, 148 и 149, соответственно;
- f. SEQ ID NO:65, 66, 67, 116, 117 и 118, соответственно;
- g. SEQ ID NO:68, 69, 70, 119, 120 и 121, соответственно;
- h. SEQ ID NO:71, 72, 73, 122, 123 и 124, соответственно;
- i. SEQ ID NO:74, 75, 76, 125, 126 и 127, соответственно;
- j. SEQ ID NO:77, 78, 79, 128, 129 и 130, соответственно; или
- k. SEQ ID NO:80, 150, 151, 131, 132 и 133, соответственно;

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с LAG-3, предпочтительно специфически связывается с человеческим LAG-3.

[00183] Вариант осуществления 2 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 или 33, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 или 34.

[00184] Вариант осуществления 3 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, содержащее:

(a) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:1, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:2;

(b) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:3, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:4;

(c) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:5, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:6;

(d) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:7, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:8;

(e) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:10;

(f) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:11, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:12;

(g) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:13, и переменную область легкой цепи, имеющую

полипептидную последовательность SEQ ID NO:14;

(h) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:16;

(i) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:17, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:18;

(j) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:19, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:20;

(k) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:21, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:22;

(l) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:23, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:24;

(m) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:25, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:26;

(n) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:27, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:28;

(o) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:30;

(p) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:31, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:32; или

(q) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:34.

[00185] Вариант осуществления 4 представляет собой выделенное моноклональное анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:192.

[00186] Вариант осуществления 5 представляет собой выделенное моноклональное анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:193.

[00187] Вариант осуществления 6 представляет собой выделенное моноклональное

анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:158.

[00188] Вариант осуществления 7 представляет собой выделенное моноклональное анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:180.

[00189] Вариант осуществления 8 представляет собой выделенное моноклональное анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:194.

[00190] Вариант осуществления 9 представляет собой выделенное моноклональное анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-8, причем моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует LAG-3 активность.

[00191] Вариант осуществления 10 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-8, причем моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно блокировать связывание LAG-3 с молекулами МНС класса II.

[00192] Вариант осуществления 11 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-8, причем моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно блокировать связывание LAG-3 с LSECtin.

[00193] Вариант осуществления 12 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-11, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

[00194] Вариант осуществления 13 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-11, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

[00195] Вариант осуществления 14 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 13, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:195, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:208;

б. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:196, и переменную область легкой цепи, имеющую

р. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:202, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:210;

с. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:203, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:210; или

г. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:204, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:210.

[00196] Вариант осуществления 15 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-14.

[00197] Вариант осуществления 16 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 15.

[00198] Вариант осуществления 17 представляет собой клетку-хозяин, содержащую вектор по варианту осуществления 16.

[00199] Вариант осуществления 18 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

[00200] Вариант осуществления 19 представляет собой способ блокирования связывания LAG-3 с молекулами МНС класса II у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 18.

[00201] Вариант осуществления 20 представляет собой способ блокирования связывания LAG-3 с LSECtin у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 18.

[00202] Вариант осуществления 21 представляет собой способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 18.

[00203] Вариант осуществления 22 представляет собой способ лечения инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 18.

[00204] Вариант осуществления 23 представляет собой способ лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 18.

[00205] Вариант осуществления 24 представляет собой способ лечения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 18.

[00206] Вариант осуществления 25 представляет собой способ лечения диабета

типа I у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 18.

[00207] Вариант осуществления 26 представляет собой способ получения моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-14, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продуцирования моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

[00208] Вариант осуществления 27 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-14, включающий объединение моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

[00209] Вариант осуществления 28 представляет собой способ определения уровня LAG-3 у субъекта, включающий

- а. получение образца от субъекта;
- б. приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому варианту осуществления 1-14; и
- с. определение уровня LAG-3 у субъекта.

[00210] Вариант осуществления 29 представляет собой способ по варианту осуществления 28, в котором образец представляет собой образец ткани.

[00211] Вариант осуществления 30 представляет собой способ по варианту осуществления 29, в котором образец ткани представляет собой образец раковой ткани.

[00212] Вариант осуществления 31 представляет собой способ по варианту осуществления 28, в котором образец представляет собой образец крови.

ПРИМЕРЫ

[00213] Пример 1: Идентификация моноклональных анти-LAG-3 антител

[00214] Мышей иммунизировали Fc-меченным гибридным белком человеческий LAG-3(ECD)-huFc, содержащим внеклеточный домен (ECD) человеческого LAG-3 и человеческий Fc (huFc) на C-конце. Титр плазмы определяли методом ИФА и подтверждали флуоресцентно-активированной сортировкой клеток (FACS). После эвтаназии селезенки и лимфатические узлы собирали для получения гибридом. Гибридомы выращивали в 96-луночных планшетах для тканевых культур, и супернатанты из отдельных лунок подвергали скринингу с помощью ELISA с использованием LAG-3(ECD)-huFc. Положительные клоны дополнительно анализировали с помощью FACS с использованием клеток CHO, экспрессирующих человеческий LAG-3. Лучшие положительные клоны выделяли и секвенировали.

[00215] Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей

моноклональных антител представлены в таблицах 1 и 2, а CDR области моноклональных анти-LAG-3 антител представлены в таблицах 3 и 4.

[00216] Таблица 1: Последовательности вариабельных областей тяжелой цепи моноклональных анти-LAG-3 антител (mAb)

Клоны mAb	VH
B1	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEW MGYIDYSGITSYNPSLKSRISTRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARE DHYDLAWFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:1)
B2	QVHLQQSGPQLVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQRPQGGLLEWI GWIFPGSGSTYYNEKFKGKATLTVDKSSSTAYMLLSSLTSEDSAVYFCV RIHFDYDWFFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:3)
B3	QVQLQQPGAELLKPGASVKMSCKASGYTFTSYDIHWLQKTPQGGLLEWI GAIYPENGDSYSQKFKDKATLTADKSSNTAYIHLSSLTSEDSAVYYCAR GGYYDYVWFPYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:5)
B4	QVQLQQPGAELLKPGASVKMSCKASGYTFTSYDIHWLQKTPQGGLLEWI GAIYPENGDSYSQKFKGKATLTADKSSNTAYIHLSSLTSEDSAVYYCAR GGYFDYVWFPYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:7)
B5	EVQLRQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTGYMNMWVKQSHGKSLEW WLAVINPYNGDTAYNRKFKGRAILTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVY YCVRDDGYHVRFFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:9)
B9	EVQLRQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTGYMNMWVKQSHGKSLEW LAVINPYNGDTAYNRKFKGRATLTVDKSSSTAYMELNRLTSEDSAVYY CVRDDGYHVRYFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:11)
B6	EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTSLNYYMNMWVKQSHGKSLEW IGVINPYNGDTAYNLKFKGKATLTADLSSNTAYMDFNSLTSEDSAVYYC ARDDGYHVYYFDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:13)
B11	EVQLQQSGPVLVRPGASVKMSCKASGYTFTNYYMNMWVKQSHGKSLEW IGVINPYNGDIAYSQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELKSLTSEDSAVYYC ARDDGYVYYFDCWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:15)
B7	EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFSDYNLNWVKQSNKGKLEWIG LINLDSAATVYNQKFKGKATLTIDQSSTAYMQLNSLTSDDSAVYYCAS YDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:17)
B10	EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFSDYNLNWVKESNGKSLEWIG LITLDYGTIYNQKFKGKATLTVDQSSSIAYMQLNSLTSDDSAVYYCAC YDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:19)
B12	EVKLLESGLVQPGGSLKLSCAASGFDGFRYWMWVRQAPGKGLEWI GEINPDSSTINYTPSLRDEFIISRDNKNTLFLQMSKVISETALYYCARIT SGYYFDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:21)
B13	EVMLVESGGGLVKPGGSLKVSACAASGFTFSIYAMCWVRQTPEKRLEWV ATISSGGSNTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDATAVYYCA RGDVYYDYDGRGFDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:23)
B15	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMFVVKQRPEQGLEWI GWIDPENGDEYASKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDATAVYYCT LYAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:25)
B16	EVQLHQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMNMWVKQSHGKSLEW IGVINPYNGRTSYNLKFKGKATLTVDKSSSTAYMDLNSLTSEDSAVYYC ASPEGYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:27)
BG27	QAYLQQSGADLVRPGASVKMSCKASGYTFTSYDMHWVKQTPRQGLE WIGAIYPGNGDASYNQKFKGKATLTVDKASSTAFMQLSSLTSEDSAVYF

	CARGDYGNYVWFAYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO:29)
BG29	QIQLQQSGPEVVKPGASVRISCKASGYTFSDYHINWVKQKPGQGLEWIG WIYPGRGDPEYNEKFKGKATLTVDRSASTAYMQLSSLTSEDTSVYFCEI YYGNYIDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:31)
BG33	QIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFSDYHINWVKQKPGQGLEWIG WIYPGRGNPEYNEKFKGKATLTVDRSANTAYMQLSSLTSEDSSVYFCEI YYGNYLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:33)

VH: вариabельная область тяжелой цепи

[00217] Таблица 2: Последовательности вариabельных областей легкой цепи моноклональных анти-LAG-3 mAb

Клоны mAb	VL
B1	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYY TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCHQYSNRPTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:2)
B2	DVVMQTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYFYWYLQKPGQSP NLLIYRVSNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDMGVYYCFQGTH VPYTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:4)
B3	DVVMQTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQSILYSNGYTYLEWYLQKPGQSPK LLIYGVS NRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVESEDMGVYYCFQGTHVP LTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:6)
B4	DVVMQTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQSIVYSNGYTYLEWYLQKPGQSP KLLIYGVS NRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDMGVYYCFQGTH VPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:8)
B5	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRSSQDISDYLSWLQQKPDGTIKRLIYST STLD SGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDFADYYCLQYASSPPTFGGGT KLEIK (SEQ ID NO:10)
B9	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDISDSLWLQQKPDGTIKRLIYST STLD SGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDFADYYCLQYASSPPTFGGGT KLEIK (SEQ ID NO:12)
B6	DIQLTQSPSSLSASLGQRVSLTCRASQDISGRLSCLQQKPDGTIKRLIYSTS TLDSGV PKRFSGSRSGSDFSLTISSESEDFADYYCLQCVSSPPTFGGGTK LEIK (SEQ ID NO:14)
B11	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGGSLNWLQQKPDGTIKRLIYST STLD SGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDFADYYCLQNANSPPTFGGGT KLEIK (SEQ ID NO:16)
B7	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLSCRASQDISHYLNWFQQKPDGTFKRLIYE TSTLDFGV PKRFSGSRSGSDYSLTIGSLESEDFADYYCLQYATYPLTFGA GTKLELK (SEQ ID NO:18)
B10	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDISNYLNWFQQKPDGTFKRLIYA TSTLDFGV PKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDFADYYCLQYASYPLTFGAG TKLELK (SEQ ID NO:20)
B12	DVVMQTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQTIVYSNGNTYLYWYLQKPGQSP KLLIYRVSNRFP GPDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDMGVYYCFQGTH VPFTFGSGTKLEMK (SEQ ID NO:22)
B13	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQ PPKMLIYWASTRESGVPERFTGSGSGTDFTLTINSVQAEDMAIYYCQND YGYPLAFGAGTRLELK (SEQ ID NO:24)
B15	DVVMQTQTPSLT SVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLSWLLQRPGQSPK RLIYLVSKLDSGV PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHFP QTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:26)

B16	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVDSDGISFMHWYQQKPGQPRL LIYRASKLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETDDVATYYCQQNNKDPL TFGAGTKLELR (SEQ ID NO:28)
BG27	DVVMQTQPLSLPVSLGDQASISCRSSQTIVHSNRYTYLEWYLQKPGQSL KLLIYGVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDMGVYYCFQGT VPPTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:30)
BG29	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLHSDGKTYLYWFLQRPQGSPQ RLIYYMSNLASGVDPDRFSGRSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCMQSLEY PWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:32)
BG33	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLHSDGKTYLYWFLQRPQGSPQ RLIYYMSNLASGVDPDRFSGRSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCMQSLEY PWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:34)

