

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040513**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.14

(21) Номер заявки
201791742

(22) Дата подачи заявки
2016.02.03

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННЫЕ ПРОТИВ ГЕНА-3 АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ (LAG-3)**

(31) **62/111,486**

(32) **2015.02.03**

(33) **US**

(43) **2018.01.31**

(86) **PCT/US2016/016424**

(87) **WO 2016/126858 2016.08.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АНАПТИСБАЙО, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Дзун Хелен Тони, Кери Мэрилин,
Бауэрз Питер, Кинг Дэвид Дж. (US)**

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

(56) **US-A1-20130224188**
WO-A1-2014089493

(57) Настоящее изобретение относится к изолированному полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина и изолированному полипептиду легкой цепи иммуноглобулина, которые связываются с белком, кодированным геном-3 активации лимфоцитов (LAG-3). Настоящее изобретение относится к LAG-3-связывающему агенту, который содержит указанные выше полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина и полипептид легкой цепи иммуноглобулина. Настоящее изобретение также относится к векторам, композициям и способам использования LAG-3-связывающего агента для лечения расстройства или заболевания, чувствительного к ингибированию LAG-3, такого как рак или инфекционное заболевание.

B1**040513****040513****B1**

Включение в виде ссылки материалов, представленных в электронном виде

В настоящее описание включен в виде ссылки во всей полноте список нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, представленный на машиночитаемом носителе и одновременно представленный в настоящем описании, который оформлен в виде ASCII (текстового) файла размером 182600 байт, названного "723163_ST25.TXT", созданного 2 февраля 2016 года.

Уровень техники

Ген-3 активации лимфоцитов (LAG-3), который также известен как CD223, является членом супергенного семейства иммуноглобулинов и относится к CD4 как по структуре, так и генетическим характеристикам. LAG-3 экспрессируется на Т-клетках, В-клетках, естественных киллерах (NK) и плазматических дендритных клетках (pDC). Было показано, что LAG-3, подобно CD4, взаимодействует с молекулами МНС класса II (Baixeras et al., *J. Exp. Med.*, 176:327-337 (1992)), но связывается с другим участком (Huard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 (11): 5744-5749 (1997)). В частности, например, иммуноглобулин-LAG-3 (sLAG-3Ig) слитый белок посредством LAG-3 специфически связывается на клеточной поверхности непосредственно с МНС класса II (Huard et al., *Eur. J. Immunol.*, 26: 1180-1186 (1996)).

После активации Т-клеток наблюдается усиление активности LAG-3, которые модулируют функцию Т-клеток, а также их гомеостаз (Sierro et al., *Expert Opin. Ther. Targets*, 15 (1):91-101 (2011)). Взаимодействие LAG-3 с молекулами МНС класса II может играть важную роль в снижении антигензависимой стимуляции CD4+ Т-лимфоцитов, как показано в *in vitro* исследованиях антигенспецифических Т-клеточных ответов, в которых добавление анти-LAG-3 антител приводило к усиленной пролиферации Т-клеток, более высокому уровню экспрессии активационных антигенов, таких как CD25, и более высоким концентрациям цитокинов, таких как интерферон-гамма и интерлейкин-4 (Huard et al., *Eur. J. Immunol.*, 24: 3216-3221 (1994)). Показано, что CD4+CD25+ регуляторные Т-клетки (Treg) экспрессируют LAG-3 при активации, а антитела к LAG-3 ингибируют подавление за счет индуцированных Treg клеток как *in vitro*, так и *in vivo*, из чего можно сделать предположение, что LAG-3 способствует подавлению активности Treg клеток (Huang et al. *Immunity*, 21: 503-513 (2004)). Также было показано, что LAG-3 оказывает регуляцию на гомеостаз Т-клеток по принципу отрицательной обратной связи через регуляторные Т-клетки как в Т-клеточно-зависимых, так и в независимых от Т-клеток механизмах (Workman, CJ and Vignali, DA, *J. Immunol.*, 174:688-695 (2005)).

Субпопуляции обычных Т-клеток, которые являются анергическими или имеют проявленные нарушенные функции, экспрессируют LAG-3 и LAG-3+ Т-клетки, которые можно наблюдать в избыточном количестве на опухолевых участках и во время хронических вирусных инфекций. Однако, хотя в отношении мышей с нокаутированным LAG-3 было показано усиление обычного вирус-специфического CD4+ и CD8+ Т-клеточного ответа, что указывает на незначительную роль LAG-3, блокада PD-1/PD-L1 сигнального пути в сочетании с блокадой LAG-3 улучшала вирусный контроль по сравнению с блокадой только PD-L1 (Blackburn et al., *Nat. Immunol.*, 10:29-37 (2009)) и Richter et al., *Int. Immunol.*, 22: 13-2 (2010)).

В аутоотолерантной/опухолевой мышинной модели, в которой трансгенные CD8+ Т-клетки становились невосприимчивыми/анергическими *in vivo*, блокада LAG-3 или дефицит CD8+ Т-клеток усиливали пролиферацию и рекрутирование Т-клеток и эффекторные функции на опухолевых участках (Grosso et al., *J. Clin. Invest.*, 117:3383-92 (2007)).

Подавление активности LAG-3, например с помощью моноклональных антител, в настоящее время изучается в доклинических исследованиях в качестве одного из терапевтических подходов к лечению вирусных инфекций и меланомы. Например, добавление растворимого huLAG-3, слитого с Fc-фрагментом, усиливало пролиферацию антиген-специфических Т-клеток по отношению к вирусным и опухолевым антигенам, таким как матриксный белок вируса гриппа или антиген меланомы, распознаваемым Т-клетками (MART-1), в PBMC у здоровых людей или больных раком пациентов (Casati et al., *J. Immunol.*, 180:3782-3788 (2008)).

Существует потребность в дополнительных антагонистах LAG-3 (например, антителах), которые имеют высокое сродство связывания с LAG-3 и при связывании эффективно нейтрализуют его активность. Настоящее изобретение предоставляет такие LAG-3-связывающие агенты.

Сущность изобретения

Изобретение относится к изолированному полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит аминокислотную последовательность

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
 Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe
 Xaa1 Ile Xaa2 Asp Asp Tyr Ile His Trp Val Xaa3 Gln Ala Pro Gly
 Lys Gly Leu Glu Trp Xaa4 Gly Trp Ile Asp Xaa5 Xaa6 Asn Xaa7 Asp
 Ser Xaa8 Tyr Xaa9 Ser Lys Phe Xaa10 Gly Arg Val Thr Ile Thr Val
 Asp Thr Ser Thr Xaa11 Thr Ala Tyr Met Xaa12 Leu Ser Ser Leu Arg
 Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Tyr Ala Phe Gly Gly Tyr
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO: 181),

в которой (a) Xaa1 представляет собой аспарагин (Asn) или серин (Ser), (b) Xaa2 представляет собой лизин (Lys), тирозин (Tyr) или аспарагин (Asn), (c) Xaa3 представляет собой лизин (Lys) или глутамин (Gln), (d) Xaa4 представляет собой изолейцин (Ile) или метионин (Met), (e) Xaa5 представляет собой аланин (Ala) или пролин (Pro), (f) Xaa6 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu) или метионин (Met), (g) Xaa6 представляет собой глицин (Gly), аспарагин (Asn) или аспарагиновую кислоту (Asp), (h) Xaa8 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu) или глутамин (Q), (i) Xaa9 представляет собой аланин (Ala) или серин (Ser), (j) Xaa10 представляет собой глутамин (Gln) или аргинин (Arg), (k) Xaa11 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp) или аспарагин (Asn) и (l) Xaa12 представляет собой глутамин (Gln) или лизин (Lys).

Изобретение относится к изолированному полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит аминокислотную последовательность

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Xaa1 Leu
 Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Xaa2 Cys Xaa3 Val Tyr Gly
 Gly Xaa4 Phe Xaa5 Gly Tyr Tyr Trp Xaa6 Trp Ile Arg Gln Pro Pro
 Xaa7 Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Xaa8
 Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
 Thr Ser Lys Asn Gln Xaa9 Ser Leu Lys Leu Xaa10 Xaa11 Val Thr Ala
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa12 Arg Glu Gly Xaa13 Tyr Gly
 Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (SEQ
 ID NO: 35),

в которой (a) Xaa1 представляет собой аргинин (Arg) или глицин (Gly), (b) Xaa2 представляет собой треонин (Thr) или изолейцин (Ile), (c) Xaa3 представляет собой треонин (Thr) или аланин (Ala), (d) Xaa4 представляет собой серин (Ser) или фенилаланин (Phe), (e) Xaa5 представляет собой серин (Ser) или фенилаланин (Phe), (f) Xaa6 представляет собой серин (Ser) или изолейцин (Ile), (g) Xaa7 представляет собой глицин (Gly) или аргинин (Arg), (h) Xaa8 представляет собой серин (Ser) или аспарагин (Asn), (i) Xaa9 представляет собой фенилаланин (Phe) или лейцин (Leu), (j) Xaa10 представляет собой аспарагин (Asn) или серин (Ser), (k) Xaa11 представляет собой серин (Ser) или фенилаланин (Phe), (l) Xaa12 представляет собой аланин (Ala) или валин (Val), и (m) Xaa13 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp) или аспарагин (Asn).

Изобретение дополнительно относится к изолированному полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий SEQ ID NO: 190 или 191.

Изобретение относится к изолированному полипептиду легкой цепи иммуноглобулина, который содержит аминокислотную последовательность

Asp Xaa1 Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
 Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Xaa2 Ser Gln
 Ser Leu Val His Ser Asp Xaa3 Xaa4 Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu
 Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Ser Asn
 Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
 Tyr Phe Cys Xaa Gln Ser Thr Xaa Val Pro Tyr Ala Phe Gly Gly Gly
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr (SEQ ID NO: 57),

в которой (a) Xaa1 представляет собой валин (Val) или изолейцин (Ile), (b) Xaa2 представляет собой цистеин (Cys) или серин (Ser), (c) Xaa3 представляет собой глицин (Gly) или серин (Ser), (d) Xaa4 представляет собой аспарагин (Asn) или аспарагиновую кислоту (Asp), (e) Xaa5 представляет собой лизин (Lys), глицин (Gly), аспарагин (Asn), серин (Ser) или лейцин (Leu), (f) Xaa6 представляет собой валин

(Val) или изолейцин (Ile), (g) Xaa7 представляет собой серин (Ser), аланин (Ala) или глицин (Gly), и (h) Xaa8 представляет собой гистидин (His) или тирозин (Tyr).

Изобретение относится к изолированному полипептиду легкой цепи иммуноглобулина, который содержит аминокислотную последовательность

