

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043093**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.25

(21) Номер заявки
201590777

(22) Дата подачи заявки
2009.08.11

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К LAG-3**

(31) **61/188,548**

(32) **2008.08.11**

(33) **US**

(43) **2016.01.29**

(62) **201100340; 2009.08.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕДАРЕКС, Л.Л.К. (US)

(72) Изобретатель:
**Таднум Кент Б., Корман Алан Дж.,
Лебланк Хейди, Яманака Марк,
Селби Марк, Зенс Кира Д. (US)**

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

(56) US-A1-20060240024
SUBRAMANYAM et al.: Soluble human
lymphocyte activation gene-3 modulates allospecific
T cell responses. Int. Immunol. May 1998,
10(5):679-689; abstract
US-A1-20060177442
US-B1-6197524
WO-A1-2008007648
US-A1-20040072164
WO-A1-2006007850
US-A1-20050226876
US-A1-20080069822
WO-A2-2005034733
US-A1-20030059937
US-A1-20070160598
WO-A2-200069914
US-A1-20050009136
US-A1-20020086014
US-A1-20030129601
US-A1-20020146753
US-A1-20070004910
US-A-6143273
WO-A1-199703695
WO-A1-2008132601

(57) Изобретение обеспечивает способы лечения рака с использованием выделенных человеческих моноклональных антител, которые специфически связываются с LAG-3 с высокой аффинностью.

B1**043093****043093****B1**

Уровень техники

Ген активации лимфоцитов-3, или LAG-3 (также известный как CD223), является членом семейства "иммуноглобулинового супергена" ("супергена иммуноглобулинов") и структурно и генетически связан с CD4. LAG-3 не экспрессируется на "спящих" лимфоцитах периферической крови, но экспрессируется на активированных Т-клетках и NK клетках. LAG-3 представляет собой мембранный белок, кодируемый геном, локализованным на дистальном участке короткого плеча хромосомы 12, близ гена CD4, это наводит на мысль, что ген LAG-3 можно выделять генной дупликацией (Triebel et al. (1990) J. Exp. Med. 171: 1393-1405).

Показано, что, аналогично CD4, LAG-3 не взаимодействует с молекулами ГКГ (МНС) Класса II, но, в отличие от CD4, LAG-3 не взаимодействует с gp120 белком вируса иммунодефицита человека (Baixeras et al. (1992) J. Exp. Med. 176: 327-337). Исследования с использованием белка слияния LAG-3 с иммуноглобулином (sLAG-3Ig) демонстрируют прямое и специфическое связывание LAG-3 с молекулами ГКГ (МНС) Класса II на поверхности клетки (Huard et al. (1996) Eur. J. Immunol. 26: 1180-1186).

В *in vitro* исследованиях антиген-специфических Т-клеточных реакций добавление антител против LAG-3 приводит к повышенной пролиферации Т-клеток, повышенной экспрессии антигенов активации, таких как CD25, и к повышенным концентрациям цитокинов, таких как интерферон-гамма и интерлейкин-4, подтверждая роль взаимодействия LAG-3/МНС Класса II в даунрегуляции антигензависимой стимуляции CD4⁺ Т лимфоцитов (Huard et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24: 3216-3221). Показано, что интраплазматическая область LAG-3 взаимодействует с белком, называемым LAP, который, предположительно, является молекулой сигнальной трансдукции, участвующей в даунрегуляции пути активации CD3/TCR (Iouzalet et al. (2001) Eur. J. Immunol. 31: 2885-2891). Кроме того показано, что CD4⁺CD25⁺ регуляторные Т-клетки (T_{reg}) экспрессируют LAG-3 при активации, а антитела к LAG-3 ингибируют супрессию индуцированными клетками T_{reg}, как *in vitro*, так и *in vivo*, это позволяет предположить, что LAG-3 вносит вклад в супрессорную активность T_{reg} клеток (Huang, C. et al. (2004) Immunity 21: 503-513).

Более того, показано, что LAG-3 негативно регулирует Т-клеточный гомеостаз с помощью регуляторных Т клеток как по Т-клеточно-зависимому, так и по Т-клеточно-независимому механизму (Workman, C. J. and Vignali, D. A. (2005) J. Immunol. 174: 688- 695).