VL: переменная область легкой цепи

[00218] Таблица 3: CDR области 1-3 тяжелой цепи анти-LAG-3 mAb

Клоны mAb	HC		
	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
B1	GYSITSDYA (35)	IDYSGIT (36)	AREDHYDLAWFAY (37)
B2	GYTFTDYY (38)	IFPGSGST (39)	VRIHFDYDWFFDV (40)
B3	GYTFTSYD (41)	IYPENGDS (42)	ARGGYDYVWFY (43)
B4	GYTFTSYD (44)	IYPENGDS (45)	ARGGYFDYVWFY (46)
B5	GYTFTGY (47)	INPYNGDT (48)	VRDDGYHVRFFDV (49)
B9	GYTFTGY (50)	INPYNGDT (51)	VRDDGYHVRFFDV (52)
B6	GYTSLNYY (53)	INPYNGDT (54)	ARDDGYHVVYFDY (55)
B11	GYTFTNYY (56)	INPYNGDI (57)	ARDDGYVYVYFDC (58)
B7	GYSFSDYN (59)	INLDSAAT (60)	ASYDY (61)
B10	GYSFTDYN (62)	ITLDYGT (63)	ACYDY (64)
B12	GFDFSRYW (65)	INPDSSTI (66)	ARITSGYVYFDY (67)
B13	GFTFSIYA (68)	ISSGGSNT (69)	ARGDVYDYDGRGFDY (70)
B15	GFNIKDDY (71)	IDPENGDT (72)	TLYAY (73)
B16	GYTFTDYY (74)	INPYNGRT (75)	ASPEGY (76)
BG27	GYTFTSYD (77)	IYPGNGDA (78)	ARGDYGNVWFY (79)
BG29	GYTFSDYH (80)	IYPGRGDP (81)	EIYYGNVYDY (82)
BG33	GYTFSDYH (83)	IYPGRGNP (84)	EIYYGNVLDY (85)

HC: тяжелая цепь; CDR: определяющая комплементарность область

CDR HC анти-LAG-3 mAb определяли с помощью метода IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

[00219] Таблица 4: CDR области 1-3 легкой цепи анти-LAG-3 mAb

Клоны mAb	LC		
	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
B1	QDISNY (86)	YTS (87)	HQYSNRPPT (88)
B2	QSIVHSNGNTY (89)	RVS (90)	FQGTHVPYT (91)
B3	QSILYSNGYTY (92)	GVS (93)	FQGTHVPLT (94)
B4	QSIVYSNGYTY (95)	GVS (96)	FQGTHVPLT (97)
B5	QDISDY (98)	STS (99)	LQYASSPPT (100)
B9	QDISDS (101)	STS (102)	LQYASSPPT (103)
B6	QDISGR (104)	STS (105)	LQCVSSPPT (106)

B11	QDIGGS (107)	STS (108)	LQNANSPPT (109)
B7	QDISHY (110)	ETS (111)	LQYATYPLT (112)
B10	QDISNY (113)	ATS (114)	LQYASYPLT (115)
B12	QTIVYSNGNTY (116)	RVS (117)	FQGTHVPFT (118)
B13	QSLNSGNQKNY (119)	WAS (120)	QNDYGYPLA (121)
B15	QSLLYSNGKTY (122)	LVS (123)	VQGTHFPQT (124)
B16	ETVDDSGISF (125)	RAS (126)	QQNNKDPLT (127)
BG27	QTIVHSNRYTY (128)	GVS (129)	FQGTHVPPT (130)
BG29	KSLHSDGKTY (131)	YMS (132)	MQSLEYPWT (133)
BG33	KSLHSDGKTY (134)	YMS (135)	MQSLEYPWT (136)

LC: легкая цепь; CDR: определяющая комплементарность область

CDR LC анти-LAG-3 mAb определяли с помощью метода IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

[00220] Пример 2: Получение и очистка mAb из супернатантов гибридомы и культуральной среды из трансфицированных клеток HEK293.

[00221] Мышиные анти-LAG-3 mAb очищали из сред гибридомы/супернатантов с помощью аффинной хроматографии с белком А. Для получения рекомбинантных химерных анти-LAG-3 mAb использовали временную трансфекцию клеток HEK293 векторами экспрессии, содержащими мышиные вариабельные области (VH и VL), слитые с константными областями тяжелой цепи и легкой каппа-цепи человеческого IgG1, соответственно. Рекомбинантные антитела, полученные в суспензии клеток HEK293, очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А. Для получения определенных mAb векторы экспрессии, содержащие мышиные вариабельные области (VH и VL), прививали на константные области тяжелой цепи и легкой каппа-цепи человеческого IgG4, соответственно, или использовали временную трансфекцию клеток 293E векторами экспрессии для гуманизированных mAb, и mAb очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А.

[00222] Пример 3: анализ FACS связывания очищенных антител

[00223] Клетки CHO-S, стабильно трансфицированные полноразмерным человеческим LAG-3, переносили в 96-луночный планшет. Примерно 200000 клеток инкубировали либо с очищенными химерными анти-LAG-3 mAb (мышиные вариабельные области mAb, слитые с константными областями тяжелой цепи и легкой каппа-цепи человеческого IgG1, соответственно), либо с очищенными мышиными анти-LAG-3 mAb из супернатантов гибридомы при различных концентрациях в течение 15 минут при 4°C. Затем клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут и трижды промывали буфером FACS (PBS с добавлением 5% BSA). Клетки, обработанные химерными антителами, затем инкубировали с PE-конъюгированными козьими поликлональными антителами к человеческому IgG и инкубировали на льду в течение еще 15 минут; клетки, обработанные мышиными mAb, инкубировали с PE-конъюгированными козьими поликлональными антителами к мышиному IgG и инкубировали на льду в течение еще 15 минут. Затем клетки трижды промывали буфером FACS и ресуспендировали в буфере FACS, содержащем 0,1 мкг/мл PI (йодид пропидия) для стробирования живых/мертвых

клеток. Затем клетки пропускали через прибор FACS Caliber, и данные анализировали с помощью программного обеспечения Flowjo. Результаты анализа FACS по связыванию мышинных анти-LAG-3 mAb (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12 и B13) представлены на фиг. 1А-1В. Результаты анализа FACS по связыванию мышинных анти-LAG-3 mAb (BG27, BG29 и BG33) представлены на фиг. 2. Результаты анализа FACS по связыванию химерных анти-LAG-3 mAb представлены на фиг. 3А-3В.

[00224] Пример 4: Анализ сродства анти-LAG-3 mAb с помощью Biacore

[00225] Антимышинные антитела IgG иммобилизовали путем аминного связывания на поверхности чипа CM5. Моноклональные анти-LAG-3 антитела в супернатантах гибридом захватывали на поверхности чипа, и серию концентраций (50-400 нМ) белка человеческий LAG-3(ECD)-huFc инъецировали и пропускали через захваченную поверхность. Измеряли скорости ассоциации и диссоциации для связывания антитело-антиген, аппроксимировали кривую и выполняли расчеты. Значения KD выбранных анти-LAG-3 mAb показаны в таблице 5.

[00226] Таблица 5: Значения KD для анти-LAG-3 mAb по результатам анализа Biacore

Клоны mAb	KD (нМ) человеческого LAG-3
B1	1,21
B2	4,09
B3	1,53
B4	0,217
B5	1,34
B9	1,53
B11	1,18
B7	0,758
B10	1,1
B13	8,17

[00227] Пример 5: Клеточный анализ для оценки блокирующего эффекта анти-LAG-3 mAb на связывание LAG-3/МНС класса II

[00228] Человеческие клетки Дауди культивировали в RPMI+10% FBS. Белок человеческий LAG-3(ECD)-mFc (ECD человеческого LAG-3, слитый с мышинным Fc) с конечной концентрацией 1 мкг/мл инкубировали с очищенными мышинными, гуманизированными или химерными анти-LAG-3 mAb в различных концентрациях в течение 15 минут при 4°C. Затем смесь добавляли к 100000 человеческих клеток Дауди в 96-луночном круглодонном планшете, перемешивали и инкубировали в течение 15 минут на льду. Затем клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут и трижды промывали буфером FACS (PBS с добавлением 5% BSA). После этого клетки

инкубировали с РЕ-конъюгированными козьими поликлональными антителами к мышиному Fc на льду в течение 15 минут, трижды промывали буфером FACS и затем ресуспендировали в буфере FACS, содержащем 0,1 мкг/мл PI (пропидин-йод) для стробирования живых/мертвых клеток. Затем клетки пропускали через прибор FACS Caliber, и данные анализировали с помощью программного обеспечения Flowjo. Результаты ингибирования связывания LAG-3 с клетками Дауди химерными mAb B2C, B7C и B10C показаны на фиг. 4А. Результаты ингибирования связывания LAG-3 с клетками Дауди химерными mAb B1C, B3C, B4C, B5C, B9C и B11C показаны на фиг. 4В. Результаты ингибирования связывания LAG-3 с клетками Дауди мышинными mAb B6, B12 и B15 показаны на фиг. 4С. Результаты ингибирования связывания LAG-3 с клетками Дауди химерным BG29 показаны на фиг. 4D.

[00229] Пример 6: Картирование эпитопа для анти-LAG-3 mAb

[00230] Связывающие области в человеческом LAG-3 (hLAG3) с анти-LAG-3 mAb картировали с помощью конкурентного анализа ELISA. Внеклеточный домен (ECD) LAG-3 состоит из четырех иммуноглобулиновых (Ig)-подобных доменов (D1-D4) (Huard et al., Proc Natl Acad Sci USA. 94:5744-9 (1997)). Первый Ig-подобный домен (D1) содержит область внеклеточной петли, которая содержит следующую 30-аминокислотную последовательность: GPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWGPRPRRY (пептид 1-30 в таблице 6; SEQ ID NO: 153). Анти-LAG-3 mAb изучали с целью определения, способно ли каждое mAb связываться с этой областью и/или смежными последовательностями. Помимо этого, картировали эпитоп на связывание каждым mAb. Для картирования эпитопов создавали конкурентные пептиды, основанные на последовательности этой области (таблицы 6, 7, 8, 9 и 10). Кроме того, аминокислотная последовательность, находящаяся непосредственно перед этой областью, также была включена в конструкцию пептида (таблица 6).