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln
Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
Pro Lys Leu Leu Ile Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Leu Glu Thr Gly Val
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
Ser Tyr Ser Xaa6 Leu Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val (SEQ ID NO: 89),
```

в которой (a) подпоследовательность Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 удалена или представляет собой Tyr-Asp-Ala-Ser-Asn, и (b) Xaa6 представляет собой треонин (Thr) или изолейцин (Ile).

Изобретение дополнительно относится к изолированному полипептиду легкой цепи иммуноглобулина, содержащий SEQ ID NO: 196 или 197.

Кроме того, изобретение относится к изолированным или очищенным последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим вышеупомянутые полипептиды иммуноглобулина, векторам, содержащим такие последовательности нуклеиновой кислоты, LAG-3-связывающим агентам, содержащим вышеуказанные полипептиды иммуноглобулина, последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим такие LAG-3-связывающие агенты, векторам, содержащим такие последовательности нуклеиновых кислот, изолированным клеткам, содержащим такие векторы, композициям, содержащим такие LAG-3-связывающие агенты или такие векторы с фармацевтически приемлемым носителем, и способам лечения рака или инфекционных заболеваний у млекопитающих путем введения млекопитающим эффективных количеств таких композиций.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1А представляет собой график зависимости среднего объема опухоли от времени у мышей с имплантированными клетками аденокарциномы толстой кишки Colon26, которым введены указанные антитела. Каждое графическое представление данных на фиг. 1 относится к определенной указанной лечебной группе.

Фиг. 1В представляет собой график зависимости объема опухоли от времени у отдельных животных в трех лечебных группах мышей с имплантированными клетками аденокарциномы толстой кишки Colon26, которым введены указанные антитела. Каждое графическое представление данных на фиг. 2 относится к отдельному животному в лечебной группе.

На фиг. 2А показана секреция IL-2 CD4+ Т-клетками в анализе реакции лимфоцитов в смешанной культуре (MLR) при разных концентрациях анти-PD-1 или анти-LAG-3 антител.

На фиг. 2В показана экспрессия LAG-3 и PD-1 в CD4+ Т-клетках до (нативные) или после (через 24, 48 и 72 ч) их взаимодействия с дендритными клетками.

Подробное описание изобретения

Изобретение относится к изолированному полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина и/или к изолированному полипептиду легкой цепи иммуноглобулина или их фрагменту (например, к антигенсвязывающему фрагменту). Используемый в настоящем описании термин "иммуноглобулин" или "антитело" относится к белку, который содержится в крови или других физиологических жидкостях позвоночных животных, который используется иммунной системой для идентификации и нейтрализации посторонних объектов, таких как бактерии и вирусы. Полипептид "изолируют" путем его удаления из естественной для него среды. В предпочтительном варианте осуществления иммуноглобулин или антитело представляет собой белок, который содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR). CDR образуют "гипервариабельную область" антитела, которая отвечает за связывание антигена (более подробно обсуждается ниже). Целый иммуноглобулин обычно состоит из четырех полипептидов: двух идентичных копий полипептида тяжелой (H) цепи и двух идентичных копий полипептида легкой (L) цепи. Каждая из тяжелых цепей содержит одну N-концевую вариабельную (V_H) область и три C-концевые константные (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}) области, и каждая легкая цепь содержит одну N-концевую вариабельную (V_L) область и одну C-концевую константную (C_L) область. Легкие цепи антител могут быть отнесены к одному из двух отличающихся типов: каппа (κ) или лямбда (λ), исходя из аминокислотных последовательностей их константных доменов. В типичном иммуноглобулине каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью дисульфидными связями, и две тяжелые цепи связаны друг с другом дисульфидными связями. Вариабельная область легкой цепи соответствует вариабельной области тяжелой цепи, а константная область легкой цепи соответствует первой константной области тяжелой цепи. Оставшиеся константные области тяжелых цепей соответствуют друг другу.

Вариабельные области каждой пары легкой и тяжелой цепей образуют антигенсвязывающий участок антитела. Области V_H и V_L имеют одинаковую общую структуру, причем каждая область состоит из четырех каркасных (FW или FR) участков. Используемый в настоящем описании термин "каркасный участок" относится к относительно консервативным аминокислотным последовательностям в вариабельной области, которые расположены между гипервариабельными или определяющими комплементарность областями (CDR). В каждой вариабельной области имеется четыре каркасных участка, которые обозначаются как FR1, FR2, FR3 и FR4. Каркасные участки образуют β -листы, которые обеспечивают структурный каркас вариабельной области (см., например, C.A. Janeway и др. (Eds.), *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)).

Каркасные участки соединены тремя определяющими комплементарность областями (CDR). Как обсуждалось выше, три CDR, известные как CDR1, CDR2 и CDR3, образуют "гипервариабельную область" антитела, которая отвечает за связывание антигена. CDR образуют петли, соединяющие, а в некоторых случаях включающие часть, структуры бета-листа, образованной каркасными участками. Хотя константные области легкой и тяжелой цепей непосредственно не участвуют в связывании антитела с антигеном, константные области могут влиять на ориентацию вариабельных областей. Константные области также выполняют различные эффекторные функции, такие как участие в антитело-зависимом опосредованном комплементом лизисе или антитело-зависимой клеточной токсичности через взаимодействия с эффекторными молекулами и клетками.

Желательно, чтобы изолированный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина и изолированный полипептид легкой цепи иммуноглобулина по изобретению связывались с белком, кодируемым геном-3 активации лимфоцитов (LAG-3) (также упоминаемым в настоящем описании как "LAG-3 белок"). Как обсуждалось выше, LAG-3 представляет собой белок, состоящий из 498 аминокислот, который оказывает регуляцию функции Т-клеток и гомеостаза по принципу отрицательной обратной связи (Triebel et al., *J. Exp. Med.*, 171 (5): 1393-1405 (1990) и Triebel F., *Trends Immunol.*, 24 (12):619-22 (2003)). LAG-3 является членом супергенного семейства иммуноглобулинов и по своей структуре и генетическим характеристикам относится к CD4. Было показано, что в цитоплазме LAG-3 взаимодействует с белком, обозначенным LAP, который считается молекулой сигнальной трансдукции, участвующей в понижающей регуляции CD3/TCR пути активации (Iouzalet et al., *Eur. J. Immunol.*, 31:2885-2891 (2001)). Более того, показано, что при активации CD4+CD25+ регуляторные Т-клетки (Treg) экспрессируют LAG-3, а антитела к LAG-3 ингибируют подавление за счет индуцированных Treg клеток как *in vitro*, так и *in vivo*, из чего можно сделать предположение, что LAG-3 способствует подавлению активности Treg клеток (Huang et al. *Immunity*, 21: 503-513 (2004)). Однако недавнее исследование показало, что экспрессия LAG-3 на CD4+ Т-клетках скорее всего делает их более восприимчивыми к подавлению Treg клетками, а не Treg клетки более подавляемыми (см. Durham et al., *PLoS ONE*, 9 (11): e109080 (2014)). Было показано, что в некоторых обстоятельствах LAG-3 обладает также иммуностимулирующим действием (см., например, Prigent et al., *Eur. J. Immunol.*, 29: 3867-3876 (1999)); El Mir and Triebel, *J. Immunol.*, 164: 5583-5589 (2000)); и Casati et al., *Cancer Res.*, 66: 4450-4460 (2006)). Изолированный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина по изобретению и изолированный полипептид легкой цепи иммуноглобулина по изобретению могут образовывать агент, который связывается с LAG-3 и другим антигеном, что приводит к образованию "двойного реактивного" связывающего агента (например, двойного реактивного антитела). Например, агент может связываться с LAG-3 и другим негативным регулятором иммунной системы, таким как, например, белок запрограммированной гибели 1 (PD-1) и/или белка, состоящего из домена Т-клеточного иммуноглобулина и домена-3 муцина (TIM-3).

Антитела, которые связываются с LAG-3, и их компоненты известны в данной области техники (см., например, публикации заявок на патент США №№ 2010/0233183, 2011/0150892 и 2014/0093511). Анти-LAG-3 антитела также можно приобрести в таких компаниях, как, например, Abcam (Cambridge, MA) и R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN).

Изобретение относится к изолированному полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит аминокислотную последовательность

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe
Xaa1 Ile Xaa2 Asp Asp Tyr Ile His Trp Val Xaa3 Gln Ala Pro Gly
Lys Gly Leu Glu Trp Xaa4 Gly Trp Ile Asp Xaa5 Xaa6 Asn Xaa7 Asp
Ser Xaa8 Tyr Xaa9 Ser Lys Phe Xaa10 Gly Arg Val Thr Ile Thr Val
Asp Thr Ser Thr Xaa11 Thr Ala Tyr Met Xaa12 Leu Ser Ser Leu Arg
Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Tyr Ala Phe Gly Gly Tyr
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO: 181),

в которой (a) Xaa1 представляет собой аспарагин (Asn) или серин (Ser), (b) Xaa2 представляет собой лизин (Lys), тирозин (Tyr) или аспарагин (Asn), (c) Xaa3 представляет собой лизин (Lys) или глутамин

(Gln), (d) Хаа4 представляет собой изолейцин (Ile) или метионин (Met), (e) Хаа5 представляет собой аланин (Ala) или пролин (Pro), (f) Хаа6 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu) или метионин (Met), (g) Хаа6 представляет собой глицин (Gly), аспарагин (Asn) или аспарагиновую кислоту (Asp), (h) Хаа8 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu) или глутамин (Q), (i) Хаа9 представляет собой аланин (Ala) или серин (Ser), (j) Хаа10 представляет собой глутамин (Gln) или аргинин (Arg), (k) Хаа11 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp) или аспарагин (Asn), и (l) Хаа12 представляет собой глутамин (Gln) или лизин (Lys).

Изобретение относится к изолированному полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности

Glu

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Thr
Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Xaa1 Ile Xaa2 Asp Asp
Tyr Ile His Trp Val Xaa3 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Xaa4 Gly Trp Ile Asp Xaa5 Glu Asn Xaa6 Asp Ser Glu Tyr Xaa7 Ser
Lys Phe Xaa8 Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Xaa9
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
Tyr Tyr Cys Thr Tyr Ala Phe Gly Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO: 1),

в которой (a) Хаа1 представляет собой аспарагин (Asn) или серин (Ser), (b) Хаа2 представляет собой лизин (Lys), тирозин (Tyr) или аспарагин (Asn), (c) Хаа3 представляет собой лизин (Lys) или глутамин (Gln), (d) Хаа4 представляет собой изолейцин (Ile) или метионин (Met), (e) Хаа5 представляет собой аланин (Ala) или пролин (Pro), (f) Хаа6 представляет собой глицин (Gly), аспарагин (Asn) или аспарагиновую кислоту (Asp), (g) Хаа7 представляет собой аланин (Ala) или серин (Ser), (h) Хаа8 представляет собой глутамин (Gln) или аргинин (Arg), и (i) Хаа9 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp) или аспарагин (Asn).

В одном из вариантов осуществления изолированный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит, состоит из, или по существу состоит из аминокислотной последовательности, любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 или SEQ ID NO: 186.

Изобретение также относится к изолированному полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Xaa1 Leu

Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Xaa2 Cys Xaa3 Val Tyr Gly
Gly Xaa4 Phe Xaa5 Gly Tyr Tyr Trp Xaa6 Trp Ile Arg Gln Pro Pro
Xaa7 Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Xaa8
Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
Thr Ser Lys Asn Gln Xaa9 Ser Leu Lys Leu Xaa10 Xaa11 Val Thr Ala
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa12 Arg Glu Gly Xaa13 Tyr Gly
Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (SEQ
ID NO: 35),

в которой (a) Хаа1 представляет собой аргинин (Arg) или глицин (Gly), (b) Хаа2 представляет собой треонин (Thr) или изолейцин (Ile), (c) Хаа3 представляет собой треонин (Thr) или аланин (Ala), (d) Хаа4 представляет собой серин (Ser) или фенилаланин (Phe), (e) Хаа5 представляет собой серин (Ser) или фенилаланин (Phe), (f) Хаа6 представляет собой серин (Ser) или изолейцин (Ile), (g) Хаа7 представляет собой глицин (Gly) или аргинин (Arg), (h) Хаа8 представляет собой серин (Ser) или аспарагин (Asn), (i) Хаа9 представляет собой фенилаланин (Phe) или лейцин (Leu), (j) Хаа10 представляет собой аспарагин (Asn) или серин (Ser), (k) Хаа11 представляет собой серин (Ser) или фенилаланин (Phe), (l) Хаа12 представляет собой аланин (Ala) или валин (Val), и (m) Хаа13 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp) или аспарагин (Asn).

В одном из вариантов осуществления изолированный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит, состоит из, или по существу состоит из аминокислотной последовательности, любой из SEQ

ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 или SEQ ID NO: 56.

В другом варианте осуществления предлагается изолированный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит SEQ ID NO: 190 или 191. Примеры такого полипептида включают полипептиды, содержащие любую из последовательностей SEQ ID NO: 192-195.

Когда полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина по изобретению состоит по существу из аминокислотной последовательности, любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 182-186 или SEQ ID NO: 190-195, в полипептид могут быть включены дополнительные компоненты, которые не оказывают существенного влияния на полипептид (например, белковые фрагменты, такие как биотин, которые облегчают очистку или выделение). Когда полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина по изобретению состоит из аминокислотной последовательности, любой из: SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 56, полипептид не содержит никаких дополнительных компонентов (т.е. компонентов, которые не являются эндогенными по отношению к полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина по изобретению).

Изобретение относится к изолированному полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% идентична) любой из SEQ ID NO: 1-56. "Идентичность" нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, как используется в настоящем описании, может быть определена путем сравнения представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности. Процент идентичности представляет собой количество нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми (т.е. идентичными) в интересующей последовательности и эталонной последовательности, деленное на длину самой длинной последовательности (т.е. длину либо представляющей интерес последовательности, либо эталонной последовательности, в зависимости от того, какая из них длиннее). Известно несколько математических алгоритмов для получения оптимального выравнивания и вычисления идентичности между двумя или более последовательностями, которые реализованы в нескольких доступных программах. Примеры таких программ включают CLUSTAL-W, T-Coffee и ALIGN (для выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот и аминокислотных последовательностей), программы BLAST (например, BLAST 2.1, BL2SEQ и их последние версии) и программы FASTA (например, FASTA3x, FASTM и SSEARCH) (для выравнивания последовательностей и поиска сходства между последовательностями). Алгоритмы для выравнивания последовательностей также описаны, например, Altschul et al., J. Molecular Biol., 215(3): 403-410 (1990), Beigert et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106(10): 3770-3775 (2009), Durbin et al., eds., Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids, Cambridge University Press, Cambridge, UK (2009), Soding, Bioinformatics, 21(7): 951-960 (2005), Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25(17): 3389-3402 (1997) и Gusfield, Algorithms on Strings, Trees and Sequences, Cambridge University Press, Cambridge UK (1997)).