Показано, что в некоторых условиях LAG-3 вызывает также иммуностимулирующий эффект. Например, трансфицированные с помощью LAG-3 опухолевых клеток, трансплантированные в сингенных мышей, проявляют заметный рост снижения или полную регрессию по сравнению с нетрансфицированными опухолевыми клетками, это позволяет предположить, что экспрессия LAG-3 на опухолевых клетках стимулирует противоопухолевый ответ за счёт инициирования (запуска, включения) антигенпрезентирующих клеток с помощью молекул ГКГ (МНС) Класса II (Prigent et al. (1999) Eur. J. Immunol. 29: 3867-3876). Помимо этого, показано, что растворимый слитый белок LAG-3 Ig стимулирует как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ при введении мышам вместе с антигеном, это показывает, что растворимый LAG-3Ig может действовать как адъювант в вакцине (El Mir and Triebel (2000) J. Immunol. 164: 5583-5589). Показано далее, что растворимый человеческий LAG-3Ig усиливает *in vitro* выработку типа I опухоль- специфического иммунитета (Casati et al. (2006) Cancer Res. 66: 4450-4460). Обзор функциональной активности LAG-3 приводится в Triebel (2003) Trends Immunol. 24: 619-622. На основании вышесказанного становится понятным, что дополнительные агенты для модуляции активности LAG-3 представляют интерес.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение включает моноклональные антитела, в частности, человеческие моноклональные антитела, которые специфически связывают LAG-3 и обладают нужными функциональными свойствами. Эти свойства включают высокоаффинное связывание с человеческим LAG-3, связывание с LAG-3 человека и обезьяны (например, LAG-3 макака циномолгус и /или резус) но не с мышинным LAG-3, способность ингибировать связывание LAG-3 с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГ, МНС) Класса II и/или способность стимулировать антигенспецифические Т-клеточные реакции (ответы). Антитела по изобретению можно применять, например, для обнаружения (детекции) белка LAG-3 или для стимуляции антигенспецифических Т-клеточных реакций, таких как у носителя опухоли или носителя вируса.

В одном аспекте изобретение относится к выделенному человеческому моноклональному антителу, или к его антигенсвязывающему участку, отличающемуся тем, что это антитело связывает человеческий LAG-3 и проявляет по меньшей мере одно из нижеследующих свойств:

- а) связывает LAG-3 обезьяны;
- (б) не связывает мышинный LAG-3;
- (в) ингибирует связывание LAG-3 с молекулами Класса II главного комплекса гистосовместимости (ГКГ, МНС) и
- (г) стимулирует иммунный ответ.

Предпочтительно антитело проявляет по меньшей мере два из этих свойств (а), (б), (в) и (г). Более предпочтительно антитело проявляет по меньшей мере три из этих свойств (а), (б), (в) и (г). Ещё более предпочтительно антитело проявляет все четыре из этих свойств (а), (б), (в) и (г).

В предпочтительном варианте изобретения антитело стимулирует антигенспецифический Т-клеточный ответ, такой как продуцирование интерлейкина-2 (IL-2) в процессе антигенспецифического Т-клеточного ответа. В других вариантах изобретения антитело стимулирует иммунный ответ, такой как противоопухолевый ответ (противоопухолевую реакцию), например, ингибирует рост опухоли на *in vivo* модели опухолевого трансплантата) или аутоиммунный ответ (например, стимулирует развитие диабета у NOD мышей). В другом предпочтительном варианте изобретения антитело связывает эпитоп человеческого LAG-3, содержащий аминокислотную последовательность PGHPLAPG (SEQ ID NO: 76). Ещё в одном предпочтительном варианте изобретения антитело связывает эпитоп человеческого LAG-3, содержащий аминокислотную последовательность HPAAPSSW (SEQ ID NO: 77) или PAAPSSWG (SEQ ID NO: 78). В других вариантах изобретения антитело связывается с человеческим LAG-3 с K_D 1×10^{-7} М или менее, или связывается с человеческим LAG-3 с K_D 1×10^{-8} М или менее, или связывается с человеческим LAG-3 с K_D 5×10^{-9} М или менее, или связывается с человеческим LAG-3 с K_D 1×10^{-9} М или менее. В одном варианте изобретения антитело окрашивает слизистую ткань в иммуногистохимическом исследовании, тогда как в другом варианте изобретения антитело не окрашивает слизистую ткань в иммуногистохимическом исследовании.