[00231] Таблица 6: Пептиды, использованные в компетентном анализе с B5 и B6

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
1-30	GPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWGPRPRRY	153
3-14	PAAAPGHPLAPG	154
2-14	PPAAAPGHPLAPG	155
1-14	GPPAAAPGHPLAPG	156
1-13	GPPAAAPGHPLAP	157
1-12	GPPAAAPGHPLA	158
1-11	GPPAAAPGHPL	159
2-12	PPAAAPGHPLA	160
31W	WQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWG	161
S14	SGPPAAAPGHPLAP	162
D15	DSGPPAAAPGHPLAP	163
P16	PDSGPPAAAPGHPLAP	164
Q17	QPDSGPPAAAPGHPLAP	165
Q16	QPDSGPPAAAPGHPLA	166
Q15	QPDSGPPAAAPGHPL	167
Q14	QPDSGPPAAAPGHP	168

[00232] Таблица 7: Пептиды, использованные в компетентном анализе с B7

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
--------	--------------------	------------

1-30	GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY	153
15-30	PHPAAPSSWGPRPRRY	169
15-29	PHPAAPSSWGPRPRR	170
15-28	PHPAAPSSWGPRPR	171
15-27	PHPAAPSSWGPRP	172
15-26	PHPAAPSSWGPR	173
16-30	HPAAPSSWGPRPRRY	174
17-30	PAAPSSWGPRPRRY	175
18-30	AAPSSWGPRPRRY	176
19-30	APSSWGPRPRRY	177
20-30	PSSWGPRPRRY	178
21-30	SSWGPRPRRY	179

[00233] Таблица 8: Пептиды, использованные в компетентном анализе с B12

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
1-14	GPPAAAPGHPLAPG	156
2-14	PPAAAPGHPLAPG	155
3-14	PAAAPGHPLAPG	154
4-14	AAAPGHPLAPG	180
5-14	AAPGHPLAPG	181
6-14	APGHPLAPG	182
1-19	GPPAAAPGHPLAPGPHPA	183
S14	SGPPAAAPGHPLAP	162
D15	DSGPPAAAPGHPLAP	163
P16	PDSGPPAAAPGHPLAP	164
Q17	QPDSGPPAAAPGHPLAP	165
Q16	QPDSGPPAAAPGHPLA	166
Q15	QPDSGPPAAAPGHPL	167
Q14	QPDSGPPAAAPGHP	168

[00234] Таблица 9: Пептиды, использованные в компетентном анализе с BG29

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
1-30	GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY	153
1-12	GPPAAAPGHPLA	158
1-13	GPPAAAPGHPLAP	157
1-14	GPPAAAPGHPLAPG	156
2-14	PPAAAPGHPLAPG	155
3-14	PAAAPGHPLAPG	154
4-14	AAAPGHPLAPG	180
5-14	AAPGHPLAPG	181
6-14	APGHPLAPG	182
7-14	PGHPLAPG	184
6-13	APGHPLAP	185

[00235] Таблица 10: Пептиды, использованные в компетентном анализе с B3 и B4

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
16-30	HPAAPSSWGPRPRRY	174
15-30	PHPAAPSSWGPRPRRY	169
14-24	GPHPAAPSSWG	186
13-24	PGHHPAAPSSWG	187
12-24	APGPHHPAAPSSWG	188
11-24	LAPGPHHPAAPSSWG	189
7-22	PGHPLAPGPHHPAAPSS	190

7-23	PGHPLAPGPHPAAPSSW	191
------	-------------------	-----

[00236] Античеловеческий IgG в карбонатном буфере для нанесения покрытия наносили на планшеты для ELISA при 4°C (50 мкл/лунку при 1 мкг/мл) в течение ночи. В каждой лунке отдельного планшета химерный вариант данного анти-LAG-3 mAb (50 мкл/лунка при 1,4 нМ) и конкурентный пептид (50 мкл/лунка при различных концентрациях, как указано на чертежах) перемешивали и выдерживали в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем в каждую лунку добавляли человеческий внеклеточный домен (ECD) LAG-3, слитый с мышинным Fc (hLAG3-mFc) (50 мкл/лунку при 2 нМ), и конечную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 60 минут перед добавлением в планшеты для ELISA (50 мкл/лунка) для еще одной 60-минутной инкубации. В некоторых анализах после добавления смеси в планшеты для ELISA также проводили заключительную инкубацию при 4°C в течение ночи. Планшеты промывали и связывание hLAG3-mFc с иммобилизованным анти-LAG-3 mAb определяли путем добавления анти-мышинного IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена (hIgG-HRP) (ThermoFisher Scientific, Cat #: A16084; Waltham, MA) и инкубирования в течение 60 минут. Затем после промывки выполняли окраску планшета ELISA с помощью раствора для одноэтапного детектирования (ThermoFisher Scientific, Cat #: 34028), и измеряли в виде поглощения при 450 нм. Сигнал ингибирования отражает способность конкурентного пептида связываться с mAb в растворе и ингибировать в растворе связывание hLAG3-mFc с mAb.

[00237] Ингибирование конкурентными пептидами связывания hLAG3-mFc с B5 показано на фиг. 5A и 5B; ингибирование конкурентными пептидами связывания hLAG3-mFc с B6 показано на фиг. 5C и 5D; ингибирование конкурентными пептидами связывания hLAG3-mFc с B7 показано на фиг. 6; ингибирование конкурентными пептидами связывания hLAG3-mFc с B12 показано на фиг. 7; ингибирование конкурентными пептидами связывания hLAG3-mFc с BG29 показано на фиг. 8; ингибирование конкурентными пептидами связывания hLAG3-mFc с B3 и B4 показано на фиг. 9A и 9B.

[00238] На основании конкурентного анализа ингибирования с использованием пептидов, показанного на фиг. 5, установлено, что B5 связывается с последовательностью SGPPAAAPGHPLA (SEQ ID: 192) и, следовательно, эта последовательность является эпитопом для B5. На основании данных на фиг. 5C и 5D определено, что SGPPAAAPGHPLA (SEQ ID NO: 192) является эпитопом для B6. Данные по картированию на фиг. 6 свидетельствуют о том, что эпитопом для B7 является PAAPSSWGPRP (SEQ ID: 193). Данные по картированию на фиг. 7 свидетельствуют о том, что эпитопом для B12 является GPPAAAPGHPLA (SEQ ID: 158). Данные по картированию на фиг. 8 указано, что эпитопом для BG29 является AAAPGHPLAPG (SEQ ID NO: 180). Данные по картированию на фиг. 9A и 9B свидетельствуют о том, что эпитопом для B3 и B4 является APGPHPAAPSSW (SEQ ID NO: 194).

[00239] **Пример 7. Гуманизация анти-LAG-3 mAb**

[00240] Мышиные анти-hLAG-3 mAb B5 и B7 гуманизировали для уменьшения потенциальной иммуногенности при использовании пациентами-людьми. CDR как тяжелой, так и легкой цепей мышиного mAb с самую высокую вероятность сохранения надлежащей структуры, необходимой для связывания антигена, прививали на человеческий каркас. При необходимости использовали обратные мутации от человеческих остатков к мышиным остаткам. Последовательности гуманизированных областей VH и VL показаны в таблице 11 и таблице 12, соответственно. Гуманизированные области VH и VL сливали с константными областями тяжелой цепи и легкой каппа-цепи человеческого IgG4, соответственно, для получения гуманизированных mAb. Конструкции, соответствующие последовательностям mAb, использовали для временной трансфекции клеток 293E. Очищенные mAb анализировали на их способность ингибировать связывание hLAG-3 с молекулами МНС класса II на клетках Дауди. Значения IC₅₀ для гуманизированных mAb показаны в таблице 13; несколько типичных кривых IC₅₀ показаны на фиг. 10A, 10B и 10C.

[00241] Таблица 11: Последовательности вариабельных областей тяжелой цепи гуманизированных B5 и B7

Конструкция	VH
B5/H1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYYMNWVRQAPGQS LEWLGVINPYNGDTAYNRKFKGRVTLTVDKSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARDG DYHVRFFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:195)
B5/H2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYYMNWVRQAPGQS LEWLGVINPYNGDTAYNRKFKGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDG DYHVRFFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:196)
B5H3	QVQLVQSGAVVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYYMNWVRQAPGQS LEWLAVINPYNGDTAYNRKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDG DYHVRFFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:197)
B5/H4	QVQLRQSGAVVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYYMNWVRQAHGQS LEWLAVINPYNGDTAYNRKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCVRDDG DYHVRFFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:198)
B7/H1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFS DYNLNWVRQAPGQGL EWMGLINLDSAATVYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCASYDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:199)
B7/H2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFS DYNLNWVRQAPGQTL EWMGLINLDSAATVYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCASYDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:200)
B7/H3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFS DYNLNWVRQAPGQGL EWMGLINLDSAATVYNQKFKGKATMTRDTSTSTVYMELSSLRSED

	AVYYCASYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:201)
B7/H4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFSDYNLNWVRQAPGQTL EWMGLINLDSAATVYNQKFKGKATMTRDQSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCASYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:202)
B7/H5	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFSDYNLNWVRQAPGQTL EWMGLINLDSAATVYNQKFKGKATMTIDQSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCASYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:203)
B7/H6	EFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFSDYNLNWVRQAPGQTL EWMGLINLDSAATVYNQKFKGKATMTIDQSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCASYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:204)

VH: варибельная область тяжелой цепи

[00242] Таблица 12: Последовательности варибельных областей легкой цепи гуманизированных B5 и B7

конструкция	VL
B5/L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQDISDYLSWLQQKPGGAPKSLI YSTSTLDSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYASSPPT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:205)
B5/L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQDISDYLSWLQQKPGGAIKSLIY STSTLDSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYASSPPTF GGGKTKVEIK (SEQ ID NO:206)
B5/L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQDISDYLSWLQQKPGGAIKSLIY STSTLDSGVPSRFSRSGTDYTLTISLQPEDFATYYCLQYASSPPTF GGGKTKVEIK (SEQ ID NO:207)
B5/L4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQDISDYLSWLQQKPGGAIKRLI YSTSTLDSGVPSRFSRSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQYASSPPT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:208)
B7/L5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISHYLNWFQQKPGKAPKLLI YETSTLDFGVPSRFSRSGSGTDFTFTISLQPEDFATYYCLQYATYPLT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:209)
B7/L8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISHYLNWFQQKPGKAPKRLI YETSTLDFGVPSRFSRSGSGTDFTFTISLQPEDFATYYCLQYATYPLT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:210)

[00243] Таблица 13: Значения IC₅₀ для анти-LAG-3 mAb в анализе связывания LAG-3/клетки Дауди

ID mAb	IC ₅₀ (нМ)
B5(H1L4)	0,98

B5(H2L2)	1,59
B5(H3L1)	6,77
B5(H3L2)	2,85
B5(H3L3)	2,91
B5(H4L1)	5,32
B7(H1L5)	1,59
B7(H2L5)	1,59
B7(H3L5)	4,18
B7(H4L5)	1,35
B7(H5L5)	0,28
B7(H6L5)	0,78
B7(H1L8)	0,90
B7(H2L8)	0,74
B7(H3L8)	0,66
B7(H4L8)	0,70
B7(H5L8)	0,72
B7(H6L8)	1,19

B5(H1L4) относится к mAb с B5/тяжелая цепь H1 и B5/легкая цепь L4; все другие гуманизированные mAb в таблице соответствуют такому же правилу обозначения.

[00183] Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отклонения от общей концепции изобретения. Следовательно, предполагается, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными раскрытыми вариантами осуществления и охватывает модификации, находящиеся в пределах сущности и объема настоящего изобретения, определенных настоящим описанием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- a. SEQ ID NO: 35, 36, 37, 86, 87 и 88, соответственно;
- b. SEQ ID NO: 38, 39, 40, 89, 90 и 91, соответственно;
- c. SEQ ID NO: 41, 42, 137, 138, 93 и 94, соответственно;
- d. SEQ ID NO: 139, 140, 141, 142, 99 и 143, соответственно;
- e. SEQ ID NO: 144, 145, 146, 147, 148 и 149, соответственно;
- f. SEQ ID NO: 65, 66, 67, 116, 117 и 118, соответственно;
- g. SEQ ID NO: 68, 69, 70, 119, 120 и 121, соответственно;
- h. SEQ ID NO: 71, 72, 73, 122, 123 и 124, соответственно;
- i. SEQ ID NO: 74, 75, 76, 125, 126 и 127, соответственно;
- j. SEQ ID NO: 77, 78, 79, 128, 129 и 130, соответственно; или
- k. SEQ ID NO: 80, 150, 151, 131, 132 и 133, соответственно;

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с LAG-3, предпочтительно человеческим LAG-3.

2. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 или 33, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 или 34.

3. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, содержащее:

a. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:2;

b. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:4;

c. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:5, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:6;

d. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:8;

e. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:9, и вариабельную область легкой цепи, имеющую

полипептидную последовательность SEQ ID NO:10;

f. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:12;

g. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:14;

h. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:16;

i. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:18;

j. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:19, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:20;

k. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:22;

l. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:23, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:24;

m. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:25, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:26;

n. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:27, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:28;

o. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:29, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:30;

p. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:31, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:32; или

q. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:33, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:34.

4. Выделенное моноклональное анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:192.

5. Выделенное моноклональное анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:193.

6. Выделенное моноклональное анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:158.

7. Выделенное моноклональное анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:180.

8. Выделенное моноклональное анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:194.

9. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, причем указанное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует активность LAG-3.

10. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, причем указанное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно блокировать связывание LAG-3 с молекулами МНС класса II.

11. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, причем указанное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно блокировать связывание LAG-3 с LSECtin.

12. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

13. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

14. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 13, содержащее:

(a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 195, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 208;

(b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 196, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 206;

(c) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 197, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 205;

(d) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

полипептидную последовательность SEQ ID NO: 210; или

(г) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 204, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 210.

15. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14.

16. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.15.

17. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.16.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

19. Способ блокирования связывания LAG-3 с молекулами МНС класса II у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.18.

20. Способ блокирования связывания LAG-3 с LSECtin у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.18.

21. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.18.

22. Способ лечения инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.18.

23. Способ лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.18.

24. Способ лечения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.18.

25. Способ лечения диабета типа I у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.18.

26. Способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продуцирования моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

27. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, включающий объединение моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

28. Способ определения уровня LAG-3 у субъекта, включающий:

(а) получение образца от субъекта;

(b) приведения образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим

фрагментом по любому из пп.1-14; и

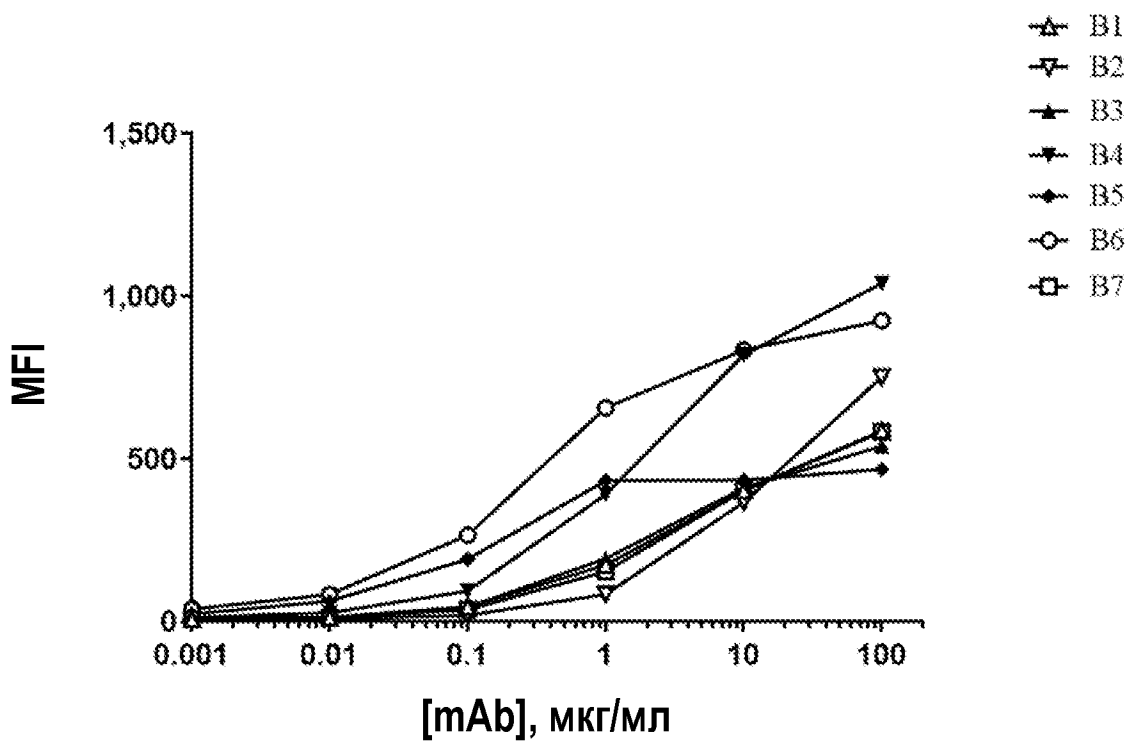
(с) определение уровня LAG-3 у субъекта.

29. Способ по п. 28, в котором образец представляет собой образец ткани.

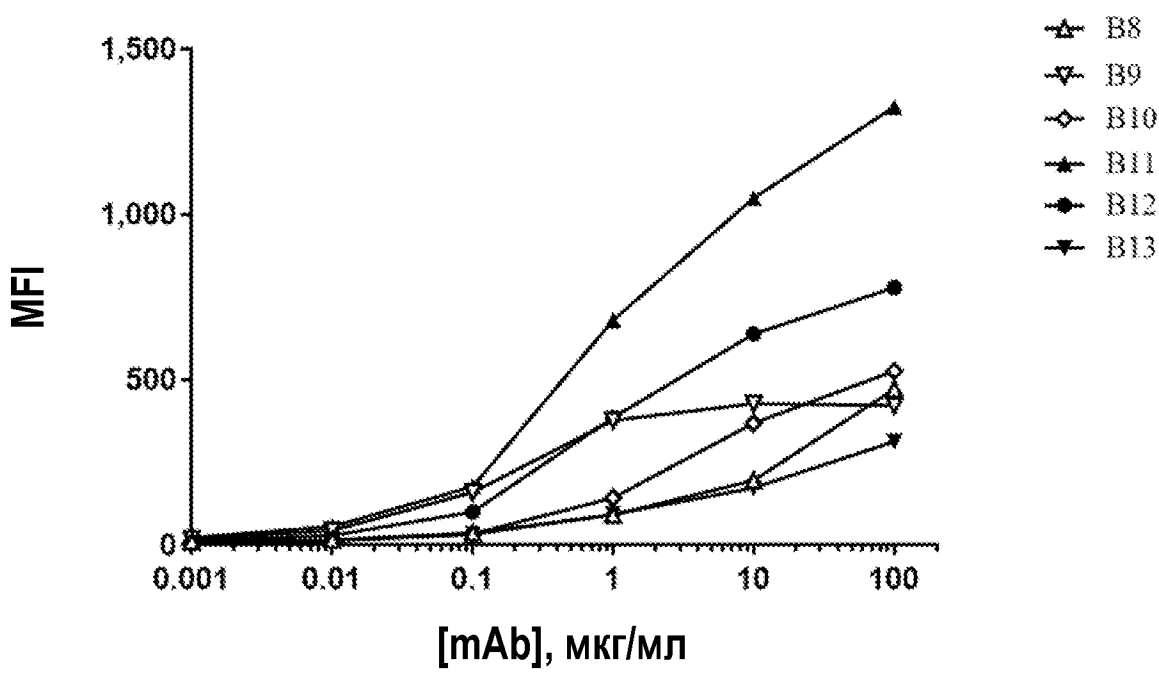
30. Способ по п. 29, в котором образец ткани представляет собой образец раковой ткани.

31. Способ по п. 28, в котором образец представляет собой образец крови.