В другом варианте осуществления изобретение относится к изолированному полипептиду легкой цепи иммуноглобулина, который содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности

Asp Xaa1 Val Met

Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser
Ile Ser Cys Arg Xaa2 Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Xaa3 Xaa4
Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu
Leu Ile Tyr Xaa Xaa Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Xaa Gln Ser Thr Xaa Val
Pro Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr (SEQ
ID NO: 57),

в которой (a) Xaa1 представляет собой валин (Val) или изолейцин (Ile), (b) Xaa2 представляет собой цистеин (Cys) или серин (Ser), (c) Xaa3 представляет собой глицин (Gly) или серин (Ser), (d) Xaa4 представляет собой аспарагин (Asn) или аспарагиновую кислоту (Asp), (e) Xaa5 представляет собой лизин (Lys), глицин (Gly), аспарагин (Asn), серин (Ser) или лейцин (Leu), (f) Xaa6 представляет собой валин (Val) или изолейцин (Ile), (g) Xaa7 представляет собой серин (Ser), аланин (Ala) или глицин (Gly), и (h) Xaa8 представляет собой гистидин (His) или тирозин (Tyr).

В одном из вариантов осуществления изолированный полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит, состоит из, или по существу состоит из аминокислотной последовательности, любой из SEQ

ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188 или SEQ ID NO: 189.

Изобретение относится к изолированному полипептиду легкой цепи иммуноглобулина, который содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности

Asp Ile

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Xaa1
Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
Glu Asp Ile Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Xaa6 Leu Ile
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
Pro Ser Val (SEQ ID NO: 89),

в которой (a) подпоследовательность Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 удалена или представляет собой Tyr-Asp-Ala-Ser-Asn, и (b) Xaa6 представляет собой треонин (Thr) или изолейцин (Ile).

Полипептид легкой цепи иммуноглобулина по изобретению может включать или может не содержать подпоследовательность Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 в положениях 49-53 в SEQ ID NO: 89, когда Xaa6 представляет собой треонин (Thr) или изолейцин (Ile). Когда полипептид легкой цепи иммуноглобулина по изобретению содержит подпоследовательность Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5, каждый из Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4 и Xaa5 может быть любым подходящим аминокислотным остатком. Предпочтительно, когда Xaa1 представляет собой тирозин (Tyr), Xaa2 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp), Xaa3 представляет собой аланин (Ala), Xaa4 представляет собой серин (Ser), и Xaa5 представляет собой аспарагин (Asn). Предпочтительная аминокислотная последовательность полипептида легкой цепи иммуноглобулина, которая включает подпоследовательность Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5, содержит SEQ ID NO: 90. Когда полипептид легкой цепи иммуноглобулина не содержит подпоследовательность Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5, полипептид легкой цепи иммуноглобулина предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91 или SEQ ID NO: 92.

В другом варианте осуществления предлагается изолированный полипептид легкой цепи иммуноглобулина, который содержит SEQ ID NO: 196 или 197. Примеры такого полипептида включают полипептиды, содержащие любую из SEQ ID NO: 198-200.

Когда полипептид легкой цепи иммуноглобулина по изобретению состоит по существу из аминокислотной последовательности, любой из: SEQ ID NO: 57 - SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 187-189 или SEQ ID NO: 196-200, в полипептид могут быть включены дополнительные компоненты, которые не оказывают существенного влияния на полипептид (например, белковые фрагменты, такие как биотин, которые облегчают очистку или выделение). Когда полипептид легкой цепи иммуноглобулина по изобретению состоит из аминокислотной последовательности, любой из: SEQ ID NO: 57 - SEQ ID NO: 92, полипептид не содержит никаких дополнительных компонентов (т.е. компонентов, которые не являются эндогенными по отношению к полипептиду легкой цепи иммуноглобулина по изобретению).

Изобретение относится к изолированному полипептиду легкой цепи иммуноглобулина, который содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% идентична) любой из SEQ ID NO: 57 - SEQ ID NO: 92. "Идентичность" последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности может быть определена при помощи раскрытых в настоящем описании способов.

Одна или более аминокислот вышеупомянутых полипептидов тяжелой цепи и/или полипептидов легкой цепи иммуноглобулина могут быть заменены или замещены другой аминокислотой. "Замена" или "замещение" аминокислоты относится к замещению одной аминокислоты в заданном положении или остатке другой аминокислотой в том же положении или остатке в полипептидной последовательности.

Аминокислоты подразделяют на две большие группы, "ароматические" и "алифатические". Ароматическая аминокислота содержит ароматическое кольцо. Примеры "ароматических" аминокислот включают гистидин (H или His), фенилаланин (F или Phe), тирозин (Y или Tyr) и триптофан (W или Trp). Неароматические аминокислоты представляют широкую группу "алифатических" аминокислот. Примеры "алифатических" аминокислот включают глицин (G или Gly), аланин (A или Ala), валин (V или Val),

лейцин (L или Leu), изолейцин (I или Ile), метионин (M или Met), серин (S или Ser), треонин (T или Thr), цистеин (C или Cys), пролин (P или Pro), глутаминовую кислоту (E или Glu), аспарагиновую кислоту (A или Asp), аспарагин (N или Asn), глутамин (Q или Gln), лизин (K или Lys) и аргинин (R или Arg).

Алифатические аминокислоты можно разделить на четыре подгруппы. "Большая подгруппа алифатических неполярных" аминокислот состоит из валина, лейцина и изолейцина. "Подгруппа алифатических слабополярных" аминокислот состоит из метионина, серина, треонина и цистеина. "Подгруппа алифатических полярных/заряженных" аминокислот состоит из глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, аспарагина, глутамина, лизина и аргинина. "Подгруппа малых остатков" состоит из глицина и аланина. Группа заряженных/полярных аминокислот может быть разделена на три подгруппы: "подгруппа положительно заряженных" аминокислот, состоящая из лизина и аргинина, "подгруппа отрицательно заряженных" аминокислот, состоящая из глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, и "подгруппа полярных" аминокислот, состоящая из аспарагина и глутамина.

Ароматические аминокислоты могут быть разделены на две подгруппы: "подгруппу аминокислот с азотсодержащим гетероциклом", состоящую из гистидина и триптофана, и "фенильную подгруппу", состоящую из фенилаланина и тирозина.

Замена или замещение аминокислот может быть консервативным, полуконсервативным или неконсервативным. Фраза "консервативное замещение аминокислоты" или "консервативная мутация" относится к замене одной аминокислоты другой аминокислотой, которые имеют общее свойство. Функциональный способ определения общих свойств у аминокислот заключается в анализе нормализованных частот изменений аминокислот между соответствующими белками у гомологичных организмов (Schulz and Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York, 1979). Согласно таким анализам можно определить группы аминокислот по предпочтительной замене аминокислот внутри группы, и, следовательно, такие аминокислоты будут иметь наибольшее сходство по своему воздействию на общую структуру белка (Schulz and Schirmer, *supra*).

Примеры консервативных замещений аминокислот включают замещения аминокислот внутри описанных выше подгрупп, например замещение лизина аргинином и наоборот с сохранением положительного заряда, глутаминовой кислоты аспарагиновой кислотой и наоборот с сохранением отрицательного заряда, серина треонином с сохранением свободной -ОН группы и глутамина аспарагином с сохранением свободной -NH₂ группы.

"Полуконсервативные мутации" включают замещения одной аминокислоты другой, которые происходят в пределах тех же самых групп, перечисленных выше, но не в пределах одной и той же подгруппы. Например, в случае замещения аспарагиновой кислоты аспарагином или аспарагина лизином участвуют аминокислоты одной и той же группы, но разных подгрупп. "Неконсервативные мутации" включают замещение одной аминокислоты другой аминокислотой, при этом эти аминокислоты принадлежат разным группам, например, лизина триптофаном или фенилаланина серином и т.д.

Кроме того, одна или более аминокислот могут быть вставлены в вышеуказанные полипептиды тяжелой цепи и/или полипептиды легкой цепи иммуноглобулина. В аминокислотную последовательность полипептида тяжелой цепи и/или полипептида легкой цепи иммуноглобулина может быть вставлено любое количество любых подходящих аминокислот. В этом отношении, в аминокислотную последовательность полипептида тяжелой цепи и/или полипептида легкой цепи иммуноглобулина может быть вставлена по меньшей мере одна аминокислота (например, 2 или более, 5 или более или 10 или более аминокислот), но не более 20 аминокислот (например, 18 или менее, 15 или менее или 12 или менее аминокислот). Предпочтительно в аминокислотную последовательность полипептида тяжелой цепи и/или полипептида легкой цепи иммуноглобулина вставлено 1-10 аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот). В этом случае аминокислота(аминокислоты) может быть вставлена в любое подходящее место в любом из вышеуказанных полипептидов тяжелой цепи и/или полипептидов легкой цепи иммуноглобулина. Предпочтительно аминокислоту(аминокислоты) вводят в CDR (например, CDR1, CDR2 или CDR3) полипептида тяжелой цепи и/или полипептида легкой цепи иммуноглобулина.

Изолированный полипептид тяжелой цепи и полипептиды легкой цепи иммуноглобулина по изобретению не ограничены полипептидами, содержащими указанные в настоящем описании конкретными аминокислотными последовательностями. Действительно, полипептид тяжелой цепи или полипептид легкой цепи иммуноглобулина может представлять собой любой полипептид тяжелой цепи или полипептид легкой цепи, который конкурирует с полипептидом тяжелой цепи или полипептидом легкой цепи иммуноглобулина по изобретению за связывание с LAG-3. В этом случае, например, полипептид тяжелой цепи или полипептид легкой цепи иммуноглобулина может представлять собой любой полипептид тяжелой цепи или полипептид легкой цепи, который связывается с тем же самым эпитопом LAG-3, распознаваемым раскрытыми в настоящем описании полипептидами тяжелой и легкой цепей. Конкуренцию антител можно оценить при помощи обычных методов конкурентного анализа пептидов, в которых используются ELISA, вестерн-блоттинг или иммуногистохимия (см., например, патенты США 4828981 и 8568992 и Braitbard et al., *Proteome Sci.*, 4:12 (2006)).

Изобретение относится к изолированному LAG-3-связывающему агенту, содержащему, по существу состоящему или состоящему из одной или более раскрытых в настоящем описании изолированных

аминокислотных последовательностей по изобретению. Под "LAG-3-связывающим агентом" подразумевается молекула, предпочтительно белковая молекула, которая специфически связывается с белком LAG-3. Предпочтительно LAG-3-связывающий агент представляет собой антитело или его фрагмент (например, иммуногенный фрагмент). LAG-3-связывающий агент по изобретению содержит, состоит по существу или состоит из изолированного полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина по изобретению и/или изолированного полипептида легкой цепи иммуноглобулина по изобретению. В одном из вариантов осуществления, LAG-3-связывающий агент по изобретению содержит, состоит по существу или состоит из полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина по изобретению или полипептида легкой цепи иммуноглобулина по изобретению. В другом варианте осуществления, LAG-3-связывающий агент содержит, по существу состоит из или состоит из полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина по изобретению и полипептида легкой цепи иммуноглобулина по изобретению.

Любой аминокислотный остаток полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина по изобретению и/или полипептида легкой цепи иммуноглобулина по изобретению может быть заменен в любой комбинации другим аминокислотным остатком или может быть удален или вставлен при условии, что биологическая активность LAG-3-связывающего агента усиливается или улучшается в результате замен, вставок и/или делеций аминокислот. "Биологическая активность" LAG-3-связывающего агента относится, например, к средству связывания с конкретным эпитопом LAG-3, нейтрализации или подавлению связывания LAG-3 с его рецептором(рецепторами), нейтрализации или подавлению активности LAG-3 *in vivo* (например, IC₅₀), фармакокинетики и перекрестной реактивности (например, с гомологами, нехарактерными для организма человека, или ортологами белка LAG-3, или с другими белками или тканями). Другие биологические свойства или характеристики антигенсвязывающего агента, известные в данной области, включают, например, авидность, селективность, растворимость, укладку, иммуноотоксичность, экспрессию и состав. Вышеуказанные свойства или характеристики можно наблюдать, измерить и/или оценить стандартными методами, включая, без ограничения, ELISA, конкурентный ELISA, анализ поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore™) или KINEXA™, анализы нейтрализации *in vitro* или *in vivo*, анализы связывания рецептора с лигандом, анализ продуцирования и/или секреции цитокинов или факторов роста, а также анализ сигнальной трансдукции и иммуногистохимический анализ.

Термины "ингибировать" или "нейтрализовать", используемые в настоящем описании в отношении активности LAG-3-связывающего агента, относятся к способности по существу противодействовать, препятствовать, предотвращать, сдерживать, замедлять, нарушать, изменять, исключать, останавливать или обращать вспять прогрессирование или тяжесть, например биологическую активность LAG-3 или заболевания или состояния, ассоциированного с LAG-3. Изолированный LAG-3-связывающий агент по изобретению предпочтительно ингибирует или нейтрализует активность LAG-3 по меньшей мере примерно на 20%, примерно на 30%, примерно на 40%, примерно на 50%, примерно на 60%, примерно на 70%, примерно на 80%, примерно на 90%, примерно на 95%, примерно на 100% или в пределах, определенных любыми двумя из приведенных выше значений.

Изолированный LAG-3-связывающий агент по изобретению может представлять собой цельное антитело, раскрытое в настоящем описании, или фрагмент антитела. Термины "фрагмент антитела", "анти-телный фрагмент" и "функциональный фрагмент антитела" используются в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения одного или более фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (см., в общих чертах, Holliger et al., Nat. Biotech., 23 (9): 1126-1129 (2005)). Изолированный LAG-3-связывающий агент может содержать любой фрагмент LAG-3-связывающего антитела.

Желательно, чтобы фрагмент антитела содержал, например, одну или более CDR, варибельную область (или ее части), константную область (или ее части) или их комбинации. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения, (i) Fab фрагмент, который является моновалентным фрагментом, состоящим из доменов V_L, V_H, C_L и CH₁, (ii) F(ab')₂ фрагмент, который представляет собой двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области, (iii) Fv фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (iv) Fab' фрагмент, который является результатом разрушения дисульфидного мостика F(ab')₂ фрагмента в умеренных восстанавливающих условиях, (v) стабилизированный дисульфидными связями Fv фрагмент (dsFv) и (vi) доменное антитело (dAb), которое является полипептидом домена (V_H или V_L) одной варибельной области антитела, который специфически связывается с антигеном.