В другом аспекте изобретение относится к выделенному человеческому моноклональному антителу, или его антигенсвязывающему участку, отличающемуся тем, что антитело конкурирует за связывание с человеческим LAG-3 с эталонным антителом, причём эталонное антитело включает:

(а) вариательную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и вариательную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43;

(б) вариательную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и вариательную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44;

(в) вариательную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и вариательную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45;

(г) вариательную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и вариательную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46;

(д) вариательную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и вариательную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47; или

(е) вариательную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и вариательную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

В предпочтительном варианте изобретения эталонное антитело содержит вариательную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и вариательную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43. В другом предпочтительном варианте изобретения эталонное антитело содержит вариательную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и вариательную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44. В другом предпочтительном варианте изобретения эталонное антитело содержит вариательную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и вариательную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45. В другом предпочтительном варианте изобретения эталонное антитело содержит вариательную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и вариательную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46. В другом предпочтительном варианте изобретения эталонное антитело содержит вариательную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и вариательную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47. В другом предпочтительном варианте изобретения эталонное антитело содержит вариательную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и вариательную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

В другом аспекте изобретение относится к выделенному моноклональному антителу, или к его антигенсвязывающему участку, содержащему вариательную область тяжёлой цепи, которая является продуктом или получена при использовании человеческого гена V_H 3-20, человеческого гена V_H 4-34, человеческого гена V_H 3-33 или человеческого гена V_H 1-24, причём антитело специфически связывает человеческий LAG-3. В другом аспекте изобретение относится к выделенному моноклональному антителу, или к его антигенсвязывающему участку, содержащему вариательную область лёгкой цепи, которая является продуктом или получена при использовании человеческого гена V_K L18, человеческого гена V_K L6 или человеческого гена V_K A27, причём антитело специфически связывает человеческий LAG-3. В

предпочтительном варианте изобретение включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий):

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_H 4-34, и вариабельную область лёгкой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_K L6;

(б) вариабельную область тяжёлой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_H 3-33, и вариабельную область лёгкой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_K A27;

(в) вариабельную область тяжёлой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_H 3-20, и вариабельную область лёгкой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_K L18;

(г) вариабельную область тяжёлой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_H 1-24, и вариабельную

область лёгкой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_K L6; или

(д) вариабельную область тяжёлой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_H 3-33, и вариабельную область лёгкой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_K L6;

причём антитело специфически связывает человеческий LAG-3. В другом аспекте изобретение относится к выделенному моноклональному антителу, или к его антигенсвязывающему участку, содержащему:

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-42;

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 43-48; причём антитело специфически связывает человеческий LAG-3. Предпочтительная комбинация включает:

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

Другая предпочтительная комбинация включает:

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; и

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

Другая предпочтительная комбинация включает:

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; и

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

Другая предпочтительная комбинация включает:

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

Другая предпочтительная комбинация включает:

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; и

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47.

Другая предпочтительная комбинация включает:

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; и

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

Антитела по изобретению могут представлять собой, например, полноразмерные антитела (антитела полной длины), например, IgG1, IgG2 или IgG4 изотипа. В предпочтительном варианте изобретения антитело представляет собой антитело IgG4 изотипа. В другом предпочтительном варианте изобретения антитело представляет собой антитело IgG4 изотипа, содержащее мутационную замену серина на пролин на шарнирном участке константной области тяжёлой цепи (в положении, соответствующем положению 241 в соответствии с описанием в Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30: 105-108), так что уменьшается или отменяется гетерогенность за счёт дисульфидного мостика между тяжёлыми цепями. Или же антитела

могут представлять собой фрагменты антител, такие как Fab, Fab' или Fab'₂ фрагменты, или одноцепочечные антитела.

Данное раскрытие включает также иммуноконъюгат, содержащий антитело по изобретению, или его антигенсвязывающий участок, связанное(ый) с терапевтическим агентом, например, цитотоксином или радиоактивным изотопом. Данное раскрытие включает также биспецифическую молекулу, содержащую антитело, или его антигенсвязывающий участок, по изобретению, связанное(ый) со второй функциональной частицей, имеющей специфичность связывания, отличную от специфичности связывания указанного антитела, или его антигенсвязывающего участка.

