



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.03

(21) Номер заявки
201890762

(22) Дата подачи заявки
2016.10.07

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К LAG3 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/239,524; 62/257,791; 62/315,119;
62/359,921; 62/365,006

(32) 2015.10.09; 2015.11.20; 2016.03.30;
2016.07.08; 2016.07.21

(33) US

(43) 2018.09.28

(86) PCT/US2016/056156

(87) WO 2017/062888 2017.04.13

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Уллман Эрика, Херманн Айнур,
Йоффе Элла, Бурова Елена, Тёрстон
Гевин (US)**

(74) Представитель:
**Урюмов В.М., Карпенко О.Ю., Лыу
Т.Н., Дементьев В.Н., Глухарёва А.О.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.,
Гизатуллина Е.М. (RU)**

(56) WO-A2-2010019570
WO-A1-2014140180
WO-A1-2015138920

Anonymous: "NCT01968109 on
2015_09_03:", ClinicalTrials.gov Archive, 3
September 2015 (2015-09-03), pages
1-6, XP055328270, Retrieved from the
Internet: URL:https://clinicaltrials.gov/archive/NCT
01968109/2015_09_03 [retrieved on 2016-12-12]

LINH T. NGUYEN ET AL.: "Clinical
blockade of PD1 and LAG3 - potential mechanisms
of action", NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY,
vol. 15, no. 1, 23 December 2014 (2014-12-23),
pages 45-56, XP055216541, ISSN: 1474-1733, DOI:
10.1038/nri3790

RUEA-YEA HUANG ET AL.: "LAG3 and
PD1 co-inhibitory molecules collaborate to limit CD8
+ T cell signaling and dampen antitumor immunity
in a murine ovarian cancer model", ONCOTARGET,
vol. 6, no. 29, 23 July 2015 (2015-07-23), pages
27359-27377, XP055328090, United States ISSN:
1949-2553, DOI: 10.18632/oncotarget.4751

US-A1-2013095114

RUDIKOFF S. ET AL.: "Single amino
acid substitution altering antigen-binding specificity",
PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY
OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF
SCIENCES, US, vol. 79, 1 March 1982 (1982-03-01),
pages 1979-1983, XP007901436, ISSN: 0027-8424,
DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979

YEE WAH WONG ET AL.: "Structural
Requirements for a Specificity Switch and for
Maintenance of Affinity Using Mutational Analysis
of a Phage-Displayed Anti-Arsonate Antibody
of Fab Heavy Chain First Complementarity-
Determining Region", THE JOURNAL OF
IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION
OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 160, 1 January
1998 (1998-01-01), pages 5990-5997, XP007916801,
ISSN: 0022-1767

JEFFEREY R. JACKSON: "In Vitro Antibody
Maturation Improvement of a High Affinity,
Neutralizing Antibody Against IL-1 beta", THE
JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 154, 1 January
1995 (1995-01-01), pages 3310-3319, XP055033979

(57) Изобретение относится к антителам, которые связываются с белком, кодируемым геном-3 активации лимфоцитов (LAG3), представляющим собой коингибитор Т-клеток, и способам их применения. Согласно различным вариантам осуществления настоящего изобретения антитела являются полностью человеческими антителами, которые специфически связываются с LAG3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению являются пригодными для ингибирования или нейтрализации активности LAG3, обеспечивая тем самым средства для лечения заболевания или нарушения, такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые специфически связываются с иммуномодулирующим рецептором, кодируемым геном-3 активации лимфоцитов (LAG3), и терапевтическим и диагностическим способам применения таких антител.

Перечень последовательностей

Официальная копия перечня последовательностей подана одновременно с настоящим описанием в электронном виде посредством EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII с названием файла 2016_10_07_10176WO01_SEQ_LIST_ST25.txt, дата создания 7 октября 2016 года, и размером приблизительно 240 килобайт. Перечень последовательностей, содержащийся в этом документе формата ASCII, является частью настоящего описания и включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения Т-клеточные костимулирующие и коингибирующие молекулы (в совокупности называемые косигнальными молекулами) играют ключевую роль в регуляции активации Т-клеток, дифференцировки в определенную субпопуляцию, эффекторной функции и выживания (Chen et al 2013, Nature Rev. Immunol. 13: 227-242). После распознавания Т-клеточным рецептором когнатных комплексов пептид-МНС на поверхности антиген-представляющих клеток, косигнальные рецепторы совместно локализуются с Т-клеточными рецепторами в зоне иммунного синапса, где они действуют синергически с передачей сигнала с участием TCR для содействия или ингибирования активации и функции Т-клеток (Flies et al 2011, Yale J. Biol. Med. 84: 409-421). Конечный иммунный ответ регулируется отношением костимулирующих и коингибирующих сигналов ("иммунологические контрольные точки") (Pardoll 2012, Nature Reviews Cancer 12: 252-264). Белок, кодируемый геном-3 активации лимфоцитов (LAG3), выполняет функцию такой "иммунологической контрольной точки" в опосредовании толерантности периферических Т-клеток. LAG3 (также называемый CD223) представляет собой трансмембранный белковый рецептор размером 503 аминокислоты, экспрессируемый на поверхности активированных CD4 и CD8 Т-клеток, $\gamma\delta$ Т-клеток, естественных Т-клеток-киллеров, В-клеток, естественных клеток-киллеров, плазматоидных дендритных клеток и регуляторных Т-клеток. LAG3 является представителем суперсемейства иммуноглобулинов (Ig). Основной функцией LAG3 является ослабление иммунного ответа. Связывание LAG3 с молекулами МНС класса II приводит к передаче отрицательного сигнала экспрессирующим LAG3 клеткам и обуславливает подавление антигензависимых CD4 и CD8 Т-клеточных ответов. LAG3 осуществляет отрицательную регуляцию способности Т-клеток пролиферировать, продуцировать цитокины и лизировать целевые клетки, что называют "истощением" Т-клеток. Сообщалось, что LAG3 также играет роль в усилении функции регуляторных Т-клеток (Treg) (Pardoll 2012, Nature Reviews Cancer 12: 252-264).

Поскольку LAG3 играет важную роль в противоопухолевом иммунитете и противоинфекционном иммунитете, он является идеальной мишенью для иммунотерапии. Блокирование LAG3 антагонистами, включая моноклональные антитела, изучали в рамках лечения злокачественной опухоли и хронических вирусных инфекций (Turnis et al 2015, Eur. J. Immunol. 45: 1892-1905).

Моноклональные антитела к LAG3 известны в данной области, и они были описаны, например, в патенте США/публикации №№ 5976877, 6143273, 6197524, 8551481, 20110070238, 20110150892, 20130095114, 20140093511, 20140127226, 20140286935, и в WO95/30750, WO97/03695, WO98/58059, WO2004/078928, WO2008/132601, WO2010/019570, WO2014/008218, EP0510079B1, EP0758383B1, EP0843557B1, EP0977856B1, EP1897548B2, EP2142210A1 и EP2320940B1.

В рамках разработки иммунотерапии для лечения людей существует потребность в антителах, характеризующихся определенными свойствами, такими как низкая иммуногенность, подходящие кинетические параметры связывания, перекрестная реактивность с мишенью обезьяны, подходящая активность *in vitro* и/или подходящая активность *in vivo*.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают LAG3. Антитела по настоящему изобретению пригодны, среди прочего, для целенаправленного воздействия на экспрессирующие LAG3 иммунные клетки и для модулирования активности LAG3. Согласно определенным вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению пригодны для ингибирования или нейтрализации активности LAG3 и/или для стимулирования активации Т-клеток, например, в тех случаях, когда благоприятным или желательным является опосредованное Т-клетками уничтожение. Согласно определенным вариантам осуществления антитела пригодны для ингибирования регуляторной функции Т-клеток и/или для обращения анергического состояния истощенных Т-клеток. Антитела к LAG3 по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие части могут быть включены как часть полиспецифической антигенсвязывающей молекулы, например, для модуляции иммунного ответа и/или для нацеливания антител на определенный тип клеток, как, например, опухолевую клетку или инфицированную вирусом клетку. Антитела являются пригодными в лечении заболевания или нарушения, такого как злокачественная опухоль (злокачественное новообразование, рак) и вирусная инфекция.

Антитела по настоящему изобретению могут быть полноразмерными (например, IgG1- или IgG4-

антитело) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, Fab-, F(ab')₂- или scFv-фрагмент), и могут быть модифицированы с возможностью воздействия на функциональные свойства, например, для устранения остальных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933). Согласно определенным вариантам осуществления антитела могут быть биспецифическими.

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к выделенным рекомбинантным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с LAG3. Согласно определенным вариантам осуществления антитела являются полностью человеческими.

Иллюстративные антитела к LAG3 по настоящему изобретению приведены в табл.1-3 в настоящем документе. В табл.1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител к LAG3. В табл.2 представлены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител к LAG3. В табл.3 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей для последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи иллюстративных антител к LAG3.

Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл.1 аминокислотных последовательностей HCVR, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся с ней по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл.1 аминокислотных последовательностей LCVR, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся с ней по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), предусматривающую любую из приведенных в табл.1 аминокислотных последовательностей HCVR в паре с любой из приведенных в табл.1 аминокислотных последовательностей LCVR. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в пределах любого из приведенных в табл.1 иллюстративных антител к LAG3. Согласно определенным вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546 и 554/562. Согласно определенным вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из одной из SEQ ID NO: 386/394 (например, H4sH15479P), 418/426 (например, H4sH15482P) или 538/546 (например, H4sH14813N). Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам к LAG3 или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR содержит приведенную в табл.1 аминокислотную последовательность не более чем с пятью аминокислотными заменами, и причем указанная LCVR содержит приведенную в табл.1 аминокислотную последовательность не более чем с пятью аминокислотными заменами. Например, настоящее изобретение относится к антителам к LAG3 или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 418 не более чем с пятью аминокислотными заменами, а указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 426 не более чем с пятью аминокислотными заменами.

Согласно другому иллюстративному варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителам к LAG3 или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 418 по меньшей мере с одной аминокислотной заменой, а указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 426 с одной аминокислотной заменой.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл.1 аминокислотных последовательностей HCDR1, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбран-

денных в табл.3 аминокислотных последовательностей HC, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся с ней по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл.3 аминокислотных последовательностей LC, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся с ней по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HC и LC (HC/LC), предусматривающую любую из приведенных в табл.3 аминокислотных последовательностей HC в паре с любой из приведенных в табл.3 аминокислотных последовательностей LC. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HC/LC, содержащуюся в пределах любого из приведенных в табл.3 иллюстративных антител к LAG3. Согласно определенным вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HC/LC выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 577/578, 579/578 и 580/581.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (т. е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в пределах любого из приведенных в табл.1 иллюстративных антител к LAG3. Согласно определенным вариантам осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 388-390-392-396-398-400 (например, H4sH15479P), 420-422-424-428-430-432 (например, H4sH15482P) и 540-542-544-548-550-552 (например, H4sH14813N).

Согласно сходному варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (т. е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в пределах пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено для любого из приведенных в табл.1 иллюстративных антител к LAG3. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в пределах пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 386/394 (например, H4sH15479P), 418/426 (например, H4sH15482P) и 538/546 (например, H4sH14813N). Способы и методики идентификации CDR в пределах аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR хорошо известны в данной области, и их можно применять для идентификации CDR в пределах аминокислотных последовательностей определенных HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем документе. Иллюстративные общепринятые подходы, которые можно применять для идентификации границ CDR, включают, например, определение по Kabat, определение по Chothia и определение на основе модели антитела. В общих чертах, определение по Kabat основывается на вариабельности последовательностей, определение по Chothia основывается на расположении областей структурных петель, а определение на основе модели антитела является компромиссом между подходами по Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al, J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Для идентификации последовательностей CDR в пределах антитела также можно использовать общедоступные базы данных.

Настоящее изобретение включает антитела к LAG3 с модифицированным профилем гликозилирования. Согласно некоторым вариантам осуществления может быть пригодна модификация с удалением нежелательных сайтов гликозилирования или отсутствие у антитела фукозного фрагмента, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, с целью усиления функции, представляющей собой антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Согласно другим вариантам применения, с целью модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC) можно выполнять модификацию в отношении галактозилирования.

Настоящее изобретение включает антитела к LAG3, содержащие Fc-домен, где Fc-домен предусматривает изотипы IgG1 или IgG4, как описано в другом месте настоящего документа. Согласно определенным вариантам осуществления Fc-домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 569, 570, 571, 572 и 573.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые конкурируют за специфическое связывание с LAG3 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащими CDR HCVR и CDR LCVR, где каждый из HCVR и LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из приведенных в табл.1 последовательностей HCVR и LCVR.

Настоящее изобретение также относится к выделенным антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые блокируют связывание LAG3 с MHC класса II. Согласно некоторым вариантам

осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые блокируют связывание LAG3, могут связываться с тем же эпитопом на LAG3, что и МНС класса II, или могут связываться с другим эпитопом на LAG3, чем МНС класса II.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с LAG3 человека или другого вида. Согласно определенным вариантам осуществления антитела могут связываться с LAG3 человека и/или с LAG3 обезьяны.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые перекрестно конкурируют за связывание с LAG3 с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащими CDR HCVR и CDR LCVR, где каждый из HCVR и LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из приведенных в табл.1 последовательностей HCVR и LCVR.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR HCVR и CDR LCVR, где каждый из HCVR и LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из приведенных в табл.1 последовательностей HCVR и LCVR. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR HCVR и CDR LCVR, где пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR содержит SEQ ID NO: 418/426.

Настоящее изобретение также включает антитела к LAG3, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в пределах внеклеточного домена LAG3 человека (SEQ ID NO: 588). Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам к LAG3 и их антигенсвязывающим фрагментам, которые взаимодействуют с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из (a) аминокислот 28-69 SEQ ID NO: 588; (b) аминокислот 28-71 SEQ ID NO: 588; (c) аминокислот 31-52 SEQ ID NO: 588 и (d) аминокислот 32-69 SEQ ID NO: 588. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам к LAG3 и их антигенсвязывающим фрагментам, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в пределах SEQ ID NO: 589, например, настоящее изобретение относится к антителам к LAG3 и их антигенсвязывающим фрагментам, которые взаимодействуют по меньшей мере с 5 аминокислотами, по меньшей мере 10 аминокислотами или по меньшей мере 20 аминокислотами, содержащимися в пределах SEQ ID NO: 589. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам к LAG3 и их антигенсвязывающим фрагментам, которые взаимодействуют с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 589 (соответствующей аминокислотам 28-71 SEQ ID NO: 588).

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантному моноклональному антителу человека или его антигенсвязывающему фрагменту, которые обладают одной или несколькими из следующих характеристик: (a) специфически связывается с LAG3 человека и/или LAG3 яванского макака; (b) блокирует связывание LAG3 с МНС класса II; (c) блокирует индуцированную LAG3 негативную регуляцию Т-клеток и обеспечивает возобновление передачи сигнала с участием Т-клетки; и (d) обеспечивает подавление роста опухоли и повышение выживаемости субъекта со злокачественной опухолью.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут специфически связываться с LAG3 как агонисты, т.е. они могут усиливать или стимулировать связывание и/или активность LAG3; согласно другим вариантам осуществления антитело может специфически связываться с LAG3 как антагонист, т. е. оно может блокировать связывание LAG3 с его лигандом.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению являются биспецифическими, при этом они предусматривают первую специфичность связывания в отношении LAG3, и вторую специфичность связывания в отношении второго целевого эпитопа. Второй целевой эпитоп может представлять собой другой эпитоп на LAG3 или другом белке. Согласно определенным вариантам осуществления второй целевой эпитоп может находиться на поверхности другой клетки, включая другую Т-клетку, В-клетку, опухолевую клетку или инфицированную вирусом клетку.

Согласно второму аспекту настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим антитела к LAG3 или их части. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим любую из приведенных в табл.1 аминокислотных последовательностей HCVR; согласно определенным вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл.2 последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих HCVR, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся с ней по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим любую из приведенных в табл.1 аминокислотных последовательностей LCVR; согласно определенным вариантам

характеризующуюся с ней по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей, и полинуклеотидную последовательность, выbranную из любой из приведенных в табл.2 последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих LCVR, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся с ней по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей. Согласно определенным вариантам осуществления в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где как HCVR, так и LCVR происходят из одного и того же приведенного в табл.1 антитела к LAG3.

Настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим любую из приведенных в табл.3 аминокислотных последовательностей тяжелой цепи. Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим любую из приведенных в табл.3 аминокислотных последовательностей легкой цепи.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим как тяжелую цепь (HC), так и легкую цепь (LC), где HC содержит аминокислотную последовательность из любой из приведенных в табл.3 аминокислотных последовательностей HC, и где LC содержит аминокислотную последовательность из любой из приведенных в табл.3 аминокислотных последовательностей LC.

Согласно сходному аспекту настоящее изобретение относится к рекомбинантным векторам экспрессии, способным экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой или легкой цепей антитела к LAG3. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из молекул нуклеиновых кислот, упоминаемых выше, т.е. молекул нуклеиновых кислот, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в табл.1. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным векторам экспрессии, способным экспрессировать полипептид, содержащий тяжелую или легкую цепи антитела к LAG3. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из молекул нуклеиновых кислот, упоминаемых выше, т.е. молекул нуклеиновых кислот, кодирующих любую из последовательностей тяжелой цепи или легкой цепи, представленных в табл.3. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые вводили такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих возможность продукции антител или фрагментов антител, и выделения полученных таким образом антител и фрагментов антител.

Согласно третьему аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантное антитело человека или его фрагмент, которые специфически связывают LAG3, и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно сходному аспекту в настоящем изобретении описана композиция, которая представляет собой комбинацию антитела к LAG3 и второго терапевтического средства. Согласно одному варианту осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое с преимущественным результатом комбинируется с антителом к LAG3. Иллюстративные средства, которые можно с преимущественным результатом комбинировать с антителом к LAG3, включают без ограничения другие средства, которые связывают LAG3 и/или модулируют передачу сигнала с его участием (включая другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.), и/или средства, которые не связывают LAG3 прямо, однако при этом модулируют активацию иммунных клеток. Дополнительные комбинированные терапевтические препараты и составы, предусматривающие антитела к LAG3 по настоящему изобретению, раскрыты в другом месте настоящего документа.

Согласно четвертому аспекту настоящее изобретение относится к способам модуляции иммунного ответа у субъекта, причем способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела к LAG3 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам усиления иммунного ответа у субъекта, причем способы предусматривают введение субъекту эффективного количества антитела или его фрагмента по настоящему изобретению, которые связывают LAG3. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу стимуляции или усиления активации Т-клеток у субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам возобновления активности Т-клетки, предусматривающим приведение Т-клетки в контакт с эффективным количеством антитела по настоящему изобретению, за счет чего происходит возобновление активности Т-клетки. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способам ингибирования регуляторной Т-клетки (Treg) у субъекта, причем способы предусматривают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам осуществления нуждающийся субъект может страдать от заболевания или нарушения, такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам освобождения от опосредованного LAG3 ингибирования активности Т-клетки, предусматривающим приведение Т-клетки в контакт с эффективным количеством антитела по настоящему изобретению.

Согласно пятому аспекту настоящее изобретение относится к терапевтическим способам лечения у субъекта заболевания или нарушения, такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция, с применением антитела к LAG3 или антигенсвязывающей части антитела по настоящему изобретению, где терапевтические способы предусматривают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или фрагмент антитела по настоящему изобретению. Подлежащее лечению нарушение представляет собой любое заболевание или состояние, которое ослабляют, течение которого улучшают, которое ингибируют или предупреждают с помощью стимуляции или ингибирования активности LAG3 или передачи сигнала с его участием. Согласно определенным вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению вводят нуждающемуся в этом субъекту в комбинации со вторым терапевтическим средством. Второе терапевтическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из антитела к другому коингибитору Т-клетки, антитела к антигену опухолевой клетки, антитела к Т-клеточному рецептору, антитела к эпитопу на инфицированной вирусом клетке, цитотоксического средства, противоопухолевого лекарственного средства, противовирусного лекарственного средства, противовоспалительного лекарственного средства (например, кортикостероидов), химиотерапевтического средства, лучевой терапии, иммунодепрессанта и любого другого лекарственного средства или вида терапии, известных в данной области. Согласно определенным вариантам осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой средство, которое способствует нейтрализации или уменьшению выраженности любого(-ых) побочного(-ых) эффектов), ассоциированного(-ых) с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению, если такой(-ие) побочный(-ые) эффект(-ы) вдруг возникают.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам подавления роста опухоли. Например, настоящее изобретение относится к подавлению роста опухоли в случае первичной опухоли или метастатической опухоли у субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам повышения выживаемости (например, выживаемости без прогрессирования или общей выживаемости) субъекта со злокачественной опухолью. Примеры злокачественной опухоли включают без ограничения первичную и/или рецидивную злокачественную опухоль, включая злокачественное новообразование кроветворной ткани (например, злокачественное заболевание системы крови, такое как лимфома, миелома или лейкоз), рак головного мозга (например, мультиформную глиобластому), рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого), плоскоклеточную карциному головы и шеи, гепатоцеллюлярную карциному, почечно-клеточную карциному, меланому, мезотелиому, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак кости, рак толстой и прямой кишки, рак предстательной железы и рак толстой кишки. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам ингибирования или подавления роста развившихся опухолей. Способы предусматривают введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела к LAG3 по настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам осуществления антитело вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством, выбранным из группы, состоящей из ингибитора белка-1 запрограммированной гибели клеток (PD-1) (например, антитела к PD-1, такого как ниволумаб или REGN2810), ингибитора лиганда белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-L1) (например, антитела к PD-L1), антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (например, афлиберцепта, бевацизумаба), ингибитора ангиопоэтина-2 (Ang2) (например, антитела к Ang2, такого как несвакумаб), ингибитора антигена-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4) (например, ипилимумаба), биспецифического антитела к CD20×CD3, цитотоксина, химиотерапевтического средства и лучевой терапии. Дополнительные примеры дополнительных видов терапии/терапевтических средств, которые можно применять в комбинации с антителом к LAG3 по настоящему изобретению для применения в лечении злокачественной опухоли, описаны в другом месте настоящего документа.

Антитело или его фрагмент можно вводить подкожно, внутривенно, внутрикожно, внутривнутрино, перорально, внутримышечно или интракраниально. Антитело или его фрагмент можно вводить в дозе от приблизительно 0,1 мг/кг веса тела до приблизительно 100 мг/кг веса тела субъекта.

Настоящее изобретение также включает применение антитела к LAG3 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие блокирование связывания LAG3 и/или передачи сигнала с его участием, такое как злокачественная опухоль.

Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора нижеследующего подробного описания.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлено схематическое изображение биологического анализа LAG3 на основе определения активности люциферазы, описанного в примере 8 в настоящем документе. Панель (А): Способ "на основе биспецифического антитела": Неактивные происходящие из Jurkat Т-клетки были активированы за счет кластеризации Т-клеточного рецептора (TCR) посредством биспецифического антитела к CD3×CD20. Панель (В): Способ "с примириванием пептидом": В этом способе неактивные происходя-

щие из Jurkat Т-клетки были активированы специфическим комплексом МНС/пептид (гетеродимер ТCR клона Ob2F3 с белком МНСII, HLA-DR2AB, в комплексе с пептидом MBP85-99). Связывание LAG3 с DR2 ослабляет ответ происходящих из Jurkat активированных Т-клеток. Блокирующее антитело к LAG3 возобновляет ответ происходящих из Jurkat активированных Т-клеток.

На фиг. 2А-2В приведены результаты по *in vivo* эффективности антитела к LAG3 мыши отдельно и в комбинации с антителом к PD-1 мыши в отношении развившихся опухолей Colon 26 (описано в примере 10). Фиг. 2А. Показатели среднего объема опухоли ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$) в каждой группе обработки измеряли в нескольких моментах времени после имплантации опухолевых клеток. Обработку начинали в день 14, когда средний объем опухоли достигал 50 мм^3 . Дни обработки указаны стрелками. Все антитела вводили внутривентриально (*i.p.*) в концентрации 10 мг/кг. Фиг. 2В. Отдельные показатели объема опухоли в каждой группе обработки измеряли в день 35 после имплантации. Статистическую значимость определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта для множественного сравнения (* $p < 0,05$). Фиг. 2А-2В. Группы обработки: изотипические контроли IgG2a крысы + контрольное IgG1-антитело мыши: (●); антитело к PD-1 мыши + контрольное IgG1 мыши (▲); антитело к LAG3 мыши + контрольное IgG2a крысы (■); антитело к PD-1 мыши + антитело к LAG3 мыши (▼).

На фиг. 3А-3В приведены результаты по *in vivo* эффективности антитела к LAG3 мыши отдельно и в комбинации с антителом к PD-1 мыши в отношении развившихся опухолей MC38 (описано в примере 11). Фиг. 3А. Показатели среднего объема опухоли ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$) в каждой группе обработки измеряли в нескольких моментах времени после имплантации опухолевых клеток. Обработку начинали в день 8, когда средний объем опухоли достигал 45 мм^3 . Дни обработки указаны стрелками. Фиг. 3В. Отдельные показатели объема опухоли в каждой группе обработки измеряли в день 23 после имплантации. Статистическую значимость определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта для множественного сравнения (*** $p < 0,0001$). Фиг. 3А-3В. Группы обработки: изотипические контроли IgG2a крысы + IgG1 мыши (●); антитело к PD-1 мыши + контрольное mIgG1 (▲); антитело к LAG3 мыши + контрольное IgG2a крысы (■); и антитело к PD-1 мыши + антитело к LAG3 мыши (▼).

На фиг. 4А-4В показаны уровни экспрессии генов IFN γ и CD8b мыши (нормализованные к уровням экспрессии циклофилина В мыши), определенные с помощью анализа Taqman, в дренирующих лимфатических узлах (DLN) (А) и селезенке (В), выделенных по окончании эксперимента (описанного в примере 11) от несущих опухоль мышей. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

На фиг. 5А-5В приведены результаты по *in vivo* эффективности антитела к LAG3 человека ("mAb1") и антитела к PD-1 человека (REGN2810) в отношении опухолей MC38 (описано в примере 12). Фиг. 5А. Показатели среднего объема опухоли ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$) в каждой группе обработки в нескольких моментах времени после имплантации опухолевых клеток. Дни обработки указаны стрелками. Фиг. 5В. Отдельные показатели объема опухоли в каждой группе отслеживали в течение 24 дней. Приведено число мышей без опухоли в каждой группе к дню 24. Фиг. 5А-5В. Группы обработки: mAb1 (антитело к hLAG3) в концентрации 25 мг/кг (■); REGN2810 (антитело к hPD-1) в концентрации 10 мг/кг (▲) и изотипическое контрольное антитело человека в концентрации 25 мг/кг (●).

На фиг. 6А-6С приведены результаты по *in vivo* эффективности антитела к LAG3 человека ("mAb1") отдельно и в комбинации с антителом к PD-1 человека (REGN2810) в отношении опухолей MC38 (описано в примере 13). Фиг. 6А. Показатели среднего объема опухоли ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$) в каждой группе обработки в нескольких моментах времени после имплантации опухолевых клеток. Дни обработки указаны стрелками. Фиг. 6В. Отдельные показатели объема опухоли в каждой группе обработки измеряли в день 22 после имплантации. Статистическую значимость определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта для множественного сравнения (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Фиг. 6А-6В. Группы обработки: mAb1 (антитело к hLAG3) в концентрации 25 мг/кг (◆); REGN2810 (антитело к hPD-1) в концентрации 10 мг/кг (■); комбинация mAb1 (антитела к hLAG3) в концентрации 25 мг/кг и REGN2810 (антитела к hPD-1) в концентрации 10 мг/кг (▲); изотипическое контрольное антитело человека в концентрации 25 мг/кг (●). Фиг. 6С. Процент выживаемости без опухоли среди обработанных мышей. Статистическую значимость определяли с помощью логарифмического рангового критерия (Мантеля-Кокса) (*** $p < 0,0001$). Группы обработки: mAb1 (антитело к hLAG3) в концентрации 25 мг/кг (◆); REGN2810 (антитело к hPD-1) в концентрации 10 мг/кг (▼); комбинация mAb1 (антитела к hLAG3) в концентрации 25 мг/кг и REGN2810 (антитела к hPD-1) в концентрации 10 мг/кг (▲); изотипическое контрольное антитело человека в концентрации 25 мг/кг (●).

На фиг. 7А-7С приведены результаты по *in vivo* эффективности антитела к LAG3 человека ("mAb1") отдельно и в комбинации с антителом к PD-1 человека (REGN2810) в отношении опухолей MC38 в первом эксперименте (описанном в примере 14). Фиг. 7А. Показатели среднего объема опухоли ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$) в каждой группе обработки в нескольких моментах времени после имплантации опухолевых клеток. Дни обработки указаны стрелками. Фиг. 7В. Отдельные показатели объема опухоли в каждой группе обработки измеряли в день 22 после имплантации. Статистическую значимость определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта для множествен-

ного сравнения (* $p < 0,05$) фиг. 7С. Процент выживаемости без опухоли среди обработанных мышей. Статистическую значимость определяли с помощью логарифмического рангового критерия (Мантеля-Кокса) (* $p < 0,0197$). Группы обработки: mAb1 (антитело к hLAG3) в концентрации 25 мг/кг (◆); REGN2810 (антитело к hPD-1) в концентрации 10 мг/кг (●); REGN2810 (антитело к hPD-1) в концентрации 1 мг/кг (▲); комбинация mAb1 (антитела к hLAG3) в концентрации 25 мг/кг и REGN2810 (антитела к hPD-1) в концентрации 10 мг/кг (■); комбинация mAb1 (антитела к hLAG3) в концентрации 25 мг/кг и REGN2810 (антитела к hPD-1) в концентрации 1 мг/кг (▼) и изотипическое контрольное антитело человека в концентрации 25 мг/кг (●).

На фиг. 8А-8С приведены результаты по *in vivo* эффективности антитела к LAG3 человека ("mAb1") отдельно и в комбинации с антителом к PD-1 человека (REGN2810) в отношении опухолей MC38 во втором эксперименте (описанном в примере 14). Фиг. 8А. Показатели среднего объема опухоли ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$) в каждой группе обработки в нескольких моментах времени после имплантации опухолевых клеток. Дни обработки указаны стрелками. Статистическую значимость определяли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта для множественного сравнения (* $p < 0,05$). Фиг. 8В. Отдельные показатели объема опухоли в каждой группе обработки, измеренные в день 23 после имплантации. Статистическую значимость определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта для множественного сравнения (** $p < 0,01$). Фиг. 8С. Процент выживаемости без опухоли среди обработанных мышей. Статистическую значимость определяли с помощью логарифмического рангового критерия (Мантеля-Кокса) с поправкой Бонферрони для множественных сравнений (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$). Группы обработки: mAb1 (антитело к hLAG3) в концентрации 25 мг/кг (◆); mAb1 (антитело к hLAG3) в концентрации 5 мг/кг (●); REGN2810 (антитело к hPD-1) в концентрации 10 мг/кг (▲); комбинация mAb1 (антитела к hLAG3) в концентрации 25 мг/кг и REGN2810 (антитела к hPD-1) в концентрации 10 мг/кг (■); комбинация mAb1 (антитела к hLAG3) в концентрации 5 мг/кг и REGN2810 (антитела к hPD-1) в концентрации 10 мг/кг (▼) и изотипическое контрольное антитело человека в концентрации 25 мг/кг (●).

На фиг. 9 приведены показатели среднего объема опухоли ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$) в каждой группе обработки в нескольких моментах времени после имплантации опухолевых клеток в эксперименте для оценки эффективности антитела к LAG3 человека ("mAb1") отдельно и в комбинации с антителом к PD-1 человека (REGN2810) в отношении развившихся опухолей MC38 (описано в примере 15 в настоящем документе). Дни обработки указаны стрелками.

На фиг. 10 приведены отдельные показатели объема опухоли в каждой группе обработки, измеренные в день 22 после имплантации в эксперименте, описанном в примере 15. Статистическую значимость определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта для множественного сравнения.

На фиг. 11 показан процент выживаемости без опухоли среди обработанных мышей в эксперименте, описанном в примере 15 в настоящем документе. Статистическую значимость определяли с помощью логарифмического рангового критерия (Мантеля-Кокса) с поправкой Бонферрони для множественных сравнений (** $p < 0,01$).

На фиг. 12 приведен график зависимости средних ($\pm \text{SD}$) концентраций функционального mAb1 в сыворотке крови от времени после однократной внутривенной инфузии mAb1 у самки яванского макака (описано в примере 16).

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Перед тем, как будут описаны способы по настоящему изобретению, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными способами и условиями проведения экспериментов, поскольку такие способы и условия могут различаться. Также следует понимать, что применяемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления, и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все применяемые в настоящем документе технические и научные термины имеют то же значение, которые обычно понятны рядовому специалисту в данной области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя для реализации на практике или тестирования настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, подобные или эквивалентные таковым, описанным в настоящем документе, предпочтительными являются способы и материалы, описанные в настоящем документе. Все упоминаемые в настоящем документе публикации включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Термин "LAG3" относится к белку, кодируемому геном-3 активации лимфоцитов, рецептору, являющемуся частью "иммунологической контрольной точки", или коингибитору Т-клетки, также известному как CD223. Аминокислотная последовательность полноразмерного LAG3 представлена в GenBank под номером доступа NP_002277.4, и также в настоящем документе указана как SEQ ID NO: 582. Термин "LAG3" также включает варианты белка LAG3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 574, 575 или 576. Термин "LAG3" включает рекомбинантный LAG3 или его фрагмент. Термин также охваты-

вает LAG3 или его фрагмент, соединенные, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или сигнальной последовательностью, например, ROR1. Например, термин включает последовательности, примером которых является SEQ ID NO: 575, содержащая на С-конце Fc мыши (mIgG2a), присоединенный к аминокислотным остаткам 29-450 полноразмерного LAG3. Варианты белка, примером которых является SEQ ID NO: 574, содержат на С-конце гистидиновую метку, присоединенную к аминокислотным остаткам 29-450 полноразмерного LAG3. Термин "LAG3" означает LAG3 человека, если не указано, что он происходит из вида, отличного от человека.

LAG3 является представителем суперсемейства иммуноглобулинов (Ig). LAG3 представляет собой трансмембранный белок I типа длиной 503 аминокислоты с четырьмя внеклеточными Ig-подобными доменами D1-D4, и он экспрессируется на поверхности активированных Т-клеток, естественных клеток-киллеров, В-клеток, плазматоидных дендритных клеток и регуляторных Т-клеток. Рецептор LAG3 связывается с молекулами МНС класса II, присутствующими на поверхности антиген-представляющих клеток (APC).

В контексте настоящего документа термин "коингибитор Т-клетки" относится к лиганду и/или рецептору, который модулирует иммунный ответ посредством активации или супрессии Т-клетки. Термин "коингибитор Т-клетки", также известный как косигнальная молекула Т-клеток, включает без ограничения белок-1 запрограммированной гибели клеток (PD-1), антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), В- и Т-лимфоцитарный аттенуатор (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, Т-клеточную молекулу-3, содержащую иммуноглобулиновый домен и домен муцина (TIM3), Т-клеточный иммунорецептор с иммуноглобулиновыми и ITIM-доменами (TIGIT; также известный как VSIG9), ассоциированный с лейкоцитами иммуноглобулин-подобный рецептор-1 (LAIR1; также известный как CD305), индуцируемый костимулятор Т-клеток (ICOS; также известный как CD278), супрессор активации Т-клеток, содержащий V-Ig-домен (VISTA) и CD 160.

Подразумевается, что в контексте настоящего документа термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулинов, состоящим из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных друг с другом дисульфидными связями (т.е. "молекулы полных антител"), а также их мультимерам (например, IgM) или их антигенсвязывающим фрагментам. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи ("HCVR" или "V_H") и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи ("LCVR" или "V_L") и константной области легкой цепи (C_L). V_H- и V_L-области дополнительно могут быть разделены на гиперварибельные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных, от amino-конца к карбокси-концу, в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут быть естественным или искусственным образом модифицированы. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определять на основе сравнительного анализа двух или более CDR.

Также возможно осуществление замены одного или нескольких остатков CDR или удаления одного или нескольких остатков CDR. В научной литературе были описаны антитела, в которых для возможности связывания можно обойтись без одной или двух CDR. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9:133-139) проанализировали области контакта антител с их антигенами основываясь на опубликованных данных о кристаллических структурах и сделали вывод, что в действительности только от приблизительно одной пятой до одной третьей доли остатков CDR контактируют с антигеном. Согласно работе Padlan, также было обнаружено множество антител, в которых одна или две CDR не содержали аминокислот, которые контактируют с антигеном (см. также Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, могут быть идентифицированы с учетом предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 зачастую не являются необходимыми), исходя из областей CDR по Kabat, находящихся за пределами CDR по Chothia, с помощью молекулярного моделирования и/или экспериментальным путем. Если CDR или ее остаток(-и) удалены, их, как правило, заменяют на аминокислоту, занимающую соответствующее положение в другой последовательности антитела человека, или консенсусом таких последовательностей. Положения в пределах CDR, по которым будут выполнены замены, и аминокислоты для замены также можно выбирать экспериментально. Экспериментальные замены могут представлять собой консервативные или неконсервативные замены.