В вариантах осуществления, где изолированный LAG-3-связывающий агент содержит фрагмент полипептида тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина, этот фрагмент может быть любого размера при условии, что фрагмент связывается с LAG-3 и предпочтительно ингибирует его активность. В этом случае желательно, чтобы фрагмент полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина содержал от примерно 5 до 18 (например, примерно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или в пределах, определенных любыми двумя из вышеперечисленных значений) аминокислот. Аналогично желательно, чтобы фрагмент полипептида легкой цепи иммуноглобулина содержал от примерно 5 до 18 (например, примерно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, или в пределах, определенных любыми двумя из вышеперечисленных значений) аминокислот.

Когда LAG-3-связывающий агент представляет собой антитело или фрагмент антитела, желательно, чтобы указанное антитело или фрагмент антитела содержал константную область (Fc) тяжелой цепи любого подходящего класса. Предпочтительно антитело или фрагмент антитела содержит константную область тяжелой цепи на основе антител IgG1, IgG2 или IgG4 дикого типа или их вариантов. В некоторых вариантах осуществления LAG-3-связывающий агент содержит Fc фрагмент, сконструированный для уменьшения или исключения эффекторных функций антитела. Созданные Fc фрагменты с уменьшенной или подавленной эффекторной функцией известны в данной области техники и являются коммерчески доступными, как и методы создания Fc фрагментов для уменьшения или устранения эффекторной функции, любой из которых может быть использован в сочетании с изобретением.

LAG-3-связывающий агент также может представлять собой фрагмент одноцепочечного антитела. Примеры фрагментов одноцепочечных антител включают, но не ограничены, (i) одноцепочечный Fv (scFv), который представляет собой моновалентную молекулу, состоящую из двух доменов Fv фрагмента (т.е. V_L и V_H), соединенных синтетическим линкером, который позволяет синтезировать два домена в виде одной полипептидной цепи (см., например, Bird et al., *Science*, 242: 423-426 (1988), Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883 (1988) и Osbourn et al., *Nat. Biotechnol.*, 16: 778 (1998)) и (ii) димер, которое представляет собой димер полипептидных цепей, где каждая полипептидная цепь содержит V_H соединенную с V_L пептидным линкером, который является слишком коротким, чтобы обеспечить спаривание между V_H и V_L на одной и той же полипептидной цепи, тем самым приводя к спариванию комплементарных доменов на разных V_H - V_L полипептидных цепях с образованием димерной молекулы, имеющей два функциональных антигенсвязывающих участка. Фрагменты антитела известны в данной области техники и более подробно описаны, например, в публикации заявки на патент США 2009/0093024 A1.

Изолированный LAG-3-связывающий агент также может быть интрателом или его фрагментом. Интратело представляет собой антитело, которое экспрессируется и функционирует внутри клетки. Как правило, интратело не содержит дисульфидных связей и способно модулировать экспрессию или активность генов-мишеней через их специфическую связывающую активность. Интратела включают фрагменты одного домена, например, изолированные домены V_H и V_L и scFv. Интратело может включать сигналы миграции на субклеточном уровне, расположенные на N- или C-конце интратела, обеспечивающие высокий уровень экспрессии в субклеточных компартментах, где расположен целевой белок. При взаимодействии с геном-мишенью интратело модулирует функцию целевого белка и/или обеспечивает фенотипический/функциональный нокаут посредством таких механизмов как ускорение деградации белка-мишени и блокированию белка-мишени в нефизиологическом субклеточном компартменте. Другие механизмы опосредованной интрателом инактивации генов могут зависеть от эпитопа, на который направлено интратело, например путем связывания с каталитическим участком в белке-мишени или с эпитопами, которые участвуют во взаимодействиях белок-белок, белок-ДНК или белок-РНК.

Изолированный LAG-3-связывающий агент также может быть конъюгатом антитела. В этом отношении изолированный LAG-3-связывающий агент может быть конъюгатом (1) антитела, альтернативно каркаса или их фрагментов и (2) фрагмента белка или небелкового фрагмента, содержащего LAG-3-связывающий агент. Например, LAG-3-связывающий агент может быть полностью или частично антителом, конъюгированным с пептидом, флуоресцентной молекулой или химиотерапевтическим агентом.

Изолированный LAG-3-связывающий агент может представлять собой или может быть получен из человеческого антитела, антитела, отличного от человеческого, или химерного антитела. Под "химерным" подразумевается антитело или его фрагмент, содержащий области, как встречающиеся, так и не встречающиеся у человека. Предпочтительно изолированный LAG-3-связывающий агент представляет собой гуманизированное антитело. "Гуманизированное" антитело представляет собой моноклональное антитело, содержащее каркас человеческого антитела и по меньшей мере одну CDR, полученную или выделенную из антитела, отличного от человеческого антитела. Антитела, не являющиеся человеческими, включают антитела, выделенные из любого животного, отличного от человека, такого как, например, грызун (например, мышь или крыса). Гуманизированное антитело может содержать одну, две или три CDR, полученные или выделенные из антитела, отличного от человеческого антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения CDRH3 LAG-3-связывающего агента по изобретению получают или выделяют из мышиног моноклонального антитела, в то время как остальные вариабельные области и константную область LAG-3-связывающего агента по изобретению получают или выделяют из человеческого моноклонального антитела.

Человеческое антитело, антитело, отличное от человеческого, химерное антитело или гуманизированное антитело могут быть получены любыми способами, в том числе путем использования *in vitro* источников (например, гибридомы или клеточной линии, продуцирующую рекомбинантное антитело) и *in vivo* источников (например, грызунов). Способы создания антител известны в данной области и описаны, например, Köhler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5: 511-519 (1976); Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988); и Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело или химерное антитело может быть получено с использованием трансгенного животного (например, мыши), у которого

один или более эндогенных генов иммуноглобулина заменены одним или более генами иммуноглобулина человека. Примеры трансгенных мышей, у которых гены эндогенного антитела эффективно заменены генами человеческого антитела, включают без ограничения Medarex HUMAB-MOUSE™, Kirin TC MOUSE™ и Kyowa Kirin KM-MOUSE™ (см., например, Lonberg, *Nat. Biotechnol.*, 23(9): 1117-25 (2005) и Lonberg, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 181: 69-97 (2008)). Гуманизированное антитело может быть получено любым подходящим методом, известным в данной области техники (см., например, An, Z. (ed.), *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2009)), including, e.g., grafting of non-human CDRs onto a human antibody scaffold (see, e.g., Kashmiri et al., *Methods*, 36(1): 25-34 (2005); and Hou et al., *J. Biochem.*, 144(1): 115-120 (2008)). В одном из вариантов осуществления гуманизированное антитело может быть получено методами, описанными, например, в публикации заявки на патент США 2011/0287485 A1.

В одном из вариантов осуществления CDR (например, CDR1, CDR2 или CDR3) или вариабельная область полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина и/или полипептида легкой цепи иммуноглобулина, раскрытого в настоящем описании, может быть трансплантирована (т.е. привита) в другую молекулу, такую как антитело или полипептид неантительной природы, либо методами химического синтеза белка, либо методами рекомбинантной ДНК. В этом отношении изобретение относится к изолированному LAG-3-связывающему агенту, содержащему по меньшей мере одну CDR полипептида тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина, как раскрыто в настоящем описании. Изолированный LAG-3-связывающий агент может содержать одну, две или три CDR вариабельной области тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина, как раскрыто в настоящем описании.

В предпочтительном варианте осуществления LAG-3-связывающий агент связывается с эпитопом LAG-3, блокируя связывание LAG-3 с молекулами МНС класса II и ингибируя сигнализацию, опосредованную LAG-3. Например, LAG-3-связывающий агент может связываться с одним или несколькими из четырех Ig-подобных внеклеточных доменов (D1-D4) белка LAG-3 (см., например, Triebel et al., *J. Exp. Med.*, 171 (5): 1393-1405 (1990) и Bruniquel et al., *Immunogenetics*, 47: 96-98 (1997)). Предпочтительно LAG-3-связывающий агент связывается с доменом 1 (D1) и/или доменом (D2) белка LAG-3. Изобретение также относится к изолированному или очищенному эпитопу LAG-3, который блокирует связывание LAG-3 с молекулами МНС класса II опосредованным или аллостерическим способом.

Изобретение также относится к одной или более изолированным или очищенным последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина по изобретению, полипептид легкой цепи иммуноглобулина по изобретению и LAG-3-связывающий агент по изобретению.

Термин "последовательность нуклеиновой кислоты" включает полимер ДНК или РНК, т.е. полинуклеотид, который может быть одноцепочечным или двухцепочечным и который может содержать не встречающиеся в природе или измененные нуклеотиды. Используемые в настоящем описании термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо рибонуклеотидов (РНК), либо дезоксирибонуклеотидов (ДНК). Эти термины относятся к первичной структуре молекулы и, таким образом, включают двух- и одноцепочечную ДНК и двух- и одноцепочечную РНК. Эти термины включают в качестве эквивалентов аналоги РНК или ДНК, полученные из нуклеотидных аналогов и модифицированных полинуклеотидов, таких как, без ограничения, метилированных и/или кэпированных полинуклеотидов. Нуклеиновые кислоты обычно связаны фосфатными связями с образованием последовательностей нуклеиновых кислот или полинуклеотидов, хотя в данной области известны многие другие связи (например, фосфоротриатные, боранофосфатные и т.п.).

Изобретение также относится к вектору, содержащему одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина по изобретению, полипептид легкой цепи иммуноглобулина по изобретению и LAG-3-связывающий агент по изобретению. Вектор может представлять собой, например, плазмиду, эписому, космиду, вирусный вектор (например, ретровирусный или аденовирусный) или фаг. Подходящие векторы и способы получения векторов хорошо известны в данной области (см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), and Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994)).

Дополнительно к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина по изобретению, полипептид легкой цепи иммуноглобулина по изобретению и/или LAG-3-связывающий агент по изобретению, вектор предпочтительно содержит последовательности контроля экспрессии, такие как промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования, терминаторы транскрипции, сигнальные пептиды (например, сигнальный пептид остеонектина), внутренние сайты входа рибосомы (IRES) и т.п., которые обеспечивают экспрессию кодирующей последовательности в клетке-хозяине. В качестве примера можно привести последовательности контроля экспрессии, известные в данной области и описанные, например в Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

Большое количество промоторов, включая конститутивные, индуцируемые и репрессируемые про-

моторы, хорошо известны в данной области из множества различных источников. Типичными источниками промоторов являются, например, вирусы, млекопитающие, насекомые, растения, дрожжи и бактерии, а подходящие промоторы из этих источников легко доступны или могут быть синтезированы на основе общедоступных последовательностей, например из депозитариев, таких как ATCC, а также других коммерческих или индивидуальных источников. Промоторы могут быть однонаправленными (т.е. инициировать транскрипцию в одном направлении) или двунаправленными (т.е. инициировать транскрипцию в 3'- или 5'-направлении). Неограничивающие примеры промоторов включают, например, бактериальную систему экспрессии T7, бактериальную систему экспрессии pBAD (araA), промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV.

Индукцируемые промоторы включают, например, систему Tet (патенты США 5464758 и 5814618), индуцируемую систему Ecdysone (No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 3346-3351 (1996)), систему T-REX™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), систему LACSWITCH™ (Stratagene, San Diego, CA) и индуцируемую рекомбиназой систему Cre-ERT тамоксифена (Indra et al., *Nuc. Acid. Res.*, 27: 4324-4327 (1999), *Nuc. Acid. Res.*, 28: e99 (2000), патент США 7121215 and Kramer & Fussenegger, *Methods Mol. Biol.*, 308: 123-144 (2005)).

Используемый в настоящем описании термин "энхансер" относится к последовательности ДНК, которая усиливает транскрипцию, например, последовательности нуклеиновой кислоты, к которой он функционально присоединен. Энхансеры могут быть расположены на расстоянии нескольких килобаз от кодирующей области последовательности нуклеиновой кислоты и могут опосредовать связывание регуляторных факторов, характер метилирования ДНК или изменения в структуре ДНК. В данной области из множества различных источников хорошо известно большое количество энхансеров, которые можно приобрести отдельно или в составе клонируемых полинуклеотидов (например, из депозитариев, таких как ATCC, а также других коммерческих или индивидуальных источников). Ряд полинуклеотидов, содержащих промоторы (такие как широко используемый промотор CMV), также содержат энхансерные последовательности. Энхансеры могут быть расположены перед, внутри или после кодирующих последовательностей.

Вектор также может содержать "селектируемый маркерный ген". Используемый в настоящем описании термин "селектируемый маркерный ген" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая в присутствии соответствующего селективного агента обеспечивает селективный выбор клеток, экспрессирующих эту последовательность нуклеиновой кислоты. Подходящие селективируемые маркерные гены известны в данной области и описаны, например, в публикациях международных заявок на патент WO 1992/008796 и WO 1994/028143; Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 3567-3570 (1980); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1527-1531 (1981); Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2072-2076 (1981); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150: 1-14 (1981); Santerre et al., *Gene*, 30: 147-156 (1984); Kent et al., *Science*, 237: 901-903 (1987); Wigler et al., *Cell*, 11: 223-232 (1977); Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48: 2026-2034 (1962); Lowy et al., *Cell*, 22: 817-823 (1980); и патентах США 522644 и 5770359.

В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой "эписомальный экспрессирующий вектор" или "эписому", который способен к репликации в клетке-хозяине и сохраняется в виде внехромосомного сегмента ДНК внутри клетки-хозяина в присутствии соответствующего селективного давления (см., например, Conese et al., *Gene Therapy*, 11: 1735-1742 (2004)). Типичные коммерчески доступные эписомальные векторы экспрессии включают, без ограничения, эписомальные плазмиды, в которых используются нуклеарный антиген 1 вируса Эпштейн-Барра (EBNA1) и точка начала репликации (oriP) вируса Эпштейн-Барра (EBV). Векторы pREP4, pCEP4, pREP7 и pcDNA3.1 компании Инвитроген (Invitrogen) (Carlsbad, CA) и pBK-CMV компании Stratagene (La Jolla, CA) представляют собой неограничивающие примеры эписомального вектора, в котором вместо EBNA1 и oriP используется Т-антиген и точка начала репликации SV40.