Изобретение также включает композиции, содержащие антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконъюгат, или биспецифическую молекулу по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Также данное раскрытие охватывает нуклеотидные молекулы, кодирующие антитела, или его антигенсвязывающие участки, а также экспрессирующие векторы, содержащие такие нуклеотидные кислоты, и клетки-хозяева, содержащие такие экспрессирующие векторы. Также данное изобретение включает способы получения антител против LAG-3 с применением таких экспрессирующих векторов, эти способы могут включать стадии:

- (i) экспрессии антитела в клетке-хозяине и
- (ii) выделения антитела из клетки-хозяина.

Другой аспект изобретения относится к способам стимуляции иммунного ответа (иммунных реакций) с помощью антител против LAG-3 по изобретению. Например, в одном варианте изобретения включает способ стимуляции антигенспецифического Т-клеточного ответа, заключающийся в контактировании указанной Т-клетки с антителом по изобретению таким образом, чтобы стимулировался антигенспецифический Т-клеточный ответ. В предпочтительном варианте изобретения стимулируется продукция интерлейкина-2 антигенспецифической Т-клеткой. Другой вариант изобретения включает способ стимуляции иммунного ответа (например, антигенспецифического Т-клеточного ответа) у субъекта, заключающийся во введении субъекту антитела по изобретению таким образом, чтобы стимулировался иммунный ответ организма субъекта (например, антигенспецифический Т-клеточный ответ). В предпочтительном варианте изобретения субъект является носителем опухоли, и стимулируется иммунный ответ против опухоли. В другом предпочтительном варианте изобретения субъект является носителем вируса, и стимулируется иммунный ответ против вируса.

Другой аспект изобретения включает способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, заключающийся во введении субъекту антитела по изобретению таким образом, чтобы у субъекта ингибировался рост опухоли. Ещё один аспект изобретения включает способ лечения вирусной инфекции у субъекта, заключающийся во введении субъекту антитела по изобретению с тем, чтобы осуществлялось лечение вирусной инфекции у субъекта.

Ещё один вариант изобретения включает способ стимуляции иммунного ответа у субъекта, заключающийся во введении субъекту антитела против LAG-3 и по меньшей мере одного дополнительного иммуностимулирующего антитела, такого как антитело против PD-1, антитело против PD-L1 и/или антитела против CTLA-4, с тем, чтобы у субъекта стимулировался иммунный ответ, например, для ингибирования роста опухоли или для стимуляции противовирусной реакции. В одном варианте изобретения субъекту вводят антитело против LAG-3 и антитело против PD-1. В другом варианте изобретения субъекту вводят антитело против LAG-3 и антитело против PD-L1. Ещё в одном варианте изобретения субъекту вводят антитело против LAG-3 и антитело против PD в варианте изобретения субъекту вводят антитело против LAG-3 и антитело против CTLA-4. В одном варианте изобретения антитело против LAG-3 представляет собой человеческое антитело, такое как антитело по данному описанию Или же, антитело против LAG-3 может представлять собой, например, химерное или гуманизированное антитело. В другом варианте изобретения по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело (например, антитело против PD-1, против PD-L1 и/или против CTLA-4) является человеческим антителом. Или же, по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело может представлять собой, например, химерное или гуманизированное антитело.

Ещё в одном аспекте изобретения относится к способу получения антитела против LAG-3. Этот способ включает:

- (а) предоставление:

- (i) последовательности вариабельной области тяжёлой цепи, содержащей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-6, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-12, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-14, GGY и 16-18; и/или

- (ii) последовательности вариабельной области лёгкой цепи, содержащей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19-24, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-30, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31-36;

- (б) изменение по меньшей мере одного аминокислотного остатка в последовательности вариабель-

ной области тяжёлой цепи антитела и/или в последовательности варибельной области лёгкой цепи антитела с целью создать по меньшей мере одну изменённую последовательность антитела; и

(в) экспрессию антитела с изменённой последовательностью в виде белка.

Другие признаки и преимущества настоящего раскрытия будут очевидны из нижеприведённого подробного описания и примеров, которые не следует рассматривать как ограничивающие. Содержание всех ссылочных материалов, данных из Genbank, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в данной заявке, однозначно вводится в данное описание в качестве ссылки.