Раскрытые в настоящем документе полностью человеческие моноклональные антитела к LAG3 по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии могут предусматривать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях варибельных доменов тяжелой и легкой цепей. Такие мутации легко могут быть установлены путем сравнения раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей, где одна или

несколько аминокислот в пределах одной или нескольких каркасных и/или CDR-областей подвергаются мутации с заменой на соответствующий(-е) остаток(-и) последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело, или соответствующий(-е) остаток(-и) другой последовательности зародышевой линии, или подлежат консервативной аминокислотной замене соответствующего(-их) остатка(-ов) зародышевой линии (такие изменения по отношению к последовательности в настоящем документе в совокупности называют "герминативными мутациями"). Специалист в данной области исходя из раскрытых в настоящем документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей легко сможет получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые предусматривают одну или несколько отдельных герминативных мутаций или их комбинации. Согласно определенным вариантам осуществления все из остатков каркасных и/или CDR-областей в пределах V_H - и/или V_L -доменов подвергаются обратной мутации к остаткам, обнаруживаемым в исходной последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело. Согласно другим вариантам осуществления только определенные остатки подвергаются обратной мутации к исходной последовательности зародышевой линии, например, только подвергнутые мутации остатки, обнаруживаемые в пределах 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только подвергнутые мутации остатки, обнаруживаемые в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам осуществления один или несколько из остатков каркасных и/или CDR-областей подвергаются мутации с заменой на соответствующий(-е) остаток(-и) другой последовательности зародышевой линии (т. е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально происходит антитело). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут предусматривать любую комбинацию двух или более герминативных мутаций в пределах каркасных и/или CDR-областей, например, где определенные отдельные остатки подвергаются мутации с заменой на соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, тогда как определенные другие остатки, которые отличаются от таковых в исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются, или их подвергают мутации с заменой на соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые предусматривают одну или несколько герминативных мутаций, можно без труда подвергать тестированию в отношении одного или нескольких требуемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в соответствующих случаях), сниженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, охвачены объемом настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также включает полностью человеческие моноклональные антитела к LAG3, содержащие варианты любых из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR с одной или несколькими консервативными заменами. Например, настоящее изобретение включает антитела к LAG3, содержащие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т. д. консервативными аминокислотными заменами по сравнению с любыми из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR.

Подразумевается, что в контексте настоящего документа термин "антитело человека" включает антитела с переменными и константными областями, происходящими из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. mAb человека по настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, вследствие мутаций, введенных посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или вследствие соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако подразумевается, что в контексте настоящего документа термин "антитело человека" не включает mAb, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши), были привиты на последовательности FR человека. Термин включает антитела, полученные рекомбинантным путем у отличного от человека млекопитающего или в клетках отличного от человека млекопитающего. Подразумевается, что термин не включает антитела, вырабатываемые в организме субъекта-человека, или взятые из него.

Термин "рекомбинантный" в контексте настоящего документа относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам по настоящему изобретению, созданным, экспрессированным, выделенным или полученным с помощью известных в данной области технологий или способов, таких как технология рекомбинантных ДНК, которые включают, например, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Термин относится к антителам, экспрессируемым в системе экспрессии с применением отличного от человека млекопитающего (включая трансгенных отличных от человека млекопитающих, например, трансгенных мышей) или клеток (например, клеток CHO), или выделенным из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека.

Термин "полиспецифические антигенсвязывающие молекулы" в контексте настоящего документа относится к биспецифическим, триспецифическим или полиспецифическим антигенсвязывающим молекулам и их антигенсвязывающим фрагментам. Полиспецифические антигенсвязывающие молекулы могут быть специфическими в отношении разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содер-

жать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении эпитопов более чем одного целевого полипептида. Полиспецифическая антигенсвязывающая молекула может представлять собой один полифункциональный полипептид, или она может представлять собой мультимерный комплекс из двух или более полипептидов, которые ковалентно или нековалентно связаны друг с другом. Термин "полиспецифические антигенсвязывающие молекулы" включает антитела по настоящему изобретению, которые могут быть коэкспрессированы с другой функциональной молекулой, или могут быть соединены с ней, например, с другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, посредством химического соединения, сплайсинга, нековалентного связывания или другим образом) с одним или несколькими другими соединениями, такими как белок или его фрагмент, с образованием биспецифической или полиспецифической антигенсвязывающей молекулы со второй специфичностью связывания. В соответствии с настоящим изобретением термин "полиспецифические антигенсвязывающие молекулы" также включает биспецифические, триспецифические или полиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Согласно определенным вариантам осуществления антитело по настоящему изобретению функционально связано с другим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с образованием биспецифического антитела со второй специфичностью связывания. Биспецифические и полиспецифические антитела по настоящему изобретению описаны в другом месте настоящего документа.

Термин "специфически связывает" или "специфически связывается с" или т. д. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют с антигеном комплекс, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание может характеризоваться равновесной константой диссоциации по меньшей мере приблизительно 1 ± 10^{-8} М или меньше (например, меньшее значение K_D означает более сильное связывание). Способы определения того, происходит ли специфическое связывание двух молекул, хорошо известны в данной области, и они включают, например, равновесный диализ, метод поверхностного плазмонного резонанса и т. д. Как описано в настоящем документе, антитела, которые специфически связываются с LAG3, были идентифицированы с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, в рамках системы BIACORE™. Кроме того, при этом полиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом LAG3 и одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифические антитела, которые связываются с двумя разными областями LAG3, в контексте настоящего документа считаются антителами, которые "специфически связывают".

Термин "высокоаффинное антитело" относится к таким mAb, которые характеризуются аффинностью связывания к LAG3, выраженной в K_D , составляющей по меньшей мере 10^{-8} М; предпочтительно 10^{-9} М; более предпочтительно 10^{-10} М, еще более предпочтительно 10^{-11} М, еще более предпочтительно 10^{-12} М, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, в рамках системы BIACORE™, или ELISA с определением аффинности в растворе.

Под термином "низкая скорость диссоциации", "Koff" или "kd" подразумевают антитело, которое диссоциирует от LAG3 с константой скорости 1×10^{-3} с⁻¹ или меньше, предпочтительно 1×10^{-4} с⁻¹ или меньше, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, в рамках системы BIACORE™.

Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т. д. в контексте настоящего документа включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или полученный с помощью методов геной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела" в контексте настоящего документа относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с LAG3.

Согласно конкретным вариантам осуществления антитело или фрагменты антител по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с соединением, таким как лиганд, или терапевтическим соединением ("иммуноконъюгат"), таким как цитотоксин, вторым антителом к LAG3, антителом к опухолеспецифическому антигену, противоопухолевым лекарственным средством или любым другим терапевтическим соединением, пригодным для лечения заболевания или состояния, включая злокачественную опухоль или вирусную инфекцию, в том числе хроническую вирусную инфекцию.

Подразумевается, что в контексте настоящего документа "выделенное антитело" относится к антителу, которое практически не содержит других антител (Ab) с другими типами антигенной специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывает LAG3, или его фрагмент, практически не содержит Ab, которые специфически связывают антигены, отличные от LAG3).

Подразумевается, что в контексте настоящего документа "блокирующее антитело" или "нейтрализующее антитело" (или "антитело, которое нейтрализует активность LAG3" или "антитело-антагонист") относится к антителу, связывание с LAG3 которого приводит к ингибированию по меньшей мере одного типа биологической активности LAG3. Например, антитело по настоящему изобретению может предотвращать или блокировать связывание LAG3 с MHC класса II.

Подразумевается, что в контексте настоящего документа "активирующее антитело" или "усили-

вающее антитело" (или "антитело-агонист") относится к антителу, связывание с LAG3 которого приводит к повышению или стимулированию по меньшей мере одного типа биологической активности LAG3. Например, антитело по настоящему изобретению может повышать степень связывания LAG3 с МНС класса II.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс" в контексте настоящего документа относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать взаимодействия биологических молекул в режиме реального времени путем выявления изменений концентраций белков на матрице в виде биосенсора, например, с применением системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция, и Пискатауэй, Нью-Джерси).

Подразумевается, что в контексте настоящего документа термин "K_D" относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим центром в пределах варибельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более чем один эпитоп. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками антигена и могут оказывать разные биологические эффекты. Термин "эпитоп" также относится к участку на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки. Он также относится к области антигена, которую связывает антитело. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы обычно представляют собой разновидность структурных эпитопов, и содержат такие остатки, которые непосредственно влияют на аффинность взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, то есть состоящими из нелинейных аминокислот. Согласно определенным вариантам осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные группы на поверхности молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи из Сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и, согласно определенным вариантам осуществления, могут обладать специфическими характеристиками трехмерной структуры и/или специфическими характеристиками заряда.

Термин "перекрестно конкурирует" в контексте настоящего документа означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с антигеном и ингибируют или блокируют связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Термин также включает конкуренцию между двумя антителами в обоих направлениях, т. е. первое антитело связывается и блокирует связывание второго антитела, и наоборот. Согласно определенным вариантам осуществления первое антитело и второе антитело могут связываться с одним и тем же эпитопом. В качестве альтернативы, первое и второе антитела могут связываться с разными, но перекрывающимися эпитопами таким образом, что связывание одного антитела ингибирует или блокирует связывание второго антитела, например, за счет стерического несоответствия. Перекрестную конкуренцию между антителами можно измерять с помощью известных в данной области способов, например, интерферометрического анализа биослоя в режиме реального времени без применения метки. Перекрестная конкуренция между двумя антителами может быть выражена как связывание второго антитела, показатель которого меньше фонового сигнала вследствие самосвязывания (где первое и второе антитела являются одним и тем же антителом). Перекрестная конкуренция между 2 антителами может быть выражена, например, в виде % связывания второго антитела, показатель которого меньше исходного фонового сигнала вследствие самосвязывания (где первое и второе антитела являются одним и тем же антителом).

Термин "значительная степень идентичности" или "в значительной степени идентичный", когда речь идет о нуклеиновой кислоте или ее фрагменте, означает, что при оптимальном выравнивании, с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями, с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной нитью), имеет место идентичность нуклеотидных последовательностей по меньшей мере по приблизительно 90% и более предпочтительно по меньшей мере по приблизительно 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, характеризующаяся значительной степенью идентичности с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может, в определенных случаях, кодировать полипептид с аналогичной или в значительной степени подобной аминокислотной последовательностью, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Идентичность последовательностей можно рассчитывать с применением алгоритма, например, алгоритма по Нидлману-Вуншу (Needleman and Wunsch 1970, J. Mol. Biol. 48. 443-453) для глобального выравнивания или алгоритма по Смитсу-Уотерману (Smith and Waterman 1981, J. Mol. Biol. 147: 195-197) для локального выравнивания. Другой предпочтительный алгоритм описан Dufresne et al в Nature Biotechnology в 2002 году (том 20, стр. 1269-71), и он используется в пакете программ GenePAST (GQ Life Sciences, Inc., Бостон, Массачусетс).

Применительно к полипептидам термин "значительное подобие" или "в значительной степени подобный" означает, что две пептидные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с применением стандартных штрафов за открытие гэпа, характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по

меньшей мере 95, 98 или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется на другой аминокислотный остаток с боковой цепью (R-группа) с подобными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень подобия могут быть увеличены с внесением поправки на консервативную природу замены. Способы внесения такой корректировки хорошо известны специалисту в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с подобными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические боковые цепи с гидроксильной группой: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспарат и глутамат, и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами для консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспарат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативное замещение представляет собой любое изменение с положительным значением в логарифмической табл. вероятностей PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45, включенной в настоящий документ посредством ссылки. "Средне консервативное" замещение представляет собой любое изменение с неотрицательным значением в логарифмической табл. вероятностей PAM250.

Подобие последовательностей для полипептидов, как правило, определяют с применением программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков позволяет сопоставлять подобные последовательности с помощью определения подобия с учетом разных замен, делеций и других модификаций, включая консервативные аминокислотные замены. К примеру, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно применять с использованием параметров по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантным вариантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с применением FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между заданными и искомыми последовательностями (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей множество последовательностей из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности, BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

Под фразой "терапевтически эффективное количество" подразумевают количество, которое обеспечивает требуемый эффект, для достижения которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения, и будет установлено специалистом в данной области с применением известных методик (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

В контексте настоящего документа термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, нуждающемуся в ослаблении, предупреждении и/или лечении заболевания или нарушения, такого как вирусная инфекция или злокачественная опухоль. Термин включает субъектов-людей, которые имеют риск развития, или у которых наблюдают злокачественную опухоль, метастатическую злокачественную опухоль или вирусную инфекцию.

В контексте настоящего документа "противоопухолевое лекарственное средство" означает любое средство, пригодное для лечения, или ослабления, или ингибирования роста злокачественной опухоли, включая без ограничения цитотоксины и такие средства, как антимаболиты, алкилирующие средства, антрациклины, антибиотики, антимитотические средства, прокарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, кортикостероиды, циклофосфамид, митотан (O,P'-(DDD)), биологические препараты (например, антитела и интерфероны) и радиоактивные вещества. В контексте настоящего документа "цитотоксическое средство" также относится к химиотерапевтическому средству, и означает любое средство, которое является губительным для клеток. Примеры включают Taxol® (паклитаксел), темозоломид, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, цисплатин, митомицин, эпопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дигидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи.

В контексте настоящего документа термин "противовирусное лекарственное средство" относится к

любому лекарственному средству или терапевтическому препарату, применяемому для лечения, предупреждения или ослабления вирусной инфекции у субъекта-хозяина. Термин "противовирусное лекарственное средство" включает без ограничения зидовудин, ламивудин, абакавир, рибавирин, лопинавир, эфавиренз, кобицистат, тенофовир, рилпивирин, анальгетики и кортикостероиды. В контексте настоящего изобретения вирусные инфекции включают продолжительные или хронические инфекции, вызванные вирусами, включая без ограничения вирус иммунодефицита человека (HIV), вирус гепатита В (HBV), вирус гепатита С (HCV), вирус папилломы человека (HPV), вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) и вирус иммунодефицита обезьян (SIV).

В контексте настоящего документа термин "усилить иммунный ответ" относится к повышению активности иммунной клетки, такой как Т-клетка или НК-клетка, в отношении опухолевой клетки или инфицированной вирусом клетки. В контексте настоящего изобретения термин включает блокирование опосредованного LAG3 ингибирования активности Т-клеток или возобновление активности или обращение состояния истощения Т-клеток. Он также включает ингибирование активности регуляторных Т-клеток. Усиленный иммунный ответ в контексте настоящего изобретения приводит к повышенной степени уничтожения опухолевых клеток и/или ингибированию роста опухоли.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению специфически связываются с LAG3 и усиливают активацию Т-клеток. Антитела к LAG3 могут связываться с LAG3 с высокой аффинностью или с низкой аффинностью. Согласно определенным вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению могут представлять собой блокирующие антитела, где антитела могут связываться с LAG3 и ингибировать передачу сигнала с участием LAG3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению блокируют связывание LAG3 с MHC класса II и/или стимулируют или усиливают активацию Т-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела связываются с LAG3 и обеспечивают обращение анергического состояния истощенных Т-клеток. Согласно определенным вариантам осуществления антитела связываются с LAG3 и ингибируют активность регуляторных Т-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела могут быть пригодны для стимулирования или усиления иммунного ответа и/или для лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли или вирусной инфекции. Антитела, при введении нуждающемуся в этом субъекту, могут обеспечивать подавление у субъекта хронической инфекции, вызванной вирусом, таким как HIV, LCMV или HBV. Их можно применять для ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта. Их можно применять в качестве монотерапии или в качестве вспомогательной терапии вместе с другими терапевтическими соединениями или способами, известными в данной области для лечения злокачественной опухоли или вирусной инфекции.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела к LAG3 могут представлять собой полиспецифические антигенсвязывающие молекулы, причем они предусматривают первую специфичность связывания в отношении LAG3 и вторую специфичность связывания в отношении антигена, выбранного из группы, состоящей из другого коингибитора Т-клетки и другого эпитопа LAG3.

Для получения антител к LAG3 можно применять иммуноген, предусматривающий любое из нижеприведенного. Согласно определенным вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению получают от мышей, иммунизированных полноразмерным нативным LAG3 (см. номер доступа в NCBI NP_002277.4) (SEQ ID NO: 582) или рекомбинантным пептидом LAG3. В качестве альтернативы, LAG3 или его фрагмент можно получать с применением стандартных биохимических методов и модифицировать (SEQ ID NO: 574-576) и применять в качестве иммуногена.

Согласно определенным вариантам осуществления иммуноген представляет собой один или несколько внеклеточных доменов LAG3. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения иммуноген представляет собой фрагмент LAG3, который находится в пределах приблизительно аминокислотных остатков 29-450 SEQ ID NO: 582.

Согласно некоторым вариантам осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный пептид LAG3, экспрессированный в *E. coli* или в других клетках эукариот или млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

Согласно определенным вариантам осуществления антитела, которые специфически связываются с LAG3, можно получать с применением фрагментов указанных выше областей или пептидов, которые выступают за границы определенных областей на от приблизительно 5 до приблизительно 20 аминокислотных остатков от каждого, или от обоих N- или C-конца областей, описанных в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления для получения LAG3-специфических антител можно применять любую комбинацию указанных выше областей или их фрагментов.

Пептиды можно модифицировать с включением добавления или замены определенных остатков для введения метки или с целью конъюгирования с молекулами-носителями, например, KLH. Например, либо к N-концу, либо к C-концу пептида можно добавлять цистеин, или можно добавлять линкерную последовательность с целью получения пептида для конъюгирования, например, с KLH, для иммунизации.

Определенные антитела к LAG3 по настоящему изобретению способны связываться с LAG3 и нейтрализовать его активность, что определено с помощью *in vitro* или *in vivo* анализов. Способность анти-

тел по настоящему изобретению связываться с LAG3 и нейтрализовать его активность можно измерять с применением любого стандартного способа, известного специалистам в данной области, включая описанные в настоящем документе анализы связывания или анализы активности.

Неограничивающие иллюстративные *in vitro* анализы для измерения активности связывания представлены в разделе Примеры настоящего документа. Согласно примеру 3, показатели аффинности связывания и константы скорости антител человека к LAG3 в отношении LAG3 человека определяли с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, и измерения выполняли на приборе Biacore 4000 или T200. Согласно примеру 4, для определения перекрестной конкуренции между антителами к LAG3 применяли анализы блокирования. В примерах 5 и 6 описывают связывание антител с клетками, сверхэкспрессирующими LAG3. Согласно примеру 7, для определения способности антител к LAG3 блокировать способность LAG3 связывать МНС класса II *in vitro* применяли анализы связывания. Согласно примеру 8, для определения способности антител к LAG3 препятствовать передаче сигнала с участием LAG3 в Т-клетки применяли анализ по активности гена люциферазы. Согласно примеру 9, для определения способности антител к LAG3 связываться с активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками обезьяны применяли флуоресцентный анализ.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению способны усиливать или стимулировать активность Т-клеток *in vitro*, у субъекта со злокачественной опухолью или у субъекта, инфицированного вирусом, таким как LCMV. Согласно определенным вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению применяют в комбинации со вторым терапевтическим средством, таким как антитело ко второму коингибитору Т-клетки, для усиления иммунного ответа и ингибирования роста опухоли у субъекта.

Специфические в отношении LAG3 антитела могут не содержать дополнительных меток или соединений, или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или соединение. Согласно одному варианту осуществления метка или соединение представляет собой биотин. В анализе связывания, расположение метки (если таковая имеется) может определять ориентацию пептида по отношению к поверхности, на которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевую биотин, будет расположен так, что C-концевая часть пептида будет отдалена от поверхности. Согласно одному варианту осуществления метка может представлять собой радиоизотоп, флуоресцентный краситель или a MRI-выявляемую метку. Согласно определенным вариантам осуществления такие меченные антитела можно применять в диагностических анализах, включая анализы с визуализацией.

Иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с белком, кодируемым геном-3 активации лимфоцитов (LAG3) человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают свойством, выбранным из группы, состоящей из: (а) связывают мономерный LAG3 человека с константой диссоциации (K_D) для равновесного связывания, составляющей менее чем приблизительно 10 нМ, как измерено в анализе на основе явления поверхностного плазмонного резонанса при 25°C; (b) связывают мономерный LAG3 человека с K_D менее чем приблизительно 8 нМ, как измерено на основе явления поверхностного плазмонного резонанса при 37°C; (c) связывают димерный LAG3 человека с K_D менее чем приблизительно 1,1 нМ, как измерено в анализе на основе явления поверхностного плазмонного резонанса при 25°C; (d) связывают димерный LAG3 человека с K_D менее чем приблизительно 1 нМ, как измерено в анализе на основе явления поверхностного плазмонного резонанса при 37°C; (e) связываются с экспрессирующей hLAG3 клеткой с EC_{50} менее чем приблизительно 8 нМ, как измерено в анализе с использованием проточной цитометрии; (f) связываются с экспрессирующей mfLAG3 клеткой с EC_{50} менее чем приблизительно 2,3 нМ, как измерено в анализе с использованием проточной цитометрии; (g) блокируют связывание hLAG3 с МНС класса II человека с IC_{50} менее чем приблизительно 32 нМ, как определено с помощью анализа клеточной адгезии; (h) блокируют связывание hLAG3 с МНС класса II мыши с IC_{50} менее чем приблизительно 30 нМ, как определено с помощью анализа клеточной адгезии; (i) блокируют связывание hLAG3 с МНС класса II более чем на 90%, как определено с помощью анализа клеточной адгезии; (j) обеспечивают освобождение от опосредованного LAG3 ингибирования активности Т-клеток с EC_{50} менее чем приблизительно 9 нМ, как определено в анализе по репортерному гену люциферазы; и (k) связываются с активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками с EC_{50} менее чем приблизительно 1,2 нМ, как определено во флуоресцентном анализе.

Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержат три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах любой из приведенных в табл.1 последовательностей вариабельной области тяжелой цепи (HCVR); и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах любой из приведенных в табл.1 последовательностей вариабельной области легкой цепи (LCVR). Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR с аминокислотной последо-

вательностью, выбранной из группы, состоящей из приведенных в табл.1 последовательностей HCVR. Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из приведенных в табл.1 последовательностей LCVR.

Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат: (a) HCDR1-домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 372, 388, 404, 420, 436, 452, 460, 468, 476, 484, 492, 500, 508, 516, 540 и 556; (b) HCDR2-домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 374, 390, 406, 422, 438, 454, 462, 470, 478, 486, 494, 502, 510, 518, 542 и 558; (c) HCDR3-домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 376, 392, 408, 424, 440, 456, 464, 472, 480, 488, 496, 504, 512, 520, 544 и 560; (d) LCDR1-домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 380, 396, 412, 428, 444, 524, 532, 548 и 564; (e) LCDR2-домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 382, 398, 414, 430, 446, 526, 534, 550 и 566; и (f) LCDR3-домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 384, 400, 416, 432, 448, 528, 536, 552 и 568.

Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546 и 554/562.

Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент является таким, как заявлено в п.7 формулы изобретения, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 386/394, 418/426 и 538/546.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые блокируют связывание LAG3 с MHC класса II, содержащим три CDR HCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 458, 466, 474, 482, 490, 498, 506, 514, 538 и 554; и три CDR LCVR, где LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 522, 530, 546 и 562.

Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 386/394, 418/426 и 538/546.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые конкурируют за связывание с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащими пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546 и 554/562.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546 и 554/562.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое представляет собой антитело человека, гуманизированное или химерное антитело. Указанное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, может представлять собой, к примеру, IgG1- или IgG4-антитело, такое как, например, IgG1- или IgG4-антитело человека. Константные области антител могут соответствовать константным областям дикого типа или константным областям, в которые были внесены мутации.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу, содержащему тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 577, 579 и 580. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу, содержащему тяжелую цепь и легкую цепь, где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 578 и 581. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим пару аминокислотных последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 577/578, 579/578 и 580/581.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к полиспецифической антигенсвязывающей молекуле, предусматривающей первый антигенсвязывающий специфический элемент, который специфически связывается с LAG3, и второй антигенсвязывающий специфический элемент, который специфически связывается с со вторым целевым эпитопом.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело к LAG3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидным молекулам и векторам, содержащим полинуклеотидные последовательности, кодирующие антитела или их антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к выделенной полинуклеотидной молекуле и/или вектору, содержащему полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR представленного в настоящем документе антитела. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к выделенной полинуклеотидной молекуле и/или вектору, содержащему полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR представленного в настоящем документе антитела.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способам усиления иммунного ответа у субъекта, причем способ предусматривает введение фармацевтической композиции, содержащей раскрытые в настоящем документе выделенное антитело к LAG3 или его антигенсвязывающий фрагмент. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам ингибирования регуляторной Т-клетки (Treg) у субъекта, предусматривающим введение фармацевтической композиции, содержащей раскрытые в настоящем документе выделенное антитело к LAG3 или его антигенсвязывающий фрагмент. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам усиления активации Т-клеток у субъекта, причем способ предусматривает введение фармацевтической композиции, содержащей раскрытые в настоящем документе выделенное антитело к LAG3 или его антигенсвязывающий фрагмент. Согласно определенным вариантам осуществления у субъекта наблюдают заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из злокачественного новообразования кровеносной ткани, рака головного мозга, почечно-клеточной карциномы (например, светлоклеточной карциномы почки), рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака молочной железы (например, трижды негативной рака молочной железы), гепатоцеллюлярной карциномы, рака кости, рака толстой кишки, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака толстой и прямой кишки, мезотелиомы, лимфомы (например, В-клеточной лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы) и меланомы. Согласно определенным вариантам осуществления у субъекта наблюдают хроническую вирусную инфекцию, вызванную вирусом, выбранным из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса гепатита С (HCV), вируса гепатита В (HBV), вируса папилломы человека (HPV), вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) и вируса иммунодефицита обезьян (SIV). Согласно определенным вариантам осуществления антитело к LAG3 вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим средством, выбранным из группы, состоящей из ингибитора PD-1, ингибитора CTLA, антитела к опухолеспецифическому антигену, антитела к антигену инфицированной вирусом клетки, ингибитора PD-L1, ингибитора CD20, биспецифического антитела к CD20 и CD3, диетической добавки, такой как антиоксидант, антагониста VEGF, химиотерапевтического средства, цитотоксического средства, облучения, NSAID, кортикостероида и любого другого вида терапии, пригодной для ослабления по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с заболеванием или нарушением.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способам ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки у субъекта, предусматривающим введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества раскрытых в настоящем документе антитела к LAG3 или его антигенсвязывающего фрагмента. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль является первичной или рецидивирующей. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль представляет собой развившуюся опухоль. Согласно определенным вариантам осуществления у субъекта наблюдают метастазирующую опухоль и/или его лечили с применением предшествующей терапии. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль имеется у субъекта с заболеванием или нарушением, выбранным из группы, состоящей из злокачественного новообразования кровеносной ткани, рака головного мозга, почечно-клеточного рака, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной же-

лезы, рака молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака кости, рака толстой кишки, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака толстой и прямой кишки, мезотелиомы, лимфомы и меланомы. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к LAG3 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в виде одной или нескольких доз, где каждую дозу вводят через 1-4 недели после ближайшей предшествующей дозы. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к LAG3 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе от приблизительно 0,1 мг/кг веса тела до приблизительно 100 мг/кг веса тела субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к LAG3 вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим средством, выбранным из группы, состоящей из ингибитора PD-1, ингибитора CTLA, антитела к опухолеспецифическому антигену, ингибитора PD-L1, ингибитора CD20, биспецифического антитела к CD20 и CD3, диетической добавки, такой как антиоксидант, антагониста VEGF, химиотерапевтического средства, цитотоксического средства, облучения, NSAID, кортикостероида и любого другого вида терапии, пригодной для ослабления по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с заболеванием или нарушением. Согласно одному варианту осуществления второе терапевтическое средство представляет собой ингибитор PD-1, где ингибитор PD-1 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-1. Согласно одному варианту осуществления ингибитором PD-1 является REGN2810. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к LAG3 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят подкожно, внутривенно, внутрикочно, внутривнутрино, перорально, внутримышечно или интракраниально.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способам освобождения от опосредованного LAG3 ингибирования активности Т-клетки, предусматривающим приведение Т-клетки в контакт с раскрытыми в настоящем документе антителом к LAG3 или его антигенсвязывающим фрагментом. Согласно одному варианту осуществления Т-клетку приводят в контакт с антителом к LAG3 по настоящему изобретению в комбинации с антителом к PD-1 (например, REGN2810).

Антигенсвязывающие фрагменты антител

Если конкретно не указано иное, следует понимать, что термин "антитело" в контексте настоящего документа охватывает молекулы антитела, содержащие две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина (т. е. "молекулы полного антитела"), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т. д. в контексте настоящего документа включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или полученный с помощью методов генной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела" в контексте настоящего документа относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с LAG3. Фрагмент антитела может включать Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, фрагмент, содержащий CDR, или выделенную CDR. Согласно определенным вариантам осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидному фрагменту полиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Согласно таким вариантам осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" включает, например, молекулу МНС класса II, которая специфически связывается с LAG3. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полных антител с применением любых подходящих стандартных методик, таких как методики на основе протеолитического расщепления или методы генетической инженерии рекомбинантных ДНК, предусматривающие осуществление манипуляций и экспрессии ДНК, кодирующей вариabельные и (необязательно) константные домены антител. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, ДНК-библиотек (включая, например, фаговые библиотеки антител), или она может быть синтезирована. ДНК можно подвергать секвенированию и химическим манипуляциям с применением методов молекулярной биологии, например, чтобы разместить один или несколько вариabельных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для включения кодонов, внесения цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) молекулы одноцепочечных Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариabельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), как, например, CDR3-пептид), или пространственно ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленными доменами, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, наноантитела (например, одновалентные наноантитела, двухвалентные наноантитела и т. д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и вариabельные домены IgNAR акулы, в контексте настоящего документа также охвачены выражением "антигенсвязывающий фрагмент".

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один вариabельный домен. Вариabельный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав, и

обычно будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая примыкает к одной или нескольким каркасным последовательностям или находится с ними в одной рамке считывания. В антигенсвязывающих фрагментах с V_H -доменом, ассоциированным с V_L -доменом, V_H - и V_L -домены могут быть расположены относительно друг друга в любой подходящей конфигурации. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры $V_H - V_H$, $V_H - V_L$ или $V_L - V_L$. В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H - или V_L -домен.

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые можно найти в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$ и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из приведенных выше иллюстративных конфигураций, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно соединены друг с другом, либо могут быть соединены посредством полной или частичной шарнирной области или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые обеспечивают гибкое или полугибкое соединение расположенных рядом переменных и/или константных доменов в пределах одной молекулы полипептида. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может предусматривать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из приведенных выше конфигураций переменных и константных доменов, нековалентно связанные друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными V_H - или V_L -доменами (например, посредством дисульфидной(-ых) связи(-ей)).

Как и в случае молекул полных антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или полиспецифическими (например, биспецифическими). Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере два разных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат полиспецифического антитела, включая иллюстративные форматы биспецифического антитела, раскрытые в настоящем документе, можно адаптировать для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с применением обычных методик, известных в данной области.

Получение антител человека

Способы получения антител человека в трансгенных мышах известны в данной области. Любые из таких известных способов можно применять в контексте настоящего изобретения для получения антител человека, которые специфически связываются с LAG3.

С применением технологии VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител сперва выделяли высокоаффинные химерные антитела к LAG3 с переменной областью человека и константной областью мыши. Технология VELOCIMMUNE® предусматривает получение трансгенной мыши с геномом, предусматривающим последовательности, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей человека, функционально связанные с эндогенными локусами, кодирующими константные области мыши, благодаря чему у мыши в ответ на стимуляцию антигеном вырабатывается антитело, содержащее переменную область человека и константную область мыши. ДНК, кодирующую переменные области тяжелых и легких цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелых и легких цепей человека. Затем обеспечивают экспрессию ДНК в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

В общем случае, полученную с помощью технологии VELOCIMMUNE® мышь иммунизируют представляющим интерес антигеном и извлекают лимфоциты (такие как В-клетки) из организма мышей, у которых экспрессируются антитела. Лимфоциты можно сливать с клеточной линией миеломы с получением бессмертных линий клеток гибридомы, и такие линии клеток гибридомы подвергают скринингу и отбору для идентификации линий клеток гибридомы, которые продуцируют антитела, специфические в отношении представляющего интерес антигена. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделять и связывать с требуемыми изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок-антитело может продуцироваться в клетке, такой как клетка СНО. В качестве альтернативы, ДНК, кодирующую антигенспецифические химерные антитела или переменные домены легких и тяжелых цепей, можно выделять непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

Сперва выделяют высокоаффинные химерные антитела с переменной областью человека и константной областью мыши. Как описано ниже в разделе с экспериментами, определяют характеристики антител и отбирают их в отношении требуемых характеристик, включая аффинность, избирательность, эпитоп и т. д. Константные области мыши замещают требуемой константной областью человека с полу-

чением полностью человеческого антитела по настоящему изобретению, например, IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированных IgG1 или IgG4. Тогда как выбранная константная область может варьировать в соответствии с конкретным применением, характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичности в отношении мишени свойственны варибельной области.

Биоэквиваленты

Антитела к LAG3 и фрагменты антител по настоящему изобретению охватывают белки с аминокислотными последовательностями, которые отличаются от таковых у описанных антител, но при этом сохраняют способность связывать LAG3. Такие варианты антител и фрагменты антител предусматривают одно или несколько добавлений, делеций, или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но характеризуются биологической активностью, которая, по сути, эквивалентна таковой у описанных антител. Аналогично, кодирующие антитело последовательности ДНК по настоящему изобретению охватывают последовательности, которые предусматривают одно или несколько добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые, по сути, являются биоэквивалентами антитела или фрагмента антитела по настоящему изобретению.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими вариантами, скорость и степень абсорбции которых не характеризуется значимым различием при введении в одинаковой молярной дозе в аналогичных условиях проведения эксперимента, как в виде однократной дозы, так и в виде многократных доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими вариантами, если они являются эквивалентными по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все еще могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены в инструкции по применению лекарственного препарата, не являются существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при длительном применении, и не считаются значимыми с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка считаются биоэквивалентными, если клинически значимые различия в их безопасности, чистоте или эффективности отсутствуют.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациента можно переводить один или несколько раз с лечения референтным препаратом на лечение биологическим препаратом, и наоборот, без ожидаемого повышения риска возникновения нежелательных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или уменьшенную эффективность, по сравнению с продолжающейся терапией без такого перевода.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба функционируют по общему механизму или механизмам действия в отношении состояния или состояний, при условии, что такие механизмы являются известными.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована с помощью *in vivo* и/или *in vitro* способов. Определение биоэквивалентности включает, например, (a) *in vivo* тест у людей или других животных, в котором измеряют концентрацию антитела или его метаболитов в крови, плазме крови, сыворотки крови или биологической жидкости в зависимости от времени; (b) *in vitro* тест, результаты которого коррелировали с данными по биодоступности *in vivo* у человека, и который является достаточно прогностическим в отношении таких данных; (c) *in vivo* тест у людей или других животных, в котором соответствующий немедленный фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется в зависимости от времени; и (d) клиническое испытание в строго контролируемых условиях, в котором устанавливают безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител по настоящему изобретению могут быть сконструированы, например, путем выполнения различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, цистеиновые остатки, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно удалять или замещать другими аминокислотами для предотвращения образования лишних или неуместных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других случаях биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител, предусматривающие изменения по аминокислоте, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые исключают или устраняют гликозилирование.

Антитела к LAG3, предусматривающие варианты Fc

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела к LAG3, содержащие Fc-домен, предусматривающий одну или несколько мутаций, которые усиливают или ослабляют связывание антитела с FcRn-рецептором, например, при кислом pH, в сравнении с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение включает антитела к LAG3, предусматривающие мутацию C_H2- или C_H3-области Fc-домена, где мутация(-и) повышает(-ют) аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от приблизительно

5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению времени полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например 308F, V308F) и 434. Согласно одному варианту осуществления модификация предусматривает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и модификацию 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). Согласно еще одному варианту осуществления модификация предусматривает модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

Например, настоящее изобретение включает антитела к LAG3, содержащие Fc-домен, предусматривающий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение включает антитела к LAG3, содержащие Fc-домен, предусматривающий мутацию S108P в шарнирной области IgG4 для содействия стабилизации димера. Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена и других мутаций в пределах раскрытых в настоящем документе вариабельных доменов антитела включены в объем настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также включает антитела к LAG3, содержащие химерную константную (C_H) область тяжелой цепи, где химерная C_H -область содержит сегменты, происходящие из C_H -областей более чем одного изотипа иммуноглобулинов. Например, антитела по настоящему изобретению могут содержать химерную C_H -область, содержащую часть или все из C_H2 -доменов, происходящих из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с частью или всеми из C_H3 -доменов, происходящих из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению содержат химерную C_H -область с химерной шарнирной областью. Например, химерный шарнир может содержать аминокислотную последовательность "верхнего шарнира" (аминокислотные остатки, соответствующие положениям 216-227 в соответствии с EU-нумерацией), происходящую из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с последовательностью "нижнего шарнира" (аминокислотные остатки, соответствующие положениям 228-236 в соответствии с EU-нумерацией), происходящей из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, происходящие из верхнего шарнира IgG1 человека или IgG4 человека, и аминокислотные остатки, происходящие из нижнего шарнира IgG2 человека. Антитело, содержащее описанную в настоящем документе химерную C_H -область, согласно определенным вариантам осуществления может проявлять эффекторные функции модифицированного Fc без отрицательного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, публикацию заявки на патент США №20140243504, раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). Согласно определенным вариантам осуществления Fc-область содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 569, 570, 571, 572 и 573.