Другие подходящие векторы включают интегральные векторы экспрессии, которые могут случайным образом встраиваться в ДНК клетки-хозяина или могут включать сайт рекомбинации, обеспечивающий специфическую рекомбинацию между вектором экспрессии и хромосомой клетки-хозяина. В таких интегральных векторах экспрессии могут быть использованы эндогенные последовательности контроля экспрессии хромосом клетки-хозяина для осуществления экспрессии нужного белка. Примеры векторов, которые встраивают в конкретный сайт, включают, например, компоненты flp-in системы компании Invitrogen (Carlsbad, CA) (например, pcDNATM5/FRT) или cre-lox системы, такие как например pExchange-6 Core векторы компании Stratagene (La Jolla, CA). Примеры векторов, которые встраиваются случайным образом в хромосомы клеток-хозяев, включают, например, pcDNA3.1 (при введении в отсутствие Т-антигена) компании Life Technologies (Carlsbad, CA), UCOE от Millipore (Billerica, MA) и pCI или pFNIOA (ACT) FLEXITM компании Promega (Madison, WI).

Также можно использовать вирусные векторы. Примеры коммерчески доступных вирусных векторов экспрессии включают, без ограничения, аденовирусную систему Per.C6, производимую компанией Crucell, Inc. (Leiden, The Netherlands), лентивирусную систему pLP1 компании Invitrogen (Carlsbad, CA) и ретровирусные векторы pFB-ERV плюс pCFB-EGSH компании Stratagene (La Jolla, CA).

Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотные последовательности по изобретению, могут быть доставлены в клетку в том же самом векторе (т.е. в *цис*-положении). Для контроля экспрессии каждой последовательности нуклеиновой кислоты можно использовать однонаправленный промотор. В другом варианте осуществления для контроля экспрессии множества последовательностей нуклеиновых кислот можно использовать комбинацию двунаправленных и однонаправленных промоторов. В качестве альтернативы, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности по изобретению, могут быть доставлены в популяцию клеток на отдельных векторах (т.е. в *транс*-положении). Каждая из последовательностей нуклеиновых кислот в каждом отдельном векторе может содержать одинаковые или различные последовательности контроля экспрессии. Отдельные векторы могут доставляться в клетки одновременно или последовательно.

Вектор (векторы), содержащий нуклеиновую кислоту (кислоты), кодирующую аминокислотные последовательности по изобретению, может быть введен в клетку-хозяина, которая способна экспрессировать кодируемые таким образом полипептиды, включая любую подходящую прокариотическую или эукариотическую клетку. Таким образом, изобретение относится к изолированной клетке, содержащей вектор по изобретению. Предпочтительными клетками-хозяевами являются клетки, процесс выращивания которых является легким и дает гарантированный результат, которые отличаются достаточно быстрой скоростью роста, имеют хорошо изученную систему экспрессии и могут быть легко трансформированы или трансфицированы.

Примеры подходящих прокариотических клеток включают, без ограничения, клетки представителей родов *Bacillus* (такие как *Bacillus subtilis* и *Bacillus brevis*), *Escherichia* (такие как *E. coli*), *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Salmonella* и *Erwinia*. Наиболее подходящие прокариотические клетки включают различные штаммы *Escherichia coli* (например, K12, HB101 (ATCC № 33694), DH5 α , DH10, MC1061 (ATCC № 53338) и CC102).

Вектор предпочтительно вводят в эукариотическую клетку. Подходящие эукариотические клетки известны в данной области и включают, например, клетки дрожжей, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Примерами подходящих дрожжевых клеток являются клетки представителей родов *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhino-sporidium*, *Saccharomyces* и *Schizosaccharomyces*.

Предпочтительные дрожжевые клетки включают, например, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

Подходящие клетки насекомых описаны, например, в Kitts et al., *Biotechniques*, 14: 810-817 (1993); Lucklow, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4: 564-572 (1993); и Lucklow et al., *J. Virol.*, 67: 4566-4579 (1993). Предпочтительные клетки насекомых включают Sf-9 и HI5 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

В настоящем изобретении предпочтительно используют клетки млекопитающих. В данной области техники известно несколько подходящих клеток-хозяев млекопитающих, и многие из них можно приобрести в Американской коллекции типовых культур (ATCC, Manassas, VA). Примеры подходящих клеток млекопитающих включают, без ограничения, клетки яичника китайского хомячка (CHO) (ATCC No. CCL61), CHO DHFR-клетки (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 4216-4220 (1980)), клетки почки человеческого эмбриона (HEK) 293 или 293T (ATCC № CRL1573) и клетки 3T3 (ATCC № CCL92). Другие подходящие линии клеток млекопитающих включают линии клеток COS-1 (ATCC № CRL1650) и COS-7 (ATCC № CRL1651) обезьян, а также линию клеток CV-1 (ATCC № CCL70). Другие приводимые в качестве примера клетки-хозяева млекопитающих включают линии клеток приматов и линии клеток грызунов, включая линии трансформированных клеток. Подходящими также являются нормальные диплоидные клетки, клеточные штаммы, полученные *in vitro* из культуры первичной ткани, а также первичные экспланты. Другие подходящие линии клеток млекопитающих включают, без ограничения, клетки N2A мышинной нейробластомы, HeLa, мышинные L-929 клетки и клеточные линии BHK или HaK хомяков, которые доступны из ATCC. Способы выбора подходящих клеток-хозяев млекопитающих и способы трансформации, культивирования, амплификации, скрининга и очистки клеток известны в данной области.

В одном из вариантов осуществления клетки млекопитающих представляют собой человеческие клетки. Например, клетка млекопитающего может быть линией лимфоидных клеток человека или может быть получена из лимфоидной линии клеток, такой как линия клеток, полученная из пре-B-лимфоцитов. Примеры линий лимфоидных клеток человека включают, без ограничения, RAMOS (CRL-1596), Daudi (CCL-213), EB-3 (CCL-85), DT40 (CRL-2111), 18-81 (Jack et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 1581-1585 (1988)), клетки Raji (CCL-86), клетки PER.C6 (Crucell Holland BV, Leiden, The Netherlands) и их производные.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность по изобретению, может быть введена в клетку путем "трансфекции", "трансформации" или "трансдукции". "Трансфекция", "трансформация" или "трансдукция", как используется в настоящем изобретении, относятся к введению одного или нескольких экзогенных полинуклеотидов в клетку-хозяина посредством физических или химических методов. В данной области техники известно множество методов трансфекции, которые включают, например, соосаждение ДНК с фосфатом кальция (см., например, Murtagh EJ (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, *Gene Transfer and Expression Protocols*, Humana Press (1991)); ДЭАЭ-декстран; электропорацию; трансфекцию с помощью катионных липосом; бомбардировку микро-

частицами вольфрама (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); и соосаждение ДНК с фосфатом стронция (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)). Фаговые или вирусные векторы могут быть введены в клетки-хозяева после роста инфекционных частиц в подходящих упаковывающих клетках, многие из которых являются коммерчески доступными.

Изобретение относится к композиции, содержащей эффективное количество полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина по изобретению, полипептида легкой цепи иммуноглобулина по изобретению, LAG-3-связывающего агента по изобретению, последовательности нуклеиновой кислоты по изобретению, кодирующей любую из вышеперечисленного, или вектор по изобретению, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению. Предпочтительно композиция представляет собой фармацевтически приемлемую (например, физиологически приемлемую) композицию, которая содержит носитель, предпочтительно фармацевтически приемлемый (например, физиологически приемлемый) носитель и аминокислотные последовательности по изобретению, антигенсвязывающий агент или вектор. В контексте изобретения можно использовать любой подходящий носитель, причем такие носители хорошо известны в данной области. Выбор носителя определяется, в частности, конкретным участком, в который может быть введена композиция, и конкретным методом, используемым для ее введения. Композиция необязательно должна быть стерильной. Композицию можно заморозить или лиофилизировать для хранения, а перед использованием восстановить в подходящем стерильном носителе. Композиции можно получать обычными способами, описанными, например, в Remington: *Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001).

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения расстройства у млекопитающего, чувствительным к ингибированию или нейтрализации LAG-3. Способ включает введение вышеупомянутой композиции млекопитающему, страдающему расстройством, чувствительным к ингибированию или нейтрализации LAG-3, что способствует лечению расстройства у млекопитающего. Расстройство, которое является "чувствительным к ингибированию LAG-3" или "чувствительным к нейтрализации LAG-3", относится к любому заболеванию или расстройству, при котором снижение уровня или активности LAG-3 оказывает благоприятное терапевтическое воздействие на млекопитающих, предпочтительно людей, или ненадлежащая экспрессия (например, избыточная экспрессия) или повышенная активность LAG-3 вызывает или приводит к патологическим эффектам этого заболевания или расстройства.

Расстройства, чувствительные к ингибированию LAG-3, включают, например, рак и инфекционные заболевания. Способ по изобретению может быть использован для лечения любого типа рака, известного в данной области, такого как, например, меланома, почечно-клеточная карцинома, рак легких, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак желчного пузыря, рак гортани, рак печени, рак щитовидной железы, рак желудка, рак слюнных желез, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы или карцинома клеток Меркеля (см., например, Bhatia et al., *Curr. Oncol. Rep.*, 13 (6): 488-497 (2011)). Способ по изобретению может быть использован для лечения инфекционного заболевания любого типа (т.е. заболевания или расстройства, вызванного бактериями, вирусами, грибами или паразитами). Примеры инфекционных заболеваний, которые можно лечить способом по изобретению, включают, без ограничения, заболевания, вызванные вирусом иммунодефицита человека (HIV), респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), вирусом гриппа, вирусом денге, вирусом гепатита В (HBV) или вирусом гепатита С (HCV)). Введение композиции, содержащей полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина по изобретению, полипептид легкой цепи иммуноглобулина по изобретению, LAG-3-связывающий агент по изобретению, последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению, кодирующую любое из вышеперечисленного, или вектор по изобретению, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению, индуцирует иммунный ответ против рака или инфекционного заболевания у млекопитающего. "Иммунный ответ" может привести, например, к образованию антител и/или к активации иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток).

Термины "лечение", "процесс лечения" и т.п., как используется в настоящем описании, относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Предпочтительно эффект является терапевтическим, т.е. эффект приводит к частичному или полному излечению заболевания и/или неблагоприятных симптомов, свойственных данному заболеванию. С этой целью способ по изобретению включает введение "терапевтически эффективного количества" LAG-3-связывающего агента. "Терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному при дозировках и в течение периода времени, необходимому для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может меняться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и вес индивидуума, а также способности LAG-3-связывающего агента вызывать желаемый ответ у индивидуума. Например, терапевтически эффективное количество LAG-3-связывающего агента по изобретению представляет собой количество, которое снижает биологическую активность LAG-3 у человека.

Альтернативно фармакологический и/или физиологический эффект может быть профилактическим, т.е. эффект полностью или частично предотвращает развитие заболевания или появление его симптомов. В этом случае способ по изобретению включает введение "профилактически эффективного количества" LAG-3-связывающего агента. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эф-

фективному при дозировках и в течение периода времени, необходимому для достижения желаемого профилактического результата (например, предупреждения начала заболевания).

Типичная доза может находиться, например, в пределах от 1 пг/кг до 20 мг/кг общего веса тела животного или человека; однако дозы ниже или выше этого интервала, приведенного в качестве примера, входят в объем настоящего изобретения. Ежедневная парентеральная доза может составлять от примерно 0,00001 мкг/кг до примерно 20 мг/кг общего веса тела (например, примерно 0,001 мкг/кг, примерно 0,1 мкг/кг, примерно 1 мкг/кг, примерно 5 мкг/кг, примерно 10 пг/кг, примерно 100 пг/кг, примерно 500 пг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 5 мг/кг, примерно 10 мг/кг или в интервале, определенном любыми двумя из вышеприведенных значений), предпочтительно от примерно 0,1 мкг/кг до примерно 10 мг/кг общего веса тела (например, примерно 0,5 пг/кг, примерно 1 пг/кг, примерно 50 пг/кг, примерно 150 пг/кг, примерно 300 мкг/кг, примерно 750 пг/кг, примерно 1,5 мг/кг, примерно 5 мг/кг или в интервале, определенном любыми двумя из вышеперечисленных значений), более предпочтительно от примерно 1 пг/кг до 5 мг/кг общего веса тела (например, примерно 3 пг/кг, примерно 15 пг/кг, примерно 75 пг/кг, примерно 300 пг/кг, примерно 900 пг/кг, примерно 2 мг/кг, примерно 4 мг/кг или в интервале, определенном любыми двумя из вышеперечисленных значений) и еще более предпочтительно от примерно 0,5 до 15 мг/кг веса тела в сутки (например, примерно 1 мг/кг, примерно 2,5 мг/кг, примерно 3 мг/кг, примерно 6 мг/кг, примерно 9 мг/кг, примерно 11 мг/кг, примерно 13 мг/кг или в интервале, определенном любыми двумя из вышеперечисленных значений). Терапевтическую или профилактическую эффективность можно отслеживать путем периодической оценки пациентов, получающих лечение. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение может повторяться до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако можно использовать и другие схемы дозирования, которые также входят в объем настоящего изобретения. Необходимую дозу можно доставлять путем одного болюсного введения композиции, путем нескольких болюсных введений композиции или путем введения композиции в виде непрерывной инфузии.

Композиция, содержащая эффективное количество полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина по изобретению, полипептида легкой цепи иммуноглобулина по изобретению, LAG-3-связывающего агента по изобретению, последовательности нуклеиновой кислоты по изобретению, кодирующей любое из вышеперечисленного, или вектора по изобретению, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению можно вводить млекопитающему стандартными методами введения, включая пероральное, внутривенное, внутривнутрибрюшинное, подкожное, легочное, трансдермальное, внутримышечное, интраназальное, буккальное, сублингвальное введение или введение суппозитория. Композиция предпочтительно подходит для парентерального введения. Используемый в настоящем описании термин "парентеральный" включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. Более предпочтительно композицию вводят млекопитающему при помощи периферической системной доставки путем внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