Краткое описание фигур

На фиг. 1A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 49) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 37) варибельной области тяжёлой цепи человеческого моноклонального антитела 25F7. Области CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 7) и CDR3 (SEQ ID NO: 13) выделены, а деривации (источники) V, D и J зародышевой линии указаны.

На фиг. 1B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 55) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 43) варибельной области лёгкой цепи каппа человеческого моноклонального антитела 25F7. Области CDR1 (SEQ ID NO: 19), CDR2 (SEQ ID NO: 25) и CDR3 (SEQ ID NO: 31) выделены, а деривации (источники) V и D зародышевой линии указаны.

На фиг. 2A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 50) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 38) варибельной области тяжёлой цепи человеческого моноклонального антитела 26H10. Области CDR1 (SEQ ID NO: 2), CDR2 (SEQ ID NO: 8) и CDR3 (SEQ ID NO: 14) выделены, а деривации (источники) V, D и J зародышевой линии указаны.

На фиг. 2B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 56) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 44) варибельной области лёгкой цепи каппа человеческого моноклонального антитела 26H10. Области CDR1 (SEQ ID NO: 20), CDR2 (SEQ ID NO: 26) и CDR3 (SEQ ID NO: 32) выделены, а деривации (источники) V и D зародышевой линии указаны.

На фиг. 3A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 51) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 39) варибельной области тяжёлой цепи человеческого моноклонального антитела 25E3. Области CDR1 (SEQ ID NO: 3), CDR2 (SEQ ID NO: 9) и CDR3 выделены, а деривации (источники) V, D и J зародышевой линии указаны.

На фиг. 3B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 57) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 45) варибельной области лёгкой цепи каппа человеческого моноклонального антитела 25E3. Области CDR1 (SEQ ID NO: 21), CDR2 (SEQ ID NO: 27) и CDR3 (SEQ ID NO: 33) выделены, а деривации (источники) V и D зародышевой линии указаны.

На фиг. 4A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 52) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 40) варибельной области тяжёлой цепи человеческого моноклонального антитела 8B7. Области CDR1 (SEQ ID NO: 4), CDR2 (SEQ ID NO: 10) и CDR3 (SEQ ID NO: 16) выделены, а деривации (источники) V, D и J из зародышевой линии указаны.

На фиг. 4B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 58) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 46) варибельной области лёгкой цепи каппа человеческого моноклонального антитела 8B7. Области CDR1 (SEQ ID NO: 22), CDR2 (SEQ ID NO: 28) и CDR3 (SEQ ID NO: 34) выделены, а деривации (источники) V и D зародышевой линии указаны.

На фиг. 5A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 53) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 41) варибельной области тяжёлой цепи человеческого моноклонального антитела 11F2. Области CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 11) и CDR3 (SEQ ID NO: 17) выделены, а деривации (источники) V, D и J из зародышевой линии указаны.

На фиг. 5B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 59) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 47) варибельной области лёгкой цепи каппа человеческого моноклонального антитела 11F2. Области CDR1 (SEQ ID NO: 23), CDR2 (SEQ ID NO: 29) и CDR3 (SEQ ID NO: 35) выделены, а деривации (источники) V и D зародышевой линии указаны.

На фиг. 6A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 54) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 42) варибельной области тяжёлой цепи человеческого моноклонального антитела 17E5. Области CDR1 (SEQ ID NO: 6), CDR2 (SEQ ID NO: 12) и CDR3 (SEQ ID NO: 18) выделены, а деривации (источники) V, D и J из зародышевой линии указаны.

На фиг. 6B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 60) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 48) варибельной области лёгкой цепи каппа человеческого моноклонального антитела 17E5. Области CDR1 (SEQ ID NO: 24), CDR2 (SEQ ID NO: 30) и CDR3 (SEQ ID NO: 36) выделены, а деривации (источники) V и D зародышевой линии указаны.

На фиг. 7 показано выравнивание аминокислотной последовательности варибельных областей тяжёлой цепи антитела 25F7 (SEQ ID NO: 37) с аминокислотными последовательностями человеческой зародышевой линии V_H 4-34 и JH5b (SEQ ID NO: 61 и 62 соответственно).