Биологические характеристики антител

В целом, функция антител по настоящему изобретению состоит в связывании LAG3. Настоящее изобретение включает антитела к LAG3 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые с высокой аффинностью связывают растворимые молекулы мономерного или димерного LAG3. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают мономерный LAG3 (например, при 25°C или при 37°C) с K_D менее чем приблизительно 10 нМ, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают мономерный LAG3 с K_D менее чем приблизительно 5 нМ, менее чем приблизительно 2 нМ, менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 0,5 нМ, менее чем приблизительно 0,1 нМ, менее чем приблизительно 0,05 нМ или менее чем приблизительно 0,04 нМ, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают димерный LAG3 (например, при 25°C или при 37°C) с K_D менее чем приблизительно 1,1 нМ,

как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают димерный LAG3 с K_D менее чем приблизительно 0,5 нМ, менее чем приблизительно 0,25 нМ, менее чем приблизительно 0,1 нМ, менее чем приблизительно 0,05 нМ или менее чем приблизительно 0,01 М, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа.

Изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают LAG3 с полупериодом диссоциации ($t^{1/2}$) более чем приблизительно 1,6 мин, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают LAG3 с $t^{1/2}$ более чем приблизительно 5 мин, более чем приблизительно 10 мин, более чем приблизительно 30 мин, более чем приблизительно 50 мин, более чем приблизительно 60 мин, более чем приблизительно 70 мин, более чем приблизительно 80 мин, более чем приблизительно 90 мин, более чем приблизительно 100 мин, более чем приблизительно 200 мин, более чем приблизительно 300 мин, более чем приблизительно 400 мин, более чем приблизительно 500 мин, более чем приблизительно 600 мин, более чем приблизительно 700 мин, более чем приблизительно 800 мин, более чем приблизительно 900 мин, более чем приблизительно 1000 мин или более чем приблизительно 1100 мин, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе (например, формата с иммобилизацией mAb или иммобилизацией антигена), или в значительной степени подобного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с экспрессирующей LAG3 человека клеткой с EC_{50} менее чем приблизительно 8 нМ, как измерено с помощью анализа с использованием проточной цитометрии, определенного в примере 5 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с экспрессирующей hLAG3 клеткой с EC_{50} менее чем приблизительно 5 нМ, менее чем приблизительно 2 нМ, менее чем приблизительно 1 нМ или менее чем приблизительно 0,5 нМ, как измерено с помощью анализа с использованием проточной цитометрии, например, с применением формата анализа из примера 5 в настоящем документе или в значительной степени подобного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с экспрессирующей LAG3 яванского макака клеткой с EC_{50} менее чем приблизительно 2,5 нМ, как измерено с помощью анализа с использованием проточной цитометрии, определенного в примере 5 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с экспрессирующей mLAG3 клеткой с EC_{50} менее чем приблизительно 2 нМ или менее чем приблизительно 1 нМ, как измерено с помощью анализа с использованием проточной цитометрии, например, с применением формата анализа, определенного в примере 5 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют связывание LAG3 с МНС класса II (HLA-DR2 человека) с IC_{50} менее чем приблизительно 32 нМ, как определено с применением анализа клеточной адгезии, например, представленного в примере 7, или в значительной степени подобного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют связывание LAG3 с МНС класса II человека с IC_{50} менее чем приблизительно 25 нМ, менее чем приблизительно 20 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ или менее чем приблизительно 5 нМ, как измерено с помощью анализа клеточной адгезии, например, с применением формата анализа, определенного в примере 7 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют связывание LAG3 с МНС класса II (HLA-DR2 мыши) с IC_{50} менее чем приблизительно 30 нМ, как определено с применением анализа клеточной адгезии, например, представленного в примере 7, или в значительной степени подобного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют связывание LAG3 мыши с МНС класса II человека с IC_{50} менее чем приблизительно 25 нМ, менее чем приблизительно 20 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ или менее чем приблизительно 5 нМ, как измерено с помощью анализа клеточной адгезии, например, с применением формата анализа, определенного в примере 7 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающий фрагмент, которые блокируют связывание LAG3 с МНС класса II человека или мыши более чем на 90%, как измерено с по-

мощью анализа клеточной адгезии, определенного в примере 7 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют индуцированную LAG негативную регуляцию Т-клеток с EC_{50} менее чем 9 нМ, как измерено с помощью анализа по репортерному гену люциферазы с использованием Т-клеток/АПС, определенного в примере 8 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют индуцированную LAG3 негативную регуляцию Т-клеток с EC_{50} менее чем приблизительно 5 нМ, менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 0,5 нМ или менее чем приблизительно 0,1 нМ, как измерено с помощью анализа по репортерному гену люциферазы с использованием Т-клеток/АПС, например, с применением формата анализа, определенного в примере 8 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками яванского макака с EC_{50} менее чем приблизительно 1,2 нМ, как измерено с помощью флуоресцентного анализа, определенного в примере 9 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками яванского макака с EC_{50} менее чем приблизительно 1,1 нМ, менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 0,5 нМ, менее чем приблизительно 0,2 нМ или менее чем приблизительно 0,1 нМ, как измерено с помощью флуоресцентного анализа, например, с применением формата анализа, определенного в примере 9 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа.

Согласно определенным вариантам осуществления функция антител по настоящему изобретению может состоять в блокировании или ингибировании активности связывания МНС класса II, ассоциированного с LAG3, посредством связывания с любой другой областью или фрагментом полноразмерного белка, аминокислотная последовательность которого представлена SEQ ID NO: 582.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению являются пригодными в ингибировании роста опухоли или задержки прогрессирования злокачественной опухоли при профилактическом введении нуждающемуся в этом субъекту, и могут обеспечить повышение выживаемости субъекта. Например, введение антитела по настоящему изобретению может приводить к уменьшению первичной опухоли и может предупредить метастазирование или развитие вторичных опухолей. Согласно определенным вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению являются пригодными в ингибировании роста опухоли при терапевтическом введении нуждающемуся в этом субъекту, и могут обеспечить повышение выживаемости субъекта. Например, введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела по настоящему изобретению может приводить к уменьшению и исчезновению развившейся опухоли у субъекта.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с LAG3, где антитело или его фрагмент обладают одной или несколькими из следующих характеристик: (i) содержат HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 458, 466, 474, 482, 490, 498, 506, 514, 538 и 554, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (ii) содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 522, 530, 546 и 562, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (iii) содержит HCDR3-домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 376, 392, 408, 424, 440, 456, 464, 472, 480, 488, 496, 504, 512, 520, 544 и 560, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; и LCDR3-домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 384, 400, 416, 432, 448, 528, 536, 552 и 568, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (iv) содержит HCDR1-домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 372, 388, 404, 420, 436, 452, 460, 468, 476, 484, 492, 500, 508, 516, 540 и 556, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере

95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; HCDR2-домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 374, 390, 406, 422, 438, 454, 462, 470, 478, 486, 494, 502, 510, 518, 542 и 558, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; LCDR1-домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 380, 396, 412, 428, 444, 524, 532, 548 и 564, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; и LCDR2-домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 382, 398, 414, 430, 446, 526, 534, 550 и 566, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (v) связывают мономерный LAG3 человека с константой диссоциации (K_D) для равновесного связывания, составляющей менее чем приблизительно 10 нМ, как измерено в анализе на основе явления поверхностного плазмонного резонанса при 25°C; (vi) связывают мономерный LAG3 человека с K_D менее чем приблизительно 8 нМ, как измерено в анализе на основе явления поверхностного плазмонного резонанса при 37°C; (vii) связывают димерный LAG3 человека с K_D менее чем приблизительно 1,1 нМ, как измерено в анализе на основе явления поверхностного плазмонного резонанса при 25°C; (viii) связывают димерный LAG3 человека с K_D менее чем приблизительно 1 нМ, как измерено в анализе на основе явления поверхностного плазмонного резонанса при 37°C; (ix) связываются с экспрессирующей hLAG3 клеткой с EC_{50} менее чем приблизительно 8 нМ, как измерено в анализе с использованием проточной цитометрии; (x) связываются с экспрессирующей mfLAG3 клеткой с EC_{50} менее чем приблизительно 2,3 нМ, как измерено в анализе с использованием проточной цитометрии; (xi) блокируют связывание hLAG3 с МНС класса II человека с IC_{50} менее чем приблизительно 32 нМ, как определено с помощью анализа клеточной адгезии; (xii) блокируют связывание hLAG3 с МНС класса II мыши с IC_{50} менее чем приблизительно 30 нМ, как определено с помощью анализа клеточной адгезии; (xiii) блокируют связывание hLAG3 с МНС класса II более чем на 90%, как определено с помощью анализа клеточной адгезии; (xiv) обеспечивают освобождение от опосредованного LAG3 ингибирования активности Т-клеток с EC_{50} менее чем приблизительно 9 нМ, как определено в анализе по репортерному гену люциферазы; (xv) связываются с активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками с EC_{50} менее чем приблизительно 1,2 нМ, как определено во флуоресцентном анализе; (xvi) обеспечивают подавление роста опухоли и повышение выживаемости субъекта со злокачественной опухолью и (xvii) являются полностью человеческими.

Антитела по настоящему изобретению могут обладать одной или несколькими из вышеупомянутых биологических характеристик или любой их комбинацией. Другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению будут очевидны для специалиста в данной области из обзора настоящего раскрытия, включая демонстрационные примеры в настоящем документе.

Межвидовая избирательность и межвидовая перекрестная реактивность В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения антитела к LAG3 связываются с LAG3 человека, но не с LAG3 других видов. В качестве альтернативы, антитела к LAG3 по настоящему изобретению согласно определенным вариантам осуществления связываются с LAG3 человека и с LAG3 одного или нескольких отличных от человека видов. Например, антитела к LAG3 по настоящему изобретению могут связываться с LAG3 человека, и могут связывать или не связывать, в соответствующих случаях, один или несколько из LAG3 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макаки-резуса или шимпанзе. Согласно определенным вариантам осуществления антитела к LAG3 по настоящему изобретению могут связываться с LAG3 человека и яванского макака с аналогичными показателями аффинности или с различными показателями аффинности, но не связываются с LAG3 крысы и мыши.

Картирование эпитопов и связанные технологии

Настоящее изобретение включает антитела к LAG3, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, находящимися в пределах одного или нескольких доменов молекулы LAG3, включая, например, внеклеточные домены D1-D4, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных в пределах любого из вышеупомянутых доменов молекулы LAG3 (например, линейный эпитоп домена). В качестве альтернативы, эпитоп может состоять из множества прерывающихся аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в пределах любого из или всех вышеупомянутых доменов молекулы LAG3 (например, конформационный эпитоп).

Для определения того факта, что антитело "взаимодействует с одним или несколькими аминокисло-

тами" в пределах полипептида или белка, можно применять различные методики, известные специалистам в данной области. Иллюстративные методики включают, например, стандартные эпитоп-перекрестные конкурентные анализы, как, например, описанные в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк). Другие способы включают мутационный анализ со сканированием аланином, блот-анализ пептидов (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), кристаллографические исследования с анализом расщепления пептидов и ЯМР-анализ. Кроме того, можно использовать такие способы, как метод вырезания эпитопа, метод выделения эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Другим способом, который можно применять для идентификации аминокислот в пределах полипептида, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, выявляемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, способ водородно-дейтериевого обмена предусматривает мечение представляющего интерес белка дейтерием, с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, и способные к обмену протоны в аминокислотах, закрытые будучи в комплексе с антителом, подвергаются обратному обмену дейтерия на водород медленнее, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью зоны контакта. В результате аминокислоты, которые образуют часть зоны контакта белок/антитело, могут сохранять с своем составе дейтерий и, таким образом, характеризоваться относительно большей массой по сравнению с аминокислотами, не включенными в зону контакта. После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, с выявлением таким образом меченных дейтерием остатков, которые соответствуют специфическим аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

Термин "эпитоп" относится к участку на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки. Эпитопы для В-клеток могут быть образованы как непрерывными, так и прерывающимися аминокислотами, расположенными рядом благодаря укладке белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные из непрерывных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные благодаря укладке в третичную структуру, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает по меньшей мере 3, и чаще, по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Анализ на основе модификаций (Modification-Assisted Profiling, MAP), также известный как анализ антител на основе структуры антигенов (Antigen Structure-based Antibody Profiling, ASAP), представляет собой способ, который позволяет классифицировать большие количества моноклональных антител (mAb), направленных против одного и того же антигена, исходя из схожести профилей связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными поверхностями антигенов (см. US 2004/0101920, включенную в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). Каждая категория может соответствовать уникальному эпитопу, который либо явно отличается от эпитопа, соответствующего другой категории, либо частично перекрывается с ним. Такая технология позволяет исключать генетически идентичные антитела, благодаря чему определение характеристик может быть сфокусировано на генетически отличающихся антителах. В случае применения для скрининга гибридом, MAP может облегчить идентификацию редких клонов гибридом, которые продуцируют mAb с требуемыми характеристиками. MAP можно применять для распределения антител по настоящему изобретению на группы антител, связывающих разные эпитопы.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела к LAG3 или их антигенсвязывающие фрагменты связывают эпитоп в пределах любой одной или нескольких областей, представленных в LAG3, либо в естественной форме, представленной SEQ ID NO: 582, либо полученной рекомбинантным путем, представленной SEQ ID NO: 574 - 576, или их фрагмента. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению связываются с внеклеточной областью, содержащей одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 29-450 LAG3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению связываются с внеклеточной областью, содержащей одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 1-533 LAG3 яванского макака, представленного SEQ ID NO: 576.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение включает антитела к LAG3 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с одним или несколькими эпитопами, находящимися в пределах внеклеточной области LAG3 (SEQ ID NO: 588). Эпитоп(-ы) могут состоять из одной или нескольких непрерывных последовательностей из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных в пределах внеклеточной области LAG3. В качестве альтернативы, эпитоп может состоять из множества прерывающихся аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в пределах внеклеточной области LAG3. Как показано в примере 18 в настоящем документе, эпитоп LAG3, с которым взаимодействует иллюстративное антитело по настоящему изобретению H4sH15482P, определен аминокислотной последовательностью LRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY (SEQ ID NO: 589), которая соответствует аминокислотам 28-71 SEQ ID NO: 588. Следовательно, настоящее изобрете-

ние включает антитела к LAG3, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в пределах области, состоящей из аминокислот 28-71 SEQ ID NO: 588 (т. е. последовательность LRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGRHRAAPSSWGPRPRRY [SEQ ID NO: 589]).

Настоящее изобретение включает антитела к LAG3, которые связываются с тем же эпитопом, или частью эпитопа, что и любое из специфических иллюстративных антител, описанных в настоящем документе в табл.1, или антитело с последовательностями CDR из любого из иллюстративных антител, описанных в табл.1. Аналогично, настоящее изобретение также включает антитела к LAG3, которые конкурируют за связывание с LAG3 или фрагментом LAG3 фрагментом с любым из специфических иллюстративных антител, описанных в настоящем документе в табл.1, или антителом с последовательностями CDR из любого из иллюстративных антител, описанных в табл.1. Например, настоящее изобретение включает антитела к LAG3, которые перекрестно конкурируют за связывание с LAG3 с одним или несколькими антителами, определенными в примере 4 в настоящем документе (например, H4sH15482P, H4sH15479P, H4sH14813N, H4H14813N, H4H15479P, H4H15482P, H4H15483P, H4sH15498P, H4H15498P, H4H17828P2, H4H17819P и H4H17823P).

С применением известных в данной области стандартных способов можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к LAG3, или конкурирует ли с ним за связывание. Например, для определения того, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к LAG3 по настоящему изобретению, обеспечивают связывание эталонного антитела с белком или пептидом LAG3 в условиях насыщения. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой LAG3. Если тестируемое антитело способно связываться с LAG3 после насыщающего связывания с использованием эталонного антитела к LAG3, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, чем эталонное антитело к LAG3. Напротив, если тестируемое антитело не способно связываться с белком LAG3 после насыщающего связывания с использованием эталонного антитела к LAG3, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный эталонным антителом к LAG3 по настоящему изобретению.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным антителом к LAG3, осуществляют описанный выше метод на основе связывания в двух направлениях: При осуществлении метода в первом направлении обеспечивают связывание эталонного антитела с белком LAG3 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой LAG3. При осуществлении метода во втором направлении обеспечивают связывание тестируемого антитела с молекулой LAG3 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой LAG3. Если, при осуществлении метода в обоих направлениях, только первое (насыщающее связывание) антитело способно связываться с молекулой LAG3, то делают вывод, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с LAG3. Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, необязательно должно связываться с эпитопом, идентичным таковому для эталонного антитела, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела за счет связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентным образом ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. А именно, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, а предпочтительно 75%, 90% или даже 99%, как измерено в конкурентном анализе связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990 50:1495-1502). В качестве альтернативы, два антитела связывают один и тот же эпитоп, если практически все мутации по аминокислотам в антигене, которые снижают или исключают связывание одного антитела, снижают или исключают связывание другого. Два антитела связывают перекрывающиеся эпитопы, если некоторые мутации по аминокислотам, которые снижают или исключают связывание одного антитела, снижают или исключают связывание другого.

Затем можно осуществлять дополнительные стандартные эксперименты (например, мутирование пептидов и анализы связывания) для подтверждения того, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела обусловлено связыванием с тем же эпитопом, что и эпитоп для эталонного антитела, или же за отсутствие наблюдаемого связывания отвечает стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого типа можно осуществлять с применением ELISA, RIA, метода поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого известного из данной области количественного или качественного анализа связывания антител.

Иммуноконъюгаты

Настоящее изобретение охватывает моноклональное антитело человека к LAG3, конъюгированное с терапевтическим соединением ("иммуноконъюгат"), таким как цитотоксин или химиотерапевтическое средство для лечения злокачественной опухоли. В контексте настоящего документа термин "иммуноконъюгат" относится к антителу, которое химически или биологически связано с цитотоксином, радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, нацеливающим или репортерным соединением, ферментом, токсином, пептидом или белком или терапевтическим средством. Антитело может быть связано с цитотоксином, радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, нацеливающим или репортер-

ным соединением, ферментом, токсином, пептидом или терапевтическим средством в любом местоположении вдоль всей молекулы при условии, что оно сохраняет способность связывать свою мишень. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антитела и лекарственного средства и слитые белки антитело-токсин. Согласно одному варианту осуществления средством может быть второе отличающееся антитело к LAG3. Согласно определенным вариантам осуществления антитело может быть конъюгировано со средством, специфическим в отношении опухолевой клетки или инфицированной вирусом клетки. Тип терапевтического соединения, которое может быть конъюгировано с антителом к LAG3, будет зависеть от состояния, подлежащего лечению, и от требуемого терапевтического эффекта, который должен быть достигнут. Примеры подходящих средств для образования иммуноконъюгатов известны в данной области; см., например, WO 05/103081.

Полиспецифические антитела

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или полиспецифическими. Полиспецифические антитела могут быть специфическими в отношении разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении более чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение включает полиспецифические антигенсвязывающие молекулы или их антигенсвязывающие фрагменты, где один специфический элемент иммуноглобулина является специфическим в отношении внеклеточного домена LAG3, или его фрагмента, а другой специфический элемент иммуноглобулина является специфическим в отношении связывания за пределами внеклеточного домена LAG3, или второй мишени для терапевтического воздействия, или конъюгирован с терапевтическим соединением.

Любая из полиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению или ее вариантов может быть сконструирована с применением стандартных методов молекулярной биологии (например, технологии рекомбинантных ДНК и белковой инженерии), как будет известно специалисту в данной области.

Согласно некоторым вариантам осуществления LAG3-специфические антитела получают в биспецифическом формате ("биспецифические"), в котором переменные области, связывающиеся с отличающимися доменами LAG3, соединены вместе для обеспечения специфичности в отношении двух доменов в рамках одной связывающей молекулы. Сконструированные соответствующим образом биспецифические молекулы могут усиливать общую эффективность в отношении ингибирования LAG3 за счет повышения как специфичности, так и avidности связывания. Переменные области со специфичностью в отношении отдельных доменов (например, сегментов N-концевого домена), или которые могут связываться с разными областями в пределах одного домена, объединяют в пару на структурном каркасе, что позволяет каждой области связываться одновременно с отдельными эпитопами или с разными областями в пределах одного домена. Согласно одному примеру биспецифические переменные области тяжелой цепи (V_H) связывающей молекулы со специфичностью в отношении одного домена рекомбинируют с переменными областями легкой цепи (V_L) ряда связывающих молекул со специфичностью в отношении второго домена с целью идентификации неродственных партнеров V_L , которые можно объединять в пару с исходной V_H без нарушения исходной специфичности для такой V_H . Таким образом, один сегмент V_L (например, V_{L1}) можно комбинировать с двумя разными V_H -доменами (например, V_{H1} и V_{H2}) с получением биспецифической молекулы, состоящей из связывающих "плеч" (V_{H1} - V_{L1} и V_{H2} - V_{L1}). Применение одного сегмента V_L упрощает систему и, таким образом, облегчает осуществление применяемых для получения биспецифической молекулы процессов клонирования, экспрессии и очистки и повышает их эффективность (см., например, USN13/022759 и US2010/0331527).

В качестве альтернативы, антитела, которые связывают более чем один домен и вторую мишень, такую как, без ограничения, например, второе отличное антитело к LAG3, могут быть получены в биспецифическом формате с применением описанных в настоящем документе методик или других известных специалистам в данной области методик. Переменные области антитела, связывающиеся с отличающимися областями, могут быть соединены вместе с переменными областями, которые связываются с соответствующими участками, например, внеклеточного домена LAG3, для обеспечения специфичности в отношении двух антигенов в рамках одной связывающей молекулы. Сконструированные соответствующим образом биспецифические молекулы такого типа выполняют двойную функцию. Переменные области со специфичностью в отношении внеклеточного домена комбинируют с переменной областью со специфичностью в отношении связывания за пределами внеклеточного домена, и объединяют их в пару на структурном каркасе, что позволяет каждой переменной области связываться с отдельными антигенами.

Иллюстративный формат биспецифического антитела, который можно применять в контексте настоящего изобретения, предусматривает применение первого C_{H3} -домена иммуноглобулина (Ig) и второго C_{H3} -домена Ig, где первый и второй C_{H3} -домены Ig отличаются друг от друга по меньшей мере по одной аминокислоте, и где отличие по меньшей мере по одной аминокислоте обуславливает снижение способности связывания биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим анти-

телом, не характеризующимся таким отличием по аминокислоте. Согласно одному варианту осуществления первый C_H3-домен Ig связывает белок А, а второй C_H3-домен Ig предусматривает мутацию, которая обуславливает снижение или устранение способности связывания с белком А, как, например, модификация Н95R (согласно IMGT-нумерации мутаций в экзонах; Н435R согласно EU-нумерации). Вторым C_H3 может дополнительно предусматривать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые можно найти в пределах второго C_H3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае IgG1-антител; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае IgG2 антител; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае IgG4-антител. Вариации описанного выше формата биспецифического антитела включены в объем настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или в виде диатела, биспецифические форматы в виде слияний IgG-scFv, Ig с двойными переменными доменами (DVD), Quadroma, антитела со структурой "выступ во впадину", антитела с общей легкой цепью (например, антитела с общей легкой цепью со структурой "выступ во впадину" и т. д.), CrossMab, CrossFab, полученного на основе технологии SEED антитела ((SEED)body), антитела, полученного путем опосредованной лейциновой застезкой димеризации, Duobody, IgG1/IgG2, IgG с Fab двойного действия (DAF) и биспецифические форматы Mab² (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11 и цитируемые в ней ссылки, для обзора перечисленных выше форматов). Биспецифические антитела также могут быть сконструированы с применением конъюгирования пептид/нуклеиновая кислота, например, где применяются аминокислоты не природного происхождения с перекрестной химической активностью для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самособираются в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтическое введение и составы

Настоящее изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим антитела к LAG3 или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению. Терапевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением будут вводить с подходящими носителями, инертными наполнителями и другими средствами, которые включают в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т. д. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания. Такие составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липид (катионный или анионный) везикулы (например, LIPOFECTINTM), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии типа "масло в воде" и "вода в масле", Carbowax в виде эмульсий (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие Carbowax. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела может варьироваться в зависимости от возраста и размера субъекта, которому его будут вводить, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.д. Если антитело по настоящему изобретению применяют для лечения заболевания или нарушения у взрослого пациента, или для предупреждения такого заболевания, целесообразно вводить антитело по настоящему изобретению обычно в виде однократной дозы, составляющей от приблизительно 0,1 до приблизительно 60 мг/кг веса тела, более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 60, от приблизительно 20 до приблизительно 50, от приблизительно 10 до приблизительно 50, от приблизительно 1 до приблизительно 10 или от приблизительно 0,8 до приблизительно 11 мг/кг веса тела. В зависимости от тяжести состояния частоту и продолжительность лечения можно корректировать. Согласно определенным вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно вводить в виде начальной дозы, составляющей по меньшей мере от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 5 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 10 до приблизительно 200 мг, до приблизительно 100 мг или до приблизительно 50 мг. Согласно определенным вариантам осуществления после начальной дозы можно осуществлять введение второй или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть примерно таким же или меньшим, чем количество в случае начальной дозы, где введение последующих доз разделено промежутком времени, составляющим от по меньшей мере 1 дня до 3 дней; по меньшей мере одну неделю, по меньшей мере 2 недели; по меньшей мере 3 недели; по меньшей мере 4 недели; по меньшей мере 5 недель; по меньшей мере 6 недель; по меньшей мере 7 недель; по меньшей мере 8 недель; по меньшей мере 9 недель; по меньшей мере 10 недель; по меньшей мере 12 недель или по меньшей мере 14 недель.

Известны различные системы доставки, и их можно применять для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, например, включение в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецеп-

торами эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Способы введения включают без ограничения внутрикожный, чрескожный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути введения. Композиция может быть введена любым подходящим путем, например, посредством инфузии или болюсной инъекции, за счет абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и тонкой кишки и т. д.), и может быть введена вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическую композицию также можно доставлять в составе везикулы, в частности, липосомы (см., например, Langer (1990) *Science* 249:1527-1533).

Применение наночастиц для доставки антител по настоящему изобретению также включено в настоящий документ. Конъюгированные с антителом наночастицы можно использовать как для терапевтических, так и для диагностических применений. Конъюгированные с антителом наночастицы и способы их получения и применения детально описаны в Arguebo, M., et al. 2009 ("Antibody-conjugated наночастицы for biomedical applications" in *J. Nanomat.* Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), включенной в настоящий документ посредством ссылки. Наночастицы могут быть разработаны и конъюгированы с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, для нацеливания на опухолевые клетки, или аутоиммунные клетки ткани, или инфицированные вирусом клетки. Наночастицы для доставки лекарственных средств также были описаны, например, в US 8257740 или US 8246995, каждая из которых включена в настоящий документ во всей своей полноте.

В определенных случаях фармацевтическая композиция может быть доставлена с помощью системы контролируемого высвобождения. Согласно одному варианту осуществления можно применять насос. Согласно другому варианту осуществления можно применять полимерные вещества. Согласно еще одному варианту осуществления система контролируемого высвобождения может быть помещена вблизи мишени композиции, благодаря чему требуется лишь часть системной дозы.

Инъекционные препараты могут предусматривать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных, интракраниальных, внутривентрикулярных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т. д. Такие инъекционные препараты можно получать с помощью общеизвестных способов. Например, инъекционные препараты можно получать, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования описанного выше антитела или его соли в стерильной водной среде или масляной среде, обычно применяемых для инъекций. В качестве водной среды для инъекций существуют, например, физиологический солевой раствор, изотоничный раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные вещества и т.д., которые можно применять в сочетании с соответствующим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно применять в сочетании с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученным таким образом инъекционным раствором предпочтительно заполняют соответствующую ампулу.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартных иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, для доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению без труда можно применять устройство для доставки в виде шприц-ручки. Такое устройство для доставки в виде шприц-ручки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки в виде шприц-ручки обычно используется заменяемый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того как вся фармацевтическая композиция из картриджа была введена, и картридж оказался пустым, пустой картридж без труда можно выбросить и заменить на новый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После этого устройстве для доставки в виде шприц-ручки можно применять повторно. В одноразовом устройстве для доставки в виде шприц-ручки нет заменяемого картриджа. Вместо этого одноразовое устройство для доставки в виде шприц-ручки выпускается предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После того как в резервуаре исчерпывается фармацевтическая композиция, устройство полностью выбрасывают.

Для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению можно применять множество устройств для доставки в виде шприц-ручки и автоинжектора многоразового использования. Примеры включают без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly и Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis,

Франкфурт, Германия) и многие другие. Примеры одноразовых устройств для доставки в виде шприц-ручки, которые можно применять для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Эбботт-Парк, Иллинойс) и многие другие.

Преимущественно описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения составляют в лекарственные формы с разовой дозой, подходящей для корректировки дозы активных ингредиентов. Такие лекарственные формы с разовой дозой включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекционные растворы (ампулы), суппозитории и т. д. Количество содержащегося в них антитела обычно составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на лекарственную форму с разовой дозой; в частности, в случае формы для инъекций является предпочтительным, чтобы антитело содержалось в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг, и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтические применения антител

Антитела по настоящему изобретению пригодны, среди прочего, для лечения, предупреждения и/или ослабления любого заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией, передачей сигнала или активностью LAG3, или обусловленного вышеуказанным, или поддающегося лечению посредством блокирования взаимодействия между LAG3 и лигандом LAG3 МНС класса II или другого способа ингибирования активности LAG3 и/или передачи сигнала с его участием. Например, настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли (ингибирование роста опухоли) и/или вирусных инфекций путем введения описанного в настоящем документе антитела к LAG3 (или фармацевтической композиции, содержащей антитело к LAG3) нуждающемуся в таком лечении пациенту, и к антителам к LAG3 (или фармацевтической композиции, содержащей антитело к LAG3) для применения в лечении злокачественной опухоли (ингибирование роста опухоли) и/или вирусных инфекций. Антитела по настоящему изобретению пригодны для лечения, предупреждения и/или ослабления заболевания, или нарушения, или состояния, такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция, и/или для ослабления по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием. В контексте описанных в настоящем документе способов лечения антитело к LAG3 можно вводить в качестве монотерапии (т.е. в качестве единственного терапевтического средства) или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами (примеры которых описаны другом месте настоящего документа).

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения описанные в настоящем документе антитела пригодны для лечения субъектов, страдающих от первичной или рецидивирующей злокачественной опухоли, включая без ограничения злокачественное новообразование кроветворной ткани, рак головного мозга (например, мультиформную глиобластому), почечно-клеточную карциному (например, светлоклеточный рак почки), рак яичника, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы (например, трижды негативную рак молочной железы), гепатоцеллюлярную карциному, рак кости, рак толстой кишки, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак толстой и прямой кишки, мезотелиому и меланому.

В контексте настоящего документа термин "злокачественное новообразование кроветворной ткани" включает злокачественное заболевание системы крови, которое затрагивает кровь, костный мозг, лимфу или лимфатическую систему. Таким образом, термин включает злокачественные новообразования из клеток лимфоидной и миелоидной линий дифференцировки клеток. Из клеток миелоидной линии дифференцировки обычно образуются гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки; из клеток миелоидной линии дифференцировки образуются В-, Т-, NK- и плазматические клетки. Таким образом, термин включает злокачественные новообразования из вышеупомянутых клеток, а именно формы лимфомы, формы миеломы, формы лимфоидного лейкоза и формы миелоидного лейкоза. Примеры включают без ограничения острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз, формы лимфомы Ходжкина, формы неходжкинской лимфомы (например, В-клеточную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому) и миелому (включая множественную миелому).

Антитела можно применять для лечения симптомов злокачественной опухоли на ранней стадии или на поздней стадии. Согласно одному варианту осуществления антитело или его фрагмент по настоящему изобретению можно применять для лечения злокачественной опухоли на поздней стадии или метастатической злокачественной опухоли. Антитела являются пригодными в снижении темпов, или ингибировании, или уменьшении степени роста опухоли как при солидных опухолях, так и при злокачественного новообразования кроветворной тканях. Согласно определенным вариантам осуществления лечение с помощью антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению обеспечивает более чем 40% регрессию, более чем 50% регрессию, более чем 60% регрессию, более чем 70% регрессию, более чем 80% регрессию или более чем 90% регрессию опухоли у субъекта. Согласно определен-

ным вариантам осуществления антитела можно применять для предупреждения рецидива опухоли. Согласно определенным вариантам осуществления антитела являются пригодными в увеличении выживаемости без прогрессирования или общей выживаемости субъекта со злокачественной опухолью. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела являются пригодными в снижении токсичности, связанной с химиотерапией или лучевой терапией, с поддержанием при этом долговременной выживаемости пациента, страдающего от злокачественной опухоли.

Согласно определенным вариантам осуществления субъектом является пациент,

страдающий от злокачественной опухоли, и который ранее не получал терапию с применением антител к PD-1/PD-L1, но является потенциальным кандидатом на получение терапии на основе антител к PD-1, и/или

ранее получал терапию на основе антител к PD-1/PD-L1, и у него был подтвержден объективный ответ (CR или PR) или SD в течение по меньшей мере 3 месяцев в процессе терапии с применением антител к PD-1/PD-L1, но затем имело место прогрессирование в процессе такой терапии, или в качестве наилучшего ответа наблюдали SD или PR с последующим устойчивым ответом в течение 6 месяцев; и/или

не является кандидатом на стандартную терапию, или в случае которого предполагается, что доступная терапия не будет обеспечивать клиническую пользу, и подходит для монотерапии mAb1; и/или

страдает от не подвергавшейся лечению антителами к PD-1/PD-L1 NSCLC стадии IIIB или IV либо без предшествующей терапии метастатического заболевания, либо с прогрессированием/повторным появлением заболевания после осуществления схемы лечения с препаратом платины; и/или

страдает от подвергавшейся лечению антителами к PD-1/PD-L1 NSCLC стадии IIIB или IV не более чем с 2 предшествующими видами терапии метастатического заболевания; и/или

страдает от не подвергавшейся лечению антителами к PD-1/PD-L1 ccRCC на поздней стадии или метастатической ccRCC со светлоклеточным компонентом, и который получал 1-2 предшествующие схемы лечения антиангиогенным терапевтическим препаратом; и/или

страдает от подвергавшейся лечению антителами к PD-1/PD-L1 ccRCC на поздней стадии или метастатической ccRCC со светлоклеточным компонентом, и который получал 1-2 предшествующие схемы лечения антиангиогенным терапевтическим препаратом; и/или

страдает от не подвергавшейся лечению антителами к PD-1/PD-L1 метастатической TNBC (негативной по рецепторам эстрогена, прогестерона и рецептору 2 эпидермального фактора роста человека), и который получал 5 или меньше предшествующих линий терапии; и/или

страдает от не подвергавшейся лечению антителами к PD-1/PD-L1 меланомы на поздней стадии или метастатической меланомы, и который получал не более чем 2 предшествующие схемы лечения метастатического заболевания; и/или

страдает от подвергавшейся лечению антителами к PD-1/PD-L1 меланомы на поздней стадии или метастатической меланомы, и который получал не более чем 2 предшествующие схемы лечения метастатического заболевания; и/или

страдает от не подвергавшейся лечению антителами к PD-1/PD-L1 рецидивирующей/рефрактерной DLBCL, и у которого либо имело место прогрессирование после трансплантации аутологичных стволовых клеток, либо он не является кандидатом на ее проведение; и/или

страдает от подвергавшейся лечению антителами к PD-1/PD-L1 рецидивирующей/рефрактерной DLBCL, и у которого либо имело место прогрессирование после трансплантации аутологичных стволовых клеток, либо он не является кандидатом на ее проведение.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению являются пригодными для лечения субъектов, страдающих от хронической вирусной инфекции. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению являются пригодными в снижении титров вирусов в организме хозяина и/или возобновлении активности истощенный Т-клеток. Согласно определенным вариантам осуществления антитело или его фрагмент по настоящему изобретению можно применять для лечения хронической вирусной инфекции, вызванной вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно вводить в терапевтической дозе пациенту с инфекцией, вызванной вирусом иммунодефицита человека (HIV), или вирусом папилломы человека (HPV), или вирусом гепатита В/С (HBV/HCV). Согласно сходному варианту осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно применять для лечения инфекции, вызванной вирусом иммунодефицита обезьян (SIV), у субъекта-обезьяны, такой как яванский макак.

Согласно определенным вариантам осуществления блокирующее антитело по настоящему изобретению можно вводить в терапевтически эффективном количестве субъекту, страдающему от злокачественной опухоли или вирусной инфекции.