После введения млекопитающему (например, человеку с кросс-реактивным ответом) биологическую активность LAG-3-связывающего агента по изобретению можно измерить любым подходящим способом, известным в данной области. Например, биологическую активность можно оценить путем определения стабильности конкретного LAG-3-связывающего агента. В одном из вариантов осуществления изобретения LAG-3-связывающий агент (например, антитело) имеет период полувыведения *in vivo* в интервале от примерно 30 мин до 45 дней (например, примерно 30 мин, примерно 45 мин, примерно 1 ч, примерно 2 ч, примерно 4 ч, примерно 6 ч, примерно 10 ч, примерно 12 ч, примерно 1 день, примерно 5 дней, примерно 10 дней, примерно 15 дней, примерно 25 дней, примерно 35 дней, примерно 40 дней, примерно 45 дней или в интервале, определенном любыми двумя из вышеперечисленных значений). В другом варианте осуществления изобретения LAG-3-связывающий агент имеет период полувыведения *in vivo* в интервале от примерно 2 ч до 20 дней (например, примерно 5 ч, примерно 10 ч, примерно 15 ч, примерно 20 ч, примерно 2 дня, примерно 3 дня, примерно 7 дней, примерно 12 дней, примерно 14 дней, примерно 17 дней, примерно 19 дней или в интервале, определенном любыми двумя из вышеперечисленных значений). В другом варианте осуществления изобретения LAG-3-связывающий агент имеет период полувыведения *in vivo* в интервале от примерно 10 дней до примерно 40 дней (например, примерно 10 дней, примерно 13 дней, примерно 16 дней, примерно 18 дней, примерно 20 дней, примерно 23 дня, примерно 26 дней, примерно 29 дней, примерно 30 дней, примерно 33 дня, примерно 37 дней, примерно 38 дней, примерно 39 дней, примерно 40 дней или в интервале, определенном любыми двумя из вышеперечисленных значений).

Биологическую активность конкретного LAG-3-связывающего агента также можно оценить путем определения его сродства связывания с LAG-3 или его эпитопом. Термин "сродство" относится к константе равновесия обратимого связывания двух агентов и выражается в виде константы диссоциации (K_D). Сродство связывающего агента к лиганду, такое как сродство антитела к эпитопу, может находиться в пределах, например, от примерно 1 пмоль (пМ) до примерно 100 мкмоль (мМ) (например, от примерно 1 пмоль (пМ) до примерно 1 нмоль (нМ), от примерно 1 нМ до примерно 1 мкМ или от примерно 1 мкМ до примерно 100 мкМ). В одном из вариантов осуществления LAG-3-связывающий агент может связываться с белком LAG-3 с K_D , меньшим или равным 1 нмоль (например, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ,

0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 пМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ, 0,025 нМ, 0,01 нМ, 0,001 нМ или в интервале, определенном любыми двумя из вышеперечисленных значений). В одном из вариантов осуществления LAG-3-связывающий агент может связываться с белком LAG-3 с K_D , меньшим или равным 200 пМ (например, 190 пМ, 175 пМ, 150 пМ, 125 пМ, 110 пМ, 100 пМ, 90 пМ, 80 пМ, 75 пМ, 60 пМ, 50 пМ, 40 пМ, 30 пМ, 25 пМ, 20 пМ, 15 пМ, 10 пМ, 5 пМ, 1 пМ или в интервале, определенном любыми двумя из вышеперечисленных значений). Сродство к иммуноглобулина к представляющему интерес антигену или эпитопу можно измерить, используя любой известный в данной области анализ. К таким методам относятся, например, сортировка активированных флуоресценцией клеток (FACS), отделяемые гранулы (например, магнитные гранулы), поверхностный плазмонный резонанс (SPR), конкуренция в жидкой фазе (KINEXA™), пэннинг антигенов и/или ELISA (см., например, Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th ed., Garland Publishing, New York, NY, 2001).

LAG-3-связывающий агент по изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с другими лекарственными средствами (например, в виде адъюванта). Например, LAG-3-связывающий агент можно вводить в комбинации с другими агентами для лечения или профилактики раскрытых в настоящем описании заболеваний. В этом случае, LAG-3-связывающий агент можно использовать в комбинации, с по меньшей мере одним другим противораковым средством, включая, например, любой известный в данной области химиотерапевтический агент, ионизирующее излучение, противоопухолевые малые молекулы, противораковые вакцины, биологические методы лечения (например, другие моноклональные антитела, вирусы, убивающие раковые клетки, генную терапию и адоптивный перенос Т-клеток) и/или операцию. Когда инфекционное заболевание лечат способом по изобретению, связывающий LAG-3 агент можно вводить в комбинации с по меньшей мере одним антибактериальным агентом или с по меньшей мере одним противовирусным агентом. В этом случае, антибактериальный агент может быть любым подходящим антибиотиком, известным в данной области. Антивирусный агент может представлять собой любую вакцину любого подходящего типа, которая специфически нацелена на конкретный вирус (например, живые аттенуированные вакцины, субъединичные вакцины, рекомбинантные векторные вакцины и методы антивирусной терапии малыми молекулами (например, ингибиторами вирусной репликации и аналогами нуклеозидов).

В другом варианте осуществления изобретения LAG-3-связывающий агент можно вводить в комбинации с другими агентами, которые ингибируют иммунные контрольные точки. Например, LAG-3-связывающий агент по изобретению можно вводить в комбинации с агентами, которые ингибируют или противодействуют запрограммированной гибели 1 (PD-1), с белком, содержащим Т-клеточный домен иммуноглобулина и домен-3 муцина (TIM-3), и белком 4, ассоциированным с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4). Комбинированные методы лечения, которые одновременно нацелены на две или более из этих иммунных контрольных точек, показали более высокую и потенциально синергическую противоопухолевую активность (см., например, Sakuishi et al., *J. Exp. Med.*, 207: 2187-2194 (2010); Ngiew et al., *Cancer Res.*, 71: 3540-3551 (2011), и Woo et al., *Cancer Res.*, 72: 917-927 (2012)). В одном из вариантов осуществления изобретения LAG-3-связывающий агент вводят в комбинации с антителом, которое связывается с TIM-3, и/или антителом, которое связывается с PD-1. В этом случае заявленный способ лечения рака или инфекционного заболевания у млекопитающего может дополнительно включать введение млекопитающему композиции, содержащей (i) антитело, которое связывается с белком TIM-3, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель, или композицию, содержащую (i) антитело, которое связывается с белком PD-1, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

В дополнение к терапевтическим применениям раскрытый в настоящем описании LAG-3-связывающий агент можно использовать в целях диагностики или в практических исследованиях. В этом случае LAG-3-связывающий агент можно использовать в методе диагностики расстройства или заболевания, при котором ненадлежащая экспрессия (например, избыточная экспрессия) или повышенная активность LAG-3 вызывает или приводит к патологическим эффектам заболевания или расстройства. Аналогичным образом LAG-3-связывающий агент можно использовать в анализах для отслеживания уровней белка LAG-3 у испытуемого, проходящего тестирование на наличие заболевания или расстройства, чувствительного к ингибированию LAG-3. Применение в практических исследованиях включает, например, способы, в которых используются LAG-3-связывающий агент и метка для обнаружения белка LAG-3 в образце, например, в жидкости организма человека или в клеточном или тканевом экстракте. LAG-3-связывающий агент может быть немодифицированным или иметь модификацию, такую как ковалентное или нековалентное связывание с меткой, содержащей детектируемый фрагмент. Например, детектируемый фрагмент может представлять собой радиоизотоп (например, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I), флуоресцентное или хемилюминесцентное соединение (например, изотиоцианат флуоресцеина, родамин или люциферин), фермент (например, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или пероксидазу хрена) или протезные группы. В контексте изобретения можно использовать любой способ, известный в данной области техники, применяемый для конъюгации антигенсвязывающего агента (например, антитела) с детектируемым фрагментом (см., например, Hunter et al., *Nature*, 194: 495-496 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, 40: 219-230 (1981); and Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407-412 (1982)).

Уровни белка LAG-3 могут быть измерены с помощью LAG-3-связывающего агента по изобретению любым подходящим способом, известным в данной области. К таким способам относятся, например, радиоиммунологический анализ (RIA) и FACS. Нормальные или стандартные уровни экспрессии LAG-3 могут быть определены любым подходящим методом, например, путем объединения образца, содержащего или с подозрением на то, что он содержит LAG-3, с LAG-3-специфическим антителом в условиях, подходящих для образования комплекса антиген-антитело. Антитело прямо или опосредованно помечают детектируемым веществом для облегчения обнаружения связанного или несвязанного антитела. Подходящие детектируемые вещества включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества и радиоактивные вещества (см., например, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987)). Затем количество полипептида LAG-3, экспрессируемого в образце, сравнивают со стандартным значением.

LAG-3-связывающий агент может предоставляться в наборе, т.е. в упакованной комбинации реагентов в заранее определенных количествах с инструкциями для проведения диагностического анализа. Если LAG-3-связывающий агент помечен ферментом, набор предпочтительно включает необходимые для фермента субстраты и кофакторы (например, предшественник субстрата, который обеспечивает детектируемый хромофор или флуорофор). Кроме того, в набор могут быть включены другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или буфер для лизиса) и т.п. Относительные количества различных реагентов могут варьировать для обеспечения в растворе концентраций реагентов, которые по существу оптимизируют чувствительность анализа. Реагенты могут быть представлены в виде сухих порошков (обычно лиофилизированных), включая наполнители, которые при растворении обеспечивают раствор реагента с соответствующей концентрацией.

Приведенные ниже примеры являются дополнительной иллюстрацией изобретения, при этом их не следует толковать как ограничивающие каким-либо образом объем изобретения.

Пример 1.

В этом примере показан способ получения моноклональных антител, направленных против LAG-3 человека.

Выполняли слияние гена, кодирующего внеклеточный домен (ECD) LAG-3 человека либо с мышиным IgG2a (huLAG-3 mIgG2a Fc), либо с инактивированной формой флуоресцентного белка wasabi (dWFP huLAG-3) с получением антигена, используемого для иммунизации мышей и скрининга гибридомы. В частности, приобретали самок мышей Swiss Webster (SWR) в компании Harlan Laboratories, Inc. (Indianapolis, IN), которых делили на две группы. Через шесть дней акклиматизации одну группу животных иммунизировали четырьмя-шестью дозами очищенного huLAG-3 mIgG2a Fc в количестве 50 мкг/мышь с интервалом от трех до четырех недель, используя полный адъювант Фрейнда (CFA) или неполный адъювант Фрейнда (IFA). Второй группе животных вводили от четырех до шести инъекций huLAG-3 mIgG2a Fc или dWFP huLAG-3 ECD поочередно с интервалами от трех до четырех недель. В качестве адъюванта во второй группе также использовали CFA или IFA. У животных брали кровь для измерения титра LAG-3 человека в сыворотке, который определяли путем связывания с LAG-3 человека на клеточной поверхности. Клетки CHO-S трансфицировали полноразмерным внеклеточным доменом LAG-3 человека, слитым с трансмембранным доменом H-2Kk (клетки CHO-S huLAG-3 ECD). Сыворотку разбавляли в отношении от 1:1000 до 1:1000000 и инкубировали с клетками CHO-S huLAG-3 ECD в течение 30 мин при 4°C. Клетки центрифугировали, промывали один раз PBS/1% BSA и инкубировали с PE-конъюгированными (Southern Biotech, Birmingham, Alabama) или козьими антимышиными IgG (H+L), меченными ALEXAFLUOR™ 647 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), в течение 30 мин при 4°C. Клетки дважды промывали PBS/1% BSA, ресуспендировали в PBS/1% BSA и анализировали на биоанализаторе BD FACSAARRAY™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Исходя из значений титра, одному животному из каждой группы вводили бустерную дозу за 3 дня до взятия селезенки. Из ткани селезенки получали одноклеточные суспензии и использовали для получения гибридом путем слияния клеток стандартными методами. Для слияния использовали две различные клеточные линии миеломы, F0 (описанные в de St. Groth and Scheidegger, *J. Immunol. Methods*, 35: 1-21 (1980)) и P3X63Ag8.653 (описанную Kearney et al., *J. Immunol.*, 123: 1548-1550 (1979)).

Супернатанты гибридом подвергали скринингу на связывание с клетками CHO-S huLAG-3 ECD и сравнивали со связыванием с описанными выше нетрансфицированными клетками CHO-S. Исходя из величины связывания с клетками CHO-S huLAG-3 ECD, гибридомы переносили в 48-луночные планшеты и размножали.

Затем супернатанты тестировали на способность блокировать связывание huLAG-3 mIgG2a Fc, меченного DyL650 (huLAG-3 mIgG2a Fc DyL650), с клетками Daudi, которые представляют собой линию В-клеток, эндогенно экспрессирующих высокие уровни МНСII (рецептор LAG-3). Кратко, huLAG-3 mIgG2a Fc DyL650 предварительно инкубировали с контрольным IgG или античеловеческими LAG-3-моноклональными антителами-кандидатами перед добавлением к клеткам Daudi. Блокирование измеряли по уменьшению флуоресценции в клетках Daudi при помощи биоанализатора BD FACS ARRAY™. Затем эти гибридомы субклонировали и высевали на чашку Петри для получения достаточного количества на-

досадочной жидкости. Затем антитела очищали и повторно тестировали для подтверждения связывания с клетками CHO-S huLAG-3 ECD и блокирующей способности в анализе с клетками Daudi.

Результаты этого примера подтверждают получение анти-LAG-3 моноклональных антител с помощью метода создания клеточных гибридом.

Пример 2.

В этом примере показано конструирование и получение CDR-привитых и химерных анти-LAG-3 моноклональных антител.

Антитела из гибридом, описанные в примере 1, изотипировали, методом ОТ-ПЦР клонировали вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и вариабельную область легкой цепи (V_L) антитела и секвенировали. В частности, РНК выделяли из клеточных осадков гибридных клонов (1×10^6 клеток/осадок) с помощью набора RNEASY™ (Qiagen, Venlo, Netherlands), и получали кДНК с помощью олиго-dT-праймированной системы синтеза SUPERScript™ III First-Strand Synthesis (Life Technologies, Carlsbad, CA). В ПЦР-амплификации V_L использовали пул мышинных выродженных прямых праймеров V_L (см. Kontermann and Dubel, eds., *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, Berlin (2001)) и обратный праймер мышинной константной области κ . В ПЦР-амплификации V_H использовали пул мышинных выродженных прямых праймеров V_H (Kontermann и Dubel, см. выше) и обратный праймер мышинной константной области $\gamma 1$ или $\gamma 2a$ (на основе изотипирования очищенного антитела из каждого клона) согласно протоколу, рекомендованному системой SUPERScript™ III First-Strand Synthesis (Life Technologies, Carlsbad, CA). Продукты ПЦР очищали и клонировали в pcDNA3.3-TOPO (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Из каждого клеточного осадка отбирали отдельные колонии и секвенировали стандартным методом секвенирования Сэнгера (Genewiz, Inc., South Plainfield, NJ).