На фиг. 8 показано выравнивание аминокислотной последовательности варибельной области лёгкой цепи антитела 25F7 (SEQ ID NO: 43) с аминокислотными последовательностями человеческой зародышевой линии V_K L6 и JK2 (SEQ ID NO: 63 и 64 соответственно).

На фиг. 9 показано выравнивание аминокислотной последовательности переменных областей тяжелой цепи антитела 26H10 (SEQ ID NO: 38) с аминокислотными последовательностями человеческой зародышевой линии V_H 3-33 и JH6B (SEQ ID NO: 65 и 66 соответственно).

На фиг. 10 показано выравнивание аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи антитела 26H10 (SEQ ID NO: 44) с аминокислотными последовательностями человеческой зародышевой линии V_K A27 и JK3 (SEQ ID NO: 67 и 68 соответственно).

На фиг. 11 показано выравнивание аминокислотной последовательности переменных областей тяжелой цепи антитела 25E3 (SEQ ID NO: 39) с аминокислотными последовательностями человеческой зародышевой линии V_H 3-20 и JH4b (SEQ ID NO: 69 и 70 соответственно).

На фиг. 12 показано выравнивание аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи антитела 25E3 (SEQ ID NO: 45) с аминокислотными последовательностями человеческой зародышевой линии V_K L18 и JK2 (SEQ ID NO: 71 и 64 соответственно).

На фиг. 13 показано выравнивание аминокислотной последовательности переменных областей тяжелой цепи антитела 8B7 (SEQ ID NO: 40) с аминокислотными последовательностями человеческой зародышевой линии V_H 4-34 и JH5b (SEQ ID NO: 61 и 62 соответственно).

На фиг. 14 показано выравнивание аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи антитела 8B7 (SEQ ID NO: 46) с аминокислотными последовательностями человеческой зародышевой линии V_K L6 и JK4 (SEQ ID NO: 63 и 72 соответственно).

На фиг. 15 показано выравнивание аминокислотной последовательности переменных областей тяжелой цепи антитела 11F2 (SEQ ID NO: 41) с аминокислотными последовательностями человеческой зародышевой линии V_H 1-24 и JH4b (SEQ ID NO: 73 и 70 соответственно).

На фиг. 16 показано выравнивание аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи антитела 11F2 (SEQ ID NO: 47) с аминокислотными последовательностями человеческой зародышевой линии V_K L6 и JK1 (SEQ ID NO: 63 и 74 соответственно).

На фиг. 17 показано выравнивание аминокислотной последовательности переменных областей тяжелой цепи антитела 17E5 (SEQ ID NO: 42) с аминокислотными последовательностями человеческой зародышевой линии V_H 3-33 и 2-2 (SEQ ID NO: 65 и 70 соответственно).

На фиг. 18 показано выравнивание аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи антитела 17E5 (SEQ ID NO: 48) с аминокислотными последовательностями человеческой зародышевой линии V_K L6 (SEQ ID NO: 63 и 75 соответственно).

На фиг. 19 показано выравнивание белковой последовательности, кодирующей кДНК LAG-3 обезьян клон ра23-5 (SEQ ID NO: 93), с депонированной в Genbank белковой последовательностью LAG-3 макака-резуса (SEQ ID NO: 94) (Регистрационный No. в Genbank XM_001108923). Область внешней пептидной петли и трансмембранный домен подчеркнуты. Одно аминокислотное различие между двумя последовательностями (аминокислотное положение 419) выделено полужирным шрифтом.

Подробное описание изобретения

Настоящее раскрытие относится к выделенным моноклональным антителам, в частности, к человеческим моноклональным антителам, которые связываются с человеческим LAG-3 и обладают требуемыми функциональными свойствами. В некоторых вариантах изобретения антитела по изобретению образованы из конкретных последовательностей тяжелых и легких цепей зародышевой линии и/или имеют конкретные структурные признаки, такие как CDR области, содержащие конкретные аминокислотные последовательности. Данное раскрытие включает выделенные антитела, способы получения таких антител, иммуноконъюгаты и биспецифические молекулы, содержащие такие антитела, и фармацевтические композиции, содержащие антитела, иммуноконъюгаты или биспецифические молекулы по изобретению. Данное раскрытие относится также к способам применения антител, таким как детекция LAG-3 белка, а также к способам применения антител против LAG-3 по изобретению для стимуляции иммунного ответа, самостоятельно или в комбинации с другими иммуностимулирующими антителами. Соответственно, данное раскрытие также включает способы применения антител против LAG-3 по изобретению, например, для ингибирования роста опухоли или лечения вирусной инфекции.