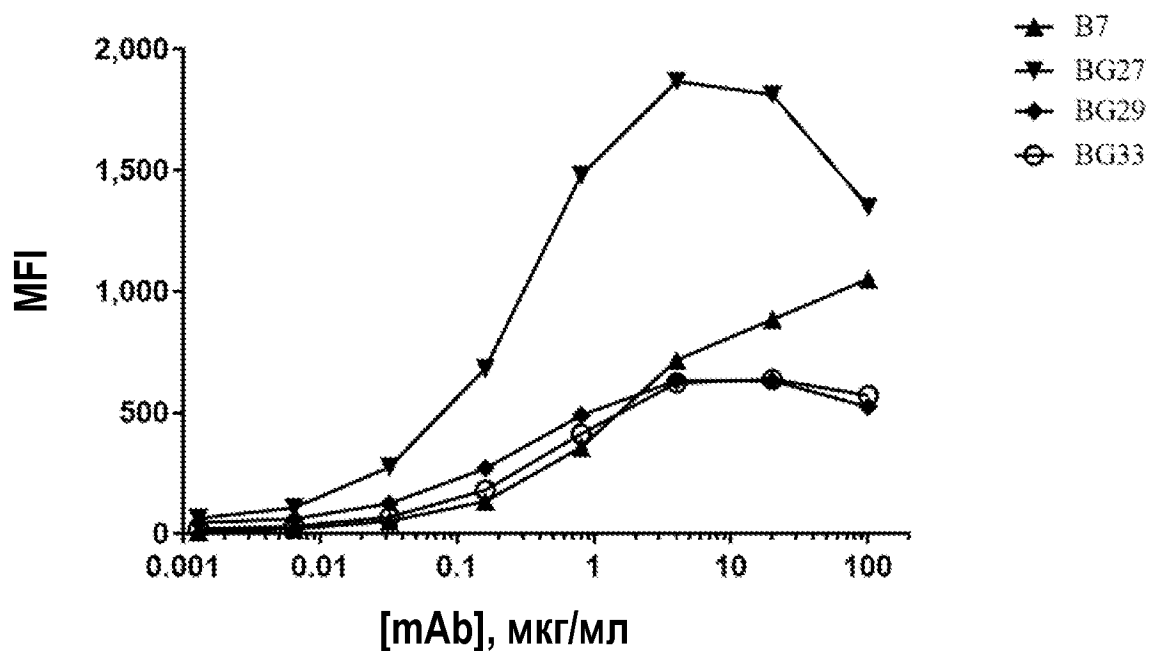
ФИГ.1А



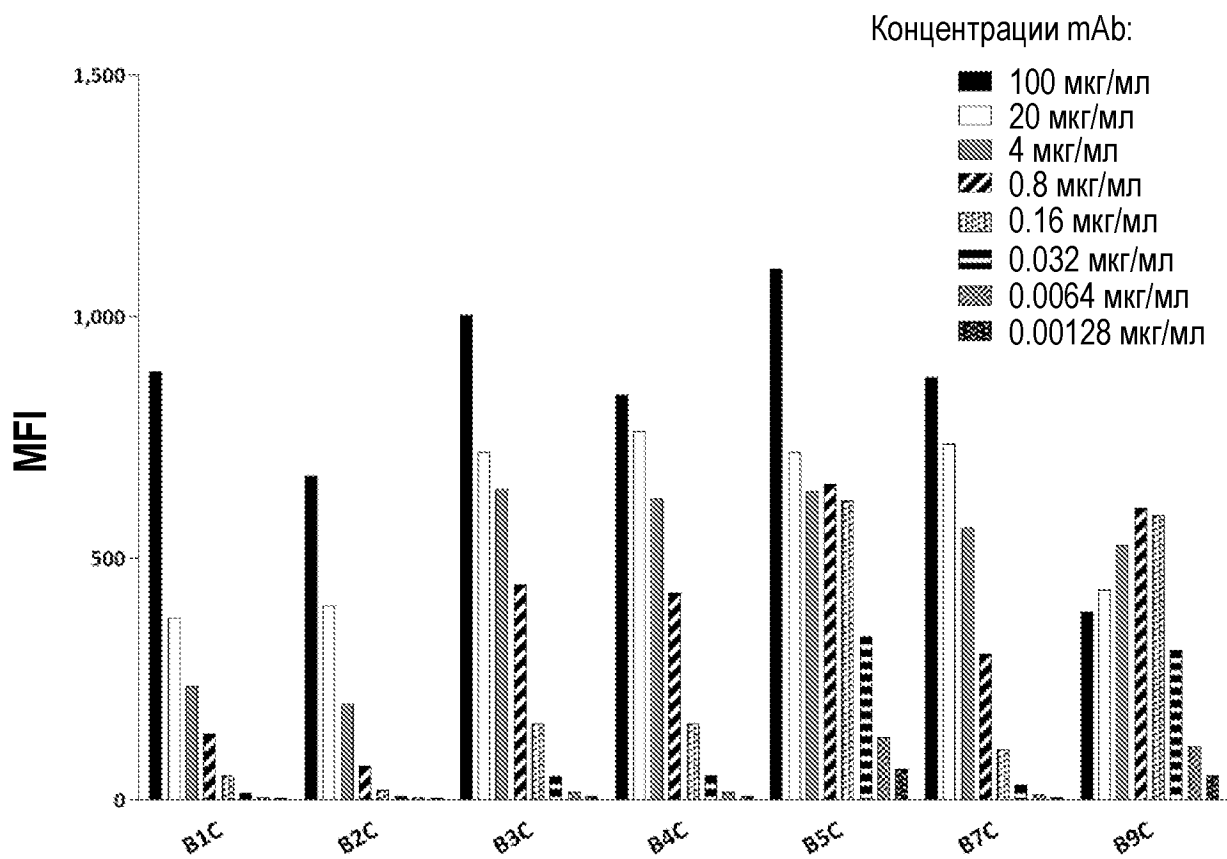
ФИГ.1В



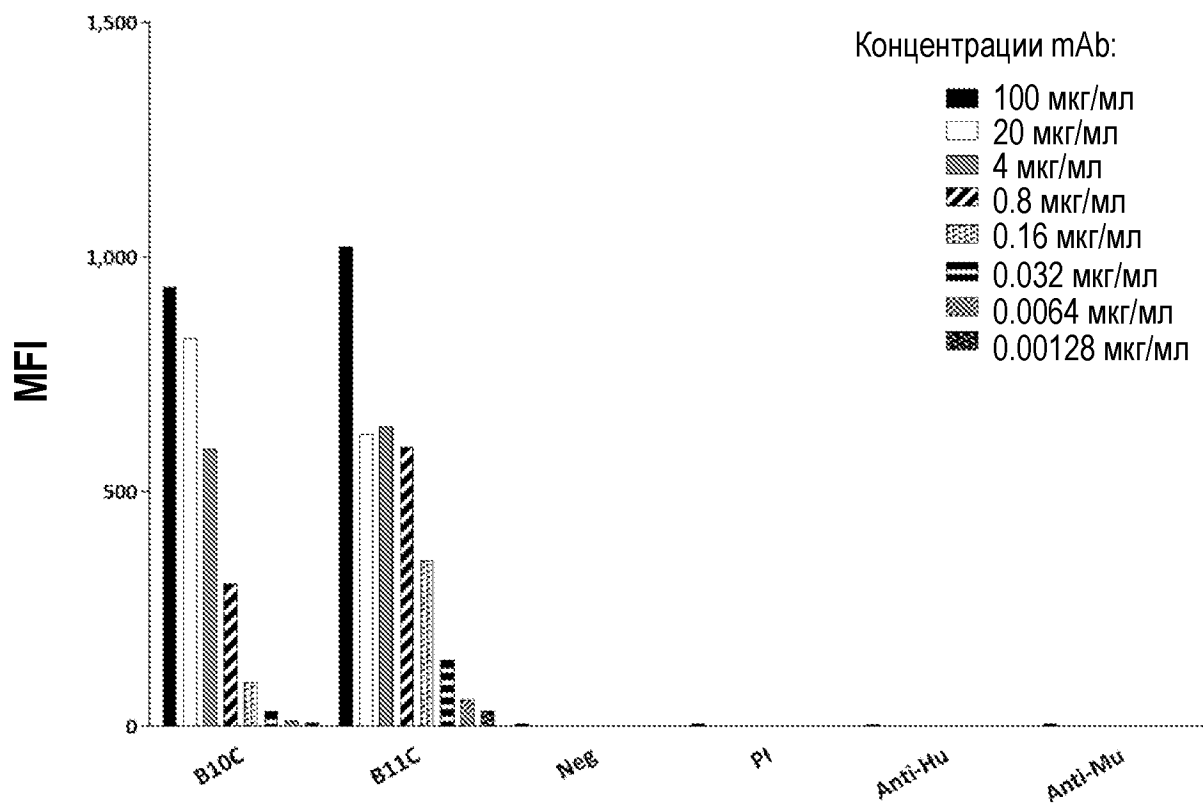
ФИГ.2



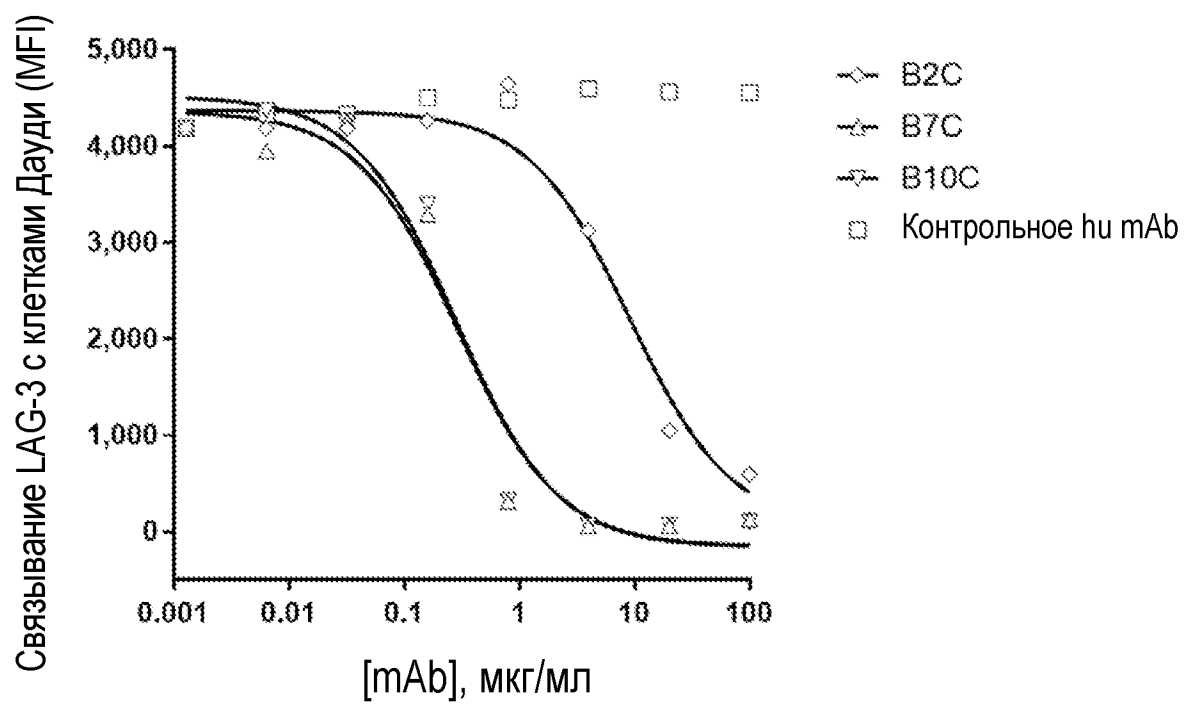
ФИГ.3А



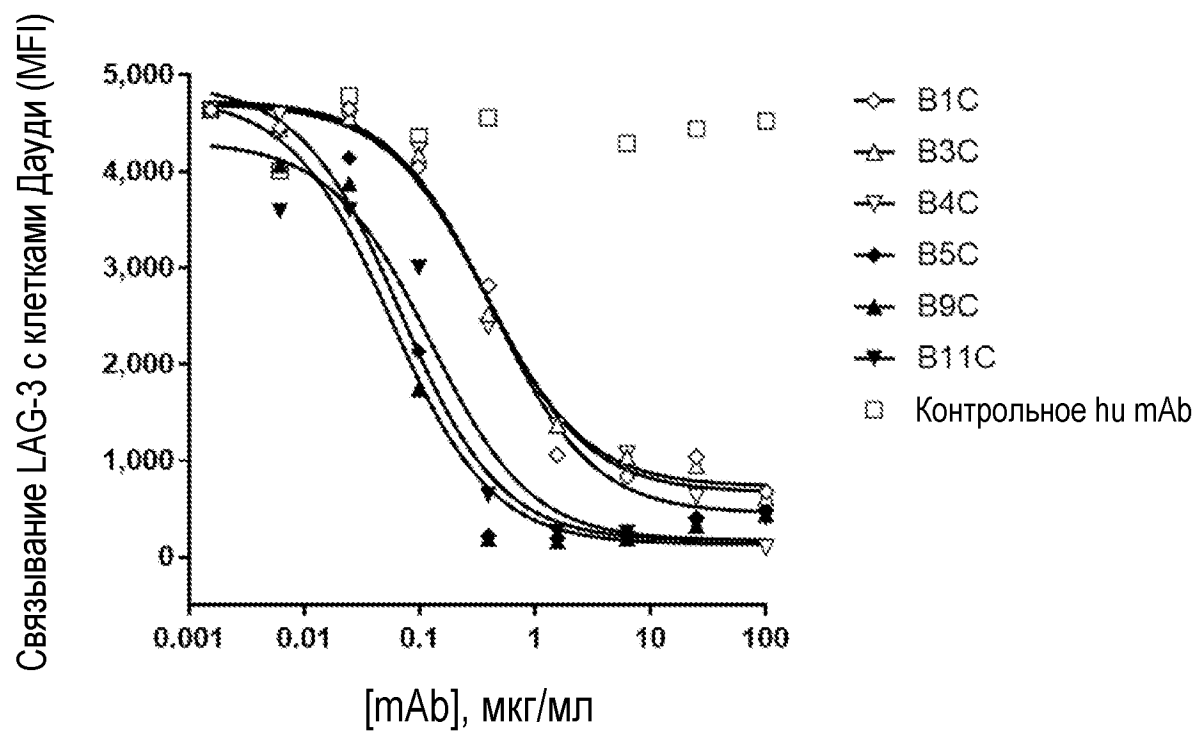