Одно или несколько антител по настоящему изобретению можно вводить для облегчения, или предупреждения, или уменьшения тяжести одного или нескольких из симптомов или состояний заболевания или нарушения.

Согласно настоящему документу также предполагается профилактическое применение одного или

нескольких антител по настоящему изобретению для пациентов с риском развития заболевания или нарушения, такого как злокачественная опухоль и вирусная инфекция.

Согласно дополнительному варианту осуществления настоящего изобретения антитела по настоящему изобретению применяют для получения фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих от злокачественной опухоли или вирусной инфекции. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения антитела по настоящему изобретению применяют в качестве вспомогательной терапии вместе с другим известным специалистам в данной области средством или другим видом терапии, пригодным для лечения злокачественной опухоли или вирусной инфекции.

Комбинированные терапевтические препараты и составы

Комбинированные терапевтические препараты включают антитело к LAG3 по настоящему изобретению и любое дополнительное терапевтическое средство, которое можно с преимущественным результатом комбинировать с антителом по настоящему изобретению или с биологически активным фрагментом антитела по настоящему изобретению.

Антитела по настоящему изобретению можно комбинировать с получением синергического эффекта с одним или несколькими противоопухолевыми лекарственными средствами или видом терапии, применяемыми для лечения или ингибирования злокачественной опухоли, включая, например, злокачественное новообразование кроветворной ткани, рак головного мозга (например, мультиформную глиобластому), почечно-клеточную карциному, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы, гепатоцеллюлярную карциному, рак кости, рак толстой кишки, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак толстой и прямой кишки, мезотелиому и меланому. Согласно настоящему документу предполагается применение антител к LAG3 по настоящему изобретению в комбинации с иммуностимулирующими и/или иммунозаместительными видами терапии для ингибирования роста опухоли и/или повышения выживаемости пациентов со злокачественной опухолью. Иммуностимулирующие виды терапии включают иммуностимулирующие виды терапии прямого действия для усиления активности иммунных клеток либо способом "отпускания тормоза" в отношении иммунных клеток с подавленной активностью, либо "прибавления газа" для активации иммунного ответа. Примеры включают нацеливание на другие рецепторы, являющиеся частью иммунологических контрольных точек, вакцинацию и адъюванты. Способы иммунозаместительного воздействия могут обеспечить повышение антигенности опухоли за счет стимуляции иммуногенной гибели клеток, воспаления, или оказывают другие опосредованные эффекты, которые стимулируют противоопухолевый иммунный ответ. Примеры включают облучение, химиотерапию, антиангиогенные средства и хирургическое вмешательство.

Согласно различным вариантам осуществления одно или несколько антител по настоящему изобретению можно применять в комбинации с ингибитором PD-1 (например, антителом к PD-1, таким как ниволумаб, пембролизумаб, пидилизумаб, BGB-A317 или REGN2810), ингибитором PD-L1 (например, антителом к PD-L1, таким как авелумаб, атезолизумаб, дурвалумаб, MDX-1105 или REGN3504), ингибитором CTLA-4 (например, ипилимумабом), ингибитором TIM3, ингибитором BTLA, ингибитором TIGIT, ингибитором CD47, ингибитором GITR, антагонистом другого коингибитора T-клетки или лиганда (например, антителом к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонистом фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (например, "белок-ловушка для VEGF", таким как афлиберцепт, или другим ингибирующим VEGF белком слияния, как изложено в US 7087411, или антителом к VEGF или его антигенсвязывающим фрагментом (например, бевацизумабом или ранибизумабом) или низкомолекулярным ингибитором киназы VEGF-рецептора (например, сунитинибом, сорафенибом или пазопанибом)), ингибитором Ang2 (например, несвакумабом), ингибитором трансформирующего ростового фактора бета (TGFB), ингибитором рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, эрлотинибом, цетуксимабом), ингибитором CD20 (например, антителом к CD20, таким как ритуксимаб), антителом к опухолеспецифическому антигену (например, CA9, CA125, ассоциированному с меланомой антигену 3 (MAGE3), эмбриональному опухолевому антигену (CEA), виментину, опухолевой M2-PK, простат-специфическому антигену (PSA), муцину-1, MART-1 и CA19-9), вакциной (например, бациллой Кальмета-Герена, противоопухолевой вакциной), адъювантом для усиления представления антигена (например, гранулоцитарно-моноцитарным колониестимулирующим фактором), биспецифическим антителом (например, биспецифическим антителом к CD3×CD20 или биспецифическим антителом к PSMA×CD3), цитотоксином, химиотерапевтическим средством (например, дакарбазином, темозоломидом, циклофосфамидом, доцетакселом, доксорубицином, даунорубицином, цисплатином, карбоплатином, гемцитабином, метотрексатом, митоксантроном, оксалиплатином, паклитакселом и винкристином), циклофосфамидом, лучевой терапией, ингибитором IL-6R (например, сарилумабом), ингибитором IL-4R (например, дупилумабом), ингибитором IL-10, цитокином, таким как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, конъюгатом антитела и лекарственного средства (ADC) (например, ADC антитело к CD19-DM4 и ADC антитело к DS6-DM4), противовоспалительным лекарственным средством (например, кортикостероидами и нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами), диетической добавкой, такой как антиоксиданты, или любой другой терапией для лечения злокачественной опухоли.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела к LAG3 по настоящему изобретению можно применять в комбинации с противоопухолевыми вакцинами, включая вакцины на основе дендритных клеток, онколитические вирусы, вакцины на основе опухолевых клеток и т. д., для усиления противоопухолевого ответа. Примеры противоопухолевых вакцин, которые можно применять в комбинации с антителами к LAG3 по настоящему изобретению, включают вакцину против MAGE3 для меланомы и рака мочевого пузыря, вакцину против MUC1 для рака молочной железы, EGFRv3 (например, риндопепимут) для рака головного мозга (включая мультиформную глиобластому) или ALVAC-CEA (для CEA+ форм злокачественной опухоли).

Согласно определенным вариантам осуществления антитела к LAG3 по настоящему изобретению можно применять в комбинации с лучевой терапией в способах обеспечения долговременных противоопухолевых ответов и/или повышения выживаемости пациентов со злокачественной опухолью. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к LAG3 по настоящему изобретению можно применять для пациента со злокачественной опухолью до, после применения лучевой терапии или параллельно с ней. Например, лучевую терапию можно применять в одной или нескольких дозах по отношению к очагам опухоли, с последующим введением одной или нескольких доз антител к LAG3 по настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления лучевую терапию можно применять локально по отношению к очагу опухоли для усиления локальной иммуногенности опухоли пациента (облучение, выполняющее функцию адьюванта) и/или для уничтожения опухолевых клеток (абляционная лучевая терапия) с последующим системным введением антитела к LAG3 по настоящему изобретению. Например, интракраниальное облучение можно применять для пациента со злокачественной опухолью головного мозга (например, мультиформной глиобластомой) в комбинации с системным введением антитела к LAG3 по настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам осуществления антитела к LAG3 по настоящему изобретению можно применять в комбинации с лучевой терапией и химиотерапевтическим средством (например, темозоломидом) или антагонистом VEGF (например, афлиберцептом).

Согласно определенным вариантам осуществления антитела к LAG3 по настоящему изобретению можно вводить в комбинации с одним или несколькими противовирусными лекарственными средствами для лечения хронической вирусной инфекции, вызванной LCMV, HIV, HPV, HBV или HCV. Примеры противовирусных лекарственных средств включают без ограничения зидовудин, ламивудин, абакавир, рибавирин, лопинавир, эфавиренз, кобицистат, тенофовир, рилпивирин и кортикостероиды.

Дополнительные терапевтически активные средства/компоненты можно вводить до, после введения антитела к LAG3 по настоящему изобретению, или одновременно с ним. Для целей настоящего раскрытия такие схемы введения предусматривают введение антитела к LAG3 "в комбинации со" вторым терапевтически активным компонентом.

Дополнительный(-е) терапевтически активный(-ые) компонент(-ы) можно вводить субъекту до введения антитела к LAG3 по настоящему изобретению. Например, можно считать, что первый компонент вводят "до" введения второго компонента, если первый компонент вводят за 1 неделю до, за 72 ч до, за 60 ч до, за 48 ч до, за 36 ч до, за 24 ч до, за 12 ч до, за 6 ч до, за 5 ч до, за 4 ч до, за 3 ч до, за 2 ч до, 1 ч до, за 30 мин до, за 15 мин до, за 10 мин до, за 5 мин до или менее чем за 1 мин до введения второго компонента. Согласно другим вариантам осуществления дополнительный(-е) терапевтически активный(-е) компонент(-ы) можно вводить субъекту после введения антитела к LAG3 по настоящему изобретению. Например, можно считать, что первый компонент вводят "после" введения второго компонента, если первый компонент вводят через 1 мин после, через 5 мин после, через 10 мин после, через 15 мин после, через 30 мин после, через 1 ч после, через 2 ч после, через 3 ч после, через 4 ч после, через 5 ч после, через 6 ч после, через 12 ч после, через 24 ч после, через 36 ч после, через 48 ч после, через 60 ч после, через 72 ч после введения второго компонента. Согласно еще одним вариантам осуществления дополнительный(-е) терапевтически активный(-е) компонент(-ы) можно вводить субъекту одновременно с введением антитела к LAG3 по настоящему изобретению. "Одновременное" введение, для целей настоящего изобретения, включает, например, введение антитела к LAG3 и дополнительного терапевтически активного компонента субъекту в единой лекарственной форме (например, в виде комбинированного состава), или в отдельных лекарственных формах, вводимых субъекту с разницей в приблизительно 30 мин или меньше друг от друга. При введении в отдельных лекарственных формах, каждую лекарственную форму можно вводить одним и тем же путем (например, как антитело к LAG3, так и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить внутривенно, подкожно и т.д.); в качестве альтернативы, каждую лекарственную форму можно вводить другим путем (например, антитело к LAG3 можно вводить внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить подкожно). Для целей настоящего раскрытия любой из случаев, введение компонентов в единой лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах одним и тем же путем или в отдельных лекарственных формах разными путями, считают "одновременным введением". Для целей настоящего раскрытия введение антитела к LAG3 "до", "одновременно с" или "после" (как эти термины определены в настоящем документе выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считают введением антитела к LAG3 "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом).

Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антитело к LAG3 по

настоящему изобретению составлено совместно с одним или несколькими из дополнительных терапевтически активных компонентов, описанных в другом месте настоящего документа, с применением ряда комбинаций дозировок.

Согласно иллюстративным вариантам осуществления, в которых антитело к LAG3 по настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором PD-1 (например, антителом к PD-1, раскрытым в US 2015/0203579, включенном в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте), включая введение комбинированных составов, содержащих антитело к LAG3 и ингибитор PD-1, субъекту можно вводить отдельные компоненты и/или их можно совместно составлять с применением ряда комбинаций дозировок. Таким образом, настоящее изобретение включает комбинацию (i) антитела к LAG3 по настоящему изобретению и (ii) ингибитора PD-1 (например, антитела к PD-1, раскрытого в US 2015/0203579, включенном в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте) для совместного, раздельного и/или последовательного применения в лечении злокачественной опухоли или вирусных инфекций. Например, каждое из антитела к LAG3 и ингибитора PD-1 (например, антитела к PD-1) можно вводить субъекту и/или они могут содержаться в комбинированном составе в количестве, выбранном из группы, состоящей из 0,01 мг, 0,02 мг, 0,03 мг, 0,04 мг, 0,05 мг, 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,7 мг, 0,8 мг, 0,9 мг, 1,0 мг, 1,5 мг, 2,0 мг, 2,5 мг, 3,0 мг, 3,5 мг, 4,0 мг, 4,5 мг, 5,0 мг, 6,0 мг, 7,0 мг, 8,0 мг, 9,0 мг и 10,0 мг. Комбинации/комбинированные составы можно вводить субъекту в соответствии с любой из схем введения, раскрытых в другом месте настоящего документа, включая, например, введение дважды в неделю, один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в месяц, один раз в 2 месяца, один раз в 3 месяца, один раз в 4 месяца, один раз в 5 месяцев, один раз в 6 месяцев и т.д. Антитело к LAG3 по настоящему изобретению можно вводить, к примеру, в дозе, составляющей от приблизительно 0,8 до приблизительно 11, от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 3 до приблизительно 10, приблизительно 1, приблизительно 3 или приблизительно 10 мг/кг, совместно с ингибитором PD-1 (например, антителом к PD-1, раскрытым в US 2015/0203579), в дозе, составляющей от приблизительно 3 до 5 или приблизительно 3,0 мг/кг. Совместное введение можно осуществлять, к примеру, каждые 14 дней, 21 день или 28 дней.

Согласно иллюстративным вариантам осуществления, в которых антитело к LAG3 по настоящему изобретению вводят в комбинации с антагонистом VEGF (например, белком-ловушкой для VEGF, таким как афлиберцепт), включая введение комбинированных составов, содержащих антитело к LAG3 и антагонист VEGF, субъекту можно вводить отдельные компоненты и/или их можно совместно составлять с применением ряда комбинаций дозировок. Например, антитело к LAG3 можно вводить субъекту и/или оно может содержаться в комбинированном составе в количестве, выбранном из группы, состоящей из 0,01 мг, 0,02 мг, 0,03 мг, 0,04 мг, 0,05 мг, 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,7 мг, 0,8 мг, 0,9 мг, 1,0 мг, 1,5 мг, 2,0 мг, 2,5 мг, 3,0 мг, 3,5 мг, 4,0 мг, 4,5 мг, 5,0 мг, 6,0 мг, 7,0 мг, 8,0 мг, 9,0 мг и 10,0 мг; и антагонист VEGF (например, белок-ловушка для VEGF, такой как афлиберцепт) можно вводить субъекту и/или он может содержаться в комбинированном составе в количестве, выбранном из группы, состоящей из 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,7 мг, 0,8 мг, 0,9 мг, 1,0 мг, 1,1 мг, 1,2 мг, 1,3 мг, 1,4 мг, 1,5 мг, 1,6 мг, 1,7 мг, 1,8 мг, 1,9 мг, 2,0 мг, 2,1 мг, 2,2 мг, 2,3 мг, 2,4 мг, 2,5 мг, 2,6 мг, 2,7 мг, 2,8 мг, 2,9 мг и 3,0 мг. Комбинации/комбинированные составы можно вводить субъекту в соответствии с любой из схем введения, раскрытых в другом месте настоящего документа, включая, например, введение дважды в неделю, один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в месяц, один раз в 2 месяца, один раз в 3 месяца, один раз в 4 месяца, один раз в 5 месяцев, один раз в 6 месяцев и т.д.

Схемы введения

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения многократные дозы антитела к LAG3 (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к LAG3 и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упоминаемый в настоящем документе) можно вводить субъекту в течение определенного промежутка времени. Способы в соответствии с таким аспектом настоящего изобретения предусматривают последовательное введение субъекту многократных доз антитела к LAG3 по настоящему изобретению. В контексте настоящего документа "последовательное введение" означает, что дозу антитела к LAG3 субъекту вводят в разные моменты времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, в часы, дни, недели или месяцы). Настоящее изобретение включает способы, которые предусматривают последовательное введение пациенту единичной начальной дозы антитела к LAG3, с последующим введением одной или нескольких доз второй очереди антитела к LAG3, и необязательно с последующим введением одной или нескольких доз третьей очереди антитела к LAG3. Антитело к LAG3 можно вводить в дозе от 0,1 до 100 мг/кг веса тела субъекта.

Термины "начальная доза", "дозы второй очереди" и "дозы третьей очереди" относятся к временной последовательности введения антитела к LAG3 по настоящему изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят вначале курса лечения (также называется "исходной дозой"); "дозы второй очереди" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "дозы третьей очереди" представляют собой дозы, которые вводят после доз второй очереди. Начальная доза, дозы второй и третьей очереди могут содержать одинаковое количество антитела к LAG3, но в целом

могут отличаться друг от друга с учетом частоты введения. Однако согласно определенным вариантам осуществления количество антитела к LAG3, содержащееся в начальной дозе, дозах второй и третьей очереди, отличаются друг от друга (например, по мере необходимости скорректированы по возрастающей или по убывающей) в ходе курса лечения. Согласно определенным вариантам осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале курса лечения в качестве "нагрузочных доз", с последующими дозами, которые вводят реже (например, "поддерживающие дозы").

Согласно определенным вариантам осуществления количество антитела к LAG3, содержащееся в начальной дозе, дозах второй и/или третьей очереди, может быть субоптимальной или субтерапевтической. В контексте настоящего документа термины "субтерапевтический" или "субоптимальный" относятся к дозе антитела, вводимой на уровне, слишком низком для обеспечения терапевтического эффекта, или на уровне ниже необходимого для лечения заболевания, такого как злокачественная опухоль.

Согласно определенным иллюстративным вариантам осуществления настоящего изобретения каждую дозу второй и/или третьей очереди вводят через 1-26 (например,

1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12,

12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22,

22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½,

или более) недель после ближайшей предшествующей дозы. Фраза "ближайшая предшествующая доза" в контексте настоящего документа означает, в случае последовательности многократных введений, дозу антитела к LAG3, которую вводят пациенту до введения следующей дозы, в случае последовательности без промежуточных доз.

Способы в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения могут предусматривать введение пациенту любого числа доз второй и/или третьей очереди антитела к LAG3. Например, согласно определенным вариантам осуществления пациенту вводят только одну дозу второй очереди. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) доз второй очереди. Аналогично, согласно определенным вариантам осуществления пациенту вводят только одну дозу третьей очереди. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) доз третьей очереди.

Согласно вариантам осуществления, предусматривающим многократные дозы второй очереди, каждую дозу второй очереди можно вводить с той же частотой, что и другие дозы второй очереди. Например, каждую дозу второй очереди можно вводить пациенту через 1-2 недели или 1-2 месяца после ближайшей предшествующей дозы. Аналогичным образом, согласно вариантам осуществления, предусматривающим многократные дозы третьей очереди, каждую дозу третьей очереди можно вводить с той же частотой, что и другие дозы третьей очереди. Например, каждую дозу третьей очереди можно вводить пациенту через 2-12 недель после ближайшей предшествующей дозы. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения частота, с которой дозы второй и/или третьей очереди вводят пациенту, может варьироваться в течение курса лечения. Частота введения также может быть скорректирована врачом в ходе курса лечения в зависимости от потребностей отдельного пациента, участвующего в клиническом исследовании.

Диагностические применения антител

Антитела к LAG3 по настоящему изобретению можно применять для выявления и/или измерения LAG3 в образце, например, в диагностических целях.

Согласно некоторым вариантам осуществления предполагается применение одного или нескольких антител по настоящему изобретению в анализах выявления заболевания или нарушения, такого как злокачественная опухоль, аутоиммунное заболевание или вирусная инфекция. Иллюстративные диагностические анализы для LAG3 могут предусматривать, например, приведение образца, полученного от субъекта (например, пациента), в контакт с антителом к LAG3 по настоящему изобретению, где антитело к LAG3 метят с помощью детектируемой метки или репортерной молекулы или применяют в качестве лиганда захвата для избирательного выделения LAG3 из образцов от субъекта. В качестве альтернативы, немеченное антитело к LAG3 можно использовать для диагностических применений в комбинации со вторичным антителом, которое является меченым для возможности выявления. Детектируемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S или ¹²⁵I; флуоресцентное или хемилюминесцентное вещество, такое как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно применять для выявления или измерения LAG3 в образце, включают ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) и сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

Образцы, которые можно применять в диагностических анализах в отношении LAG3 в соответствии с настоящим изобретением, включают любой образец ткани или жидкости организма, который можно получить от субъекта, который содержит выявляемые количества либо белка LAG3, либо его фрагментов, при нормальных или патологических состояниях. В общем случае, уровни LAG3 в конкретном

образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, который не страдает от злокачественной опухоли или аутоиммунного заболевания), будут измерять сначала для установления исходного, или стандартного, уровня LAG3. Такой исходный уровень LAG3 затем можно сопоставлять с уровнями LAG3, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на наличие состояния, связанного со злокачественной опухолью, или симптомами, ассоциированными с таким состоянием.

Специфические в отношении LAG3 антитела могут не содержать дополнительных меток или соединений, или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или соединение. Согласно одному варианту осуществления метка или соединение представляет собой биотин. В анализе связывания, расположение метки (если таковая имеется) может определять ориентацию пептида по отношению к поверхности, на которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевую биотин, будет расположен так, что C-концевая часть пептида будет отдалена от поверхности.

Аспекты настоящего изобретения относятся к применению раскрытых антител в качестве маркеров для выполнения предсказаний в отношении злокачественной опухоли или вирусной инфекции у пациентов. Антитела по настоящему изобретению можно применять в диагностических анализах для прогностической оценки в отношении злокачественной опухоли у пациента и для предсказания показателей выживаемости.

Примеры

Следующие примеры приведены с целью предоставления специалистам в данной области полного раскрытия и описания того, как выполнять и применять способы и композиции по настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают как свое изобретение. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении применяемых значений (например, количеств, температуры и т. д.), однако следует учитывать наличие некоторых погрешностей и отклонений в экспериментах. Если не указано иное, части являются частями по весу, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура приведена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет приблизительно 25°C и давление является атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1. Получение антител человека к LAG3.

Антитела человека к LAG3 получали с применением фрагмента LAG3, который находится в пределах приблизительно аминокислотных остатков 29-450 последовательности под номером доступа в GenBank NP_002277.4 (SEQ ID NO: 582), соединенные с Fc-областью мыши. Иммуноген, с адьювантом для стимуляции иммунного ответа, непосредственно вводили полученной с помощью технологии VELOCIMMUNE® мыши (т. е. сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой цепи и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека), как описано в US 8502018 B2, или полученной с помощью технологии VelocImmune® гуманизированной мыши с универсальной легкой цепью (Universal Light Chain, ULC), как описано в WO 2013022782. Гуморальный иммунный ответ отслеживали с применением LAG3-специфического иммунологического анализа. Когда требуемый иммунный ответ был достигнут, спленоциты собирали и сливали с клетками миеломы мыши для сохранения жизнеспособности первых и для получения линий клеток гибридомы. Линии клеток гибридомы подвергали скринингу и отбору для идентификации клеточных линий, которые продуцируют LAG3-специфические антитела. С применением такой методики, и описанного выше иммуногена, были получены несколько химерных антител к LAG3 (т.е. антител, имеющих вариабельные домены человека и константные домены мыши); иллюстративные антитела, полученные таким образом у полученных с помощью технологии VELOCIMMUNE® мышей, были обозначены как H1M14985N, H1M14987N, H2M14811N, H2M14885N, H2M14926N, H2M14927N, H2M14931N, H2M18336N, H2M18337N и H4H14813N.

Антитела к LAG3 также выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток (от каждой из иммунизированных мышей) без слияния с клетками миеломы, как описано в заявке на патент США № 7582298, включенной в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. С применением такого способа были получены несколько полностью человеческих антител к LAG3 (т.е. антител, имеющих вариабельные домены человека и константные домены человека);

иллюстративные антитела, полученные таким образом, были обозначены как

H4H15477P,

H4H15483P, H4H15484P, H4H15491P, H4H17823P, H4H17826P2, H4H17828P2,

H4sH15460P, H4sH15462P, H4sH15463P, H4sH15464P, H4sH15466P, H4sH15467P,

H4sH15470P, H4sH15475P, H4sH15479P, H4sH15480P, H4sH15482P, H4sH15488P,

H4sH15496P2, H4sH15498P2, H4sH15505P2, H4sH15518P2, H4sH15523P2, H4sH15530P2,

H4sH15555P2, H4sH15558P2, H4sH15567P2 и H4H17819P.

Иллюстративные антитела

H4sH15496P2, H4sH15498P2, H4sH15505P2,

H4sH15518P2, H4sH15523P2, H4sH15530P2, H4sH15555P2, H4sH15558P2 и H4sH15567P2

были получены из В-клеток от полученных с помощью технологии Velocimmune® мышей с ULC.

Биологические свойства иллюстративных антител, полученных в соответствии со способами в этом примере, подробно описаны в представленных ниже примерах.

Пример 2. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности для переменных областей тяжелой и легкой цепей.

В табл.1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и CDR выбранных антител к LAG3 по настоящему изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в табл.2.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M14985N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1M14987N	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M14811N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M14885N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M14926N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M14927N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M14931N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M18336N	114	116	118	120	122	124	126	128
H2M18337N	130	132	134	136	138	140	142	144
H4H15477P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4H15483P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4H15484P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4H15491P	194	196	198	200	202	204	206	208
H4H17823P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4H17826P2	226	228	230	232	234	236	238	240
H4H17828P2	242	244	246	248	250	252	254	256
H4sH15460P	258	260	262	264	266	268	270	272
H4sH15462P	274	276	278	280	282	284	286	288
H4sH15463P	290	292	294	296	298	300	302	304
H4sH15464P	306	308	310	312	314	316	318	320
H4sH15466P	322	324	326	328	330	332	334	336
H4sH15467P	338	340	342	344	346	348	350	352
H4sH15470P	354	356	358	360	362	364	366	368
H4sH15475P	370	372	374	376	378	380	382	384
H4sH15479P	386	388	390	392	394	396	398	400
H4sH15480P	402	404	406	408	410	412	414	416
H4sH15482P	418	420	422	424	426	428	430	432
H4sH15488P	434	436	438	440	442	444	446	448
H4sH15496P2	450	452	454	456	522	524	526	528
H4sH15498P2	458	460	462	464	522	524	526	528
H4sH15505P2	466	468	470	472	522	524	526	528
H4sH15518P2	474	476	478	480	522	524	526	528
H4sH15523P2	482	484	486	488	522	524	526	528
H4sH15530P2	490	492	494	496	522	524	526	528
H4sH15555P2	498	500	502	504	530	532	534	536
H4sH15558P2	506	508	510	512	530	532	534	536
H4sH15567P2	514	516	518	520	530	532	534	536
H4H14813N	538	540	542	544	546	548	550	552
H4H17819P	554	556	558	560	562	564	566	568

Таблица 2. Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M14985N	1	3	5	7	9	11	13	15
H1M14987N	17	19	21	23	25	27	29	31
H2M14811N	33	35	37	39	41	43	45	47
H2M14885N	49	51	53	55	57	59	61	63
H2M14926N	65	67	69	71	73	75	77	79
H2M14927N	81	83	85	87	89	91	93	95
H2M14931N	97	99	101	103	105	107	109	111
H2M18336N	113	115	117	119	121	123	125	127
H2M18337N	129	131	133	135	137	139	141	143
H4H15477P	145	147	149	151	153	155	157	159
H4H15483P	161	163	165	167	169	171	173	175
H4H15484P	177	179	181	183	185	187	189	191
H4H15491P	193	195	197	199	201	203	205	207
H4H17823P	209	211	213	215	217	219	221	223
H4H17826P2	225	227	229	231	233	235	237	239
H4H17828P2	241	243	245	247	249	251	253	255
H4sH15460P	257	259	261	263	265	267	269	271
H4sH15462P	273	275	277	279	281	283	285	287
H4sH15463P	289	291	293	295	297	299	301	303
H4sH15464P	305	307	309	311	313	315	317	319
H4sH15466P	321	323	325	327	329	331	333	335
H4sH15467P	337	339	341	343	345	347	349	351
H4sH15470P	353	355	357	359	361	363	365	367
H4sH15475P	369	371	373	375	377	379	381	383
H4sH15479P	385	387	389	391	393	395	397	399
H4sH15480P	401	403	405	407	409	411	413	415
H4sH15482P	417	419	421	423	425	427	429	431
H4sH15488P	433	435	437	439	441	443	445	447
H4sH15496P2	449	451	453	455	521	523	525	527
H4sH15498P2	457	459	461	463	521	523	525	527
H4sH15505P2	465	467	469	471	521	523	525	527
H4sH15518P2	473	475	477	479	521	523	525	527
H4sH15523P2	481	483	485	487	521	523	525	527
H4sH15530P2	489	491	493	495	521	523	525	527
H4sH15555P2	497	499	501	503	529	531	533	535
H4sH15558P2	505	507	509	511	529	531	533	535
H4sH15567P2	513	515	517	519	529	531	533	535
H4H14813N	537	539	541	543	545	547	549	551
H4H17819P	553	555	557	559	561	563	565	567

Антитела, как правило, названы в настоящем документе в соответствии со следующей системой обозначений: префикс, соответствующий Fc (например, "H1M", "H4sH", "H4H" и т.д.), затем следует числовой идентификатор (например, "14813", "17828" и т.д., как показано в табл.1), затем следует суффикс "P", "P2" или "N". Таким образом, в соответствии с такой системой обозначений антитело в настоящем документе может быть названо, например, "H4sH14813N", "H4H17819P", "H4H17828P2" и т.д. Префиксы H4sH и H4H в применяемых в настоящем документе обозначениях антител указывают на конкретный изотип по Fc-области антитела. Например, антитело "H4sH" содержит Fc IgG4 человека с 2 или более изменениями по аминокислоте, как раскрыто в US20140243504 (включенной в настоящий документ во всей своей полноте), антитело "H4H" содержит Fc IgG4 человека с мутацией в виде замены серина на

пролин в шарнирной области (S108P), антитело "H1M" содержит Fc IgG1 мыши, а антитело "H2M" содержит Fc IgG2 мыши (все переменные области являются полностью человеческими, на что указывает первая "H" в обозначении антитела). Как будет понятно специалисту в данной области, антитело с Fc конкретного изоформа можно преобразовать в антитело с Fc другого изоформа (например, антитело с Fc IgG1 мыши можно преобразовать в антитело с Fc IgG4 человека и т. д.), но, в любом случае, переменные домены (включая CDR) - которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в табл.1, - будут оставаться такими же, а свойства связывания с антигеном, как ожидается, будут идентичными или в значительной степени подобными, независимо от происхождения Fc-домена.

Согласно определенным вариантам осуществления выбранные антитела с Fc IgG1 мыши преобразовывали в антитела с Fc IgG4 человека. Согласно определенным вариантам осуществления антитело содержит Fc IgG4 человека с 2 или более изменениями по аминокислоте, как раскрыто в US20100331527 (включенной в настоящий документ во всей своей полноте). Согласно одному варианту осуществления Fc-домен IgG4 предусматривает мутацию в виде замены серина на пролин в шарнирной области (S108P) для содействия стабилизации димера. Согласно определенным вариантам осуществления Fc-область антител по настоящему изобретению содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 569, 570, 571, 572 или 573. В табл.3 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей для последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи выбранных антител к LAG3 с Fc IgG4 человека.

Таблица 3. Идентификаторы аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи

Обозначение антитела	SEQ ID NO:	
	Тяжелая цепь	Легкая цепь
H4sH15482P	577	578
H4H15482P	579	578
H4sH14813N	580	581

Каждая последовательность тяжелой цепи в табл.3 образует переменную область (V_H или HCVR, содержащие HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и константную область (содержащую C_{H1} -, C_{H2} - и C_{H3} - домены). Каждая последовательность легкой цепи в табл.3 образует переменную область (V_L или LCVR, содержащие LCDR1, LCDR2 и LCDR3) и константную область (C_L). SEQ ID NO: 577 образует HCVR, содержащую аминокислоты 1-123, и константную область, содержащую аминокислоты 124-449. SEQ ID NO: 578 образует LCVR, содержащую аминокислоты 1-107, и константную область, содержащую аминокислоты 108-214. SEQ ID NO: 579 образует HCVR, содержащую аминокислоты 1-123, и константную область, содержащую аминокислоты 124-450. SEQ ID NO: 580 образует HCVR, содержащую аминокислоты 1-119, и константную область, содержащую аминокислоты 120-445. SEQ ID NO: 581 образует LCVR, содержащую аминокислоты 1-107, и константную область, содержащую аминокислоты 108-214.

Контрольные конструкции, применяемые в последующих примерах В целях сравнения в следующие эксперименты были включены две контрольные конструкции (антитела к LAG3): "препарат сравнения 1", моноклональное антитело человека к LAG3 с последовательностями V_H/V_L антитела "25F7" в соответствии с WO2010/019570; и "препарат сравнения 2", моноклональное антитело человека к LAG3 с последовательностями V_H/V_L антитела "v3.5" в соответствии с US2014/0093511.

Пример 3. Связывание антитела с LAG3, определенное с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса.

Константы скорости ассоциации и диссоциации (соответственно k_a и k_d) при связывании, равновесные константы диссоциации и полупериоды диссоциации (соответственно K_D и $t^{1/2}$) для связывания антигенов с очищенными антителами к LAG3 определяли с применением анализа на основе явления поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени с использованием биосенсора на приборе BiaCore 4000 или BiaCore T200. На сенсорной поверхности BiaCore иммобилизовали либо поликлональное антитело кролика к антителу мыши (GE, № BR-1008-38), либо моноклональное антитело мыши к Fc человека (GE, № BR-1008-39), для захвата примерно 50-85 ОЕ моноклональных антител к LAG3, экспрессируемых соответственно либо с Fc мыши, либо с Fc человека. Реагенты LAG3, тестируемые в отношении связывания с антителами к LAG3, включали рекомбинантный LAG3 человека, экспрессируемый с C-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (hLAG3-mmh; SEQ ID: 574), и рекомбинантный LAG3 человека, экспрессируемый с C-концевой меткой, представляющей собой mFc IgG2a мыши (hLAG3-mFc; SEQ ID: 575). Разными концентрациями (50, 25, 12,5 и 6,25 нМ) реагентов LAG3 путем впрыскивания покрывали поверхность с захваченным моноклональным антителом к LAG3 при скорости потока 50 мкл/мин на BiaCore T200. Связывание реагентов LAG3 с захваченными моноклональными антителами отслеживали в течение 4 мин, а их диссоциацию от антител отслеживали в течение 8 мин, в подвижном буфере HBST (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20). Эксперименты проводили при 25 и 37°C. Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли by processing and fitting the data to a 1:1 связыва-

ние model с применением Scrubber 2.0с curve fitting software. Константы диссоциации (K_D) для равновесного связывания и полупериоды диссоциации ($t^{1/2}$) затем рассчитывали исходя из кинетических констант скорости как: K_D (M) = k_d/k_a и $t^{1/2}$ (мин.) = $[\ln 2/(60*k_d)]$.

Параметры кинетики связывания для связывания разных моноклональных антител к LAG3 с мономерными (меченными mmH) или димерными (меченными mFc) реагентами LAG3 при 25°C и 37°C сведены в табл.4-7.

Таблица 4. Параметры кинетики связывания для связывания моноклональных антител к LAG3 с LAG3-mmh человека при 25°C

ID Ab	25°C			
	k_a (л/моль*с)	k_d (1/с)	K_D [M]	$t_{1/2}$ (мин.)
H4H15479P	1,09E+06	5,35E-05	4,93E-11	215,9
H4sH15479P	1,23E+06	5,98E-05	4,87E-11	193,1
H4sH14813N	4,45E+05	7,89E-05	1,77E-10	146,4
H4H14813N	4,11E+05	8,80E-05	2,14E-10	131,2
H4H15498P2	3,01E+05	7,81E-05	2,60E-10	147,9
H4H17819P	1,13E+06	4,43E-04	3,91E-10	26
H4H17823P	1,04E+06	4,47E-04	4,29E-10	25,8
H4sH15498P2	1,57E+05	1,01E-04	6,45E-10	114
H4H15482P	1,99E+05	1,94E-04	9,72E-10	59,7
H4sH15482P	2,12E+05	2,60E-04	1,23E-09	44,5
H4H15483P	1,88E+05	3,70E-04	1,97E-09	31,2
H4H17828P2	6,12E+05	1,41E-03	2,31E-09	8,2
H4H15462P	9,39E+05	5,40E-03	5,75E-09	2,1
H4sH15462P	1,07E+06	6,97E-03	6,51E-09	1,7
H4H17826P2	4,50E+05	4,57E-03	1,02E-08	2,5
Изотипический контроль 1	NB	NB	NB	NB
Изотипический контроль 2	NB	NB	NB	NB
Препарат сравнения 1	1,09E+06	8,70E-04	8,02E-10	13,3
Препарат сравнения 2	1,01E+06	5,82E-04	5,77E-10	19,9

*NB означает, что в условиях проведения эксперимента реагент LAG3 не связывался с захваченным моноклональным антителом к LAG3.

Из табл.4 видно, что при 25°C все антитела к LAG3 по настоящему изобретению связываются с hLAG3-mmh со значениями K_D в диапазоне от 49 пМ до 10 нМ, тогда как препараты сравнения связываются со значениями K_D 0,58 нМ и 0,8 нМ.