Последовательности вариабельной области исследовали и выравнивали с наиболее близкой последовательностью V-области тяжелой цепи или легкой цепи зародышевой линии человека. Для CDR-прививки выбирали три антитела, которые обозначили (1) 5.B11, (2) 5.D7 и (3) 1.E10.

Последовательности CDR-привитых антител конструировали путем клонирования CDR-остатков из каждого из описанных выше мышинных антител в ближайший гомолог зародышевой линии человека. Вариабельные области CDR-привитых антител синтезировали и для анализа выполняли экспрессию с константными областями IgG1/ κ человека. Кроме того, были сконструированы химерные антитела мышь:человек с использованием вариабельных областей описанных выше мышинных антител, связанных с константными областями IgG1/ κ человека. Получали характеристику химерных и CDR-привитых антител в отношении их связывания с клетками CHO-S huLAG-3 ECD и активности в анализе блокады LAG-3 ECD/Daudi, как описано выше.

Функциональную антагонистическую активность химерных и CDR-привитых антител также тестировали в анализе реакции лимфоцитов (MLR) в смешанной культуре CD4+ Т-клетки:дендритные клетки человека, в котором оценивали активацию CD4+ Т-клеток в присутствии анти-LAG-3 антител путем измерения секреции IL-2. Поскольку LAG-3 является негативным регулятором функции Т-клеток, предполагалось, что антагонизм LAG-3 приведет к увеличенной активации Т-клеток, измеряемой по увеличению продуцирования IL-2. CDR-привитые антитела 5.B11, 5.D7 и 1.E10 продемонстрировали антагонистическую активность в анализе MLR, измеренную по увеличению активности IL-2.

Результаты этого примера демонстрируют способ получения химерных и CDR-привитых моноклональных антител, которые специфически связываются с LAG-3 и ингибируют их.

Пример 3.

В этом примере показано созревание сродства моноклональных антител, направленных против LAG-3 человека.

Обеспечивали созревание сродства CDR-привитых антител, полученных из двух исходных мышинных моноклональных антител, описанных в примере 2, 5.D7 и 1.E10, посредством *in silico* соматической гипермутации (iSHM). Этот метод включает мутации, предсказанные методом компьютерного анализа путем сравнения последовательностей *in vivo* созревших антител, загруженных из NCBI, и сравнения их с последовательностями IGHV, IGKV и IGLV человеческой зародышевой линии и их аллельными формами (как описано Bowers et al., *J. Biol. Chem.*, 288(11):7688-7696 (2013)). Методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) анализировали свойства связывания LAG-3 полученных антител, а также их способность связываться с клетками CHO-S huLAG-3 ECD, как описано ранее. Анализ сродства в растворе также выполняли, используя анализ KINEXA™ 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, Idaho), и результаты анализировали с помощью программного обеспечения KINEXA™ Pro 3.2.6. Экспериментальные параметры выбирали таким образом, чтобы максимальный сигнал обеспечиваемый только антителом находился в пределах от 0,8 до 1,2 В, при ограничении сигнала неспецифического связывания, обеспечиваемого только буфером, до менее 10% от максимального сигнала. Гранулы азлактона (50 мг) покрывали антигеном путем разбавления в растворе WFP-LAG-3 японского макака или человека (50 мкг/мл в 1 мл) в 50 мМ Na₂CO₃.

Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, гранулы осаждали в центрифуге рico и дважды промывали блокирующим раствором (10 мг/мл BSA, 1 М Трис-HCl, pH 8,0). Гранулы ре-

суспендировали в блокирующем растворе (1 мл), перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и разбавляли в 25 объемах PBS/0,02% NaN₃. Для измерения сродства в качестве вторичных антител использовали ALEXFLUOR™ 647 краситель-анти-человеческий IgG (500 нг/мл). Концентрации образцов антител поддерживали на постоянном уровне (50 пМ или 75 пМ), тогда как антиген WFP-LAG-3 человека или японского макака титровали, используя серию трехкратных разведений от 1 мкМ до 17 пМ. Все образцы разбавляли в PBS, 0,2% NaN₃, 1 мг/мл BSA и выдерживали в течение 30 ч при комнатной температуре для приведения в равновесное состояние. Кроме того, тестировали образцы, содержащие только антитело и только буфер, для определения максимального сигнала и сигнала неспецифического связывания, соответственно.

Термическую стабильность выбранных антител оценивали, используя термофлуоресцентный анализ, как описано в McConnell et al., *Protein Eng. Des. Sel.*, 26: 151 (2013). С помощью этого анализа оценивается стабильность по способности гидрофобного флуоресцентного красителя связываться с гидрофобными участками на поверхности белка, которые обнажаются при разворачивании белка. Температура, при которой белок разворачивается на 50% (T_m), определяется для измерения термической стабильности. Этот анализ показал, что варианты моноклонального антитела 5.D7 имеют приемлемую температуру плавления (T_ms) (т.е. выше 70°C), которая подходит для разработки лекарственного средства.

Снижение рисков возникновения потенциальных проблем, связанных с *in vivo* фармакокинетическими характеристиками тестируемых антител, обеспечивали путем оценки неспецифического связывания с целевыми отрицательными клетками (см., например, Hotzel et al., *mAbs*, 4: 753-760 (2012)). Антитела тестировали в отношении их связывания с клетками HEK 293f, используя метод проточной цитометрии. Результаты показали низкое неспецифическое связывание антител 5.D7, которое может быть дополнительно устранено повторной очисткой.

Результаты этого примера подтверждают способ созревания сродства гуманизированных моноклональных антител, направленных против LAG-3.

Пример 4.

В этом примере показан способ идентификации антител, направленных против LAG-3 человека, полученных из созданной библиотеки.

Созданную IgG библиотеку, основанную на сегментах последовательности V-гена зародышевой линии, соединенных с рекомбинированными J(D) участками, полученными от доноров людей, получали, как описано у Bowers et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(51): 20455-20460 (2011). Тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC) IgG клонировали в отдельные эписомальные векторы (Horlick et al., *Gene*, 243 (1-2): 187-194 (2000)), где каждый вектор кодировал отдельный селектируемый антибиотиком маркер. Вектор HC сконструировали таким образом, чтобы антитело могло быть представлено как на поверхности клетки, так и могло секретироваться в тканевой культуральной среде (Horlick et al., *J. Biol. Chem.*, 288 (27): 19861-19869 (2013)). Выполняли совместную трансфекцию HC и LC в различных комбинациях в клетки HEK293, которые размножали до количества примерно 10⁹ клеток. Затем библиотеку клеток подвергали двум видам обработки, каждая из которых представляла собой отрицательный отбор только в отношении магнитных гранул, связанных со стрептовидином (SA) (№ 11047 по каталогу, Life Technologies, Carlsbad, CA), и в отношении магнитных гранул, связанных с SA и покрытых нерелевантным биотинилированным антигеном. Затем проводили одну обработку, представляющую собой положительный отбор с использованием либо магнитных гранул, покрытых непосредственно huLAG-3 mIgG2a Fc, либо магнитных гранул, связанных с SA и покрытых биотинилированным LAG-3 ECD mIgG1 Fc. Клетки, прошедшие положительный отбор, разбавляли и наносили а 96-луночный планшет с плотностью примерно 1-10 клеток/луночка. Полученные колонии размножали в дочерних планшетах и часть каждой популяции тестировали на связывание с LAG-3 ECD mIgG1 Fc DyL650 с помощью анализа FACSARRAY™. Антитела, секретированные в супернатант, также тестировали с помощью BIACORE™ на их способность связываться с LAG-3 ECD mIgG1 Fc.

Клетки, которые показали специфическое окрашивание prLAG-3 mIgG2a Fc DyL650 в анализе FACSARRAY™ и/или связывание в анализе BIACORE™, использовали для сортировки и подвергали секвенированию для получения специфических комбинаций HC/LC, способных связываться с LAG-3. Открытые рамки считывания (ORF), кодирующие HC и LC антител, обнаруженных в клеточных популяциях, амплифицировали методом ПЦР. В целом в результате секвенирования было обнаружено множество последовательностей HC/LC. В некоторых случаях нужные комбинации HC/LC идентифицировали путем увеличения концентрации клеток, экспрессирующих представляющие интерес моноклональные антитела, с помощью первой FACS сортировки, используя huLAG-3 mIgG2a Fc DyL650. Популяции клеток с высокой экспрессией антител и положительных в отношении связывания с huLAG-3 mIgG2a Fc DyL650 изолировали и затем подвергали анализу последовательностей. В целом идентифицировали 12 различных пар HC/LC в качестве потенциальных специфических анти-LAG-3 антител, подходящих для дальнейшего определения их характеристик. Эти стратегии обозначили как A1/A14, A2, A3/A17, A4/A19, A5/A16, A6, A8/A20, A9, A10/A15, A11, A12 и A13.

Антитела также охарактеризовали в отношении их способности связываться с белком LAG-3 яван-

ского макака (супо LAG-3). Поскольку эти антитела зародышевой линии, идентифицированные из библиотеки, показали слишком слабое связывание с антигеном, экспрессированным на клеточной поверхности, растворимый антиген, аналогичный человеческому антигену, помечали DyL650 (супоLAG-3 mIgG2a Fc DyL650), а затем инкубировали с клетками HEK293, демонстрирующими стратегии антител на клеточной поверхности. Было протестировано восемь стратегий антител, идентифицированных из созданной библиотеки, которые продемонстрировали способность связываться с супоLAG-3 ECD mIgG1 Fc.

Результаты этого примера подтверждают, что моноклональные антитела, направленные против LAG-3 человека и LAG-3, отличного от человеческого, могут быть идентифицированы с помощью разработанной библиотеки.

Пример 5.

В этом примере показано созревание сродства антител, направленных против LAG-3 человека, идентифицированных при помощи созданной библиотеки.

Стабильные клеточные линии, экспрессирующие одновременно HC и LC каждого антитела, идентифицированного из созданной библиотеки, описанной в примере 4, трансфицировали активационно-индуцированной цитидин дезаминазой (AID) для инициации *in vitro* SHM. AID также трансфицировали непосредственно в исходную смешанную популяцию клеток, размноженную после скрининга библиотеки. Во всех случаях популяции клеток окрашивали как для определения экспрессии IgG, так и для определения связывания с антигеном, собирали методом проточной цитометрии в виде общей популяции, а затем размножали для анализа последовательности путем секвенирования нового поколения (NGS). Этот процесс повторяли итеративно для накопления мутаций SHM в переменных областях как тяжелой, так и легкой цепей и их производных для каждой стратегии. Улучшение сродства отслеживали с помощью (1) SPR, (2) способности связываться с клетками CHO-S huLAG-3 ECD и (3) активности в анализе MLR. По мере улучшения сродства каждого антитела, строгость отбора увеличивали до достижения целевого сродства путем идентификации и рекомбинации новых мутаций.

Термическую стабильность выбранных антител оценивали с помощью ThermoFluor анализа, как описано выше. Этот анализ показал, что выбранные моноклональные антитела из стратегии A₁₇ имеют приемлемые значения T_m, которые подходят для разработки лекарственного средства. Антитела также тестировали в отношении их связывания с клетками HEK 293f, используя метод проточной цитометрии. Результаты показали низкое неспецифическое связывание у выбранных кандидатов A₁₇.

Выбранные антитела тестировали на способность блокировать связывание huLAG-3 mIgG2a Fc, меченного DyL650 (huLAG-3 mIgG2a Fc DyL650), с клетками Daudi, как описано выше. Дозу нейтрализующих антител предварительно инкубировали с растворимым LAG-3 и анализировали методом проточной цитометрии. Некоторые аффинно-зрелые антитела против LAG-3 полностью ингибировали взаимодействие растворимого LAG-3 с МНСII.

Результаты этого примера подтверждают способ созревания сродства моноклональных антител, направленных против LAG-3, идентифицированных с помощью разработанной библиотеки.

Пример 6.

В этом примере показано, что моноклональное анти-LAG-3 антитело по изобретению может ингибировать передачу сигналов LAG-3 и усиливать активацию Т-клеток *in vitro*, как отдельно, так и в комбинации с анти-PD-1 антителом или анти-TIM-3 антителом.

Чтобы установить параметры для изучения комбинации анти-LAG-3 и анти-PD-1 антител, анти-PD-1 антитело APE02058 титровали для определения вызывающей эффект дозы в CD4⁺ Т-клетках человека с помощью MLR анализа, как описано выше. На основании результатов титрования анти-PD-1 антител в нескольких анализах MLR были выбраны количества 133 пМ (приблизительно, равное EC₅₀) и 13 пМ (приблизительно равное EC₁₀) для тестирования комбинации с целью изучения антагониста с анти-LAG-3 моноклональным антителом. В комбинации с анти-PD-1 в количестве 133 пМ или 13,3 пМ значение EC₅₀ анти-LAG-3 моноклонального антитела уменьшилось с 690 пМ (только анти-LAG-3) до 40 пМ (+133 пМ анти-PD-1) или до 200 пМ (+13,3 мкМ анти-PD-1), что представляло собой соответственно 17-кратное и 3-кратное увеличение эффективности.

Для определения параметров для изучения комбинации анти-LAG-3 и анти-TIM-3 антител, анти-LAG-3-антитело APE05505 титровали для определения вызывающей эффект дозы в CD4⁺ Т-клетках человека с помощью MLR анализа, как описано выше. На основании результатов титрования анти-LAG-3 антитела в нескольких анализах MLR, были выбраны количества 2 нМ (равное, приблизительно EC₅₀) и 0,2 нМ (равное приблизительно EC₁₀) для тестирования в комбинации с целью изучения антагониста с анти-TIM-3 моноклональным антителом. В комбинации с анти-LAG-3 в количестве 2 нМ или 0,2 нМ значение EC₅₀ анти-LAG-3 mAb уменьшилось с 11 нМ (только анти-LAG-3) до 6 нМ (+0,2 нМ анти-TIM-3) или до 3 нМ (+2 нМ анти-TIM-3), что представляло собой соответственно 1,8-кратное и 3,6-кратное увеличение эффективности.

Результаты этого примера показывают, что LAG-3-связывающий агент по изобретению может ингибировать биологическую активность LAG-3 как отдельно, так и в комбинации с антагонистами других негативных регуляторов иммунной системы.

Пример 7.

В этом примере показано, что анти-LAG-3 моноклональное антитело по изобретению может ингибировать LAG-3 сигнальный путь и усиливать активацию Т-клеток *in vivo* в комбинации с анти-PD-1 антителом.

Активность антимышиного LAG-3 суррогатного моноклонального антитела (mAb C9B7W, BioXcell, West Lebanon, New Hampshire) тестировали отдельно или в комбинации с антимышиным PD-1 суррогатным моноклональным антителом (mAb RMP1-14, BioXcell, West Lebanon, New Hampshire) в модели сингенной опухоли MC38. Группе из десяти животных вводили подкожно с помощью инъекции 1×10^6 клеток MC38. Через десять дней после инокуляции животные были рандомизированы по размеру опухоли. Мышам вводили 5 мг/кг анти-PD-1 моноклонального антитела и/или 10 мг/кг анти-LAG-3 моноклонального антитела в дни 1, 4, 8 и 11, всего четыре дозы каждого антитела или комбинации антител. Опухоли измеряли два раза в неделю для оценки ответа на лечение. Комбинация анти-PD-1+анти-LAG-3 оказалась более эффективной в отношении уменьшения роста опухоли по сравнению с каждым агентом, вводимым по отдельности. В группе, получавшей комбинацию, наблюдали полный ответ у всех десяти животных по сравнению с семью животными в группе, получавшей только PD-1, и отсутствием таких животных в группе, получавшей только анти-LAG-3. Девяти животным из группы, получавшей комбинацию, у которых наблюдали полный ответ, затем повторно инокулировали подкожно 4×10^6 клеток MC38. Ни у одного из животных в группе, получившей повторную инокуляцию, не обнаружили измеряемую опухоль, тогда как у всех контрольных интактных мышей, которым вводили такое же количество клеток, обнаружили пальпируемую опухоль.