ФИГ.3В



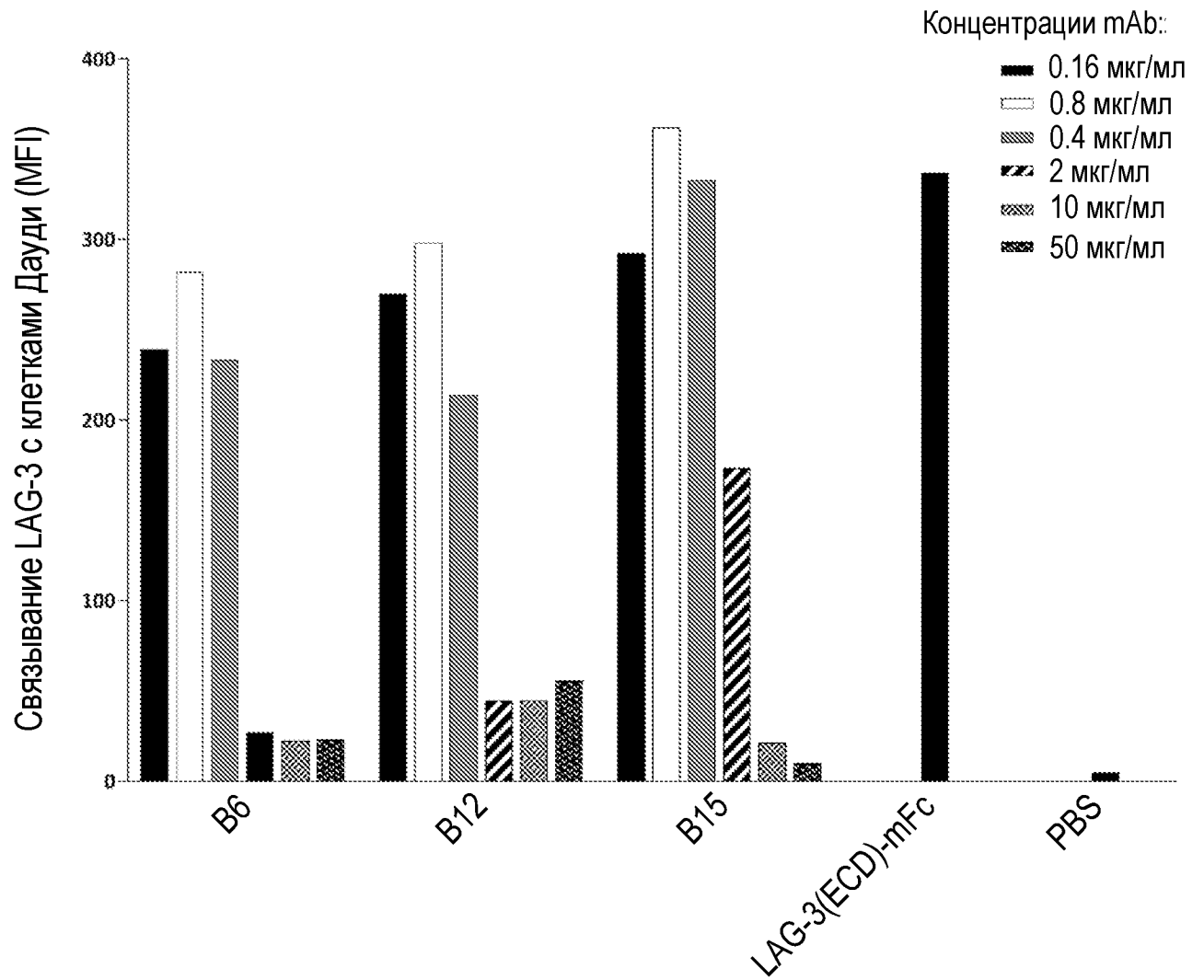
ФИГ.4А



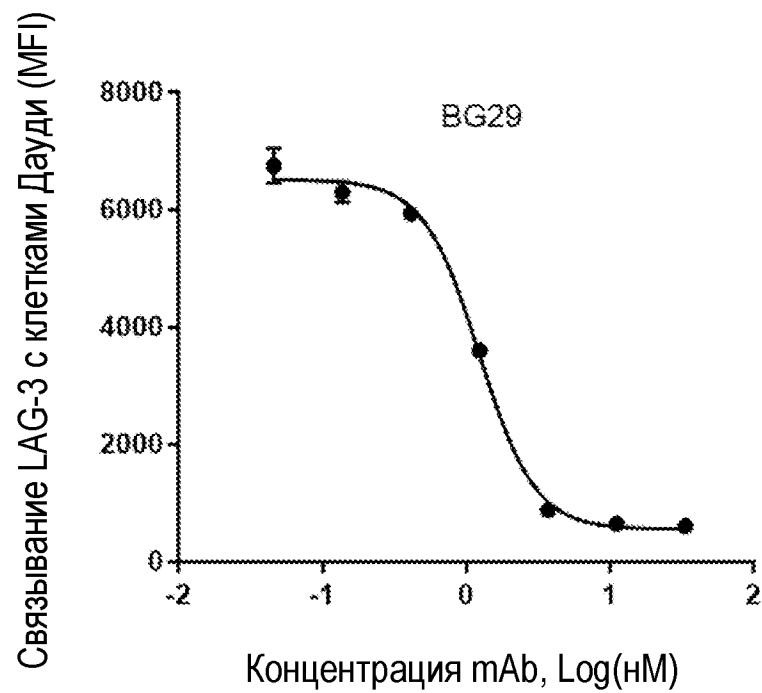
ФИГ.4В



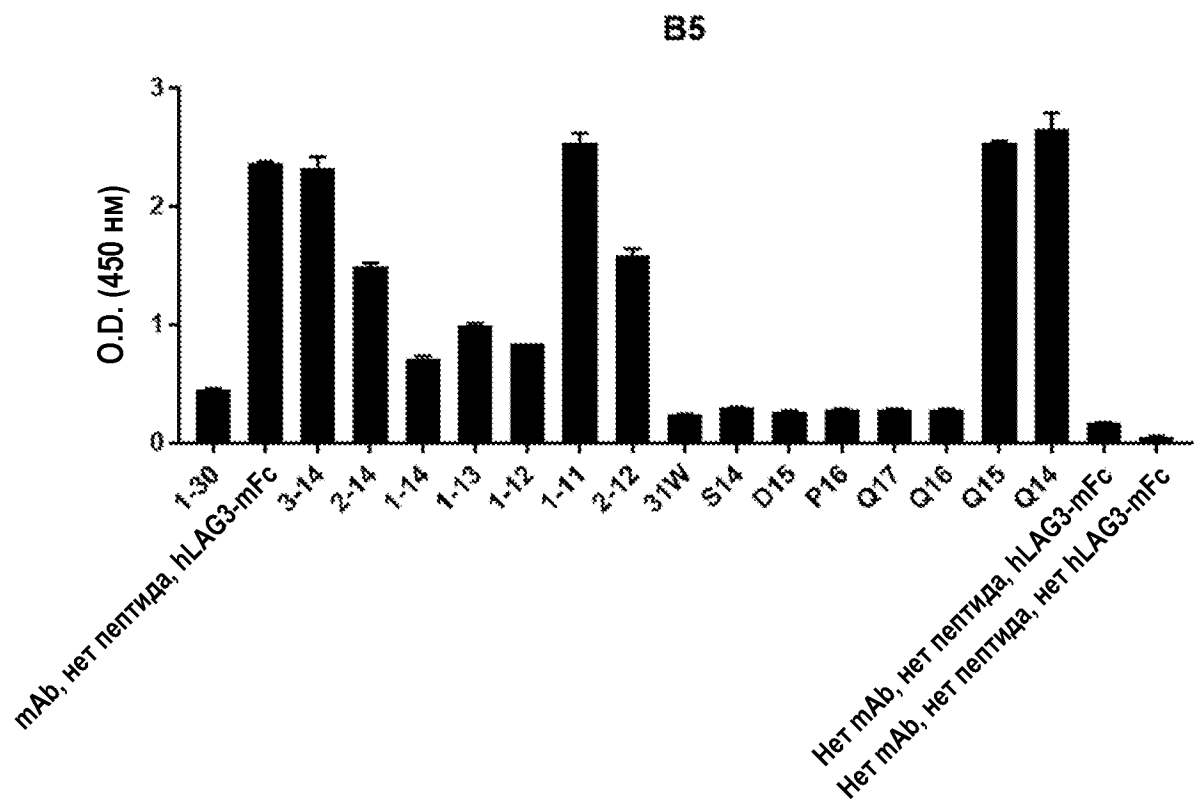
ФИГ.4С



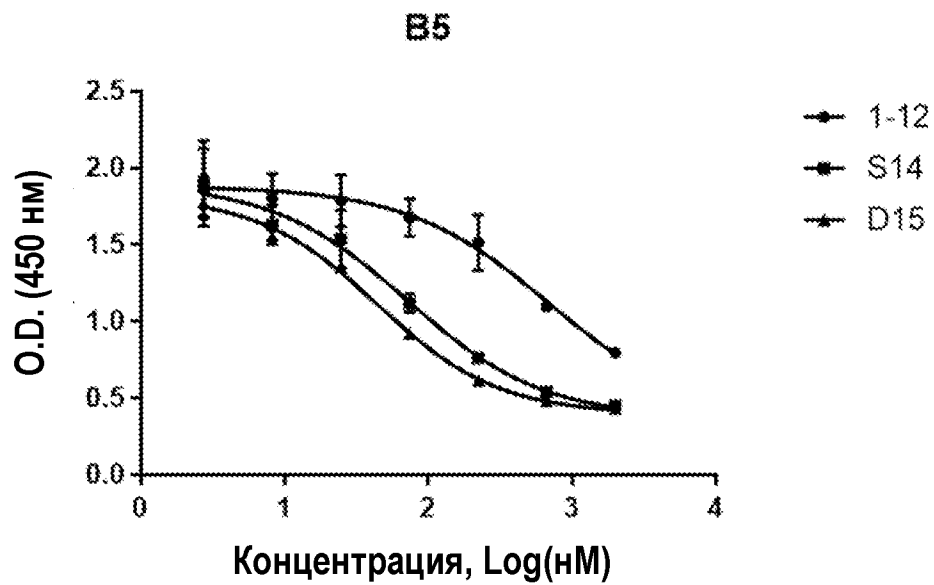
ФИГ.4D