Таблица 5. Параметры кинетики связывания для связывания моноклональных антител к LAG3 с hLAG3-mmh при 37°C

ID Ab	37°C			
	k_a (л/моль*с)	k_d (1/с)	K_D^* [M]	$t_{1/2}$ (мин.)
H4H15479P	1,27E+06	4,08E-05	3,21E-11	283
H4sH15479P	1,24E+06	4,24E-05	3,41E-11	272,5
H4H15498P2	3,81E+05	2,96E-05	7,83E-11	390,2
H4sH15498P2	3,78E+05	7,08E-05	1,85E-10	163,1
H4sH14813N	5,78E+05	1,54E-04	2,66E-10	75,1
H4H14813N	5,35E+05	1,52E-04	2,84E-10	76
H4H17823P	1,76E+06	9,24E-04	5,24E-10	12,5
H4H17819P	1,59E+06	8,76E-04	5,52E-10	13,2
H4H15483P	7,74E+05	1,11E-03	1,43E-09	10,4
H4sH15482P	2,81E+05	5,12E-04	1,82E-09	22,6
H4H17828P2	1,10E+06	2,07E-03	1,89E-09	5,6
H4H15482P	2,92E+05	5,70E-04	1,96E-09	20,2
H4H17826P2	1,07E+06	2,14E-03	1,99E-09	5,4
H4H15462P	1,08E+06	6,26E-03	5,80E-09	1,8
H4sH15462P	1,01E+06	7,72E-03	7,66E-09	1,5
Изотипический контроль 1	NB	NB	NB	NB
Изотипический контроль 2	NB	NB	NB	NB
Препарат	1,23E+06	3,74E-03	3,03E-09	3,1
сравнения 1				
Препарат сравнения 2	1,10E+06	2,31E-03	2,10E-09	5

*NB означает, что в условиях проведения эксперимента реагент LAG3 не связывался с захваченным моноклональным антителом к LAG3.

Из табл.5 видно, что при 37°C все антитела к LAG3 по настоящему изобретению связываются с hLAG3-mmh со значениями K_D в диапазоне от 32 пМ до 7,66 нМ, тогда как препараты сравнения связываются со значениями K_D 2,1 нМ и 3,0 нМ.

Данные в табл.4 и 5 указывают на то, что все антитела к LAG3 связываются с мономерным hLAG3-mmh с очень похожими показателями аффинности как при 25°, так и при 37°C.

Таблица 6. Параметры кинетики связывания для связывания моноклональных антител к LAG3 с димером hLAG3 (hLAG3-mFc) при 25°C

	25°C			
	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
ID Ab	(л/моль*с)	(1/с)	[М]	(мин.)
H4H15479P	2,30E+06	1,00E-05	4,35E-12	≥1155,0
H4sH15479P	3,05E+06	1,00E-05	3,28E-12	≥1155,0
H4H15483P	1,34E+06	1,00E-05	7,45E-12	≥1155,0
H4H14813N	9,58E+05	1,00E-05	1,04E-11	≥1155,0
H4sH14813N	1,80E+06	1,90E-05	1,06E-11	606,6
H4H15482P	7,58E+05	1,00E-05	1,32E-11	≥1155,0
H4sH15482P	7,09E+05	1,00E-05	1,41E-11	≥1155,0
H4H15498P2	3,63E+05	1,00E-05	2,76E-11	≥1155,0
H4sH15498P2	2,84E+05	1,00E-05	3,52E-11	≥1155,0
H4H17819P	1,45E+06	1,80E-04	1,24E-10	64,2
H4H17823P	1,26E+06	2,18E-04	1,74E-10	52,9
H4H17828P2	1,88E+06	4,60E-04	2,45E-10	25,1
H4sH15462P	2,34E+06	1,90E-03	8,14E-10	6,1
H4H17826P2	6,91E+05	5,64E-04	8,17E-10	20,5
H4H15462P	2,02E+06	2,03E-03	1,01E-09	5,7
Изотипический контроль 1	NB*	NB	NB	NB
Изотипический контроль 2	NB	NB	NB	NB
Препарат сравнения 1	2,69E+06	4,50E-04	1,67E-10	25,7
Препарат сравнения 2	3,09E+06	3,00E-04	9,68E-11	38,6

*NB означает, что в условиях проведения эксперимента реагент LAG3 не связывался с захваченным моноклональным антителом к LAG3.

Из табл.6 видно, что при 25°C все антитела к LAG3 по настоящему изобретению связываются с димерными белками hLAG3 со значениями K_D в диапазоне от 4,3 пМ до 1,0 нМ, тогда как препараты сравнения связываются со значениями K_D 97 пМ и 0,16 нМ.

Таблица 7. Параметры кинетики связывания для связывания моноклональных антител к LAG3 с димером hLAG3 (hLAG3-mFc) при 37°C

ID Ab	37°C			
	k_a (л/моль*с)	k_d (1/с)	K_D [M]	$t_{1/2}$ (мин.)
H4H15479P	2,50E+06	1,00E-05	3,99E-12	≥1155,0
H4sH15479P	2,92E+06	1,00E-05	3,42E-12	≥1155,0
H4sH15498P2	5,15E+05	1,00E-05	1,94E-11	≥1155,0
H4H15498P2	4,60E+05	1,00E-05	2,17E-11	≥1155,0
H4H14813N	4,27E+06	1,17E-04	2,74E-11	98,8
H4sH14813N	3,42E+06	1,01E-04	2,95E-11	114,4
H4sH15482P	5,19E+06	1,64E-04	3,16E-11	70,3
H4H15482P	1,01E+06	9,01E-05	8,91E-11	128,1
H4H15483P	1,38E+06	2,98E-04	2,15E-10	38,8
H4H17826P2	1,98E+06	5,47E-04	2,77E-10	21,1
H4H17819P	1,66E+06	5,27E-04	3,17E-10	21,9
H4H17828P2	1,73E+06	7,18E-04	4,15E-10	16,1
H4H15462P	2,16E+06	8,95E-04	4,15E-10	12,9
H4H17823P	1,34E+06	5,85E-04	4,37E-10	19,7
H4sH15462P	1,80E+06	1,57E-03	8,76E-10	7,3
Изотипический контроль 1	NB	NB	NB	NB
Изотипический контроль 2				
Препарат сравнения 1	3,44E+06	1,56E-03	4,54E-10	7,4
Препарат сравнения 2	4,36E+06	1,13E-03	2,58E-10	10,3

*NB означает, что в условиях проведения эксперимента реагент LAG3 не связывался с захваченным моноклональным антителом к LAG3.

Из табл.7 видно, что при 37°C все антитела к LAG3 по настоящему изобретению связываются с димерными белками hLAG3 со значениями K_D в диапазоне от 4,0 пМ до 0,9 нМ, тогда как препараты сравнения связываются со значениями K_D 0,26 нМ и 0,45 нМ.

Данные в табл.6 и 7 указывают на то, что все антитела к LAG3 связываются с димерами hLAG3 в качестве реагентов с очень похожими показателями аффинности как при 25°, так и при 37°C.

Пример 4. Перекрестная конкуренция между антителами к LAG3 в системе Octet.

Для оценки того, конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мономерным LAG3 человека (hLAG3.mmh), конкуренцию за связывание между моноклональными антителами к LAG3 определяли с применением интерферометрического анализа биослоя в режиме реального времени без применения метки на биосенсоре Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Эксперимент по перекрестной конкуренции проводили при 25°C в 0,01 М HEPES, pH7,4, 0,15 М NaCl, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, 0,1 мг/мл BSA (буфер HBS-P для Octet) со встряхиванием планшетов при скорости 1000 об./мин. Все тестируемые растворы антитела к LAG3 и hLAG3 составляли в буфере HBS-P для Octet. Для оценки того, способны ли 2 антитела конкурировать друг с другом за связывание с hLAG3, сперва примерно ~0,6-0,85 нМ hLAG3.mmh захватывали на покрытых антителом к His кончиках биосенсоров Octet из лунок, содержащих 5 мкг/мл hLAG3, в течение 75 с. Кончики биосенсоров Octet с захваченными hLAG3 насыщали путем погружения на 5 мин в лунки, содержащие 50 мкг/мл первого моноклонального антитела к LAG3 (называемого в настоящем документе mAb-1), с последующим погружением в лунки, содержащие второе моноклональное антитело к LAG3 (называемое в настоящем документе mAb-2). В промежутках между каждой стадией кончики биосенсоров Octet промывали в буфере HBS-P в течение 30 секунд.

Ответ в отношении связывания в режиме реального времени отслеживали в течение эксперимента и в конце каждой стадии ответ в отношении связывания регистрировали. Ответ в отношении связывания

hLAG3 с mAb-1, а затем с блокирующим mAb, корректировали с поправкой на фоновое связывание, сравнивали и определяли конкурентный/неконкурентный характер связывания разных моноклональных антител к Lag.

В табл.8 явным образом определены взаимосвязи антител, конкурирующих в обоих направлениях, независимо от порядка связывания.

Таблица 8. Перекрестная конкуренция антител к LAG3 за связывание с мономерным hLAG3

Первое mAb (mAb-1), захваченное с применением биосенсоров АНС Octet	Антитела mAb-2, для которых была показана конкуренция с mAb-1 *
H4sH15482P	H4sH15479P, H4sH14813N, H4H14813N, H4H15479P, H4H15482P, H4H15483P
H4sH15479P	H4sH15482P, H4sH14813N, H4H14813N, H4H15479P, H4H15482P, H4H15483P
H4sH14813N	H4sH15482P, H4sH15479P, H4H14813N, H4H15479P, H4H15482P, H4H15483P
H4H14813N	H4sH15482P, H4sH15479P, H4sH14813N, H4H15479P, H4H15482P, H4H15483P
H4H15479P	H4sH15482P, H4sH15479P, H4sH14813N, H4H14813N, H4H15482P, H4H15483P
H4H15482P	H4sH15482P, H4sH15479P, H4sH14813N, H4H14813N, H4H15479P, H4H15483P
H4H15483P	H4sH15482P, H4sH15479P, H4sH14813N, H4H14813N, H4H15479P, H4H15482P
H4sH15498P2	H4H15498P2, H4H17828P2, H4H17819P, H4H17823P
H4H15498P2	H4sH15498P2, H4H17828P2, H4H17819P, H4H17823P
H4H17828P2	H4sH15498P2, H4H15498P2, H4H17819P, H4H17823P
H4H17819P	H4sH15498P2, H4H15498P2, H4H17828P2, H4H17823P
H4H17823P	H4sH15498P2, H4H15498P2, H4H17828P2, H4H17819P
	H4H17819P
H4sH15462P	Отсутствует
H4H15462P	Отсутствует
H4H17826P2	Отсутствует

(*Конкурирующие сами с собой mAb2 не приведены).

Пример 5. Связывание антител со сверхэкспрессирующими LAG3 клетками, определенное с помощью проточной цитометрии.

Были получены стабильные линии клеток HEK293 (HEK293; ATCC, #CRL-1573), которые экспрессируют рекомбинантный hLAG3 (номер доступа в NCBI NP_002277.4) или LAG3 обезьяны (mfLAG3) [последовательность яванского макака с номером доступа в NCBI XP_005570011.1 дополнительно модифицирована с заменой "X" в положении аминокислоты 74 на пролин в соответствии с последовательностью макака-резуса (Macaca mulata) с номером доступа в NCBI XP_001108923.1] (SEQ ID NO: 576) на клеточной поверхности, и их применяли для определения специфичности связывания моноклональных антител к LAG3 по настоящему изобретению с помощью анализа с использованием проточной цитометрии.

Связывание антител к LAG3 оценивали следующим образом: Стабильные клетки HEK293, экспрессирующие либо hLAG3, либо mfLAG3, промывали 1× D-PBS (Irvine Scientific, номер по каталогу 9240), трипсинизировали (Specialty Media, номер по каталогу SM-2004-C) и блокировали с применением среды для культивирования клеток HEK293 (DME + 10% FBS + P/S/G + заменимые аминокислоты). После цен-

трифугирования клетки ресуспендировали в концентрации $2,0 \times 10^6$ клеток/мл в буфере для окрашивания (D-PBS + 2% FBS). Антитела к LAG3 и изотипические контроли серийно разводили в буфере для окрашивания с дозой в диапазоне от 5 пМ до 100 нМ, включая один буфер без антитела в качестве контроля. Серийно разведенные антитела добавляли к суспензии клеток и инкубировали в течение 15-30 мин на льду. Клетки центрифугировали и осадки промывали буфером для окрашивания для удаления несвязавшихся антител. Затем клетки инкубировали в течение 15-30 мин на льду со вторичным конъюгированным с аллофикоцианином F(ab')₂, распознающим Fc человека (Jackson ImmunoResearch, № 109-136-170). Клетки центрифугировали, и осадки промывали буфером для окрашивания для удаления несвязавшегося вторичного F(ab')₂, и фиксировали в течение ночи с применением Cytofix (BD Biosciences, № 554655) в разведении 1:1 и буфера для окрашивания. На следующий день фиксированные клетки центрифугировали и осадки промывали буфером для окрашивания, ресуспендировали и фильтровали. Результаты измерений флуоресценции получали на цитометре HyperCyt® и анализировали в ForeCyt™ (IntelliCyt; Альбукерке, Нью-Мексико) для определения средних значений интенсивности флуоресценции (MFI). Значения EC₅₀ рассчитывали на основе уравнения четырехпараметрической логистической модели по кривой ответа из 11 точек с применением GraphPad Prism. EC₅₀ определено как концентрация антитела, при которой выявляют 50% от максимального сигнала связывания. Отношение MFI для каждого антитела рассчитывали путем деления MFI при 100 нМ на MFI при 0 нМ концентрации антител.

Таблица 9. Связывание антител к LAG3 с клетками HEK293 дикого типа (wt), определенное с помощью FACS

PID# Ab	FACS для HEK293 wt	
	EC50 [M]	Отношение MFI (100 нМ/0 нМ)
Изотипический контроль hIgG4	-	1,5
H4sH15462P	-	0,9
H4H15462P	-	8,2
H4sH15479P	-	1,1
H4H15479P	-	1,7
H4sH15482	-	1,2
H4H15482P	-	4,9
H4sH15498P2	-	1
H4H15498P2	-	1
H4sH14813N	-	1,5
H4H14813N	-	1,3
H4H17828P2	-	1,1
H4H17826P2	-	2,5
H4H17823P	-	2,5
H4H15483P	-	2,6
H4H17819P	-	1,1
Препарат сравнения 1	-	1
Препарат сравнения 2	-	1,6

Как показано в табл.9, в FACS-анализе для препаратов сравнения и изотопических контролей не было продемонстрировано никакого измеряемого связывания с исходными клетками HEK293 дикого типа. Рассчитанные отношения MFI находились в диапазоне от 1,0 до 1,6×. Для нескольких антител к LAG3 были показаны более высокие отношения в случае клеток дикого типа, что указывает на неспецифическое связывание, с рассчитанными показателями MFI, находящимися в диапазоне от 0,9 до 8,2×. В таких условиях окрашивания значения EC₅₀ для антител к LAG3, а также препаратов сравнения, не определяли.

Таблица 10. Связывание антител к LAG3 с клетками HEK293/hLag3, определенное с помощью FACS

PID# Ab	FACS для HEK293/hLAG3	
	EC50 [M]	Отношение MFI (100 нМ/0 нМ)
Изотипический контроль hIgG4	-	1,8
H4sH15462P	6,65E-10	181,6
H4H15462P	3E-10	62,6
H4sH15479P	9,03E-10	198,7
H4H15479P	7,52E-10	203,2
H4sH15482	1,11E-09	140,8
H4H15482P	1,91E-09	103,7
H4sH15498P2	7,92E-09	400,6
H4H15498P2	5,76E-09	305
H4sH14813N	1,18E-09	197,2
H4H14813N	1,44E-09	208,5
H4H17828P2	2,65E-09	355,2
H4H17826P2	3,86E-09	414,2
H4H17823P	1,25E-09	304,9
H4H15483P	2,31E-09	206,3
H4H17819P	2,79E-09	435,8
Препарат сравнения 1	7,52E-10	188,2
Препарат сравнения 2	6,5E-10	150,9

Как показано в табл. 10, для изотипических контролей не было продемонстрировано никакого измеряемого связывания с клетками HEK293/hLag3. Для всех 15 антител к LAG3 по настоящему изобретению было показано значительное связывание с клетками HEK293/hLag3 со значениями EC₅₀ в диапазоне от 300 пМ до 7,9 нМ. Рассчитанные отношения MFI находились в диапазоне 62-414×. В анализе связывания значения EC₅₀ для препаратов сравнения составляли 0,65 нМ и 0,75 нМ, а отношения MFI составляли менее 200× для обоих антител.

Таблица 11. Связывание антител к LAG3 с клетками HEK293/mfLag3, определенное с помощью FACS

PID# Ab	FACS для HEK293/mfLAG3	
	EC50 [M]	Отношение MFI (100 нМ/0 нМ)
Изотипический контроль hIgG4	-	1,3
H4sH15462P	-	1
H4H15462P	-	2,9
H4sH15479P	9,02E-10	20,7
H4H15479P	1,35E-09	21,5
H4sH15482	1,15E-09	10
H4H15482P	2,2E-09	11,9
H4sH15498P2	>10 нМ	12,1
H4H15498P2	>10 нМ	12,8
H4sH14813N	1,57E-09	16,7
H4H14813N	1,42E-09	17,1
H4H17826P2	>10 нМ	14,3
H4H17823P	>10 нМ	12,4
H4H15483P	>10 нМ	8,8
H4H17819P	>10 нМ	12,1
Препарат сравнения 1	>10 нМ	6,7
Препарат сравнения 2	>10 нМ	8,6

Как показано в табл.11, для изотипических контролей не было продемонстрировано никакого измеряемого связывания с клетками HEK293/mfLag3. В общей сложности для 13 из 15 антител к LAG3 по настоящему изобретению было показано значительное связывание с клетками HEK293/mfLAG3 со зна-

чениями EC_{50} в диапазоне от 900 пМ до более чем 10 нМ. Рассчитанные отношения MFI находились в диапазоне от 8,8× до 21,5×. Значения EC_{50} для препаратов сравнения составляли более чем 10 нМ, а рассчитанные отношения MFI составляли 6,7× и 8,6×.

Пример 6. Связывание антител со сверхэкспрессирующими LAG3 клетками, определенное с помощью электрохемилюминесцентного иммунологического анализа.

Для изучения способности панели моноклональных антител к LAG3 связывать экспрессируемый на клеточной поверхности LAG3 был разработан *in vitro* анализ связывания, в котором используют экспрессирующие LAG3 человека и обезьяны клеточные линии, с применением платформы для детектирования на основе электрохемилюминесценции [Meso Scale Diagnostics, Роквилл, Мэриленд - (MSD)].

С помощью лентивирусной трансдукции были получены стабильные клеточные линии HEK293 (ATCC, #CRL-1573) для экспрессии рекомбинантного hLAG3 (номер доступа в NCBI NP_002277.4) или LAG3 обезьяны (mfLAG3) [последовательность яванского макака (*Macaca fascicularis*) с номером доступа XP_005570011.1, модифицированная с заменой "X" в положении аминокислоты 74 на пролин в соответствии с последовательностью макака-резуса (*Macaca mulata*) с номером доступа в NCBI XP_001108923.1] (SEQ ID NO: 576). Исходная клеточная линия HEK293, для которой при сортировке клеток с активированной флуоресценцией (FACS) не наблюдали выявляемую экспрессию LAG3, была включена в эксперимент в качестве контроля фонового связывания. Неродственные IgG4 человека и hIgG4 были включены в качестве изотопических контрольных антител.

Эксперименты проводили в соответствии со следующей процедурой. Клетки из трех описанных выше клеточных линий один раз промывали в 1× буфере PBS без Ca^{2+}/Mg^{2+} с последующей 10-минутной инкубацией при 37°C с не содержащим ферментов раствором для диссоциации клеток. Открепившиеся клетки один раз промывали 1×PBS с Ca^{2+}/Mg^{2+} и подсчитывали с помощью счетчика клеток Cellometer™ Auto T4 (Nexcelom Bioscience). Примерно 10000 клеток на лунку в буфере для промывки клеток высевали в 96-луночные планшеты с угольными электродами (планшет с высокой связывающей способностью MULTI-ARRAY, MSD) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C для обеспечения прикрепления клеток. Сайты неспецифического связывания блокировали с помощью 2% BSA (масса/объем) в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. К прикрепленным в планшете клеткам в двух повторах добавляли растворы антител к LAG3 в серийных разведениях в диапазоне от 1,7 пМ до 100 нМ и растворы без антитела, и планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промывали для удаления несвязавшихся антител с применением устройства отмывки иммунологических планшетов Aqua-Max2000 (MDS Analytical Technologies). Связанные в планшете антитела детектировали с помощью конъюгированного с SULFO-TAG™ антитела к IgG человека (MSD) в течение 1 ч при комнатной температуре. После осуществления промывок содержимое планшетов проявляли с помощью буфера для считывания (MSD) в соответствии с рекомендуемой производителем процедурой, и с помощью прибора SECTOR Imager 6000 (MSD) регистрировали сигналы люминесценции. Сигналы прямого связывания (в относительных световых единицах - RLU) анализировали в зависимости от концентрации антитела, и данные аппроксимировали с помощью сигмоидальной (четырепараметрической логистической) модели доза-ответ с применением программного обеспечения GraphPad Prism™. Эффективность каждого антитела определяли путем расчета EC_{50} . EC_{50} для связывания клеток HEK293-hLAG3 и HEK293-mfLAG3 определено как концентрация антитела, при которой выявляют 50% от максимального сигнала связывания. Отношение сигнала, выявляемого при связывании 100 нМ антитела с клетками HEK293-hLAG3 или HEK293-mfLAG3, по сравнению с исходными клетками HEK293, регистрировали как показатель специфичности связывания LAG3. Для отношений ниже 2-кратных при наиболее высокой концентрации антитела (100 нМ) делали вывод, что антитело является неспецифическим (NS). Результаты по связыванию приведены в табл.12.

Таблица 12. Связывание антител со сверхэкспрессирующими hLAG3 или mfLAG3 клетками

ID Ab	Эффективность клеточного связывания для клеток HEK293-hLAG3 EC_{50} (M)	Эффективность клеточного связывания для клеток HEK293-mfLAG3 EC_{50} (M)	Отношение связывания 100 нМ антител с клетками HEK293-hLAG3 и клетками HEK293	Отношение связывания 100 нМ антител с клетками HEK293-mfLAG3 и клетками HEK293
H4sH15462P	8,53E-10	NS	6,8	NS
H4sH15482P	1,13E-08	NS	4,5	NS
H4sH15479P	1,34E-08	NS	17,8	NS
H4sH15498P2	2,87E-09	2,00E-08	99,8	32,7
H4sH14813N	2,03E-08	NS	19,8	NS

H4H14813N	1,99E-08	NS	8,9	NS
H4H15462P	6,85E-09	NS	2,3	NS
H4H15482P	2,47E-08	NS	7,4	NS
H4H15479P	5,20E-08	7,39E-08	20,1	2,1
H4H15498P2	2,95E-09	9,68E-09	38,8	13,8
H4H17828P2	1,2E-09	1,31E-08	8,7	6
H4H17826P2	3,48E-09	7,85E-09	7	4,7
H4H17823P	1,5E-09	2,78E-08	5,3	2,8
H4H15483P	1,72E-08	NS	6,6	NS
H4H17819P	6,9E-10	4,02E-08	22,7	8,3
Изотипический контроль H4H	NS	NS	NS	NS
Изотипический контроль H4sH	NS	NS	NS	NS
Препарат сравнения 1	4,03E-09	NS	7,7	NS
Препарат сравнения 2	6,77E-09	NS	8,1	NS

NS = неспецифическое связывание - отношение при 100 нМ ab <2.

Как показано в табл.12, эффективность антител варьировала в диапазоне значений EC₅₀ от 690 пМ до 52 нМ для связывания с клетками HEK293-hLAG3, причем все антитела характеризовались специфическим связыванием с >2-кратным превышением связывания с экспрессирующими LAG3 человека клетками по сравнению с исходными клетками HEK293 при связывании 100 нМ антитела. Только семь из антител специфически связываются с клетками HEK293-mfLAG3 со значениями EC₅₀ в диапазоне от 7,9 нМ до 74 нМ. Значения эффективности связывания препарата сравнения в отношении клеток HEK293-hLag3 составляли примерно 4,0 нМ и 7,0 нМ. Для препаратов сравнения не было показано специфическое связывание с клетками HEK293-mfLag3. Связывание нерелевантных контролей с клетками HEK293-hLAG3 и HEK293-mfLAG3, как и ожидалось, было неспецифическим, со связыванием изотипического контроля H4H и изотипического контроля H4sH с отношениями в диапазоне значений, в 0,7-1,1 раз превышающих связывание с исходными клетками HEK293.

Пример 7. Блокирование связывания LAG3 с МНС класса II в анализе клеточной адгезии.

Анализ клеточной адгезии использовали для измерения способности моноклональных антител к LAG3 блокировать адгезию клеток, экспрессирующих либо МНСII человека, либо МНСII мыши (клеток RAJI и A20 соответственно), к экспрессирующим hLAG3 клеткам HEK293, прикрепленным на микротитрационном планшете (основываясь на анализе, описанном в Eur J Immunol. 1995, 25: 2718-21 by Huard, et al.).

С помощью лентивирусной трансдукции были получены стабильные клеточные линии HEK293 (ATCC, #CRL-1573) для экспрессии рекомбинантного hLAG3 (номер доступа в NCBI NP_002277.4) или LAG3 мыши (mLAG3) (номер доступа в GenBank NP_032505.1). Для исходной клеточной линии HEK293 не наблюдали выявляемую экспрессию LAG3 человека при использовании технологии сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), и ее применяли для того, чтобы продемонстрировать необходимость LAG3 для адгезии экспрессирующих МНСII клеток RAJI и A20.

Эксперименты проводили в соответствии со следующей процедурой. Субконфлюэнтные экспрессирующие hLAG3 клетки HEK293 один раз промывали 1X PBS, трипсинизировали и центрифугировали при 1200 об./мин. в течение 5 мин. Клеточные осадки ресуспендировали в 1X PBS, а затем подсчитывали для определения числа клеток. Соответствующее число клеток отбирали и ресуспендировали в полной среде (DMEM + 10% FBS + пенициллин/стрептомицин/глутамин) так, чтобы каждая лунка содержала 1,2⁴ клеток в 100 мкл. Клетки высевали в стерильные черные планшеты с лунками с прозрачным дном Nunclon™ Delta 96-Well MicroWell™ (Thermo Scientific). Лунки по периметру планшета не включали в анализ во избежание краевых эффектов. В лунки по периметру вместо клеток добавляли 100 мкл 1×PBS. Высеванные на планшете клетки HEK293-hLAG3 инкубировали в течение ночи при 37°C, при 5% CO₂. После инкубации эти клетки обрабатывали антителами к LAG3 и изотипическими контролями.

В день лечения все антитела серийно (1:3) разводили в среде RPMI (без добавления FBS или добавок). Концентрации при 9-точечном разведении находились в диапазоне от 45 пМ до 300 нМ, причем последняя точка разведения не содержала mAb. Для тестирования антител H4sH в анализе адгезии с применением клеток RAJI концентрации при 9-точечном разведении находились в диапазоне от 23 пМ до 150 нМ, причем последняя точка разведения не содержала mAb. К клеткам HEK293-hLAG3 добавляли антитела к LAG3 или изотипические контроли в конечном объеме 50 мкл и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, при 5% CO₂. В то время как высеванные на планшете клетки HEK293-LAG3 инкубировали с тестируемыми или контрольными антителами, неадгезивные В-клетки (RAJI или A20) метили кальцеи-

ном-AM с применением следующей процедуры. Суспензию клеток RAJI и A20 собирали и центрифугировали при 1200 об./мин. В течение 5 мин. Клеточные осадки ресуспендировали в 1X PBS и подсчитывали. Клетки промывали RPMI и ресуспендировали в RPMI в концентрации 10^6 клеток на 1 мл. Клетки метили путем добавления 5 мкл кальцеина-AM на 1 мл суспензии клеток и инкубировали в течение 30 мин. при 37°C, при 5% CO₂. Меченные клетки промывали 1× с помощью RPMI, центрифугировали, промывали 1X PBS и ресуспендировали в PBS в концентрации 5×10^6 клеток на 1 мл. Затем добавляли 10 мкл блокирующих Fc антител BD Pharmingen Fc Block (0,5 мг/мл) на 1 мл меченных кальцеином-AM клеток, которые инкубировали при RT в течение 10 мин. Окрашенные кальцеином-AM, заблокированные по Fc клетки RAJI или A20 ресуспендировали в RPMI до достижения конечной концентрации 3×10^6 клеток на 1 мл, а затем применяли в анализе адгезии.

По окончании обработки клеток HEK293-LAG3 антителом к LAG3 в течение одного часа, в каждую лунку добавляли 50 мкл меченных клеток RAJI или A20 при плотности $1,5 \times 10^5$ клеток/лунку. Суспензию меченных клеток инкубировали с монослоем HEK293 в течение 1 ч при 37°C, при 5% CO₂. Неадгезивные клетки смывали путем аккуратной промывки лунок 4× RPMI, промакивания планшетов после каждой промывки бумажными салфетками, с последующей 2× промывкой PBS. В каждую лунку добавляли PBS в конечном объеме 200 мкл и считывали флуоресценцию кальцеина-AM при длине волны возбуждения/испускания 485 нм/535 нм на многофункциональном планшет-ридере VICTOR™ X5. Значения IC₅₀ рассчитывали на основе уравнения четырехпараметрической логистической модели по кривой ответа из 9 точек с применением GraphPad Prism. IC₅₀ было определено как концентрация антитела, при которой наблюдали 50% блокирование адгезии клеток HEK к клеткам RAJI или A20.

Способность антител к LAG3 блокировать связывание LAG3 с МНСII как человека, так и мыши, оценивали с применением клеточного анализа адгезии. В анализе использовался формат со связыванием меченных флуоресцентной меткой клеток, эндогенно экспрессирующих МНСII [МНСII человека (RAJI) или МНСII мыши (A20)], с клетками, сконструированными для экспрессии LAG3 человека. Оценивали способность антител к LAG3 блокировать такое взаимодействие, и результаты представлены в табл.13.

Таблица 13. Значения IC₅₀ для антител к LAG3 в отношении блокирования адгезии клеток RAJI и A20 к клеткам HEK293-hLAG3

ID# Ab	Анализ адгезии	
	RAJI	A20
	IC50 [M]	IC50 [M]
H4sH15462P	2,50E-09	3,60E-09
H4H15462P	3,20E-09	7,10E-09
H4sH15479P	9,60E-09	6,30E-09
H4H15479P	3,10E-08	1,10E-08
H4sH15482	3,30E-09	3,80E-09
H4H15482P	1,50E-08	1,10E-08
H4sH15498P2	1,60E-08	2,10E-08
H4H15498P2	1,50E-08	3,00E-08
H4sH14813N	6,00E-09	1,00E-08
H4H14813N	1,70E-08	1,00E-08
H4H17828P2	1,10E-08	1,60E-08
H4H17826P2	2,70E-08	1,00E-08
H4H17823P	8,60E-09	9,40E-09
H4H15483P	1,90E-08	1,60E-08
H4H17819P	1,70E-08	1,60E-08
Изотипический контроль	-	-
Препарат сравнения 1	3,40E-09	5,10E-09
Препарат сравнения 2	7,20E-09	9,60E-09

Как показано в табл.13, для изотипического контроля не было продемонстрировано никакого измеряемого блокирования связывания клеток RAJI или A20 с клетками HEK293/hLAG3. Все антитела к LAG3 по настоящему изобретению блокировали 92-98% адгезии клеток RAJI или A20 к клеткам HEK293-hLAG3 при максимальной концентрации антитела, со значениями IC₅₀ в диапазоне от 2,5 нМ до

31 нМ для адгезии клеток RAJI и от 3,6 нМ до 30 нМ для адгезии клеток A20 к клеткам HEK293-hLAG3. Значения IC₅₀ для препаратов сравнения составляли 3,4 нМ и 7,2 нМ для адгезии клеток RAJI и 5,1 нМ и 9,6 нМ для адгезии клеток A20 к клеткам HEK293-Lag3.

Пример 8. Блокирование индуцированной LAG3 негативной регуляции Т-клеток в анализе по репортерному гену люциферазы с использованием Т-клеток/APC.

Активация Т-клеток обеспечивается стимулированием рецепторов Т-клеток (TCR), которые распознают определенные пептиды, представленные белками главного комплекса гистосовместимости класса I или II (MHC I или MHC II) на антиген-представляющих клетках (APC) (Goldrath et al. 1999, Nature 402, 255-262). Активированные TCR в свою очередь инициируют события в рамках сигнального каскада, которые можно отслеживать по репортерным генам под контролем транскрипционных факторов, таких как активаторный белок 1 (AP-1), ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) или ядерный фактор энхансера гена легкой цепи каппа активированных В-клеток (NFκB). Т-клеточный ответ оптимизируется посредством вовлечения корецепторов, экспрессируемых на Т-клетках либо конститутивно, либо индуцируемо. Одним из таких рецепторов является LAG3, отрицательный регулятор активности Т-клеток. LAG3 взаимодействует с его лигандом, MHC II, который экспрессируется на целевых клетках, включая APC или клетки злокачественной опухоли, и ингибирует активацию Т-клеток путем подавления положительных сигналов, инициируемых сигналомой TCR (Workman et al. 2002, J Immunol 169:5392-5395).

Для описания способности антител к LAG3 препятствовать опосредованной LAG3 передачи сигнала в Т-клетки, был разработан репортерный анализ с использованием экспрессирующих LAG3 Т-клеток/APC для исследования передачи сигнала с участием Т-клетки, индуцированной взаимодействием APC и Т-клеток, с использованием смешанной культуры, происходящей из двух клеточных линий млекопитающих: происходящие из Jurkat Т-клетки (клон JRT3.T3.5, как описано ниже) и сконструированные APC в окружении HEK293 (как описано ниже) (фиг. 1).

Что касается первого компонента, линия Т-клеток для репортерного биологического анализа с использованием экспрессирующих LAG3 Т-клеток/APC была создана следующим образом: Происходящий из Jurkat клон Т-клеток, JRT3.T3.5 (ATCC, № TIB-153), сперва трансдуцировали с применением лентивирусной конструкции с репортерной системой AP-1-Luc Signal (Signal Lenti AP-1 Luc reporter) (Qiagen - Sabiosciences, №CLS-011L) согласно инструкциям производителя. Лентивирус кодирует ген люциферазы светлячка под контролем минимального промотора CMV, tandemные повторы TPA-индуцируемого транскрипционного элемента ответа (TRE) и ген устойчивости к пуромицину. После селекции с использованием антибиотика устойчивые к пуромицину пулы репортерных клеток дополнительно трансдуцировали конструкциями, кодирующими CD28 человека (NP_006130.1), альфа и бета субъединицы TCR клона Ob2F3 (альфа AGA92550.1, бета AAA61026.1), химеру LAG3 человека (содержащую внеклеточный домен LAG3 человека (NP_002277.4) и трансмембранный/цитоплазматический домен CD300a человека (аминокислоты 181-299; номер доступа NP 009192.2) и PD-1 человека (номер доступа NP_005009.2). Экспрессию белков подтверждали с помощью FACS-анализа после каждого раунда трансдукции. Затем получали один клон JRT3.T3/API-Luc/CD28/химера hLAG3-CD300a/hPD-1, клон 2D2, и применяли в биологическом анализе с использованием Т-клеток/APC. Клеточную линию поддерживали в RPMI + 10% FBS + пенициллин/стрептомицин/глутамин (P/S/G), дополненной 100 мкг/мл гигромицина + 500 мкг/мл G418 + 1 мкг/мл пуромицина, называемой в настоящем документе средой для селекции. Эти клетки в настоящем документе называют репортерными Т-клетками.

Что касается второго компонента, линия клеток APC для репортерного биологического анализа с использованием экспрессирующих LAG3 Т-клеток/APC была получена следующим образом: Стабильную клеточную линию HEK293 (ATCC, № CRL-1573), экспрессирующую CD20 человека (номер NP_068769.2), трансдуцировали конструкциями, кодирующими субъединицы MHC II человека, HLA-DR2A (NP_061984.2) и HLA-DR2B (NP_002115). HLA-DR2-положительные клетки выделяли с помощью FACS, и полученную клеточную линию, HEK293/CD20/HLA-DR2, поддерживали в DME + 10% + P/S/G + заменимые аминокислоты, дополненной 100 мкг/мл гигромицина + 500 мкг/мл G418, называемой в настоящем документе средой для селекции. Эти клетки в настоящем документе называют клетками APC.

Для обеспечения взаимодействия Т-клетки и APC с целью инициации передачи сигнала с участием TCR применяли два подхода: (1) способ на основе биспецифического антитела; и (2) способ с примирением пептидом. В этом биологическом анализе антитела к LAG3 блокировали взаимодействие LAG3/MHC II и возобновляли активность Т-клеток путем нарушения передачи ингибирующего сигнала посредством цитоплазматического хвоста молекулы CD300a, с последующим повышением в отношении передачи сигнала AP1-Luc. Активацию Т-клеток отслеживали путем считывания показателей люциферазы.

Способ на основе биспецифического антитела. В этом способе использовали биспецифическое антитело, состоящее из одного Fab-плеча, которое связывается с CD3 на Т-клетках, и второго Fab, связывающегося с CD20 на клетках HEK293 (биспецифическое антитело к CD3×CD20; например, раскрытое в US20140088295). Присутствие биспецифической молекулы приводит к образованию иммунного синапса и активации TCR-комплекса за счет кластеризации молекул CD3 на сконструированных Т-клетках.