Для того, чтобы настоящее раскрытие стало понятнее, прежде всего даётся определение некоторых терминов. Дополнительные определения даются по ходу подробного описания.

Термин "LAG-3" относится к гену активатора лимфоцитов-3. Термин "LAG-3" включает варианты, изоформы, гомологи, ортологи и паралоги. Например, антитела, специфические к человеческому белку LAG-3, могут в некоторых случаях перекрёстно реагировать с белком LAG-3 другого вида, нежели человеческий белок LAG-3. В других вариантах изобретения антитела, специфические к человеческому белку LAG-3, могут быть полностью специфическими к человеческому белку LAG-3 и могут не проявлять видовую или другого типа перекрёстную реактивность, или могут перекрёстно реагировать с LAG-3 некоторых, но не всех, (например, перекрёстно реагировать с LAG-3 обезьяны, но не с мышинным LAG-3). Термин "человеческий LAG-3" относится к человеческой последовательности LAG-3, такой как полная аминокислотная последовательность человеческого LAG-3, имеющая Регистрационный номер в Genbank NP_002277. Термин "мышинный LAG-3" относится к мышинной последовательности LAG-3, такой как полная аминокислотная последовательность мышинного LAG-3, имеющая Регистрационный номер в

Genbank NP_032505. В уровне техники LAG-3 также известен, например, как CD223. Последовательность человеческого LAG-3 может отличаться от человеческой последовательности LAG-3, имеющей Регистрационный номер в Genbank NP_002277 тем, что она может иметь, например, консервативные мутации или мутации в неконсервативных областях и LAG-3 имеет практически такую же биологическую функцию, что и человеческий LAG-3 из Genbank Регистрационный No. NP_002277. Например, биологическая функция человеческого LAG-3 заключается в том, что он имеет эпитоп во внеклеточном домене LAG-3, который специфически связан с антителом по настоящему раскрытию, или биологической функцией LAG-3 является связывание с молекулами Класа II ГКГ (МНС).

Предполагается, что термин "обезьяний LAG-3 (LAG-3 обезьяны)" охватывает LAG-3 белки, экспрессируемые в клетках обезьян Старого и Нового Света, включая, но без ограничения, LAG-3 обезьян циномогус и LAG-3 обезьян (макак) резус. Репрезентативная аминокислотная последовательность обезьяньего LAG-3 представляет собой аминокислотную последовательность LAG-3 макака-резус, показанную на фиг. 19 и SEQ ID NO: 85, которая также депонирована в Genbank, Регистрационный No. XM_001108923. Другая репрезентативная аминокислотная последовательность обезьяньего LAG-3 представляет собой альтернативную последовательность макака-резус клона pa23-5, показанную на фиг. 19 и SEQ ID NO: 84, выделенную как описано в примере 3А, подраздел 3. Эта альтернативная аминокислотная последовательность макака-резус имеет единственное отличие в положении 419 от аминокислотной последовательности, депонированной в Genbank.

Конкретная последовательность человеческого LAG-3 обычно по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности человеческого LAG-3, депонированной в Genbank, Регистрационный No. NP_002277, и содержит аминокислотные остатки, которые определяют аминокислотную последовательность как человеческую последовательность при сравнении с аминокислотными последовательностями LAG-3 других видов (например, мышинного LAG-3). В некоторых случаях аминокислотная последовательность человеческого LAG-3 может быть по меньшей мере на 95%, или даже по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности LAG-3 из Genbank Регистрационный No. NP_002277. В некоторых вариантах изобретения имеется не более 10 аминокислотных различий между человеческой последовательностью LAG-3 и последовательностью LAG-3 из Genbank Регистрационный No. NP_002277. В некоторых вариантах изобретения имеется не более 5, или даже не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотного различия между человеческой последовательностью LAG-3 и последовательностью LAG-3 из Genbank Регистрационный No. NP_002277. Идентичность в процентах определяют как указано в данном описании.