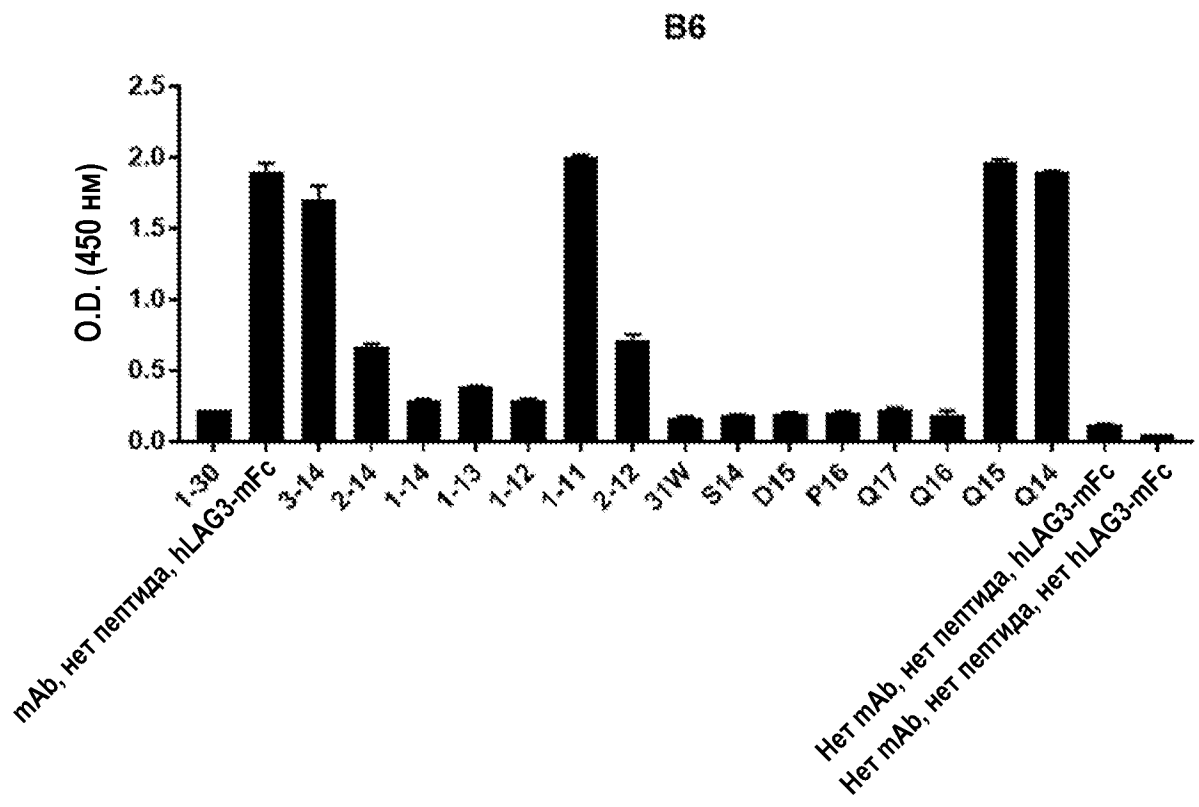
ФИГ.5A



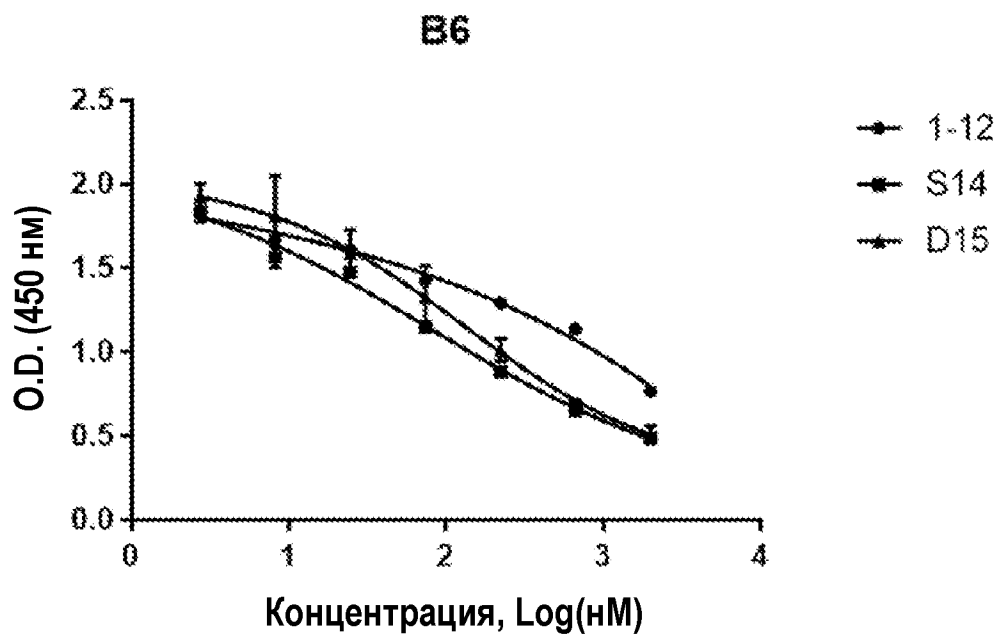
ФИГ.5В



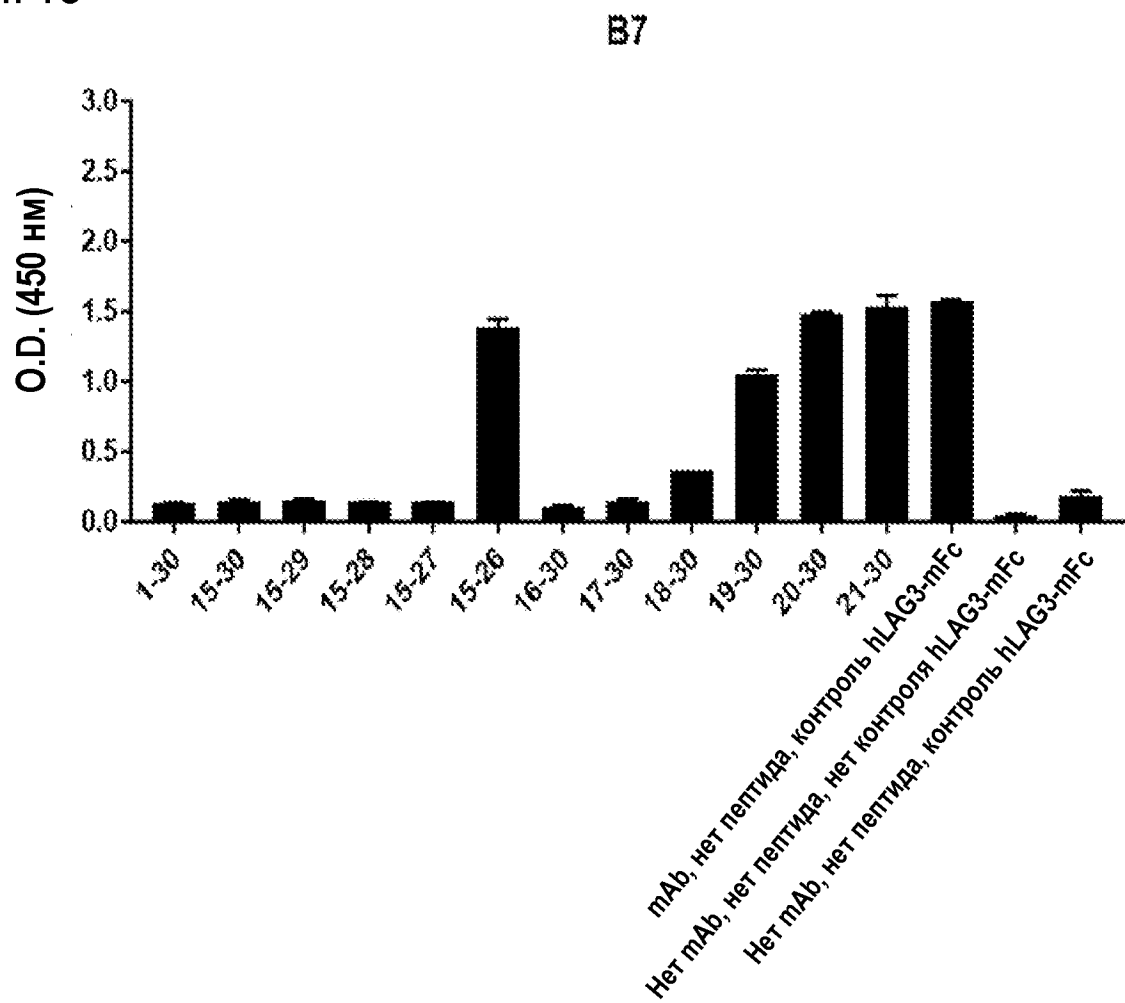
ФИГ.5С



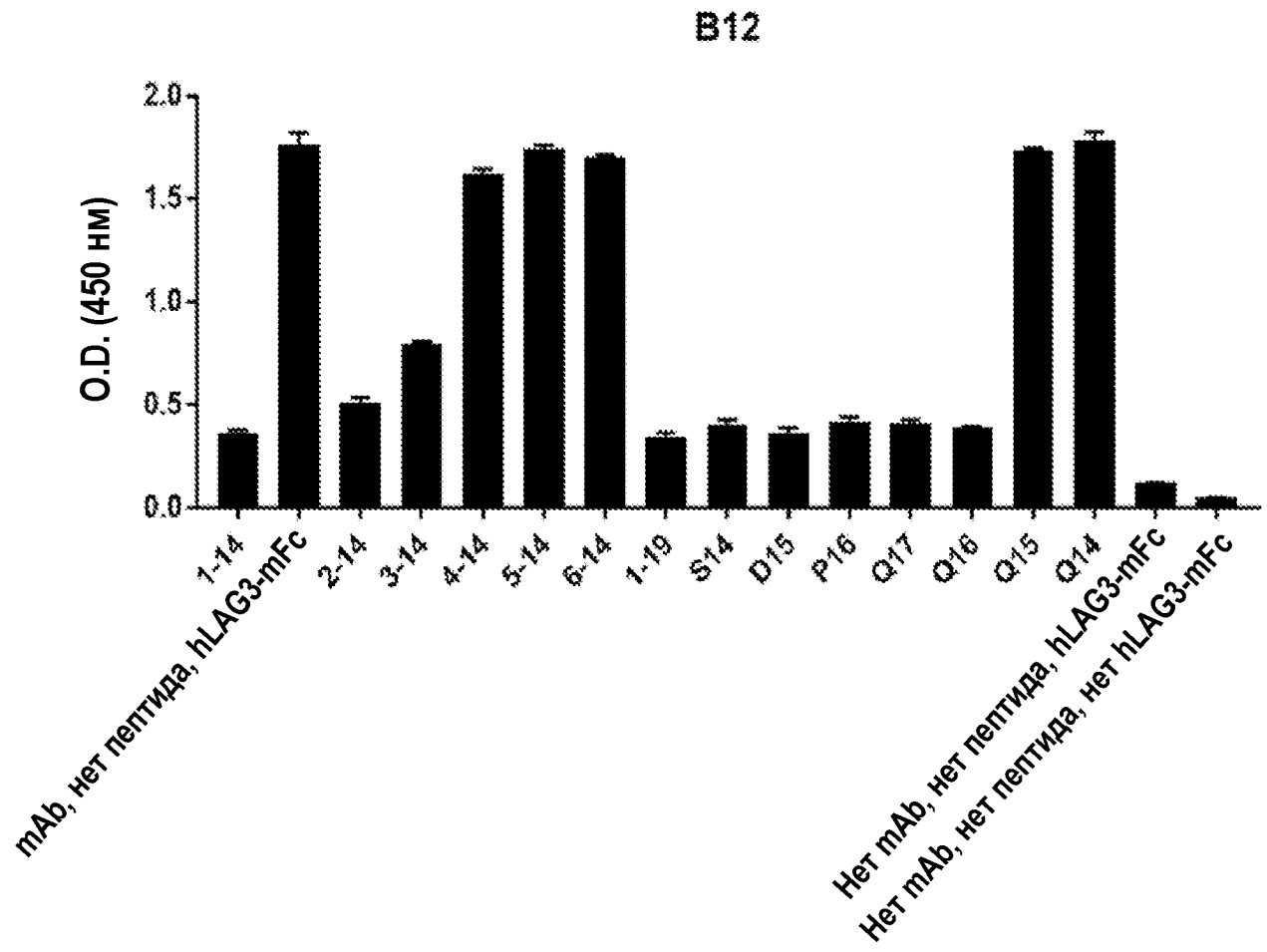
ФИГ.5D



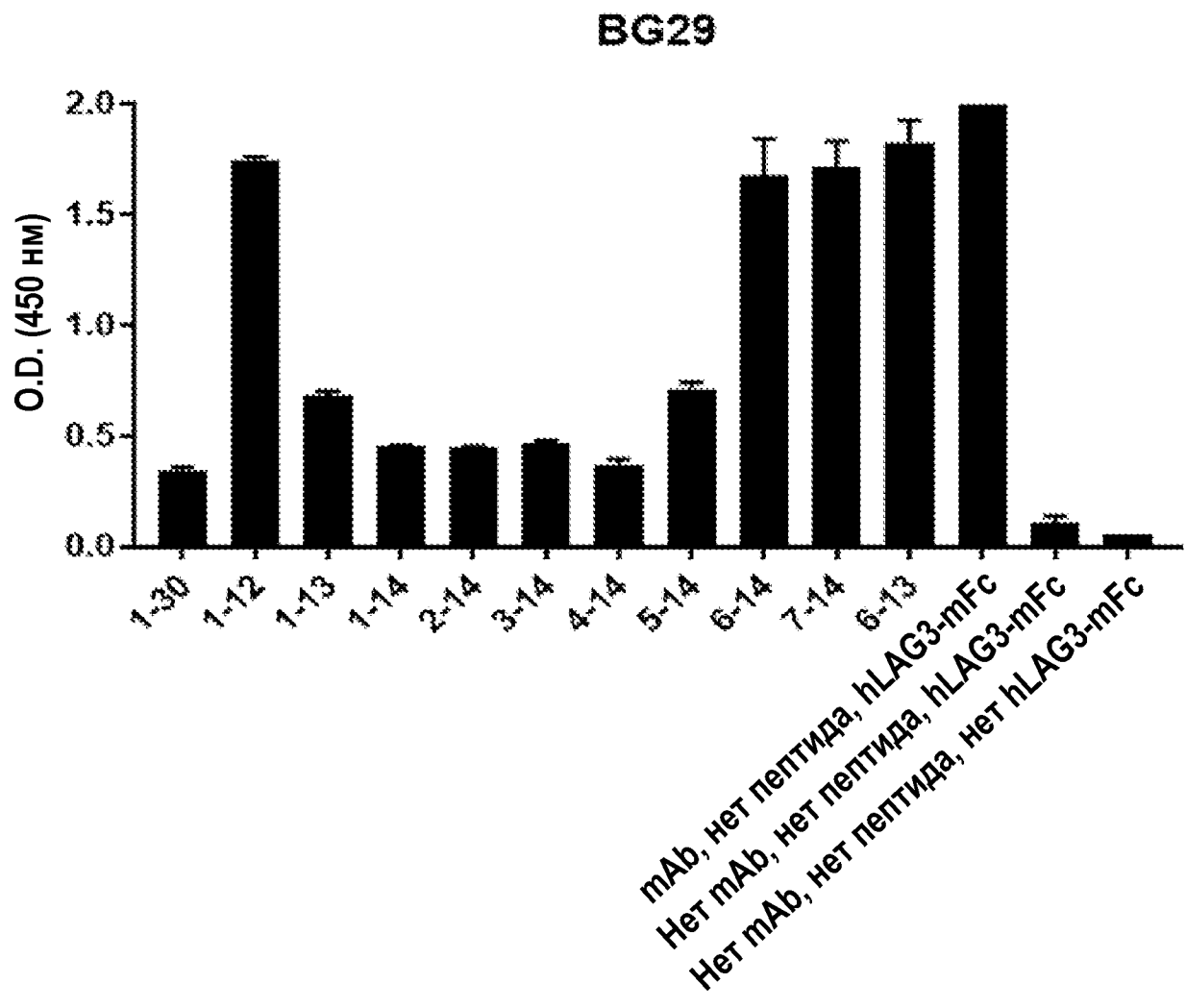
ФИГ.6