За день до скрининга сконструированные репортерные Т-клетки культивировали в среде для селекции до достижения концентрации 5×10^5 клеток/мл, а на следующий день тестировали в биологическом анализе. Значения EC_{50} антител к LAG3 определяли в присутствии фиксированной концентрации биспецифического антитела к CD3×CD20 (100 пМ). Реагенты добавляли в следующем порядке. Антитела к Lag 3 и изотипические контроли серийно разводили в RPMI1640, дополненной 10% FBS и пенициллином/стрептомицином/глутамином (среда для анализа). Концентрации при 10-точечном разведении находились в диапазоне от 15 пМ до 100 нМ, причем конечная точка разведения не содержала mAb (один буфер в качестве контроля). Серийно разведенные антитела добавляли в соответствующие лунки 96-луночных белых планшетов с лунками с плоским дном, содержащие фиксированную концентрацию (100 пМ) биспецифического антитела. Культивированные в течение ночи репортерные Т-клетки ресуспендировали в концентрации 2×10^6 /мл в среде для анализа, добавляли в планшеты, содержащие антитела к LAG3 и биспецифическое антитело, и инкубировали в течение 30 мин при 37°C/5% CO₂. Конечная концентрация репортерных Т-клеток составляла 5×10^4 на лунку.

Затем клетки APC промывали 1× D-PBS (Irvine Scientific, номер по каталогу 9240), трипсинизировали (специализированная среда (Specialty Media), номер по каталогу SM-2004-C) и блокировали средой для анализа. После центрифугирования клетки ресуспендировали до достижения концентрации 4×10^5 /мл в среде для анализа и добавляли в планшеты, содержащие репортерные Т-клетки, инкубированные с антителами к LAG3 и биспецифическим антителом. Конечная концентрация клеток APC составляла 1×10^4 на лунку. Планшеты инкубировали в течение 4-6 ч при 37°C, 5% CO₂. После добавления реагента ONE-Glo™ (Promega, №E6051) выявляли активность API-Luc, и собирали данные в относительных световых единицах (RLU) на люминиметре Victor. Все образцы тестировали в двух повторах.

Способ с примириванием пептидом с применением MBP85-99. TCR распознают специфический комплекс МНС/пептид и обеспечивают активацию Т-клеток. Сообщалось, что применяемый в этом анализе гетеродимер TCR клона Ob2F3 взаимодействует с белком МНСII, HLA-DR2AB, в комплексе с пептидом MBP85-99 (основной белок миеллина, NP_001020272; SEQ ID NO: 583).

За день до скрининга получали сконструированные репортерные Т-клетки, как описано выше для способа на основе биспецифического антитела. Клетки APC примиривали в течение ночи 0,2 мкМ пептида MBP85-99 (Celtex HLA-DR2 MBP85-99 в DMSO, ER-15, партия № 140411, молекулярная масса 1797,1 г/моль) в соответствующей среде для культивирования клеток, содержащей антибиотик, при 37°C/5% CO₂. Значения EC_{50} антител к LAG3 определяли в присутствии 1×10^4 примириванных APC. Реагенты добавляли в следующем порядке: Антитела к LAG3 и контроли серийно разводили в среде для анализа. Концентрации антител к LAG3 при 10-точечном серийном разведении находились в диапазоне от 15 пМ до 100 нМ, причем последняя точка разведения не содержала mAb. Антитела добавляли в соответствующие лунки 96-луночного белого планшета с лунками с плоским дном. Культивированные в течение ночи репортерные Т-клетки ресуспендировали до достижения концентрации 2×10^6 /мл в среде для анализа, добавляли в планшеты и инкубировали в течение 30 мин при 37°C при 5% CO₂. Конечная концентрация репортерных Т-клеток составляла 5×10^4 Т-клеток на лунку. Затем примириванные пептидом MBP85-99 клетки APC промывали 1× D-PBS (Irvine Scientific, номер по каталогу 9240), трипсинизировали (специализированная среда (Specialty Media), номер по каталогу SM-2004-C) и блокировали средой для анализа. После центрифугирования клетки ресуспендировали до достижения концентрации 4×10^5 /мл в среде для анализа и добавляли в планшеты с антителами к LAG3 и примириванными пептидом репортерными Т-клетками. Конечная концентрация клеток APC составляла 1×10^4 на лунку. Планшеты для анализа инкубировали в течение 4-6 ч при 37°/5% CO₂. После добавления реагента ONE-Glo™ (Promega, №E6051) выявляли активность API-Luc, и собирали данные в относительных световых единицах (RLU) на люминиметре Victor. Все образцы тестировали в двух повторах.

Значения EC_{50} определяли на основе уравнения четырехпараметрической логистической модели по кривой ответа из 10 точек с применением GraphPad Prism. Значения RLU для каждого подвергнутого скринингу антитела нормализовали, принимая не содержащее mAb последнее серийное разведение в качестве контроля за 100%, что теоретически должно отображать максимальный API-Luc ответ, обусловленный либо биспецифической молекулой (в способе на основе биспецифического антитела), либо примириванными пептидом MBP85-99 APC. Результаты приведены в табл.14.

Таблица 14. Зависимая от антител к LAG3 активация передачи сигнала API-Luc в биологическом анализе с использованием экспрессирующих LAG3 Т-клеток/APC.

ID# Ab	EC_{50} [M]	
	Способ с примириванием пептидом	Способ на основе биспецифического антитела
Изотип hIgG4	-	-

H4sH15462P	4,86E-10	1,48E-10
H4H15462P	3,44E-10	2,24E-10
H4sH15479P	1,35E-10	8,72E-11
H4H15479P	2,84E-10	1,45E-10
H4sH15482P	8,06E-10	5,18E-10
H4H15482P	2,48E-09	>100 нМ
H4sH15498P2	4,61E-09	>100 нМ
H4H15498P2	5,89E-09	6,62E-09
H4sH14813N	8,16E-10	6,88E-10
H4H14813N	1,01E-09	1,07E-09
H4H15483P	2,54E-09	3,69E-09
H4H17819P	2,12E-09	>100 нМ
H4H17823P	6,88E-10	>100 нМ
H4H17826P2	8,83E-09	2,66E-07
H4H17828P2	4,91E-09	>100 нМ
Препарат сравнения 1	2,79E-10	1,57E-10
Препарат сравнения 2	3,49E-10	2,38E-10

Как показано в табл.14, все mAb к Lag3 по настоящему изобретению, которые тестировали в биологическом анализе с использованием Т-клеток/АПС, обеспечивали освобождение от опосредованного LAG3/HLA-DR2 ингибирования со значениями EC₅₀ в диапазоне от 135 пМ до 8,83 нМ в способе анализа с примированием пептидом, и с EC₅₀ в диапазоне от 87 пМ до более чем 100 нМ в способе анализа на основе биспецифического антитела, тогда как препараты сравнения характеризовались значениями EC₅₀ 280 пМ и 350 пМ. Для тестируемых изотипических контролей не было показано значимое возобновление активности в биологическом анализе. В дополнительном эксперименте добавление антитела к PD-1 (REGN 2810; описанное в примере 12 в настоящем документе) не усиливало возобновление активации Т-клеток.

Во втором эксперименте клеточную линию HEK293/CD20/HLA-DR2 трансдуцировали геном PD-L1 человека (аминокислоты 1-290 белка с номером доступа NP_054862.1), который был клонирован в лентивирусную векторную систему (pLVX). Как описано выше, происходящие из Jurkat Т-клетки, экспрессирующие hLAG-3 и репортерную люциферазу под контролем AP-1, инкубировали с PD-L1 -положительными антиген-представляющими клетками, экспрессирующими комплекс МНС II человека/пептид. В этом анализе антитела к LAG-3 обеспечивали возобновление активности Т-клеток только в присутствии антитела к PD-1 (REGN2810; описанное в примере 12 в настоящем документе), а не в отсутствие антитела к PD-1. Таким образом, в этом анализе с использованием Т-клеток антитела к LAG-3 обеспечивали возобновление активации Т-клеток посредством блокирования передачи ингибирующего сигнала LAG-3/МНС II и действовало синергически с антителом к PD-1.

Пример 9. Антитела к LAG3 характеризуются связыванием с CD4+ и CD8+ стимулированными Т-клетками яванского макака.

В этом примере с помощью FACS оценивали способность выбранных антител к LAG3 связываться с экспрессирующими LAG3 CD4+ и/или CD8+ Т-клетками яванского макака.

Сперва из цельной крови яванского макака (Bioreclamation, Вестбери, Нью-Йорк) выделяли Т-клетки. Вкратце, цельную кровь от двух доноров-яванских макаков разводили 1:1 в PBS и наслаивали на 85% раствор Ficoll-Paque. Следуя стандартным процедурам, эритроциты отделяли от мононуклеарных клеток и Т-клетки выделяли с применением набора для выделения общего пула Т-клеток (panT cells isolation kit) (Miltenyi Biotech).

Выделенные Т-клетки активировали с применением набора для активации/размножения Т-клеток (T-cell Activation/Expansion kit) для отличного от человека примата (Miltenyi Biotech). Смесь клеток с гранулами ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в полной среде. Спустя 72 ч инкубации гранулы удаляли, и активированные Т-клетки размножали в полной среде в течение 96 ч.

Затем стимулированные Т-клетки яванского макака от каждого донора, как описано выше, окрашивали красителем LIVE/DEAD (Molecular Probes) для различения живых и мертвых клеток с помощью FACS. Затем клетки совместно инкубировали с конъюгированными с PE антителами к CD8 и конъюгированными с FITC антителами к CD4 в течение 15 мин на льду для обеспечения возможности выявления

CD4- и CD8-положительных и отрицательных популяций клеток.

Для оценки связывания антител к LAG3 с ранее выделенными CD4+ и CD8+ Т-клетками яванского макака антитела к LAG3 и изотипические контроли серийно разводили в блокирующем буфере и высевали в 96-луночный планшет с лунками с V-образным дном с конечными дозами в диапазоне от 100 нМ до 50 нМ. Затем серийно разведенные антитела непосредственно метили с применением Zenon Alexa-Fluor 647 (Molecular Probes) и инкубировали с суспензией CD4+/CD8+ Т-клеток яванского макака в течение 15-30 мин. на льду. Клетки центрифугировали, и осадки промывали буфером для окрашивания для удаления несвязавшихся антител, и фиксировали в течение 12 ч Cytofix (BD Biosciences) в разведении 1:1 и буфере для окрашивания. По истечении периода инкубации буфер для фиксации удаляли, а осадки ресуспендировали в буфере для окрашивания, фильтровали, и применяли для измерений флуоресценции.

Результаты измерений флуоресценции получали на Fortessa (Becton Dickinson) и данные анализировали в FlowJo для определения средних значений интенсивности флуоресценции (MFI). Значения EC₅₀ рассчитывали на основе уравнения четырехпараметрической логистической модели по кривой ответа из 11 точек с применением GraphPad Prism. Отношение MFI для каждого антитела рассчитывали путем деления MFI при 11,1 нМ на MFI при 0 нМ концентрации антител (отрицательный контроль).

Таблица 15. EC₅₀ и отношения MFI для связывания выбранных антител к LAG3 с CD4+ и CD8+ Т-клетками яванского макака от нескольких доноров

Исследуемое с помощью FACS связывание в отношении популяции стимулированных Т-клеток	Донор-яванский макак 1				Донор-яванский макак 2			
	CD4+		CD8+		CD4+		CD8+	
	EC ₅₀ [M]	Отношение MFI (11 нМ/ 0 нМ)						
H4sH15482P	1,20E-09	1,3	4,60E-10	3	3,80E-10	1,3	4,10E-10	4,7
H4sH14813N	4,20E-10	1,3	8,50E-11	3,5	2,20E-10	1,5	1,10E-10	6,3
Препарат сравнения 1	NB	1,1	9,20E-10	2,4	NB	1,2	7,80E-10	4,2
Изотипический контроль hIgG4	NB	1	NB	1	NB	1	NB	1

NB: связывание отсутствует.

Как было показано ранее, антитела к LAG3 H4sH15482P и H4sH14813N характеризовались связыванием со сконструированными клеточными линиями LAG3-HEK293 яванского макака. В этом примере для H4sH15482P и H4sH14813N было продемонстрировано специфическое связывание с CD4+ и CD8+ экспрессирующими LAG3 Т-клетками яванского макака с EC₅₀ в диапазоне от 1,1 нМ до 85 нМ (табл.15). Таким образом, описанные в этом примере выбранные антитела к LAG3 связываются, проявляя перекрестную реактивность, с LAG3, экспрессируемым на активированных CD4+ и CD8+ Т-клетках яванского макака. В отличие от этого, для препарата сравнения 1 было продемонстрировано связывание только с CD8+ Т-клетками яванского макака.

Пример 10. In vivo эффективность антител к LAG3 в отношении опухолей Colon 26.

In vivo эффективность антител мыши к LAG3 отдельно и в комбинации с антителами к PD-1 мыши исследовали на доклинической модели сингенной опухоли Colon 26.

Мыши BALB/c были приобретены у Taconic Biosciences. Colon 26, клеточная линия аденокарциномы мыши, происходящая из штамма мышей BALB/c, была получена из Американской коллекции типовых культур (ATCC). В день 0 пятидесяти мышам BALB/c подкожно имплантировали 1×10^6 клеток Colon 26 (линия аденокарциномы мыши, происходящая из штамма BALB/c). В день 8 выбирали сорок мышей со средним объемом опухоли 50 мм³ и рандомизировали их в 4 группы обработки (N=10/групп). В дни 14, 17, 21, 24 и 28 мышам вводили дозы антител следующим образом: группа 1, изотипические контрольные IgG2a-антитела крысы (клон 2A3, BioXCell, номер по каталогу BE0089) и изотипические контрольные mIgG1-антитела (клон MOPC-21, BioXCell, номер по каталогу BE0083); группа 2, антитела к PD-1 мыши (IgG2a крысы для антитела к PD-1 мыши, клон RPMI-14, BioXCell, номер по каталогу BE0089) и изотипические контрольные mIgG1-антитела; группа 3, антитела к LAG3 мыши (IgG1 крысы для антитела к LAG3 мыши, клон C9B7W, BioXCell, номер по каталогу BE0174) и изотипические контрольные IgG2a-антитела крысы; группа 4, антитела к PD-1 мыши и к LAG3 мыши. Все антитела вводили

ли путем внутривенной инъекции в концентрации 10 мг/кг. Показатели объема опухоли отслеживали путем измерения с помощью штангенциркуля дважды в неделю на протяжении всего эксперимента (42 дня).

Значительное подавление роста опухоли наблюдали у мышей, которых обрабатывали антителом к PD-1 мыши (фиг. 2А-В), причем по окончании эксперимента у 5 из 10 мышей к дню 45 опухоль исчезала. Подавление роста опухоли также наблюдали в подгруппе мышей, обработанных антителом к LAG3 мыши, причем у 3 из 10 мышей к дню 45 опухоль исчезала. С разительным отличием, комбинированная обработка антителами к LAG3 и к PD-1 превосходила любой препарат в качестве монотерапии, причем по окончании эксперимента у 8 из 10 мышей опухоль исчезала, что свидетельствует о сильном аддитивном эффекте обработки антителом к LAG3 и антителом к PD-1. В контрольной группе по окончании эксперимента мышей без опухоли не наблюдали. К дню 35 имело место статистически значимое уменьшение показателей объема опухоли у мышей, обработанных комбинированным терапевтическим препаратом ($p < 0,05$, фиг. 2В), но не любым из препаратов в качестве монотерапии. Не смотря на эффективное устранение опухоли, никаких симптомов потери веса тела не наблюдали (не показано). Таким образом, в модели развившейся опухоли Colon 26 схема с комбинацией антител к PD-1 и к LAG3 была значимо более эффективной, чем с соответствующими препаратами в качестве монотерапии.

In vivo активность антител к PD-1 мыши и к LAG3 мыши также изучали на доклинических моделях сингенных опухолей 4Т1, RENCA и А20. Комбинированная обработка обоими антителами обеспечивала по меньшей мере аддитивный противоопухолевый эффект по сравнению с обработкой любым из антител по отдельности (данные не приведены).

Пример 11. In vivo эффективность антител к LAG3 мыши в отношении опухолей MC38.

Эффект двойного блокирования PD-1 и LAG3 изучали в отношении развившихся опухолей MC38 у мышей C57BL/6 с применением блокирующих антител к PD-1 мыши и к LAG3 мыши.

Мыши C57BL/6 были приобретены у Taconic Biosciences. MC38, клеточная линия аденокарциномы мыши, происходящая из штамма мышей C57BL/6, была получена из депозитария Национальных институтов здравоохранения. Антитела к LAG3 и к PD-1, а также контроли, были получены как описано в примере 10.

В день 0 пятидесяти мышам C57BL/6 подкожно в бок имплантировали 3×10^5 клеток MC38. В день 8 выбирали сорок мышей со средним объемом опухоли 45 мм^3 и рандомизировали их в 4 группы обработки ($N=10/\text{групп}$). В дни 8, 12, 15, 19 и 23 мышам вводили дозы антител следующим образом: Группа 1, контрольные изотипические IgG2а-антитела крысы и mIgG1-антитела; группа 2, антитела к PD-1 мыши и mIgG1-антитела; группа 3, антитела к LAG3 мыши и IgG2а-антитела крысы; группа 4, антитела к PD-1 мыши и антитела к LAG3 мыши. Все антитела вводили в концентрации 10 мг/кг путем внутривенной инъекции. Показатели объема опухоли отслеживали путем измерения с помощью штангенциркуля дважды в неделю на протяжении всего эксперимента (28 дня).

Терапия антителом к PD-1 обеспечивала значимое подавление роста опухоли в подгруппе мышей ($p < 0,0001$; день 23) (фиг. 3А-В), причем по окончании эксперимента опухоль исчезала у 2 из 10 мышей. В случае монотерапии антителом к LAG3 не было показано какого-либо значимого противоопухолевого эффекта (по окончании эксперимента у 0/10 мышей исчезала опухоль), тогда как комбинация антител к LAG3 и к PD-1 превосходила терапию антителом к PD-1 отдельно, что свидетельствует о наличии синергического эффекта.

Для тестирования иммуномодулирующих свойств антител к PD-1 и к LAG3 в комбинации, изучали Т-клеточные маркеры в селезенках и дренирующих лимфатических узлах (DLN) обработанных мышей (фиг. 4). Селезенки и дренирующие лимфатические узлы несущих опухоль мышей удаляли при препарировании и помещали в 15 мл среды RPMI1640 Glutamax I (Invitrogen). Выделяли общую РНК и осуществляли RT-PCR-анализ Taqman с применением смеси праймер/зонд, специфической для CD8P мыши [зонд: AGCAGCTCTGCCCTCAT (SEQ ID NO: 584), прямой праймер: GCTCTGGCTGGTCTTTCAGTATG (SEQ ID NO: 585), обратный праймер: TTGCCGATGGTTGGTTTGAAC (SEQ ID NO: 586)] и IFN γ мыши (Mm01168134_m1, Applied Biosystems). Образцы нормализовали к уровням экспрессии транскрипта, кодирующего циклофилин В мыши. В анализе TaqMan было продемонстрировано размножение CD8+ Т-клеток как в DLN, так и в селезенках мышей в группе комбинированной обработки, а также повышенная продукция эффекторной молекулы IFN γ Т-клеток у животных, обработанных как комбинацией, так и только антителом к PD-1, что свидетельствует о том, что блокирование PD-1 и LAG3 обеспечивает повышение в отношении пролиферации и эффекторной функции Т-клеток.

Пример 12. In vivo эффективность антител к LAG3 человека в отношении опухолей MC38.

В этом эксперименте изучали эффективность иллюстративного антитела к LAG3 человека по настоящему изобретению в отношении опухолей MC38. mAb к LAG3 человека не связываются с LAG3 мыши. Следовательно, для изучения противоопухолевых свойств таких антител у мышей in vivo применяли мышей, гуманизированных для экспрессии белка LAG3 человека. Для экспериментов согласно настоящему документу, с применением технологии VelociGene® были созданы гуманизированные по двум генам мыши, у которых экспрессируется внеклеточная часть PD-1 человека и LAG3 человека и транс-

мембранная и внутриклеточная части мышинных версий этих белков (Valenzuela et al 2003; Nat. Biotechnol. 21. 652-659).

Гуманизированные по двум генам мыши LAG3/PD-1 были сконструированы с применением технологии VelociGene® для замещения областей генов Pcdcl и Lag3 мыши, кодирующих внеклеточные домены, на соответствующие области генов PD-1 человека и LAG3 человека (публикация заявки на патент США с серийным номером 62/258181, поданная 20 ноября 2015 года). Экспрессию гуманизированных PD-1 и LAG3 подтверждали путем изучения экспрессии белков PD-1 и LAG3 на Т-клетках гуманизированной мыши после стимуляции антителом к CD3/CD28. Взаимодействие белков PD-1 и LAG3 человека с соответствующими лигандами мыши проверяли путем тестирования связывания LAG3 человека с МНС II мыши в анализе клеточной адгезии, а связывание PD-1 человека с PD-L1 мыши проверяли в исследовании по связыванию SPR-Biacore.

Иллюстративное антитело к LAG3, применяемое для этого исследования, является полностью человеческим антителом, которое специфически связывается с LAG3 человека и содержит HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 SEQ ID NO: 420-422-424-428-430-432 и HCVR/LCVR SEQ ID NO: 418/426 (также известное как H4sH15482P, и как "mAb1" далее в настоящем документе).

Антитела к PD-1 человека раскрыты в публикации заявки на патент США US20150203579, включенной в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Применяемое в этом примере антитело к PD-1 представляет собой H4H7798N (раскрытое в US20150203579; также известное как REGN2810). Более конкретно, H4H7798N содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 330 и легкой цепи SEQ ID NO: 331 (раскрытые в US20150203579). REGN2810 (антитело к hPD-1) с высокой аффинностью связывается с PD-1 человека и блокирует взаимодействие PD-1 с PD-L1 и PD-L2.

Клетки аденокарциномы толстой кишки мыши (MC38.Ova) были сконструированы с возможностью экспрессии альбумина куриного яйца с целью повышения иммуногенности опухоли.

В день 0 мышам LAG3^{hum/hum}PD-1^{hum/hum} подкожно имплантировали $1,5 \times 10^6$ клеток MC38.Ova и рандомизировали их в три группы обработки (N=7/группа). В дни 3, 6, 10, 14 и 17 мышам путем внутрибрюшинной инъекции вводили mAb1 (антитело к hLAG3) (25 мг/кг), REGN2810 (антитело к hPD-1) (10 мг/кг) или изотипическое контрольное антитело (25 мг/кг). Показатели объема опухоли отслеживали путем измерения с помощью штангенциркуля дважды в неделю на протяжении всего эксперимента (24 дня).

В день 0 гуманизированным по двум генам мышам LAG3^{hum/hum}PD-1^{hum/hum} вводили клетки MC38.Ova, а в дни 3, 6, 10, 14 и 17 внутрибрюшинным путем вводили дозы mAb1 (антитела к hLAG3) (25 мг/кг), REGN2810 (антитела к hPD-1) (10 мг/кг) или изотипического контроля (25 мг/кг). Для REGN2810 (антитела к hPD-1) было показано частичное ингибирование роста опухоли (фиг. 5), причем регрессию опухоли наблюдали у 2 из 7 мышей, тогда как в группе, получавшей изотипический контроль, не было ни одной мыши без опухоли. Для монотерапии mAb1 (антителом к hLAG3) в концентрации 25 мг/кг не было показано какого-либо значимого эффекта в отношении роста опухоли, причем по окончании эксперимента опухоль исчезала только у 1 из 7 мышей. На показатели веса тела мышей mAb1 (антитело к hLAG3), REGN2810 (антитело к hPD-1) или изотипический контроль не влияли.

Пример 13. In vivo эффективность комбинации антител к LAG3 человека и к PD-1 человека в отношении опухолей MC38.

В этом эксперименте изучали эффективность mAb1 (антитела к hLAG3) в комбинации с REGN2810 (антителом к hPD-1) в отношении опухолей MC38.Ova у гуманизированных по двум генам мышей LAG3^{hum/hum}PD-1^{hum/hum}. Гуманизированные по двум генам мыши описаны в примере 12 в настоящем документе.

Иллюстративное антитело к LAG3, применяемое для этого исследования, является полностью человеческим антителом, которое специфически связывается с LAG3 человека и содержит HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 SEQ ID NO: 420-422-424-428-430-432 и HCVR/LCVR SEQ ID NO: 418/426 (также известное как H4sH15482P, и как "mAb1" далее в настоящем документе).

Применяемое в этом примере антитело к PD-1 представляет собой H4H7798N (раскрытое в US20150203579; также известное как REGN2810). REGN2810 (антитело к hPD-1) с высокой аффинностью связывается с PD-1 человека и блокирует взаимодействие PD-1 с PD-L1 и PD-L2.

В день 0 мышам подкожно имплантировали 1×10^6 клеток MC38.Ova и рандомизировали их в четыре группы обработки (N=7 в контрольной группе и N=12 в каждой из групп обработки mAb1 (антителом к hLAG3), REGN2810 (антителом к hPD-1) и комбинацией mAb1 (антитело к hLAG3) + REGN2810 (антитело к hPD-1)). В дни 3, 7, 10, 14 и 17 мышам путем внутрибрюшинной инъекции вводили mAb1 (антитело к hLAG3) (25 мг/кг), REGN2810 (антитело к hPD-1) (10 мг/кг), комбинацию mAb1 (антитела к hLAG3) (25 мг/кг) и REGN2810 (антитела к hPD-1) (10 мг/кг) или изотипический контроль (25 мг/кг). Показатели объема опухоли отслеживали путем измерения с помощью штангенциркуля дважды в неделю на протяжении эксперимента (32 дня), и за животными без опухоли наблюдали в отношении отсутствия повторного появления опухоли в течение периода длительностью до 80 дней.

Монотерапия REGN2810 (антителом к hPD-1) приводила к ингибированию роста опухоли (фиг. 6А-

В), с регрессией опухоли у 2 из 12 (17%) животных, тогда как mAb1 (антитело к hLAG3) не было значительно эффективным, что подтверждает заключение из предыдущего эксперимента. Регрессию опухоли наблюдали только у 1 из 12 мышей, обработанных mAb1 (антитело к hLAG3). В группе, получавшей изотипический контроль, к дню 32 не было мышей без опухоли. В отличие от этого, для комбинации mAb1 (антитела к hLAG3) и REGN2810 (антитела к hPD-1) было продемонстрировано сильное ингибирование роста опухоли MC38.Ova, в результате чего по окончании эксперимента было 5 из 12 (42%) мышей без опухоли. Ни у одной из мышей без опухоли не наблюдали повторного появления опухоли в течение 80 дней после имплантации, что свидетельствует о долгосрочных эффектах комбинированной иммунотерапии. С помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки для множественного сравнения было выявлено значимое различие в показателях объема опухоли между группами комбинированной обработки mAb1 (антителом к hLAG3) и REGN2810 (антителом к hPD-1) и группами, получавшими монотерапевтический препарат mAb1 (антитело к hLAG3) ($p < 0,05$), или изотипический контроль ($p < 0,01$) в день 22 (фиг. 6B). Для монотерапевтического препарата REGN2810 (антитела к hPD-1) также было показано значимое подавление роста опухоли ($p < 0,05$). Комбинированная обработка mAb1 (антителом к hLAG3) и REGN2810 (антителом к hPD-1) также приводила к значимому улучшению в отношении процента выживаемости животных ($p < 0,0001$), согласно анализу с помощью логарифмического рангового критерия (Мантеля-Кокса) (фиг. 6C). Не смотря на улучшенную эффективность комбинированной терапии, симптомов потери веса тела не наблюдали (данные не приведены). Таким образом, комбинация mAb1 (антитела к hLAG3) и REGN2810 (антитела к hPD-1) обеспечивала улучшенную эффективность, включая подавление роста опухоли, улучшенное устранение опухоли и повышенную выживаемость по сравнению с препаратами REGN2810 (антителом к hPD-1) или mAb1 (антителом к hLAG3) в качестве монотерапии.

Пример 14. Исследования по определению оптимальной дозы комбинации антител к LAG3 и к PD-1 в отношении опухолей MC38.

В этом примере описана серия экспериментов по определению оптимальной дозы с измерением *in vivo* эффективности комбинации антител к PD-1 человека и к LAG3 человека в отношении опухолей MC38.Ova у гуманизированных по двум генам мышей LAG3^{hum/hum}PD-1^{hum/hum}. Гуманизированные по двум генам мыши описаны в примере 12 в настоящем документе.

Иллюстративное антитело к LAG3, применяемое для этого исследования, является полностью человеческим антителом, которое специфически связывается с LAG3 человека и содержит HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 SEQ ID NO: 420-422-424-428-430-432 и HCVR/LCVR SEQ ID NO: 418/426 (также известное как H4sH15482P, и как "mAb1" далее в настоящем документе).

Применяемое в этом примере антитело к PD-1 представляет собой H4H7798N (раскрытое в US20150203579; также известное как REGN2810). REGN2810 (антитело к hPD-1) с высокой аффинностью связывается с PD-1 человека и блокирует взаимодействие PD-1 с PD-L1 и PD-L2.

В первом эксперименте REGN2810 (антитело к hPD-1) титровали и тестировали при уровнях дозы 10 мг/кг и 1 мг/кг, причем в обеих дозовых группах тестировали и в качестве отдельного средства, и в комбинации с mAb1 (антителом к hLAG3) (25 мг/кг). Результаты для обеих групп комбинированной обработки сравнивали с результатами монотерапии REGN2810 (1 мг/кг или 10 мг/кг) или mAb1 (25 мг/кг) чтобы определить, наблюдается ли аддитивный/синергический противоопухолевый эффект. Также тестировали обработку изотипическим контрольным антителом (25 мг/кг). В день 0 мышам LAG3^{hum/hum}PD-1^{hum/hum} вводили клетки MC38.Ova и рандомизировали их в шесть групп обработки (N=6 в группе, получающей изотипический контроль, и N=12 в группах обработки mAb1, REGN2810 или REGN2810 + mAb1). Мышам вводили: mAb1 (25 мг/кг); REGN2810 (10 мг/кг); REGN2810 (1 мг/кг); mAb1 (25 мг/кг) + REGN2810 (10 мг/кг); mAb1 (25 мг/кг) + REGN2810 (1 мг/кг); или изотипический контроль (25 мг/кг) путем внутривенной инъекции в дни 3, 7, 10, 14 и 17. Показатели объема опухоли отслеживали в течение 36 дней, а за животными без опухоли наблюдали в течение периода длительностью 80 дней.

В табл.16 приведены показатели среднего объема опухоли в различные моменты времени исследования, а в табл.17 приведено число мышей без опухоли к дню 36.

Таблица 16. Показатели среднего объема опухоли в различные моменты времени

Группа обработки	Объем опухоли, мм ³ , среднее значение (\pm SEM)				
	День 7	День 10	День 14	День 17	День 22
Изотипический контроль	24 (\pm 6)	54 (\pm 11)	104 (\pm 25)	269 (\pm 70)	749 (\pm 180)
mAb1 (антитело к LAG3) (25 мг/кг)	27 (\pm 4)	53 (\pm 20)	83 (\pm 38)	155 (\pm 73)	451 (\pm 211)
R2810 (10 мг/кг)	27 (\pm 4)	29 (\pm 8)	34 (\pm 11)	86 (\pm 26)	313 (\pm 98)
R2810 (1 мг/кг)	36 (\pm 8)	92 (\pm 23)	150 (\pm 47)	264 (\pm 73)	669 (\pm 183)
R2810 (10 мг/кг) + mAb1	25 (\pm 3)	10 (\pm 3)	4 (\pm 4)	8 (\pm 5)	38 (\pm 19)
R2810 (1 мг/кг) + mAb1	31 (\pm 7)	38 (\pm 13)	55 (\pm 35)	106 (\pm 58)	378 (\pm 137)

Таблица 17. Число мышей без опухоли к дню 36

Группа	Мыши без опухоли (день 36) n/N ^a (%)
Изотипический контроль	0/6 (0%)
REGN2810 (1 мг/кг)	2/12 (16%)
REGN2810 (10 мг/кг)	4/12 (33%)
mAb1 (25 мг/кг)	1/12 (8%)
REGN2810 (1 мг/кг) + mAb1 (25 мг/кг)	3/12 (25%)
REGN2810 (10 мг/кг) + mAb1 (25 мг/кг)	6/12 (50%)

^an/N: число мышей без опухоли/общее число мышей на группу.

Для монотерапии REGN2810 в концентрации только 1 мг/кг была показана минимальная регрессия опухоли за период времени 36 дней, подобно результатам для группы обработки изотипическим контролем (фиг. 7А-В). К дню 36 в группах, получавших REGN2810 (1 мг/кг) и изотипический контроль, соответственно было 2/12 (~16%) и 0/6 (0%) мышей без опухоли. В отличие от этого, в группах обработки mAb1 (25 мг/кг), REGN2810 (10 мг/кг) и REGN2810 (1 мг/кг) + mAb1 (25 мг/кг) были продемонстрированы подобные показатели подавления роста опухоли за период времени 22 дня (фиг. 7А). В день 36 в результате обработки mAb1 (25 мг/кг) было 1/12 (~8%) мышей без опухоли, тогда как в группе, получавшей REGN2810 (10 мг/кг), и группе, получавшей REGN2810 (1 мг/кг) + mAb1 (25 мг/кг), соответственно было 4/12 (~33%) и 3/12 (25%) мышей без опухоли. В целом, для mAb1 (25 мг/кг) + REGN2810 (10 мг/кг) было продемонстрировано наиболее сильное подавление роста опухоли MC38.Ova, причем у 6 из 12 (50%) мышей к дню 36 опухоль исчезала. Ни у одной из мышей без опухоли не наблюдали повторного появления опухоли в течение 80 дней после имплантации не смотря на прекращение обработки, что свидетельствует о долгосрочных эффектах комбинированной иммунотерапии. Обработка mAb1 (25 мг/кг) + REGN2810 (10 мг/кг) также приводила к значимому улучшению в отношении процента выживаемости животных ($p = 0,0197$), согласно анализу с помощью логарифмического рангового критерия (Мантеля-Кокса) (фиг. 1С). Также не наблюдали каких-либо симптомов потери веса.

Во втором эксперименте mAb1 (антитело к hLAG3) титровали и тестировали при уровнях дозы 25 мг/кг и 5 мг/кг, причем в обоих дозовых группах тестировали и в качестве отдельного средства, и в комбинации с REGN2810 (антителом к hPD-1) (10 мг/кг). Результаты для обеих групп комбинированной обработки сравнивали с результатами монотерапии mAb1 (5 мг/кг или 25 мг/кг) или REGN2810 (10 мг/кг) чтобы определить, наблюдается ли аддитивный/синергический противоопухолевый эффект. Также тестировали обработку изотипическим контрольным антителом (25 мг/кг). В день 0 мышам LAG-3^{hum/hum}PD-1^{hum/hum} вводили клетки MC38.Ova и рандомизировали их в шесть групп обработки (N=6 в группе, получающей изотипический контроль, и N=12 в группах обработки mAb1, REGN2810 или REGN2810 + mAb1). Мышам вводили: mAb1 (5 мг/кг); mAb1 (25 мг/кг); REGN2810 (10 мг/кг); mAb1 (5 мг/кг) +

REGN2810 (10 мг/кг); mAb1 (25 мг/кг) + REGN2810 (10 мг/кг); или изотипический контроль (25 мг/кг) путем внутривенной инъекции в дни 3, 7, 10, 14 и 17. Показатели объема опухоли отслеживали в течение 31 дня.

Для монотерапии mAb1 в концентрации 5 мг/кг была показана минимальная регрессия опухоли, подобно результатам для группы обработки изотипическим контролем. Для комбинации mAb1 (25 мг/кг) + REGN2810 (10 мг/кг) было показано наиболее сильное подавление опухоли (фиг. 8А). Сильный эффект в результате комбинирования также был продемонстрирован для группы обработки mAb1 (5 мг/кг) + REGN2810 (10 мг/кг). Показатели объема опухоли, измеренные в день 23, приведены на фиг. 8В. Для комбинации антитела к LAG-3 и REGN2810 также было показано значимое улучшение в отношении выживаемости животных ($p < 0,001$, согласно анализу с помощью логарифмического рангового критерия Мантеля-Кокса) (фиг. 8С). Из результатов видно, что сильный эффект в результате комбинирования наблюдался даже при низких дозах антитела к LAG3. Согласно представленным в настоящем документе результатам, для курсов лечения опухолей может не потребоваться применение высоких доз антител к LAG3 в комбинации с антителами к PD-1.

Таким образом, для комбинации REGN2810 (антитела к hPD-1) и mAb1 (антитела к hLAG3) в модели опухоли MC38.ova у гуманизированных по двум генам мышей LAG3/PD-1, которая позволяет выполнять тестирование пригодных для лечения антител, которые не связываются перекрестно к рецепторами мыши, была продемонстрирована улучшенная дозозависимая эффективность, включая подавление роста опухоли и повышенную выживаемость по сравнению с таковыми в случае препаратов REGN2810 (антитело к hPD-1) и mAb1 (антитело к hLAG3) в качестве монотерапии. Устойчивая противоопухолевая эффективность комбинации REGN2810 (антитела к hPD-1) и mAb1 (антитела к hLAG3) в доклинических условиях дает основания для проведения для нее клинических исследований в качестве комбинированной иммунотерапии злокачественной опухоли.

Пример 15. In vivo эффективность комбинации антител к LAG3 человека и к PD-1 человека в отношении развившихся опухолей MC38.