Активность суррогатных моноклональных антител, описанных выше, также тестировали по отдельности или в комбинации в модели сингенной опухоли Colon26. Мышам в группах из 12 животных вводили подкожно виде инъекции 5×10^5 клеток Colon26. Мышам вводили 10 мг/кг анти-PD-1-антитела и/или 10 мг/кг анти-LAG-3 антитела в дни 4, 7, 11 и 14, всего четыре дозы каждого антитела или комбинации антител. Опухоли измеряли два раза в неделю для оценки ответа на лечение. Комбинация анти-PD-1+анти-LAG-3 оказалась более эффективной в отношении роста опухоли по сравнению с каждым агентом, вводимым по отдельности. В группе, получавшей комбинацию, наблюдали полный ответ у 10 из 12 животных по сравнению с тремя животными в группе, получавшей только PD-1, и одним животным в группе, получавшей только анти-LAG-3. Девяти животным из группы, получавшей комбинацию, у которых наблюдали полный ответ, затем повторно инокулировали подкожно 5×10^5 клеток Colon26. Ни у одного из животных в группе, получившей повторную инокуляцию, не обнаружили измеряемую опухоль, тогда как у всех контрольных интактных мышей, которым вводили такое же количество клеток, обнаружили пальпируемую опухоль.

Результаты этого примера показывают, что LAG-3-связывающий агент по изобретению в комбинации с антагонистами других негативных регуляторов иммунной системы может ингибировать биологическую активность LAG-3 *in vivo*.

Пример 8.

В этом примере показан эффект изотипа антитела на противоопухолевую активность анти-LAG-3 антитела отдельно или в комбинации с анти-PD-1 антителом в модели сингенной мышинной опухоли.

Суррогатные антитела, распознающие мышинный LAG-3 изотипов IgG1 (D265A) и IgG2a, создавали после секвенирования и клонирования переменных областей противомышиных LAG-3 нейтрализующих антител (mAb C9B7W, BioXcell, West Lebanon, NH), используя гибридомную линию клеток крысы, и клонировали в вектор экспрессии IgG1 или IgG2a мыши. Затем эти антитела тестировали на эффективность как отдельно, так и в комбинации с мышинным IgG1 (D265A) суррогатным антителом, распознающим мышинный PD-1, аналогично полученными из антитела крысы, приобретенного у компании BioXcel (mAb RMP1-14, West Lebanon, NH). В частности, клетки аденокарциномы толстой кишки Colon26 (5×10^5 s.c.) имплантировали Balb/c мышам и выращивали в течение 3 дней. Мышей рандомизировали на семь групп по 12 животных в группе, и каждой мыши вводили дозу каждого антитела или комбинации антител в дни 4, 7, 11 и 14, как указано в таблице. Мыши, которым вводили антитела соответствующих изотипов, служили контролем. Объемы опухолей измеряли два раза в неделю до конца исследования.

Группа	Лечение	Доза
1	изотип IgG2a+изотип IgG1 (D265A)	10 мг/кг, 1 мг/кг
2	изотип IgG1 (D265A)	10 мг/кг
3	анти-mPD-1 IgG1 (D265A)	1 мг/кг
4	анти-mLAG-3 IgG2a	10 мг/кг
5	анти-mLAG-3 IgG1 (D265A)	10 мг/кг
6	анти-mPD-1 IgG1 (D265A) + анти-mLAG-3 IgG2a	1 мг/кг, 10 мг/кг
7	анти-mPD-1 IgG1 (D265A) + анти-mLAG-3 IgG1 (D265A)	1 мг/кг, 10 мг/кг

Результаты этого эксперимента показаны на фиг. 1А и 1В, согласно которым одноагентное противомышье LAG-3 антитело с минимальной эффекторной функцией (т.е. IgG1 (D265A)) имеет противомышью опухолевую эффективность по сравнению с противомышним LAG-3 антителом с эффекторной функцией (т.е. IgG2a), которое не оказывает заметного влияния на рост опухоли.

Кроме того, на фиг. 1А видно, что противомышье LAG-3 антитело с минимальной эффекторной функцией (т.е. IgG1 (D265A)), вводимое в комбинации противомышним PD-1 IgG1 (D265A) антителом, проявляло повышенную противоопухолевую активность, чем только противомышье PD-1 IgG1 (D265A) антитело. Однако противомышье LAG-3 антитело с интактной эффекторной функцией (IgG2a) в комбинации с противомышним PD-1 антителом оказалось менее эффективным, чем только противомышье PD-1 IgG1 (D265A) антитело, что указывает на возможную интерференцию эффекторной функции антитела с эффективностью, опосредованной противомышним PD-1.

На фиг. 1В представлены графики зависимости объема опухоли от времени для отдельных животных из группы лечения 3 (животных, которым вводили противомышье PD-1 IgG1 (D265A) антитело), группы 7 (комбинация противомышнего PD-1 IgG1 (D265A) антитела с противомышним LAG-3 IgG1 (D265A) антителом) и группы 6 (комбинация противомышнего PD-1 IgG1 (D265A) антитела с противомышним LAG-3 IgG2 антителом). В группе 7 (комбинация противомышнего PD-1 IgG1 (D265A) антитела с противомышним LAG-3 IgG1 (D265A) антителом) у 8/12 животных не был обнаружен заметный рост опухоли к концу исследования. Напротив, к концу исследования только у 3/12 животных из группы 6 (комбинация противомышнего PD-1 IgG1 (D265A) антитела с противомышним LAG-3 IgG2 антителом) не была обнаружена заметная опухоль. В группе 3 (только противомышье PD-1 IgG1 (D265A) антитело) у 6/12 животных не было опухоли к концу исследования, что предполагает возможную интерференцию эффекторной функции противомышнего LAG-3 IgG2 антитела, вводимого в комбинации с противомышним PD-1 IgG1 (D265A) антителом.

Результаты этого примера демонстрируют, что противомышные LAG-3 антитела и противомышные PD-1 антитела без эффекторной функции, вводимые по отдельности и в комбинации, могут ингибировать рост опухоли в мышинной модели сингенной опухоли. Эффективность отсутствовала в случае введения противомышнего LAG-3 антитела с эффекторной функцией, которое, тому же, может интерферировать с анти-PD-1-опосредованной эффективностью.

Пример 9.

В этом примере показано, что ингибирующая активность анти-LAG-3 моноклонального антитела по изобретению может отличаться от активности анти-PD-1 моноклонального антитела в реакции лимфоцитов в смешанной культуре в зависимости от времени сбора и коррелирует с экспрессией PD-1 и LAG-3.

Функциональное LAG-3 антитело-антагонист тестировали в анализе реакции CD4⁺ Т-клеток человека (MLR), в котором оценивали активацию CD4⁺ Т-клеток в присутствии анти-LAG-3 антител путем измерения секреции IL-2. Анти-LAG-3 антитело тестировали вместе с антагонистическим анти-PD-1 антителом, причем антитела добавляли и/или собирали в разные моменты времени. В частности, изолированные моноциты периферической крови от донора человека дифференцировали в дендритных клетках (DC), а затем смешивали с CD4⁺ Т-клетками, выделенными из второго донора. Ингибирующие антитела добавляли либо в начале совместного культивирования, либо через 24 ч после начала совместного культивирования. Уровни IL-2 измеряли через 24 и 48 ч после добавления антител.

Предполагалось, что антагонизм LAG-3 и PD-1 приведет к увеличенной активации Т-клеток, измеряемой по увеличению продуцирования IL-2. При добавлении в начале анализа, анти-PD-1-антитело увеличивало секрецию IL-2 как через 24, так и 48 ч после добавления антитела, тогда как анти-LAG-3 антитело увеличивало секрецию IL-2, измеренную через 48 ч в анализе MLR, но не через 24 ч. Когда ингибирующие анти-LAG-3 или анти-PD-1 антитела добавляли через 24 ч после начала совместного культивирования и сбора через 72 ч, оба антитела были активными, при этом оказалось, что оба антитела имеют

эквивалентные значения EC50 (фиг. 2A). Это коррелирует с экспрессией, поскольку повышенная экспрессия PD-1 наблюдается через 24-72 ч, тогда как LAG-3, согласно результатам анализа, экспрессируется позже через 48 и 72 ч (фиг. 2B).

Результаты этого примера демонстрируют, что эффекты ингибирования LAG-3 коррелируют с целевой экспрессией и что экспрессия LAG-3 происходит по времени позже, чем PD-1.

Все документы, включая публикации, заявки на патент и патенты, приведенные в настоящем описании, включены в описание путем ссылки, как если бы каждый документ был указана отдельно, как включенный в качестве ссылки, и полностью изложен в настоящем описании.

Использование единственного числа и словосочетания "по меньшей мере один" и аналогичных выражений в контексте описания изобретения (особенно в контексте приведенной ниже формулы изобретения) следует толковать как охватывающие как единственное, так и множественное число, если в настоящем описании не указано иное или не находится в явном противоречии с контекстом. Использование термина "по меньшей мере один", за которым следует список одного или нескольких элементов (например, "по меньшей мере один из А и В"), следует толковать как один элемент, выбранный из перечисленных элементов (А или В) или любой комбинации из двух или более перечисленных элементов (А и В), если не указано иное или не находится в явном противоречии с контекстом. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "состоящий" должны толковаться как открытые термины (т.е. означающие "включая, без ограничения"), если не указано иное. Указание в настоящем описании интервала значений предназначено для использования в качестве сокращенного способа указания каждого отдельного значения, попадающего в этот интервал, если не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было представлено в настоящем описании отдельно. Все раскрытые в настоящем описании способы могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если в настоящем описании не указано иное или находится в явном противоречии с контекстом. Использование любых и всех примеров или выражений (слов), относящихся к представлению в виде примера (например, "такой как"), приведенных в настоящем описании, предназначено исключительно для лучшего раскрытия изобретения и не является ограничением объема изобретения, если не указано иное. Ничто в настоящем описании не следует толковать как указание на какой-либо незаявленный элемент как являющийся существенным для практического осуществления изобретения.

В настоящем описании раскрыты предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, включая наилучший вариант осуществления, известный авторам изобретения. Изменения этих предпочтительных вариантов осуществления могут стать очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения вышеприведенного описания. Авторы изобретения предполагают, что специалисты в данной области будут использовать при необходимости такие изменения, и авторы изобретения допускают возможность осуществления настоящего изобретения иначе, чем, в частности, раскрыто в настоящем описании. Соответственно настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, указанного в прилагаемой формуле изобретения, как это разрешено применимым законодательством. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных вариантах входит в объем изобретения, если в описании не указано иное или не находится в явном противоречии с контекстом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ген-3 активации лимфоцитов (LAG-3)-связывающий агент, содержащий вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 SEQ ID NO: 88, и вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 SEQ ID NO: 182.
2. LAG-3-связывающий агент по п.1, содержащий вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 88; и вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 182.
3. LAG-3-связывающий агент по п.1 или 2, где область VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 88.
4. LAG-3-связывающий агент по любому из пп.1-3, где область VL содержит SEQ ID NO: 88.
5. LAG-3-связывающий агент по любому из пп.1-4, где область VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 182.
6. LAG-3-связывающий агент по любому из пп.1-5, где область VH содержит SEQ ID NO: 182.
7. LAG-3-связывающий агент по любому из пп.1-6, который представляет собой фрагмент антитела, выбранный из F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, scFv, dsFv, dAb и одноцепочечного связывающего полипептида.
8. LAG-3-связывающий агент по любому из пп.1-7, где LAG-3-связывающий агент содержит константную область IgG4.
9. LAG-3-связывающий агент по любому пп.1-8, где LAG-3-связывающий агент содержит Fc область с уменьшенной или подавленной эффекторной функцией.
10. Изолированная или очищенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая поли-

пептид тяжелой цепи иммуноглобулина и полипептид легкой цепи иммуноглобулина LAG-3-связывающего агента по любому из пп.1-9.

11. Изолированная или очищенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина LAG-3-связывающего агента по любому из пп.1-9.

12. Изолированная или очищенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид легкой цепи иммуноглобулина LAG-3-связывающего агента по любому из пп.1-9.

13. Вектор, содержащий изолированную или очищенную нуклеиновую кислоту по п.10.

14. Изолированная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп.10-12.

15. Изолированная клетка-хозяин, содержащая вектор по п.13.

16. Способ получения LAG-3-связывающего агента по любому из пп.1-9, включающий экспрессию в клетке одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, или экспрессию в клетке вектора по п.13.

17. Композиция для лечения заболевания, которое чувствительно к ингибированию LAG-3, у человека, содержащая (а) LAG-3-связывающий агент по любому из пп.1-9 и (б) фармацевтически приемлемый носитель.

18. Композиция по п.17, где заболевание представляет собой рак.

19. Композиция по п.17, где заболевание представляет собой инфекционное заболевание.

20. Применение LAG-3-связывающего агента по любому из пп.1-9 или композиции по п.17 для изготовления лекарственного средства для лечения рака, который чувствителен к ингибированию LAG-3.

21. Применение по п.20, где рак выбирают из меланомы, почечно-клеточной карциномы, рака легких, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака желчного пузыря, рака гортани, рака печени, рака щитовидной железы, рака желудка, рака слюнных желез, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы или карциномы клеток Меркеля.

22. Применение по п.20, где рак представляет собой рак толстой кишки.

23. Применение LAG-3-связывающего агента по любому из пп.1-9 или композиции по п.17 для изготовления лекарственного средства для лечения инфекционного заболевания, которое чувствительно к ингибированию LAG-3.

24. Применение по п.23, где инфекционное заболевание вызвано вирусами или бактериями.

25. Применение по п.24, где инфекционное заболевание вызывается вирусом иммунодефицита человека (HIV), респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), вирусом гриппа, вирусом денге или вирусом гепатита В (HBV).

26. Применение по любому из пп.20-25, где период полувыведения LAG-3-связывающего агента в организме млекопитающего составляет от 30 мин до 45 дней.

27. Применение по любому из пп.20-26, где LAG-3-связывающий агент связывается с LAG-3 с величиной K_D от примерно 1 пмоль (пМ) до примерно 1 нмоль (нМ).

28. Применение по любому из пп.20-27, где LAG-3-связывающий агент или композиция применяются в комбинации с PD-1-связывающим агентом.

29. Применение по любому из пп.20-27, где LAG-3-связывающий агент или композиция применяются в комбинации с TIM-3-связывающим агентом.

30. Способ лечения рака или инфекционного заболевания, которое чувствительно к ингибированию LAG-3, у человека, включающий введение LAG-3-связывающего агента по любому из пп.1-10 или композиции по п.18 человеку.

31. Способ по п.30, где рак представляет собой меланому, почечно-клеточную карциному, рак легких, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак желчного пузыря, рак гортани, рак печени, рак щитовидной железы, рак желудка, рак слюнных желез, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы или карциному клеток Меркеля.

32. Способ по п.31, где рак представляет собой рак толстой кишки.

33. Способ по п.30, где инфекционное заболевание вызвано вирусами или бактериями.

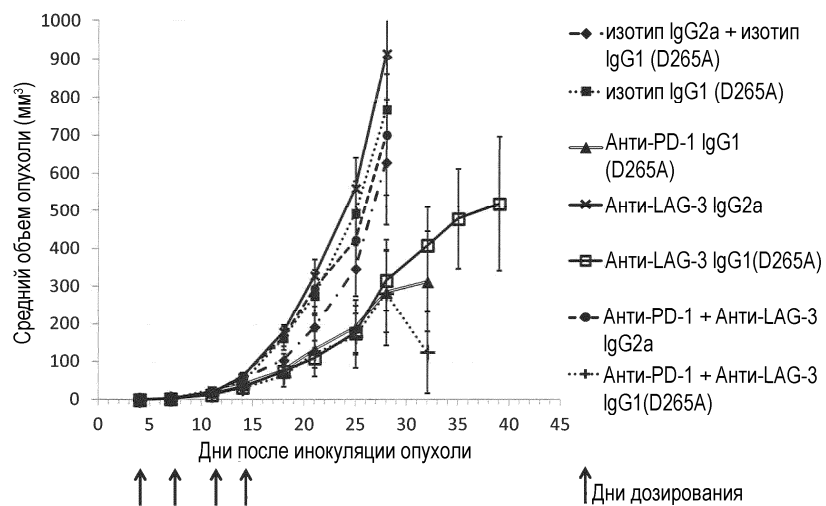
34. Способ по п.33, где инфекционное заболевание вызвано вирусом иммунодефицита человека (HIV), респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), вирусом гриппа, вирусом денге или вирусом гепатита В (HBV).

35. Способ по любому из пп.30-34, где период полувыведения LAG-3-связывающего агента в организме млекопитающего составляет от 30 мин до 45 дней.

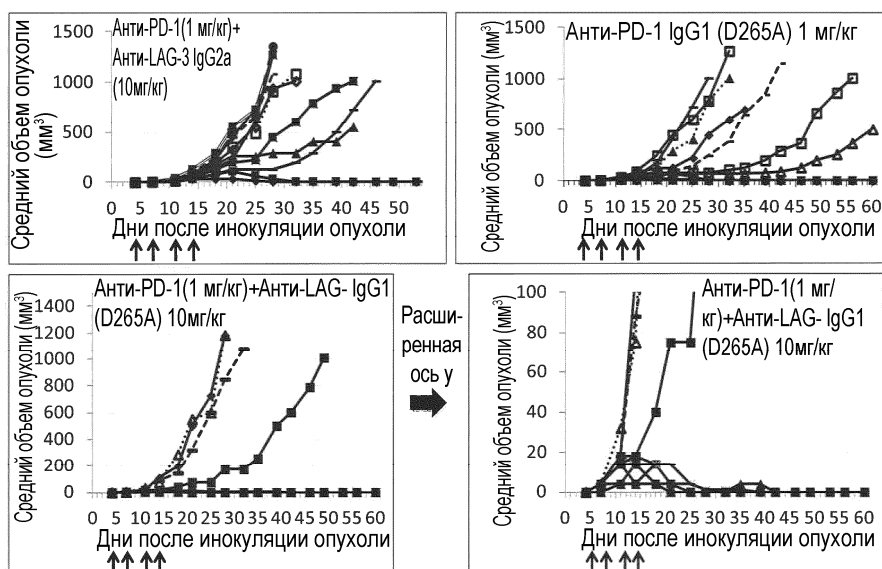
36. Способ по любому из пп.30-35, где LAG-3-связывающий агент связывается с LAG-3 с величиной K_D от примерно 1 пмоль (пМ) до примерно 1 нмоль (нМ).

37. Способ по любому из пп.30-36, дополнительно включающий введение человеку PD-1-связывающего агента.

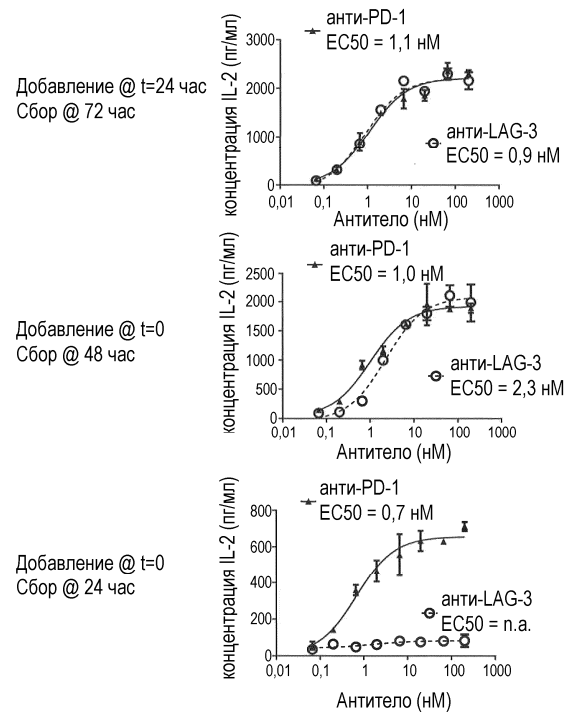
38. Способ по любому из пп.30-37, дополнительно включающий введение TIM-3-связывающего агента человеку.



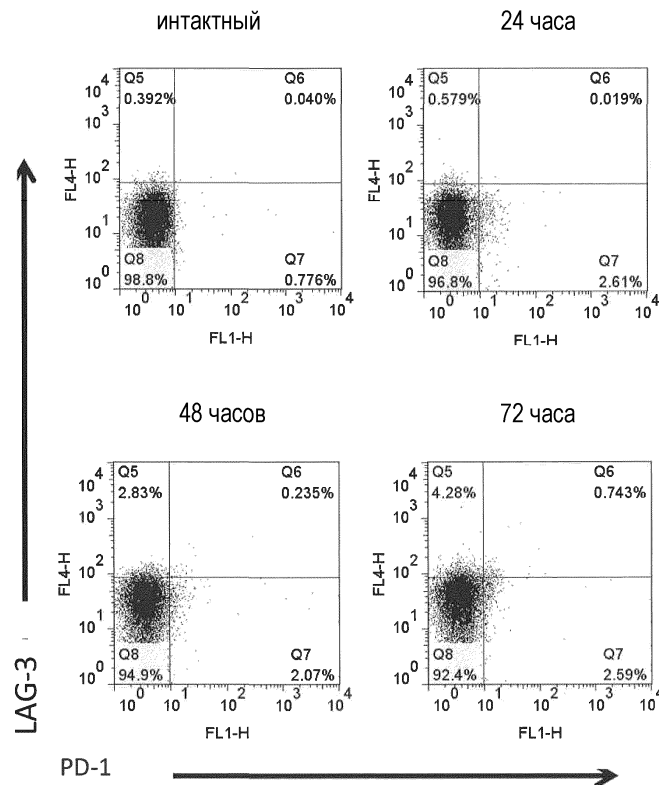
Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 2А



Фиг. 2В