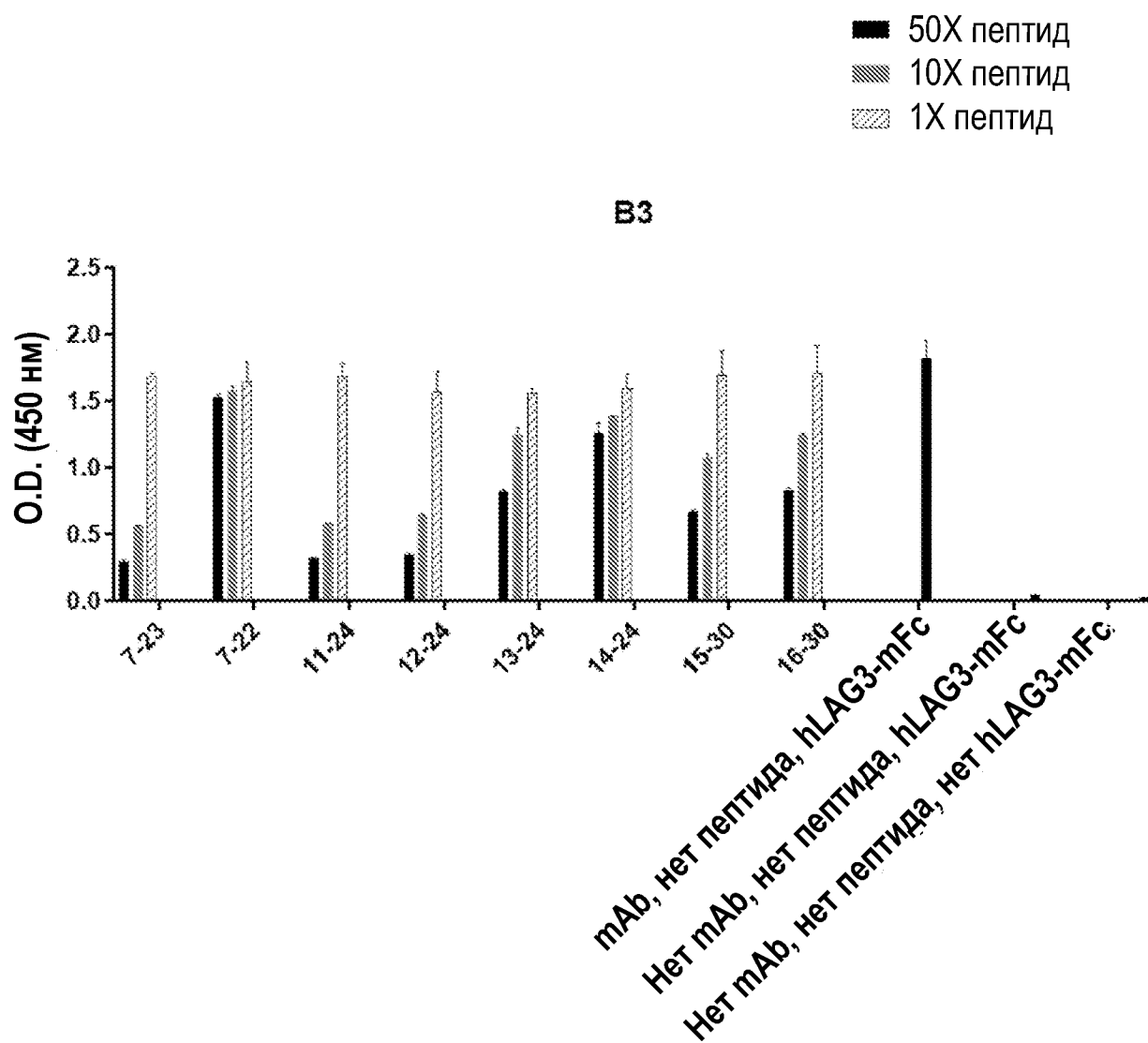
ФИГ.7



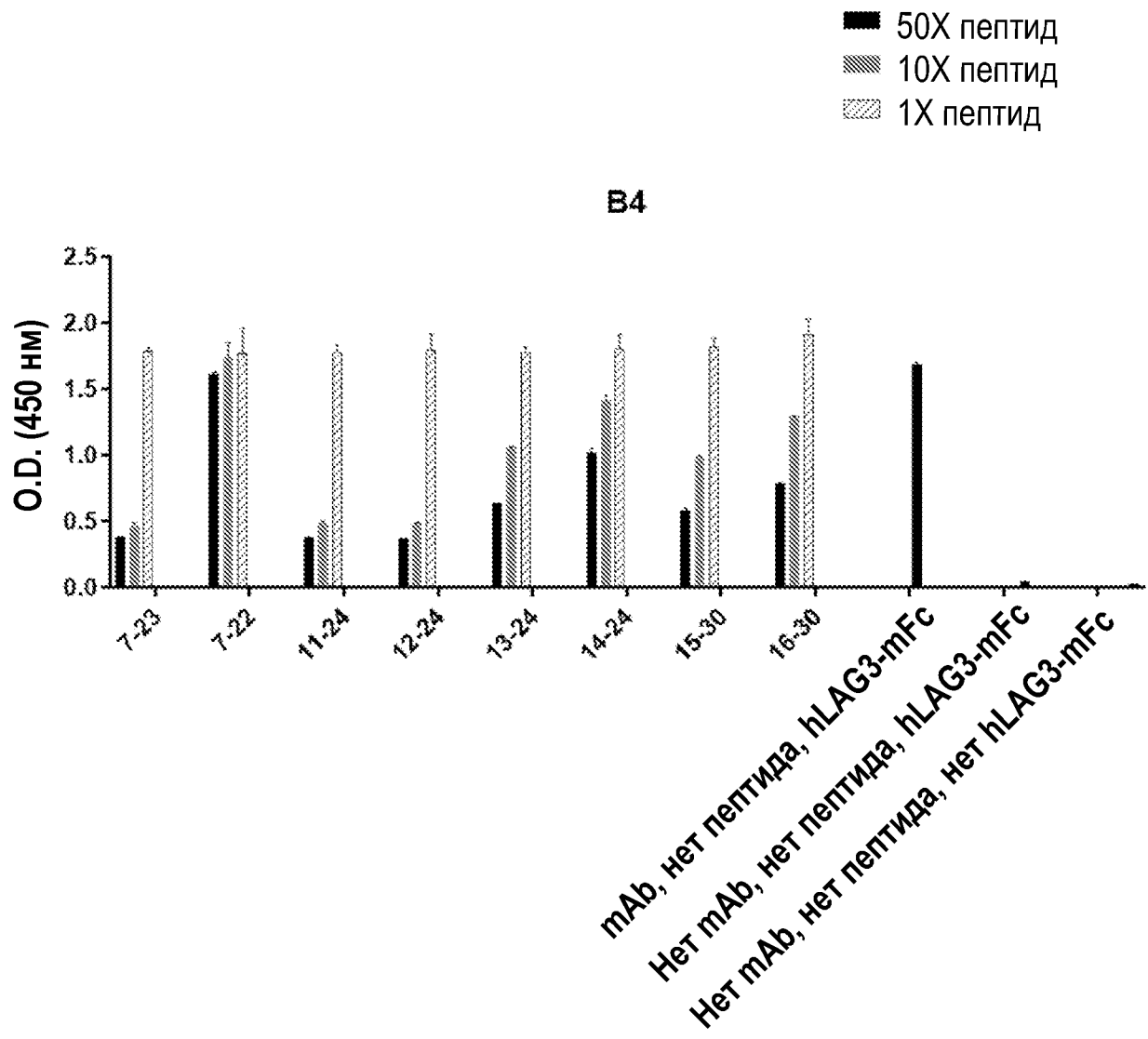
ФИГ.8



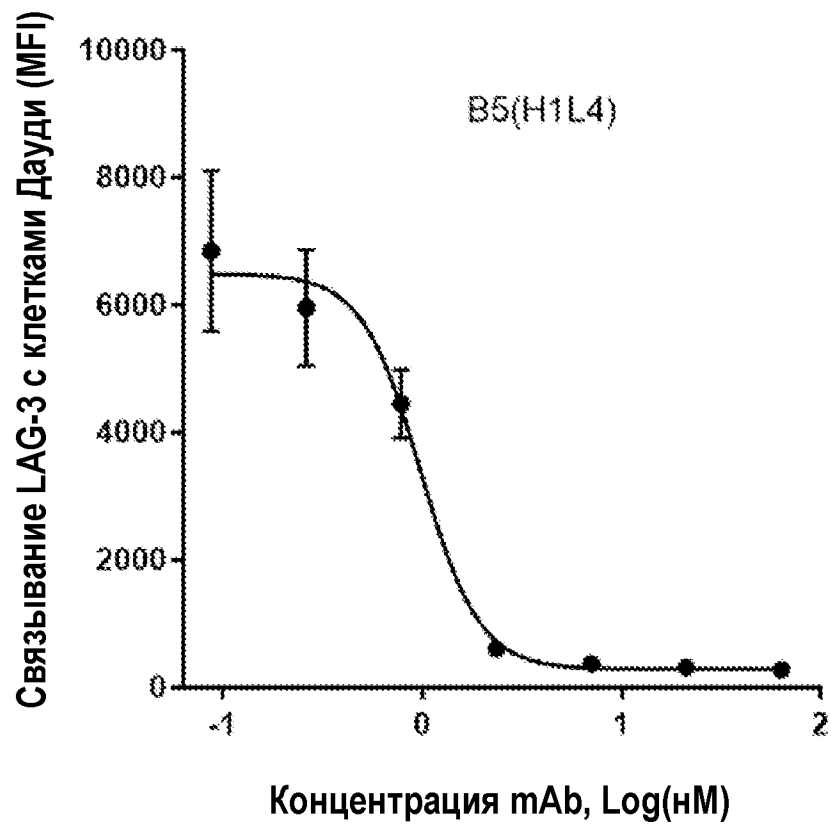
ФИГ.9А



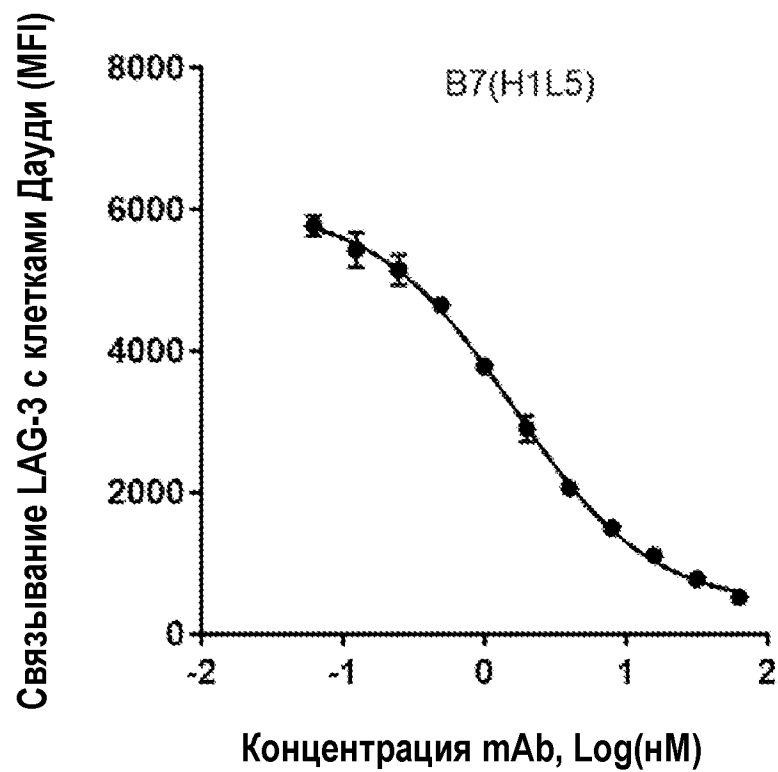
ФИГ.9В



ФИГ.10А



ФИГ.10В



ФИГ.10С