В этом эксперименте изучали эффективность mAb1 (антитела к hLAG3) в комбинации с REGN2810 (антителом к hPD-1) в отношении развившихся опухолей MC38.Ova у гуманизированных по двум генам мышей LAG3^{hum/hum}PD-1^{hum/hum}. Гуманизированные по двум генам мыши описаны в примере 12 в настоящем документе.

Иллюстративное антитело к LAG3, применяемое для этого исследования, является полностью человеческим антителом, которое специфически связывается с LAG3 человека и содержит HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 SEQ ID NO: 420-

422-424-428-430-432 и HCVR/LCVR SEQ ID NO: 418/426 (также известное как H4sH15482P, и как "mAb1" далее в настоящем документе).

Применяемое в этом примере антитело к PD-1 представляет собой H4H7798N (раскрытое в US20150203579; также известное как REGN2810). REGN2810 (антитело к hPD-1) с высокой аффинностью связывается с PD-1 человека и блокирует взаимодействие PD-1 с PD-1 и PD-12.

В день 0 мышам LAG-3^{hum/hum} PD-1^{hum/hum} подкожно вводили клетки MC38.Ova. В день 10 выбирали мышей со средним объемом опухоли 100 мм³ и рандомизировали их в четыре группы обработки. В дни 10, 14, 17, 22 мышам путем IP инъекции вводили mAb1 (25 мг/кг; N=9), REGN2810 (10 мг/кг; N=10), комбинацию mAb1 (25 мг/кг) + REGN2810 (10 мг/кг) (N=11) или изотипическое контрольное антитело (25 мг/кг; N=7). Показатели объема опухоли отслеживали в течение 28 дней после имплантации опухолевых клеток.

Обработка несущих опухоль MC38.ova гуманизированных мышей комбинацией антител к hPD-1 и к hLAG-3 вызывала активацию внутриопухолевых и периферических Т-клеток. Монотерапия REGN2810 приводила к частичному ингибированию роста опухоли, а для монотерапии mAb1 не было показано уменьшения среднего объема опухоли по сравнению с таковым у мышей, обработанных изотипическим контролем (фиг. 9). В отличие от этого, для комбинации mAb1 (25 мг/кг) и REGN2810 (10 мг/кг) было продемонстрировано сильное ингибирование роста опухоли MC38.Ova. В однофакторном дисперсионном анализе (ANOVA) с апостериорным критерием Бонферрони для множественного сравнения было выявлено значимое различие в показателях среднего объема опухоли между группой, получавшей комбинацию mAb1 и REGN2810, и монотерапией mAb1 ($p < 0,01$) или изотипическим контролем ($p < 0,05$) (фиг. 10). При сравнении комбинированной терапии с монотерапией REGN2810 в целом показатели среднего объема опухоли в течение всего эксперимента были ниже в случае комбинированной терапии, однако это различие не достигало статистической значимости. Комбинация антитела к LAG-3 и REGN2810 также обеспечивала значимое повышение выживаемости, а также увеличение продолжительности выживания животных ($p < 0,01$, согласно анализу с помощью логарифмического рангового критерия Мантеля-Кокса). К дню 25 выжило 50% обработанных комбинированным терапевтическим препаратом мышей, по сравнению с контролем и монотерапией (фиг. 11). Согласно результатам, комбинированная обработка оказывала аддитивный, дозозависимый противоопухолевый эффект по сравнению с соответствующими монотерапевтическими препаратами.

Пример 16. Фармакокинетика антитела к LAG-3 у яванского макака.

Фармакокинетику (ПК) антитела к LAG3 mAb1 описывали после введения самкам яванских макаков (5 животных на дозовую группу) однократной внутривенной (IV) дозы, составляющей 1,0, 5,0 или 15,0 мг/кг. Для определения концентрации функционального mAb1 у всех животных в различные моменты времени собирали образцы крови. Концентрации функционального mAb1 в сыворотке крови определяли с применением ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA). Антитела к mAb1 в сыворотке крови анализировали с применением мостикового иммунологического анализа на основе электрохемилюминесценции. ПК-параметры оценивали с применением некомпартментного анализа (NCA). Профили средняя концентрация-время характеризуются начальной кратковременной фазой распределения с последующей линейной бета-фазой выведения (фиг. 12). На протяжении исследования продолжительностью 8 недель фазы мишень-опосредованного клиренса не наблюдали. Среднее AUC_{inf} повышалось зависимым от дозы образом, как было продемонстрировано по схожим значениям $AUC_{inf}/\text{доза}$ среди тестируемых уровней доз. В соответствии с этим заключением, средние значения общего клиренса (CL) были схожими для 3 дозовых групп. Кроме того, периоды полувыведения в бета-фазе ($t_{1/2}$) для 3 дозовых групп были сопоставимы, в диапазоне от 10,8 до 11,5 дней. Исходя из результатов, в качестве максимальной дозы, не приводящей к развитию явных нежелательных эффектов (NOAEL), могло быть принято вплоть до 50 мг/кг. Эти результаты указывают на то, что для mAb1 была продемонстрирована линейная кинетика в условиях данного исследования.

Пример 17. Токсикологическая оценка антитела к LAG3 у яванских макаков.

In vivo токсикологические и токсикокинетические профили mAb1 оценивали в ходе 4-недельного, соответствующего правилам GLP токсикологического исследования с повторным введением доз у самцов и самок яванских макаков. Обезьянам (5 животных каждого пола на группу) путем IV инфузии вводили 0, 2, 10 или 50 мг/кг/неделю mAb1. Оценка токсичности основывалась на показателях смертности, предсмертного состояния, клинических наблюдений, веса тела, потребления пищи, офтальмологических осмотров, ECG-исследований, частоты дыхания, пульсовой оксиметрии, температуры тела и определения кровяного давления и неврологических осмотров. Также оценивали параметры в рамках лабораторной диагностики (общий анализ крови, коагуляция, клиническая биохимия и анализ мочи) и иммунофенотипирование. Также проводили макроскопические исследования при вскрытии, измерение показателей веса органов и гистопатологические исследования. Полное вскрытие проводили по окончании периода введения доз или по окончании 8-недельного периода без введения доз. Выбранные органы взвешивали, и ткани подвергали макроскопическому и микроскопическому исследованию.

mAb1 хорошо переносилось при всех уровнях дозы, оцениваемых при введении яванским макакам посредством IV инфузии. Поскольку mAb1 хорошо переносилось и не наблюдали связанных с mAb1 изменений по каким-либо оцениваемым параметрам безопасности, максимальной дозой, не приводящей к развитию явных нежелательных эффектов (NOAEL), для данного исследования считалась доза 50 мг/кг, наиболее высокая доза, вводимая в данном исследовании.

Пример 18. Картирование эпитопов на основе водородно-дейтериевого обмена (H/D) для антитела к LAG3 H4sH15482P, связывающегося с внеклеточным доменом hLAG3.

Эксперименты проводили для определения аминокислотных остатков внеклеточного домена LAG3 человека (аминокислоты Leu23-Leu450 LAG3 человека, номер доступа в UniProt P18627, полученные с Fc-меткой IgG1 человека на с-конце ("hLag3.Fc") (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота) (SEQ ID NO: 587), с которыми взаимодействует антитело к LAG3 H4sH15482P. Для этой цели использовали картирование эпитопов на основе водородно-дейтериевого (H/D) обмена с масс-спектрометрией (HDX-MS). Общее описание способа HDX изложено в Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; и Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Процедура эксперимента.

Эксперименты HDX-MS осуществляли с применением интегрированной платформы Waters HDX/MS (Waters Corporation, Милфорд, Массачусетс), состоящей из системы Leartec HDX PAL для меченя дейтерием, Waters Acquity M-Class (Auxiliary solvent manager) для расщепления и загрузки образца, Waters Acquity M-Class (μ Binary solvent manager) для создания градиента в аналитической колонке и масс-спектрометра Synapt G2-Si для измерения массы расщепленных пепсином пептидов.

Раствор для меченя готовили в 10 mM буфере PBS в D₂O при pD 7,0. Для меченя дейтерием 3,8 мкл hLAG3.Fc (5 пмоль/мкл) или hLAG3.Fc, предварительно смешанного с антителом к LAG3 H4sH15482P в молярном отношении 1:1, инкубировали с 56,2 мкл раствора для меченя на основе D₂O в течение различных промежутков времени (например, недеитерированный контроль = 0 с, мечение дейтерием: 1 и 20 мин).

Дейтерирование останавливали путем переноса 50 мкл образца в 50 мкл предварительно охлажденного буфера для остановки реакции (0,2 M TCEP, 6 M гуанидин хлорид в 100 mM фосфатном буфере, pH2,5), и смесь инкубировали при 1,0°C в течение 4 мин. Образец, в котором останавливали реакцию, затем вводили в Waters HDX Manager для расщепления пепсином/протеазой XIII с возможностью отслеживания в режиме реального времени. Расщепленные пептиды захватывали на предколонке ACQUITY UPLC VEN C18 1,7-мкм, 2,1 × 5 мм VanGuard (Waters Corporation) при 0°C и элюировали в аналитиче-

скую колонку ACQUITY UPLC BEH C18 1,7-мкм, 1,0×50 мм для 9-минного разделения в градиенте 5-40% В (подвижная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в воде, подвижная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле). На масс-спектрометре настраивали следующие параметры: напряжение на конусе 37 В, время сканирования 0,5 с и диапазон отношений масса/заряд 50-1700 томсон (Th).

Для идентификации остатков пептида LAG3 человека, с которыми взаимодействует H4sH15482P, данные LC-MS^E для недеитерированного образца обрабатывали и выполняли поиск по базе данных, которая включала последовательности LAG3 человека, пепсина и случайные последовательности, с применением программного обеспечения ProteinLynx Global Server (PLGS) от Waters. Идентифицированные пептиды импортировали в программу DynamX и фильтровали по двум критериям: 1) минимальное количество продуктов на аминокислоту = 0,2 и 2) граничное число повторений в файле = 3. Затем программа DynamX автоматически определяет поглощение дейтерия каждым из пептидов исходя из времени удержания и точного определения массы (<10 ppm) в нескольких моментах времени с 3 повторами для каждого момента времени.

Результаты.

С применением колонки с пепсином/протеазой XIII с возможностью отслеживания в режиме реального времени, в сочетании со сбором данных MS^E, в общей сложности были воспроизводимо идентифицированы 123 пептида из LAG3 человека в отсутствие или в присутствии антитела, характеризующиеся 78,3% перекрытием последовательностей. Четыре пептида Lag-3 характеризовались значительно сниженным поглощением дейтерия (дельта значений центроидов > 0,8 дальтон с р-значениями < 0,05) при связывании с H4sH15482P. Зарегистрированная масса пептида соответствует среднему значению центроидов массы MH⁺ из трех повторов. Эти пептиды, соответствующие аминокислотам 34-77 hLAG3.Fc, (SEQ ID NO: 587), характеризовались меньшими скоростями дейтерирования при связывании с H4sH15482P. Эти идентифицированные остатки также соответствуют остаткам 28-71 LAG3 человека, определенным в записи Uniprot P18627 (LAG3_HUMAN, SEQ ID NO: 588), и приведенным в табл.18.

Таблица 18. Пептиды LAG3 человека с измененными скоростями дейтерирования после связывания H4sH15482P

Аминокислотные остатки SEQ ID NO: 588	T=1 мин. дейтерирования			T=20 мин. дейтерирования		
	hLAG3.Fc; MH ⁺	hLAG3.Fc + H4sH15482P; MH ⁺	Δ	hLAG3.Fc; MH ⁺	hLAG3.Fc + H4sH15482P; MH ⁺	Δ
28 – 69	4352,30±0,03	4350,14±0,06	-2,15	4352,33±0,20	4351,43±0,12	-0,90
28 – 71	4672,54±0,03	4670,42±0,01	-2,12	4672,69±0,21	4671,57±0,18	-1,13
31 – 52	2198,11±0,10	2196,49±0,01	-1,61	2198,97±0,18	2197,18±0,10	-1,79
32 – 69	3853,07±0,12	3851,37±0,07	-1,69	3853,23±0,07	3852,35±0,14	-0,88

Пример 19. Клиническое испытание антитела к LAG3 с участием пациентов со злокачественными новообразованиями на поздней стадии.

В этом примере описано клиническое испытание с целью оценки безопасности, переносимости и противоопухолевой активности антитела к LAG3 в качестве монотерапевтического препарата и в комбинации с антителом к PD-1 у пациентов со злокачественными новообразованиями на поздней стадии.

Иллюстративное антитело к LAG3, применяемое для этого исследования, является полностью человеческим антителом, которое специфически связывается с LAG3 человека и содержит HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 SEQ ID NO: 420-422-424-428-430-432 и HCVR/LCVR SEQ ID NO: 418/426 (также известное как H4sH15482P, и как "mAb1" далее в настоящем документе).

Применяемое для этого исследования антитело к PD-1 представляет собой H4H7798N (раскрытое в US20150203579; также известное как REGN2810). REGN2810 (антитело к hPD-1) с высокой аффинностью связывается с PD-1 человека и блокирует взаимодействие PD-1 с PD-L1 и PD-L2.

Цели клинического исследования.

Первичные цели исследования являются следующими.

В фазе с повышением дозы: оценить безопасность и фармакокинетику (ПК) с целью определения для 2 фазы дозы mAb1 в качестве монотерапевтического препарата и в комбинации с REGN2810 у пациентов со злокачественными новообразованиями на поздней стадии, включая лимфому. Конечные точки включают частоту случаев дозолимитирующей токсичности (DLT), нежелательные явления (AE) (включая таковые, связанные с иммунитетом), серьезные нежелательные явления (SAE), случаи смерти и отклонения лабораторных показателей от нормы (3 степень или выше согласно общим терминологическим критериям нежелательных явлений [CTCAE]) и фармакокинетику.

В фазе повышения дозы до максимально переносимой: предварительно оценить противоопухолевую активность mAb1 отдельно и в комбинации с REGN2810 (по отдельности в отдельных когортах), которую измеряют по ORR. Конечные точки включают общую частоту ответа (ORR) на основе критериев оценки ответа солидных опухолей (RECIST) 1.1 (Eisenhauer et al 2009, Eur. J. Cancer 45: 228-247) (со-

лидные опухоли) и критериев по Lugano (Cheson et al 2014, J. Clin. Oncol. 32: 3059-3068) (лимфома).

Вторичные цели являются следующими: (a) предварительно оценить противоопухолевую активность mAb1 отдельно и в комбинации с REGN2810 (по отдельности в отдельных когортах), которую измеряют по ORR на основе критериев оценки ответа солидных опухолей при иммунотерапии (irRECIST) (Wolchok et al 2009, Clin. Cancer Res. 15: 7412-7420; Nishino et al 2013, Clin. Cancer Res. 19: 3936-3943), наилучшему общему ответу (BOR), длительности ответа (DOR), частоте контроля заболевания и PFS на основе критериев RECIST, irRECIST и Lugano (Cheson et al 2014, J. Clin. Oncol. 32: 3059-3068); (b) охарактеризовать профиль безопасности в каждой когорте с повышением дозы до максимально переносимой, что определяют в фазе с повышением дозы; (c) охарактеризовать PK mAb1 в качестве монотерапевтического препарата и mAb1 и REGN2810 при введении в комбинации; и (d) оценить иммуногенность, измеряемую с применением антител к лекарственному средству (ADA) для mAb1 и REGN2810.

Поисковые цели исследования являются следующими: (a) оценить объем опухоли; (b) изучить фармакодинамические эффекты REGN2810 в сыворотке крови, плазме крови, мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) и в образцах опухолевой ткани (включая архивный образец ткани), полученных в начале, во время лечения и в период прогрессирования от пациентов, которых лечили mAb1 в качестве монотерапевтического препарата или в комбинации с REGN2810; и (c) оценить предсказательный потенциал и корреляцию с клиническим ответом для представляющих интерес биомаркеров, которые могут включать без ограничения: (i) циркулирующие в крови нуклеиновые кислоты из опухолевых клеток; (ii) распределение субпопуляции PBMC и экспрессию молекул, являющихся частью иммунологической контрольной точки, и других представляющих интерес биомаркеров; (iii) экспрессию РНК из опухолевых клеток; (iv) число и распределение инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, регуляторных Т-клеток и проникающих в ткани других подтипов, таких как В-клетки, клетки миелоидного ряда, NK-клетки и т. д.); (v) уровни экспрессии (матричной РНК и/или белка) PD-1, PD-L1, LAG3 и возможных других модуляторов контрольных точек; (vi) мутации в известных онкогенах и потенциальных опухолевых неоантигенах; и (vii) мутационную нагрузку опухоли.

Дизайн исследования.

Исследование представляет собой относящееся к фазе 1, предусматривающее первое применение препарата у людей (FIH), открытое, многоцентровое, с повышением дозы, исследование безопасности, переносимости, активности и PK mAb1, вводимого в качестве монотерапевтического препарата и в комбинации с REGN2810 пациентам со злокачественными новообразованиями на поздней стадии. Исследовали три уровня дозы mAb1 (1,0, 3,0 и 10 мг/кг) в качестве монотерапевтического препарата и в комбинации с REGN2810 в дозе 3,0 мг/кг.

По окончании скринингового периода длительностью до 28 дней, пациенты проходили до семнадцати циклов 21-дневного лечения (в течение в общей сложности до 51 недели лечения) с последующим 24-недельным периодом наблюдения. Каждый пациент получал mAb1 (+/- REGN2810) в каждом 21-дневном цикле.

Лечение продолжалось до тех пор, пока не был завершен 51-недельный период лечения, или до момента наступления прогрессирования заболевания, неприемлемой токсичности, отзыва согласия или появления критерия исключения из исследования. Ответ оценивали каждые 6 недель в течение первых 24 недель, затем каждые 9 недель в течение следующих 27 недель, независимо от отсрочки введения доз исследуемых лекарственных средств. По истечении минимум 24 недель лечения (минимум 8 циклов лечения) пациенты с подтвержденной полной ремиссией (CR) могли принять решение прекратить лечение, но продолжить участие в отношении проведения всех соответствующих оценок в рамках исследования. Аналогичным образом, после консультации с лечащим врачом пациенты, которые получали лечение в течение минимум 24 недель, со стабилизацией заболевания (SD) или частичным ответом (PR), которые сохранялись на протяжении 3 последующих оценок опухоли, могли принять решение прекратить лечение, но продолжить участие в отношении проведения всех соответствующих оценок в рамках исследования. В случае пациентов, у которых наблюдали ответ и последующее прогрессирование, требовалось проведение биопсии опухоли в период прогрессирования. У пациентов, которые переносили 4 дозы монотерапевтического препарата mAb1, и у которых при первичной оценке опухоли наблюдали по меньшей мере SD, но у которых затем наблюдали прогрессирование заболевания (PD), допускалось добавление REGN2810 3,0 мг/кг к наиболее высокой дозе mAb1, безопасно вводимой до определенного момента (если известно) с целью "возобновления" ответа посредством комбинированного блокирования белка, кодируемого геном-3 активации лимфоцитов (LAG-3), и белка-1 запрограммированной гибели клеток (PD-1). Оценки безопасности проводили при каждом визите для введения исследуемого лекарственного средства.

Повышение дозы.

Было запланировано включение трех когорт, получающих монотерапевтический препарат и комбинированный терапевтический препарат с повышением дозы (1,0, 3,0 и 10 мг/кг mAb1 с или без 3 мг/кг REGN2810). Первая подлежащая включению когорты получала монотерапевтический препарат mAb1 в дозе 1,0 мг/кг. Последующее включение каждой дополнительной когорты может быть ограничено числом случаев дозолимитирующей токсичности (DLT), наблюдаемой в предыдущих когортах. При необходи-

мости были включены когорты с уменьшением дозы (0,3 мг/кг mAb1 с или без 3 мг/кг REGN2810).

Правила повышения дозы.

Для оценки всех уровней доз для обоих когорт, получающих монотерапевтический препарат mAb1 и mAb1 + REGN2810, применяют модификацию классического дизайна 3+3 ("4+3"). Хотя требуется, чтобы минимум для 3 пациентов на каждый уровень дозы проводили оценку в отношении DLT, с целью максимизации эффективности повышения дозы на 1 фазе, с сохранением при этом безопасности пациента, включают 4 пациента на каждый уровень дозы на случай, если пациент прекратит лечение до проведения оценки в отношении DLT. Продолжительность оценки DLT составляет 28 дней. Переносимость уровня дозы достигается только в том случае, когда все потенциально подлежащие оценке DLT пациенты завершают 28-дневный период оценки DLT без DLT (0/3 или 0/4). Если 3 пациента завершают период оценки DLT без перенесения DLT, но в период оценки DLT включен четвертый пациент, переносимость уровня дозы достигается только в том случае, когда четвертый пациент завершает период оценки DLT или прекращает лечение до проведения оценки в отношении DLT. Если имеется 1 случай DLT у 3 или 4 подлежащих DLT-оценке пациентов, тогда включают (соответственно) 4 или 3 дополнительных пациента для достижения общего количества в 7 пациентов. Аналогично, 1/6 или 1/7 случаев DLT считается приемлемым. Два случая DLT у 2-7 подлежащих DLT-оценке пациентов будут считаться превышением максимальной переносимой дозы (MTD). При наиболее высоком переносимом уровне, для дополнительной оценки безопасности будут включены дополнительные 3-4 пациента для достижения общего количества в 6-10 подлежащих DLT-оценке пациентов. 0-1 из 6-8 или 2 из 9-10 случаев DLT будут считаться приемлемыми. Для дополнительной оценки безопасности могут быть включены 3 дополнительных пациента для любого уровня дозы на усмотрение спонсора (при консультации с исследователями).

Если 1,0 мг/кг mAb1 (уровень дозы 1; DL1) считается безопасным (по результатам для 3-7 пациентов), включение начнут при 3,0 мг/кг mAb1 (DL2). После включения 4 пациентов в DL2, может быть начато включение в первую когорту, получающую комбинацию (1,0 мг/кг mAb1 + 3,0 мг/кг REGN2810; DL3). Повышение дозы до 10 мг/кг mAb1 (DL4) может быть начато, когда 3,0 мг/кг mAb1 (DL2) посчитают безопасным. Вторую когорту, получающую комбинацию (3,0 мг/кг mAb1 + 3,0 мг/кг REGN2810; DL5), набирают только после того, как оба DL2 и DL3 посчитают безопасными. Третью когорту, получающую комбинацию (10 мг/кг mAb1 + 3,0 мг/кг REGN2810; DL6), набирают только после того, как оба DL4 и DL5 посчитают безопасными. Если одновременно доступны для дальнейшего включения несколько когорт, предпочтение отдают когорте с меньшим числом (т. е. DL2 предпочтительнее DL3 или DL3 предпочтительнее DL4).

Дозолимитирующая токсичность.

Период наблюдения DLT для определения безопасности в отношении повышения дозы или начала новой комбинированной терапии определен как 28 дней, начиная с цикла 1, день 1, с целью контроля безопасности и переносимости первых 2 доз исследуемого (исследуемых) лекарственного (лекарственных) средства (средств) (mAb1 с или без REGN2810 в соответствующих случаях). Для оценки DLT пациент должен получить по меньшей мере первые 2 дозы исследуемого (исследуемых) лекарственного (лекарственных) средства (средств) (т. е. день 1 и день 22), и наблюдаться в течение по меньшей мере 28 дней после первого введения, и по меньшей мере 7 дней после второго введения, или перенести DLT (определено ниже) до завершения периода оценки DLT. Отсрочки введения второй дозы исследуемого (исследуемых) лекарственного (лекарственных) средства (средств) за пределы 35 дня и/или прекращение приема исследуемого лекарственного средства считаются DLT, если они связаны с исследуемым лекарственным средством. Продолжительность периода наблюдения DLT, таким образом, увеличивается для пациентов, у которых отсрочено введение второй дозы, и для пациентов, которые перенесли АЕ, для которых продолжительность должна быть оценена для определения того, было ли явление DLT.

Помимо невозможности введения (ввиду токсичности исследуемого лекарственного средства) дозы № 2 в пределах определенного интервала, DLT в целом определена как любая из следующих связанных с исследуемым лекарственным средством видов токсичности:

Токсичность помимо гематологической: увеит степени ≥ 2 .

Любая токсичность помимо гематологической степени ≥ 3 (за исключением не являющихся значимыми с медицинской точки зрения отклонений лабораторных показателей от нормы, таких как показатели амилазы или липазы без проявления симптомов).

Гематологическая токсичность:

нейтропения 4 степени длительностью >7 дней;

тромбоцитопения 4 степени;

тромбоцитопения 3 степени с кровотечением;

фебрильная нейтропения степени ≥ 3 или нейтропения степени ≥ 3 с подтвержденной инфекцией.

Как *igAE*, так и АЕ, не являющиеся *igAE*, которые соответствуют определению DLT, считаются DLT.

Максимальная переносимая доза.

MTD определяют как уровень дозы, непосредственно ниже уровня, при котором введение дозы

прекращают ввиду наличия 2 или более DLT из 6-7 подлежащих оценке пациентов, и будет определен отдельно для монотерапевтического препарата и комбинированного терапевтического препарата. Однако, ввиду известных случаев АЕ, обусловленных монотерапией REGN2810 и другими антителами к PD-1/PD-L1, для когорты, получающих комбинацию, степень проявления, частота и отсутствие известных данных токсичности комбинации могут быть учтены при определении MTD и принятии решения касательно добавления дополнительных пациентов на уровень дозы. Если повышение дозы не прекращается для DLT, считается, что MTD не определена. Будут включены дополнительные 3 пациента в каждую из когорты, получающих монотерапевтический препарат и комбинацию, которые предположительно переносят наиболее высокие уровни доз (т. е. 6-10 пациентов в каждой из этих когорты). Если повышение дозы для монотерапевтического препарата mAb1 или комбинированного терапевтического препарата с REGN2810 прекращают на уровне 1,0 мг/кг ввиду наличия DLT, включают когорту, получающую дозу 0,3 мг/кг. Если повышение дозы для монотерапевтического препарата mAb1 или комбинированного терапевтического препарата прекращают ввиду наличия DLT при уровне дозы 3,0 или 10 мг/кг, дозу mAb1 снижают до ранее тестируемого уровня дозы для новых включенных пациентов (в когортах, получающих монотерапевтический препарат или комбинированный терапевтический препарат соответственно). Ни один пациент не может начать принимать комбинированный терапевтический препарат с дозой mAb1, которая не переносима в качестве монотерапевтического препарата.

Рекомендуемая доза для 2 фазы.

RP2D для когорты с повышением дозы до максимально переносимой не будет превышать MTD или наиболее высокую тестируемую дозу, и может отличаться для когорты, получающих монотерапевтический препарат и комбинированный терапевтический препарат. Определение RP2D будет основываться на данных по безопасности и РК.

У пациентов в когортах, получающих монотерапевтический препарат, которые переносили 4 дозы mAb1, и у которых при первичной оценке опухоли наблюдали по меньшей мере SD, но у которых затем наблюдали PD, допускалось добавление REGN2810 3,0 мг/кг к наиболее высокой дозе mAb1, безопасно вводимой до определенного момента (если известно) с целью "возобновления" ответа посредством комбинированного блокирования LAG-3 и PD-1.

Когорты с повышением дозы до максимально переносимой.

После того, как переносимость mAb1 была установлена, отдельно и в комбинации с REGN2810, несколько когорты с повышением дозы до максимально переносимой, применяющие монотерапевтический препарат или комбинированный терапевтический препарат при выбранных показаниях [немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), светлоклеточный рак почки (ccRCC), трижды негативная злокачественная опухоль молочной железы (TNBC), меланома и диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL)], набирают для дополнительной оценки безопасности и получения предварительных данных о противоопухолевой активности при опухолях, при которых, как известно, экспрессируется или сверхэкспрессируется LAG3; противоопухолевая активность mAb1 может наблюдаться при введении отдельно или в комбинации с REGN2810. Включение в когорты с повышением дозы до максимально переносимой начинается после завершения повышения дозы. Дополнительные 10 когорты с повышением дозы до максимально переносимой (таблица 19), с использованием 2-ступенчатого дизайна Саймона (Simon 1989, Controlled Clinical Trials 10: 1-10), набирали после подтверждения RP2D. Пациента определяют в когорту, получающую конкретное лечение, на основании типа опухоли пациента, наличия или отсутствия предшествующей терапии антителами к PD-1/антителами к лиганду белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-L1), оценки исследователя касательно целесообразности курса лечения для такого пациента и наличия вакантных мест среди пациентов в назначенной когорте, получающей лечение. Если в ходе ступени 1 2-ступенчатого дизайна Саймона появляются опасения касательно безопасности в отдельной когорте с повышением дозы до максимально переносимой, включение может быть приостановлено. После обсуждения между исследователями и представителями компании Regeneron включение может быть возобновлено при той же или более низкой дозе mAb1. Опасения касательно безопасности, служащие поводом для приостановки, могут включать ранние или поздние события, связанные с безопасностью. Пациенты проходят лечение монотерапевтическим препаратом mAb1 (доза, определяемая по результатам повышения дозы) или комбинацией mAb1 и REGN2810 3 мг/кг Q3W в течение периода длительностью до 51 недели. Включение в стадию 2 для каждой когорты с повышением дозы до максимально переносимой имеет место только в том случае, если на стадии 1 наблюдается минимальное число ответов опухоли.

Таблица 19. Таблица когорт с повышением дозы до максимально переносимой

Когорта с повышением дозы до максимально переносимой	Тип опухоли	Не подвергавшаяся лечению антителами к PD-1/PD-L1	Подвергавшаяся лечению антителами к PD-1/PD-L1	Лечение
1	Немелкоклеточный рак легкого	X		Комбинация mAb1 и REGN2810
2	Немелкоклеточный рак легкого		X	Комбинация mAb1 и REGN2810
3	Светлоклеточный рак почки	X		Комбинация mAb1 и REGN2810
4	Светлоклеточный рак почки		X	Комбинация mAb1 и REGN2810
5	Трижды негативная злокачественная опухоль молочной железы	X		Комбинация mAb1 и REGN2810
6	Меланома	X		Комбинация mAb1 и REGN2810
7	Меланома		X	Комбинация mAb1 и REGN2810
8	Диффузная В-крупноклеточная лимфома	X		Монотерапевтический препарат mAb1
9	Диффузная В-крупноклеточная лимфома	X		Комбинация mAb1 и REGN2810
10	Диффузная В-крупноклеточная лимфома		X	Комбинация mAb1 и REGN2810

Исследуемая популяция.

В фазе с повышением дозы: пациенты со злокачественными новообразованиями на поздней стадии, которые не получали предшествующую терапию лекарственным средством в виде антител к LAG3 и/или ингибитором PD-1/PD-L1, и которые не являются кандидатами на стандартную терапию, или в случае которых предполагается, что доступная терапия не будет обеспечивать клиническую пользу, и пациенты со злокачественными новообразованиями, которые не поддаются лечению и для которых не наблюдали ответа или было показано прогрессирование опухоли независимо от наличия стандартной терапии.

В когортах с повышением дозы до максимально переносимой: пациенты с выбранными злокачественными новообразованиями, которые не получали предшествующую терапию лекарственным средством в виде антител к LAG3, и которые ранее не получали терапию с применением антител к PD-1/PD-L1, но являются потенциальными кандидатами на получение терапии на основе антител к PD-1 (когорты 1, 3, 5, 6 и 9), или ранее получали терапию на основе антител к PD-1/PD-L1, и у них был подтвержден объективный ответ (CR или PR) или SD в течение по меньшей мере 3 месяцев в процессе терапии с применением антител к PD-1/PD-L1, но затем имело место прогрессирование в процессе такой терапии, или в качестве наилучшего ответа наблюдали SD или PR с последующим устойчивым ответом в течение 6 месяцев (когорты 2, 4, 7 и 10), или не являются кандидатами на стандартную терапию, или в случае которого предполагается, что доступная терапия не будет обеспечивать клиническую пользу, и подходит для монотерапии mAb1 (когорта 8).

Критерии включения.

Чтобы подходить для включения в исследование, пациент должен соответствовать следующим критериям.

1. Мужчины и женщины в возрасте ≥ 18 лет.

2. Когорты с повышением дозы: пациенты с гистологически или цитологически подтвержденным диагнозом злокачественное новообразование (включая лимфому), с наблюдаемым прогрессированием опухоли, для которых не существует альтернативного стандартного способа лечения, или не существует альтернативного стандарта лечения с терапевтическим потенциалом (т.е. у которых не наблюдали ответа или у которых развивалось прогрессирование опухоли независимо от наличия стандартной терапии), и которые ранее не проходили лечение ингибитором PD-1/PD-L1. Для таких пациентов не требуется, чтобы заболевание представляло собой измеряемую в размере опухоль по критериям RECIST 1.1 или Lugano.

3. Когорты с повышением дозы до максимально переносимой: пациенты с гистологически или цитологически подтвержденным диагнозом 1 из следующих опухолей, представляющих собой измеряемые в размере опухоли по критериям RECIST 1.1 или Lugano, соответствующие следующим критериям:

- i) страдают от не подвергавшейся лечению антителами к PD-1/PD-L1 NSCLC стадии IIIВ или IV либо без предшествующей терапии метастатического заболевания, либо с прогрессированием/повторным появлением заболевания после осуществления схемы лечения с препаратом платины (когорта 1);
- ii) страдают от подвергавшейся лечению антителами к PD-1/PD-L1 NSCLC стадии IIIВ или IV не более чем с 2 предшествующими видами терапии метастатического заболевания (когорта 2);
- iii) страдают от не подвергавшейся лечению антителами к PD-1/PD-L1 ссRCC на поздней стадии или метастатической ссRCC со светлоклеточным компонентом, и которые получали 1-2 предшествующие схемы лечения антиангиогенным терапевтическим препаратом (когорта 3);
- iv) страдают от подвергавшейся* лечению антителами к PD-1/PD-L1 ссRCC на поздней стадии или метастатической ссRCC со светлоклеточным компонентом, и которые получали 1-2 предшествующие схемы лечения антиангиогенным терапевтическим препаратом (когорта 4);
- v) страдают от не подвергавшейся лечению антителами к PD-1/PD-L1 метастатической TNBC (негативной по рецепторам эстрогена, прогестерона и рецептору 2 эпидермального фактора роста человека), и которые получали 5 или меньше предшествующих линий терапии (когорта 5);
- vi) страдают от не подвергавшейся лечению антителами к PD-1/PD-L1 меланомы на поздней стадии или метастатической меланомы, и которые получали не более чем 2 предшествующие схемы лечения метастатического заболевания (когорта 6);
- vii) страдают от подвергавшейся* лечению антителами к PD-1/PD-L1 меланомы на поздней стадии или метастатической меланомы, и которые получали не более чем 2 предшествующие схемы лечения метастатического заболевания (когорта 7);
- viii) страдают от не подвергавшейся лечению антителами к PD-1/PD-L1 рецидивирующей/рефрактерной DLBCL, и у которых либо имело место прогрессирование после трансплантации аутологичных стволовых клеток, либо они не являются кандидатами на ее проведение (когорты 8 и 9)
- ix) страдают от подвергавшейся* лечению антителами к PD-1/PD-L1 рецидивирующей/ рефрактерной DLBCL, и у которых либо имело место прогрессирование после трансплантации аутологичных стволовых клеток, либо они не являются кандидатами на ее проведение (когорта 10).

Пимечание: * подвергавшийся лечению антителами к PD-1/PD-L1 определен как такой, который перенес или переносит на данный момент терапию антителами к PD-1/PD-L1 (т. е. не прекратил ввиду токсичности), и у которого в рамках контроля заболевания наблюдали одно из двух:

- a) CR/PR, подтвержденный после повторной диагностической визуализации, или SD в течение по меньшей мере 12 недель начиная от введения первой дозы, до прогрессирования заболевания. Прогрессирование заболевания должно было наблюдаться либо во время терапии антителами к PD-1/PD-L1, либо в пределах 12 недель от последней дозы;
- b) SD или PR в качестве наилучшего ответа с последующим устойчивым ответом (не более чем 70% ниже исходного уровня) в течение 6 месяцев во время терапии антителами к PD-1/PD-L1.

4. Функциональный статус 0 или 1 по шкале Восточной Объединенной Онкологической группы.

5. Ожидаемая продолжительность жизни по меньшей мере 3 месяца.

6. Адекватная функция органов и костного мозга в соответствии со следующим:

- (a) гемоглобин $\geq 9,0$ г/дл;
- (b) абсолютное число нейтрофилов $\geq 1,5 \times 10^9$ /л;
- (c) число тромбоцитов $\geq 75 \times 10^9$ /л;
- (d) креатинин сыворотки крови в $\leq 1,5 \times$ превышает верхнюю границу нормального диапазона (ULN) или установленная скорость клубочковой фильтрации > 50 мл/мин/1,73 м²;
- (e) общий билирубин в $\leq 1,5 \times$ превышает ULN;
- (f) аспартатаминотрансфераза и аланинаминотрансфераза (ALT) в $\leq 3 \times$ превышает ULN или в $\leq 5 \times$ превышает ULN, при наличии метастазов в печень; и/или
- (g) щелочная фосфатаза в $\leq 2,5 \times$ превышает ULN (или в $\leq 5,0 \times$ превышает ULN, при наличии метастазов в печень или кости).

7. Готовность и способность выполнять требования касательно визитов в клинику и процедур, связанных с исследованием.

8. Предоставляют подписанную форму информированного согласия.

Критерии исключения. Пациент, который соответствует любому из следующих критериев, будет исключен из исследования.

1. На данный момент получает лечение в рамках другого исследования, или принимал участие в исследовании экспериментального средства и получал лечение, или использовал экспериментальное изделие в течение 4 недель от применения первой дозы исследуемой терапии, или получал лечение с применением одобренной системной терапии в течение 3 недель от применения первой дозы исследуемой терапии, или получал любую предшествующую системную терапию в течение 5 периодов полувыведения

первой дозы исследуемой терапии (в зависимости от того, что длилось дольше). Только в случае когорт с повышением дозы до максимально переносимой 2, 4, 7, 10 (подвергавшихся лечению антителами к PD-1/PD-L1) не допускалось получение предшествующей терапии антителами к PD-1/PD-L1 в течение 3 недель от применения первой дозы исследуемой терапии, независимо от периода полувыведения или статуса лекарственного средства как одобренного.

2. Предшествующее лечение любым биологическим препаратом или низкомолекулярной молекулой, нацеленными на LAG-3.

3. Лучевая терапия в течение 2 недель до рандомизации и отсутствие восстановления до исходного уровня после любого АЕ, вызванного облучением.

4. Только когорты с повышением дозы до максимально переносимой: Другое злокачественное новообразование, прогрессирующее или требующее интенсивного лечения, за исключением злокачественной опухоли кожи, не относящейся к меланоме, которая подвергалась потенциально радикальной терапии или *in situ* карциномы шейки матки, или любая другая опухоль, которая подвергалась предположительно эффективному лечению посредством радикального локального контроля опухоли в течение по меньшей мере 2 лет до включения.

5. Не подвергавшиеся лечению или активные метастазы в центральную нервную систему. Пациенты с ранее подвергавшимися лечению метастазами в центральную нервную систему могут принимать участие при условии, что они являются стабильными (т. е. нет данных о прогрессировании после диагностической визуализации за период по меньшей мере 6 недель до применения первой дозы исследуемого лечения, и любые неврологические симптомы вернулись к исходному уровню), и нет данных о новых или распространяющихся метастазах в центральную нервную систему, и пациент не нуждается в применении каких-либо системных кортикостероидов для контроля метастазов в центральную нервную систему в течение 4 недель до применения первой дозы REGN2810.

6. Энцефалит, менингит или неконтролируемые лихорадки за год до информированного согласия.

7. Текущие или недавние (в течение 5 лет) данные о значимом аутоиммунном заболевании, требующем лечения системными иммунодепрессантами, что может предполагать риск развития *igAE*. Следующее не является параметрами исключения: витилиго, детская астма, которая была устранена, гипотиреоз, требующий только гормон-заместительной терапии, диабет 1 типа или псориаз, не требующий системного лечения.

8. Терапия кортикостероидами (>10 мг преднизона/день или эквивалентным препаратом) в течение 1 недели до применения первой дозы исследуемого лекарственного средства. Не подлежат исключению пациенты, для которых требуется короткий курс приема стероидов.

9. Известно из анамнеза, или имеются какие-либо еще данные об интерстициальном заболевании легких, или активной неинфекционной пневмонии (за последние 5 лет).

10. Неконтролируемая инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека, инфекция, вызванная вирусом гепатита В или гепатита С; или диагностированный иммунодефицит.

11. Активная инфекция, требующая системной терапии.

12. Получение живой вакцины в пределах 30 дней до запланированного начала исследуемого лечения.

13. Серьезная хирургическая процедура, операционная биопсия или значительное травматическое повреждение в пределах 4 недель до скрининга.

14. Инфаркт миокарда в пределах 9 месяцев до применения первой дозы исследуемой терапии.

15. Предшествующая аллогенная трансплантация стволовых клеток.

16. Любое медицинское состояние, которое, по мнению исследователя, будет способствовать тому, что участие в исследовании не будет максимально соответствовать интересам пациента.

17. Задokumentированная аллергическая реакция или острая реакция гиперчувствительности, приписываемая лекарственным препаратам на основе антител.

18. Известная аллергия на доксициклин или другие антибиотики тетрациклинового ряда.

19. Известные психические расстройства или расстройства, вызванные злоупотреблением наркотических веществ, которые будут препятствовать участию с требованиями в рамках исследования.

20. Ведущие активную половую жизнь мужчины или женщины репродуктивного возраста, не желающие применять средства контрацепции в ходе исследования. Женщины, которые являются беременными, кормят грудью или ожидают беременность, или мужчины, планирующие зачать ребенка, в пределах предполагаемой продолжительности исследования (скрининговый визит через 180 дней после применения последней дозы исследуемого лекарственного средства).

21. Ведущие активную половую жизнь мужчины или женщины репродуктивного возраста, не желающие применять соответствующие требованиям средства контрацепции перед началом первого лечения, в ходе исследования и в течение по меньшей мере 6 месяцев после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства.

Исследуемые варианты лечения.

Моноterapia: mAb1 вводят в амбулаторных условиях путем внутривенной (IV) инфузии в течение 30 мин каждые 21 день в течение периода длительностью до 51 недели в следующих дозах монотерапев-

тического препарата:

DL1: IV инфузия 1,0 мг/кг mAb1 в течение 30 мин каждые 21 день в течение 51 недели.

DL2: IV инфузия 3,0 мг/кг mAb1 в течение 30 мин каждые 21 день в течение 51 недели.

DL4: IV инфузия 10 мг/кг mAb1 в течение 30 мин каждые 21 день в течение 51 недели.

DL-1m: IV инфузия 0,3 мг/кг mAb1 в течение 30 мин каждые 21 день в течение 51 недели (при необходимости).

Комбинированная терапия.

В случае комбинированной терапии последовательность введения исследуемого лекарственного средства включает сперва введение mAb1, а затем REGN2810 в тот же день. Исследуемые лекарственные средства вводят в амбулаторных условиях путем IV-инфузии в течение 30 мин каждый каждые 21 день в течение периода длительностью до 51 недели. Планируемые схемы с комбинацией, которые должны быть назначены, включают:

DL3: IV-инфузия 1,0 мг/кг mAb1 и 3,0 мг/кг REGN2810 в течение 30 мин каждые 21 день в течение 51 недели;

DL5: IV-инфузия 3,0 мг/кг mAb1 и 3,0 мг/кг REGN2810 в течение 30 мин каждые 21 день в течение 51 недели;

DL6: IV-инфузия 10 мг/кг mAb1 и 3,0 мг/кг REGN2810 в течение 30 мин каждые 21 день в течение 51 недели;

DL-1c: IV-инфузия 0,3 мг/кг mAb1 и 3,0 мг/кг REGN2810 в течение 30 мин каждые 21 день в течение 51 недели (при необходимости).

Конечные точки исследования.

Первичные конечные точки.

В фазе с повышением дозы: частота случаев DLT, нежелательные явления (АЕ; включая таковые, связанные с иммунитетом), серьезные нежелательные явления (SAE), случаи смерти и отклонения лабораторных показателей от нормы (3 степень или выше согласно общим терминологическим критериям нежелательных явлений [CTCAE]) и PK. В фазе повышения дозы до максимально переносимой: доля пациентов с объективным ответом (ORR) на основе критериев RECIST 1.1 (солидные опухоли) и Lugano (лимфома).

Вторичные конечные точки.

ORR на основе критериев оценки ответа солидных опухолей при иммунотерапии (irRECIST); наилучший общий ответ (BOR), длительность ответа (DOR), частота контроля заболевания и выживаемость без прогрессирования (PFS) на основе критериев RECIST, irRECIST и Lugano; АЕ, включая таковые, связанные с иммунитетом, SAE, случаи смерти и отклонения лабораторных показателей от нормы (3 степень или выше согласно CTCAE); PK и ADA.

Процедуры и оценки.

Безопасность и переносимость mAb1 отдельно или в комбинации с REGN2810 контролировали с применением клинической оценки АЕ и повторяющихся измерений в рамках клинического обследования, включая основные физиологические показатели (температура, кровяное давление, частота сердечных сокращений и частота дыхательных движений), физикальные обследования (полное и ограниченное), электрокардиограмма в 12 отведениях (ECG) и лабораторное исследование, включая стандартный общий анализ крови, биохимию и анализ мочи.

Собирали образцы крови для определения функционального mAb1 и функционального REGN2810 в сыворотке крови и ADA (антитела к mAb1 или антитела к REGN2810). Образцы сыворотки крови и плазмы крови собирали для анализа дополнительных биомаркеров. Рассматриваемые фармакодинамические, предсказывающие и прогностические биомаркеры, связанные с воздействием лечения mAb1 и REGN2810, клинической активностью или сопутствующим заболеванием, исследовали в сыворотке крови, плазме крови, мононуклеарных клетках периферической крови (PBMС) и опухолевой ткани. Противоопухолевую активность оценивали с помощью СТ и MRI. У пациентов, которые согласились на необязательное участие в подисследовании фармакогеномики собирали образец геномной ДНК.

Результаты.

Ожидается, что введение mAb1 в рамках исследования является безопасным и хорошо переносится пациентами со злокачественными новообразованиями на поздней стадии. Ожидается, что комбинация с 3 мг/кг REGN2810 обеспечивает регрессию опухоли, оцениваемую по ORR у пациентов с солидными опухолями, такими как немелкоклеточный рак легкого, меланома, светлоклеточный рак почки, В-клеточная лимфома или злокачественная опухоль молочной железы.

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Фактически, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к тем, которые описаны в настоящем документе, будут очевидны для специалистов в данной области из предшествующего описания и прилагаемых чертежей. Предполагается, что такие модификации охвачены объемом прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком, кодируемым геном-3 активации лимфоцитов (LAG3) человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат определяющую комплементарную область тяжелой цепи 1 (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 420, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 422 и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 424, CDR 1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 428, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 430 и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 432.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее варируемую область тяжелой цепи (HCVR) и/или варируемую область легкой цепи (LCVR), где HCVR содержит:

(i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 418,

(ii) аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 418,

(iii) аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 418; или

(iv) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 418 не более чем с 5 аминокислотными заменами;

и LCVR содержит:

(i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 426,

(ii) аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 426,

(iii) аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 426; или

(iv) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 426 не более чем с 5 аминокислотными заменами.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком LAG3 человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 418 и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 426.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают одним или несколькими свойствами, выбранными из группы, состоящей из:

(a) связывают мономерный LAG3 человека с константой диссоциации (K_D) для равновесного связывания менее чем приблизительно 1,5 нМ, как измерено в анализе на основе явления поверхностного плазмонного резонанса при 25°C;

(b) связывают мономерный LAG3 человека с K_D менее чем приблизительно 2 нМ, как измерено в анализе на основе явления поверхностного плазмонного резонанса при 37°C;

(c) связывают димерный LAG3 человека с K_D менее чем приблизительно 20 пМ, как измерено в анализе на основе явления поверхностного плазмонного резонанса при 25°C;

(d) связывают димерный LAG3 человека с K_D менее чем приблизительно 90 пМ, как измерено в анализе на основе явления поверхностного плазмонного резонанса при 37°C;

(e) связываются с экспрессирующей hLAG3 клеткой с EC_{50} менее чем приблизительно 2 нМ, как измерено в анализе с использованием проточной цитометрии;

(f) связываются с экспрессирующей mfLAG3 клеткой с EC_{50} менее чем приблизительно 2,3 нМ, как измерено в анализе с использованием проточной цитометрии;

(g) блокируют связывание hLAG3 с МНС класса II человека с IC_{50} менее чем приблизительно 20 нМ, как определено с помощью анализа клеточной адгезии;

(h) блокируют связывание hLAG3 с МНС класса II мыши с IC_{50} менее чем приблизительно 15 нМ, как определено с помощью анализа клеточной адгезии;

(i) блокируют связывание hLAG3 с МНС класса II более чем на 90%, как определено с помощью анализа клеточной адгезии;

(j) обеспечивают освобождение от опосредованного LAG3 ингибирования активности Т-клеток с EC_{50} менее чем приблизительно 2,5 нМ, как определено в анализе по репортерному гену люциферазы; и

(k) связываются с активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками с EC_{50} менее чем приблизительно 1,2 нМ, как определено во флуоресцентном анализе.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 418 не более чем с 5 аминокислотными заменами.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1 или 2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат LCVR, содержащую аминокислотную последовательность

тельность SEQ ID NO: 426 не более чем с 5 аминокислотными заменами.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1 или 2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 418 не более чем с 5 аминокислотными заменами, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 426 не более чем с 5 аминокислотными заменами.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1 или 2, содержащие HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 418.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1 или 2, содержащие LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 426.

10. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по пп.1 или 2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 418/426.

11. Выделенное антитело по п.10, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 577.

12. Выделенное антитело по п.10, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 578.

13. Выделенное антитело, которое специфически связывается с белком LAG3, где антитело содержит пару аминокислотных последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи SEQ ID NO: 577/578.

14. Фармацевтическая композиция для ингибирования роста опухоли у субъекта, где опухоль или опухолевая клетка содержат клетки, экспрессирующие LAG3, композиция содержит выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

15. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела, приведенную по любому из пп.1-10.

16. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR антитела, приведенную по любому из пп.1-10.

17. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь антитела по п.11.

18. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь антитела по п.12.

19. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидные молекулы по пп.15 и 16 или 17 и 18.

20. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.19 для продукции антитела.

21. Способ ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-13, где опухоль имеется у субъекта с заболеванием или нарушением, выбранным из группы, состоящей из злокачественного новообразования кроветворной ткани, рака головного мозга, почечно-клеточного рака, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака кости, рака толстой кишки, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака толстой и прямой кишки, мезотелиомы, В-клеточной лимфомы и меланомы.

22. Способ по п.21, в котором опухоль представляет собой первичную или рецидивную опухоль.

23. Способ по п.21, в котором опухоль представляет собой развившуюся опухоль.

24. Способ по любому из пп.21-23, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в виде начальной дозы, затем в виде одной или нескольких доз второй очереди, в котором каждую дозу второй очереди вводят через 1-4 недели после ближайшей предшествующей дозы.

25. Способ по п.24, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе приблизительно 1, 3 или 10 мг/кг веса тела субъекта.

26. Способ по любому из пп.21-25, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим средством, выбранным из группы, состоящей из ингибитора PD-1, ингибитора CTLA, антитела к опухолеспецифическому антигену, антитела к антигену инфицированной вирусом клетки, ингибитора PD-L1, ингибитора CD20, биспецифического антитела к CD20 и CD3, диетической добавки, такой как антиоксидант, антагониста VEGF, химиотерапевтического средства, цитотоксического средства, облучения, NSAID, кортикостероида и любого другого вида терапии, пригодной для ослабления по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с заболеванием или нарушением.

27. Способ по п.26, в котором второе терапевтическое средство представляет собой ингибитор PD-1, выбранный из группы, состоящей из REGN2810, ниволумаба и пембролизумаба.

28. Способ по п.26, в котором ингибитор PD-1 вводят в дозе 1, 3 или 10 мг/кг веса тела субъекта.

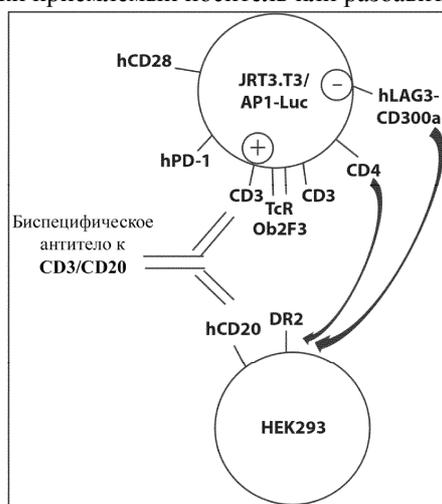
29. Способ по любому из пп.21-28, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят подкожно, внутривенно, внутрикочно, внутривнутрино, перорально, внутримышечно или интракраниально.

30. Способ лечения заболевания или нарушения, которое поддается лечению посредством антаго-

нистического воздействия на LAG3, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-13, в котором заболевание или нарушение (а) выбрано из группы, состоящей из злокачественного новообразования кроветворной ткани, рака головного мозга, почечно-клеточного рака, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака кости, рака толстой кишки, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака толстой и прямой кишки, мезотелиомы, В-клеточной лимфомы и меланомы или (б) представляет собой хроническую вирусную инфекцию, вызванную вирусом, выбранным из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса гепатита С (HCV), вируса гепатита В (HBV), вируса папилломы человека (HPV), вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) и вируса иммунодефицита обезьян (SIV).

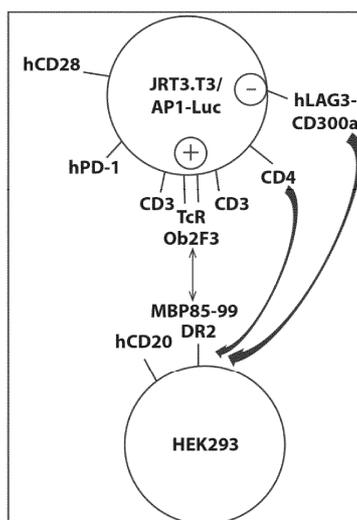
31. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком LAG3 человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи SEQ ID NO: 577/578.

32. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат пару аминокислотных последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи SEQ ID NO: 577/578 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.



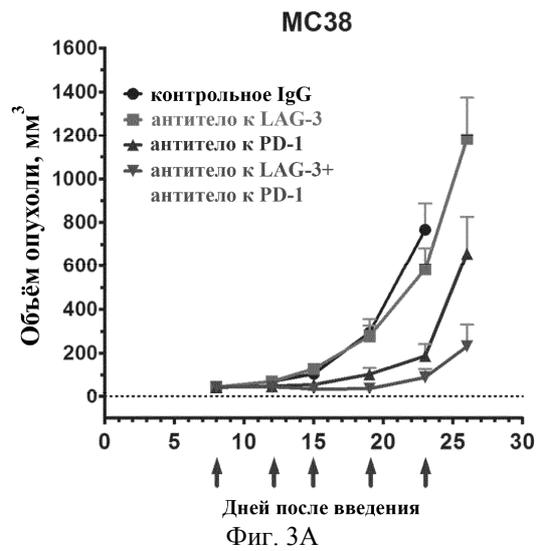
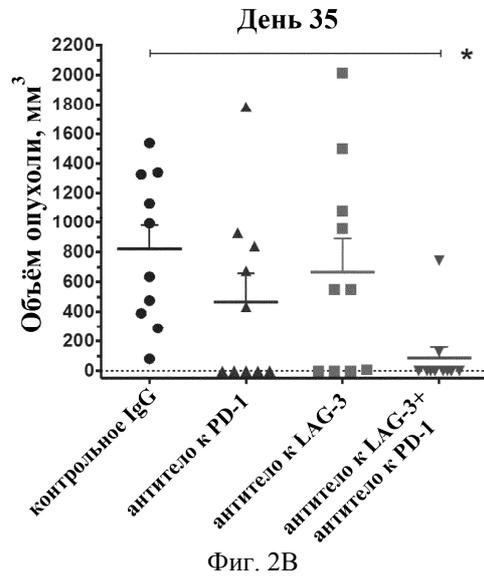
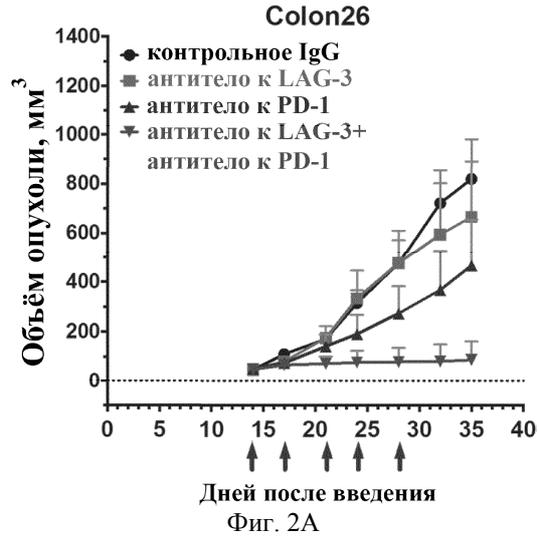
Способ «с применением биспецифического антитела»

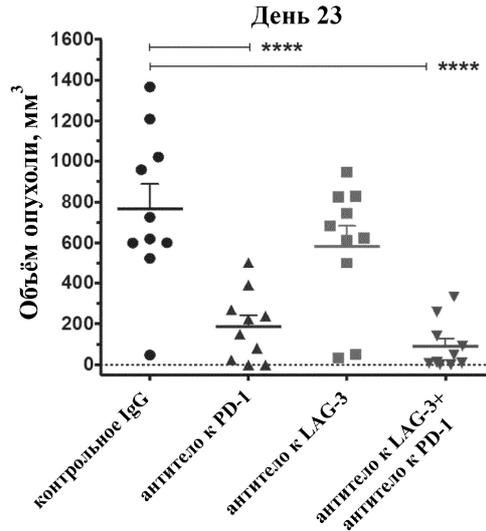
Фиг. 1А



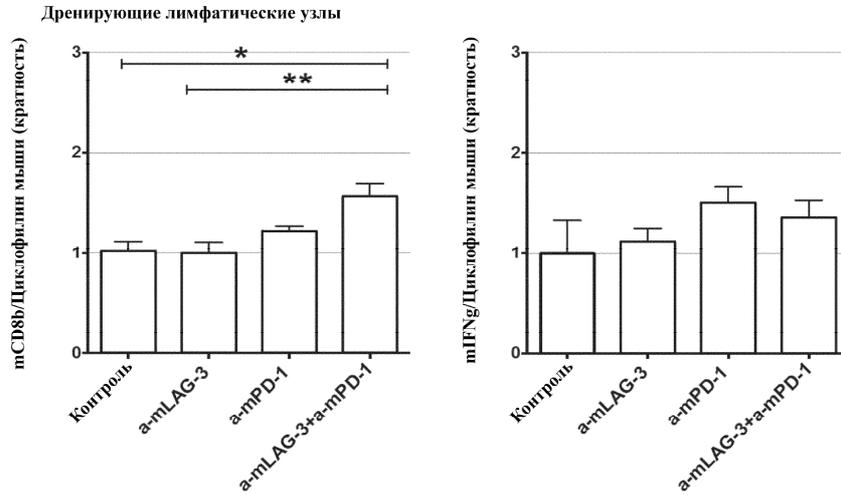
Способ «с примированием пептидом»

Фиг. 1В

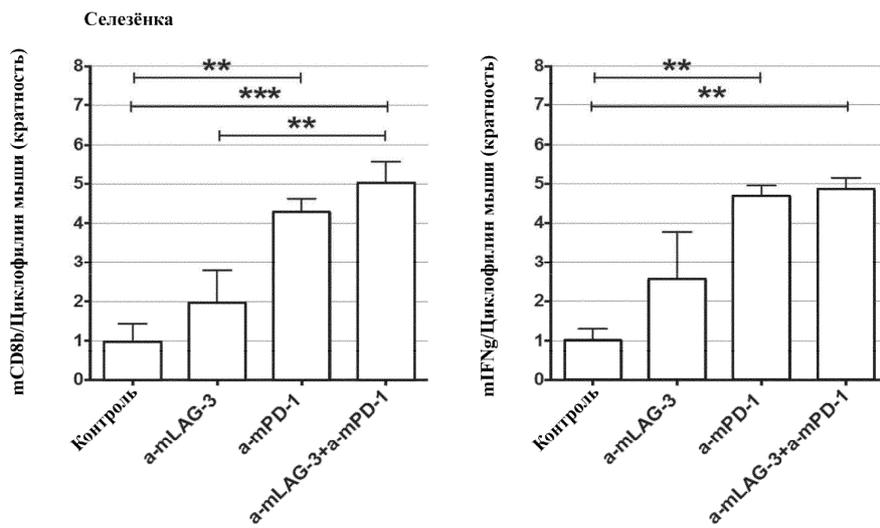




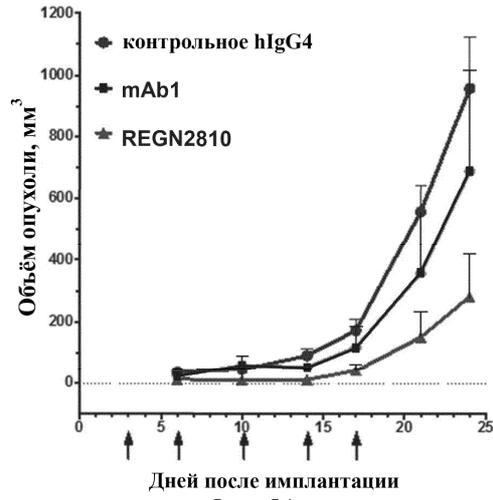
Фиг. 3В



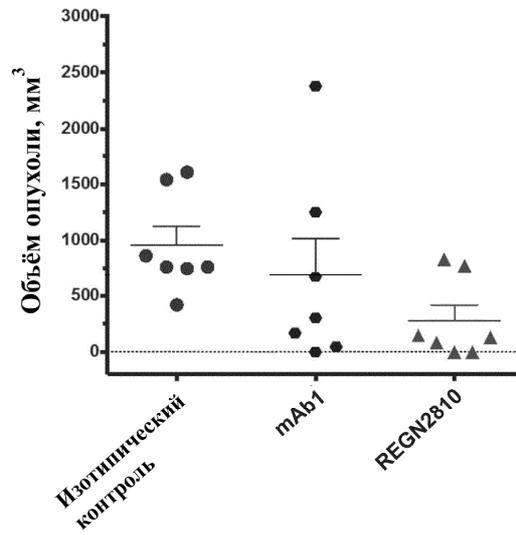
Фиг. 4А



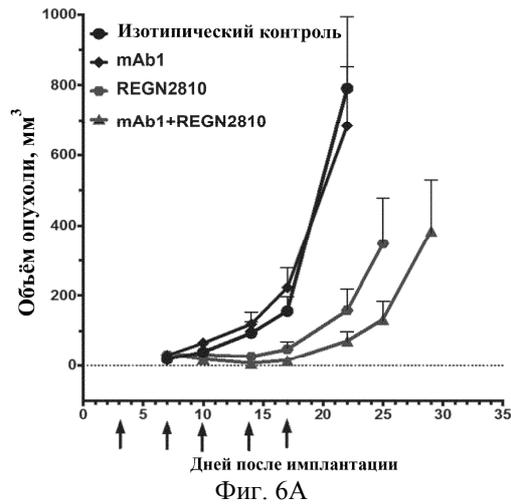
Фиг. 4В



Фиг. 5А

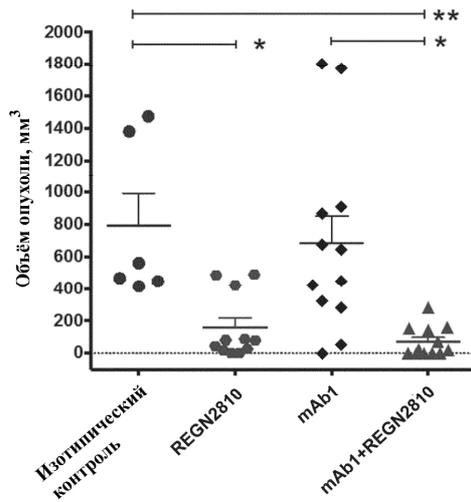


Фиг. 5В

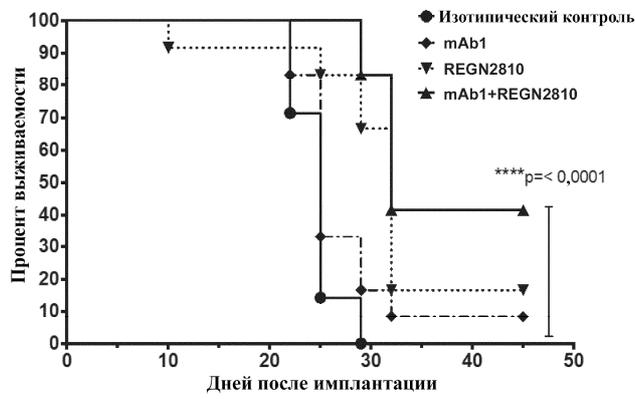


Фиг. 6А

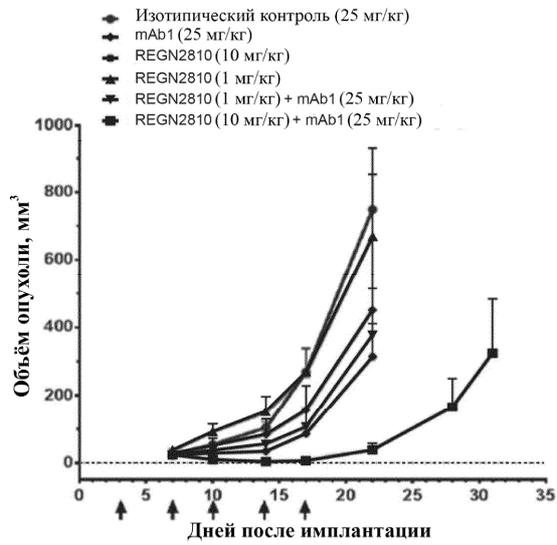
День 22



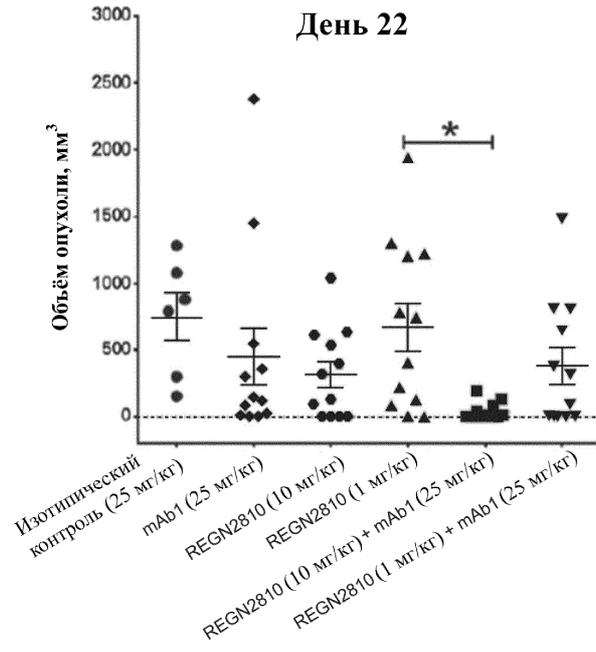
Фиг. 6B



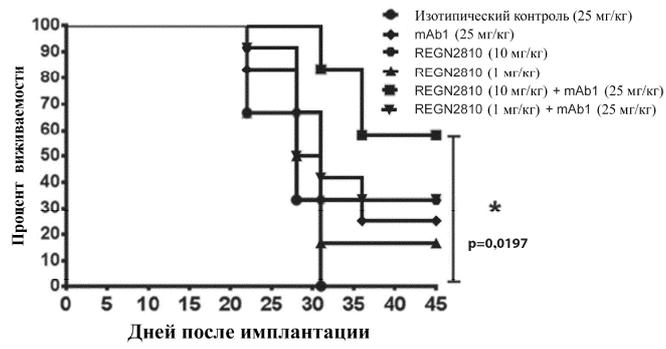
Фиг. 6C



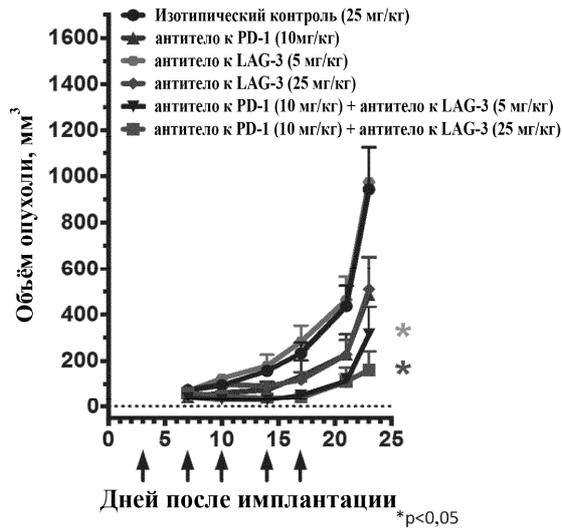
Фиг. 7A



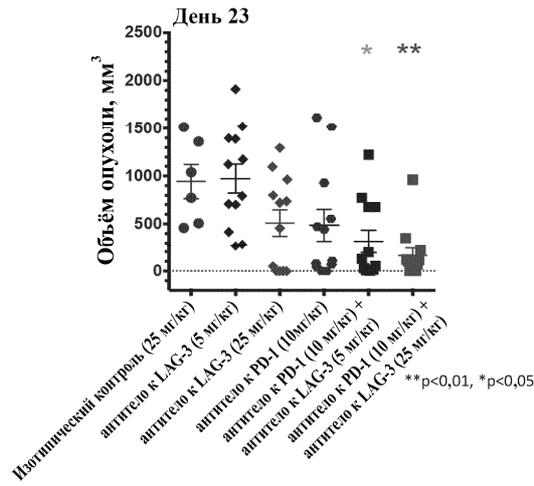
Фиг. 7В



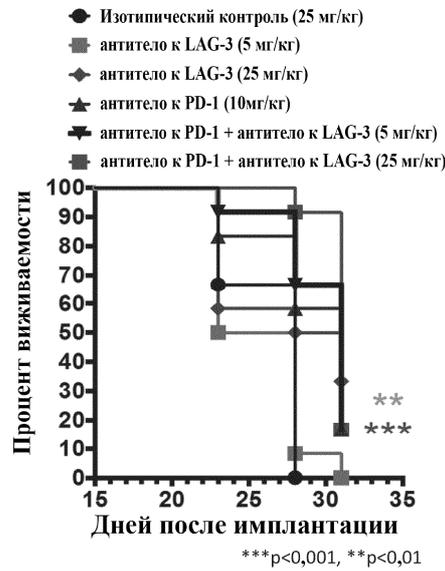
Фиг. 7С



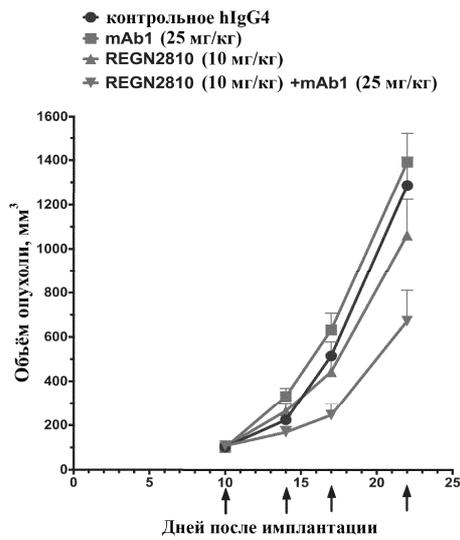
Фиг. 8А



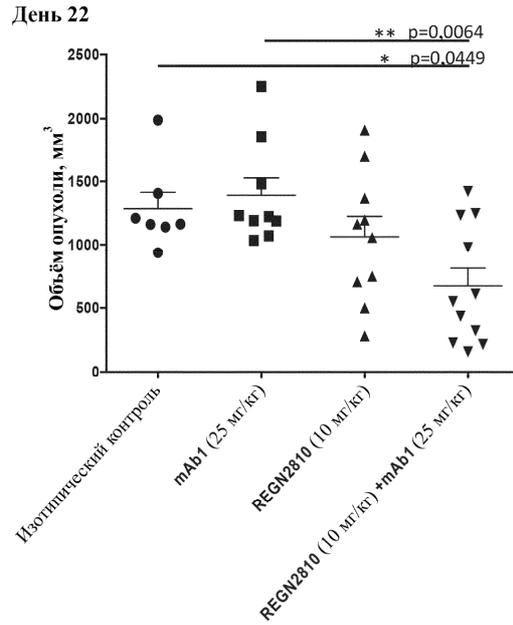
Фиг. 8В



Фиг. 8С

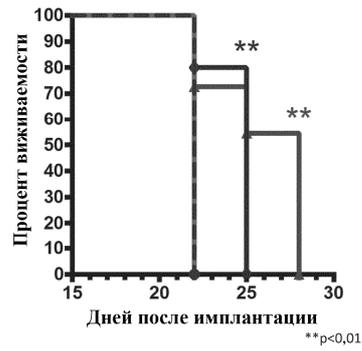


Фиг. 9

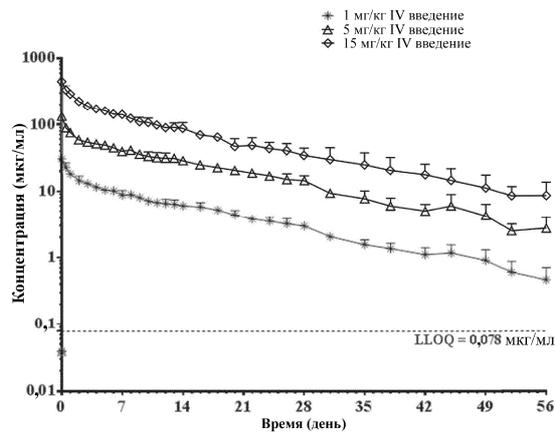


Фиг. 10

- ◆ контрольное IgG (25 мг/кг)
- ▲ антитело к LAG-3 (25 мг/кг)
- антитело к PD-1 (10 мг/кг)
- ◆ антитело к PD-1 + антитело к LAG-3



Фиг. 11



Фиг. 12