Термин "иммунный ответ (иммунная реакция)" относится к действию, например, лимфоцитов, антигенпрезентирующих клеток, фагоцитарных клеток, гранулоцитов и растворимых макромолекул, продуцируемых вышеуказанными клетками или печенью (включая антитела, цитокины и комплемент), которое приводит к селективному поражению, деструкции или удалению из человеческого организма инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых клеток или, в случае аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей.

Выражение "антигенспецифический Т-клеточный ответ" относится к ответу (реакциям) Т-клетки, который(ые) является результатом стимуляции Т-клетки антигеном, к которому специфична Т-клетка. Неограничивающие примеры ответов Т-клетки на антигенспецифическую стимуляцию включают пролиферацию и продукцию цитокинов (например, продукцию IL-2).

Термин "антитело" по данному описанию включает целые антитела и любой их антигенсвязывающий фрагмент (т.е. "антигенсвязывающий участок") или их одиночные цепи. Целые антитела представляют собой гликопротеины, содержащие по меньшей мере две тяжёлых (H) цепи и две лёгких (L) цепи, связанных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжёлая цепь состоит из варибельной области тяжёлой цепи (сокращённо обозначаемой в данном описании V_H) и константной области тяжёлой цепи. Константная область тяжёлой цепи состоит из трёх доменов, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая лёгкая цепь состоит из варибельной области лёгкой цепи (сокращённо обозначаемой в данном описании V_L) и константной области лёгкой цепи. Константная область лёгкой цепи состоит из одного домена, C_L . Области V_H и V_L могут также подразделяться на гиперварибельные области, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающимися с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая область V_H и V_L состоит из трёх CDR и четырёх FR, расположенных от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варибельные области тяжёлой и лёгкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классического пути системы комплемента.

Термин "антигенсвязывающий участок" антитела (или просто "участок антитела") по данному описанию относится к одному или более фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, с LAG-3 белком). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающий участок" антитела, включают:

- (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_H1 ;
- (ii) фрагмент $F(ab')_2$, двухвалентный фрагмент, который практически представляет собой Fab с участком шарнирной области (см., *Fundamental immunology* (Paul ed., 3. sup. ed. 1993);
- (iv) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и C_H1 ;
- (v) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H единичного плеча (фрагмента Fab) антитела,
- (vi) фрагмент dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 341: 544- 546), который состоит из V_H домена;
- (vii) выделенную гипервариабельную область (CDR) и
- (viii) нанотело, вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую один вариабельный домен и два константных домена.

Помимо этого, хотя два домена фрагмента Fv, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, их можно связывать, используя методы рекомбинантной ДНК, синтетическим линкером, который позволяет их получать в виде единой белковой цепи, в которой области V_L и V_H "спариваются" с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечный фрагмент Fv (scFv); см. например., Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; и Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Предполагается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином "антигенсвязывающий участок" антитела. Эти фрагменты антитела получают обычными методами, известными специалистам в данной области техники, и эти фрагменты подвергают скринингу на полезность такими же методами, как и интактные антитела.

Предполагается, что выражение "выделенное антитело" по данному описанию относится к антителу, которое практически свободно от других антител, имеющих отличную антигенную специфичность (например, выделенное антитело, которое специфически связывает белок LAG-3, практически не содержит (свободно от) антител, которые специфически связывают антигены, отличные от белков LAG-3). Выделенное антитело, которое специфически связывает человеческий белок LAG-3, может, однако, участвовать в перекрёстных реакциях с другими антигенами, такими как белок LAG-3 других видов. Кроме того, выделенное антитело может практически не содержать другого клеточного материала и/или химических агентов.

Термины "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" по данному описанию относятся к препарату молекул антитела единого молекулярного состава. Композиция моноклонального антитела проявляет единственную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу.

Предполагается, что термин "человеческое антитело" по данному описанию включает антитела, имеющие вариабельные области, в которых как каркасные, так и CDR области образованы из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также образована из человеческих иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодированные генами для человеческих иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако, предполагается, что термин "человеческое антитело" по данному описанию не включает антитела, у которых последовательности CDR, образованные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, привиты к человеческим каркасным последовательностям.

Выражение "человеческое моноклональное антитело" относится к антителам, проявляющим единственную специфичность связывания, имеющим вариабельные области, в которых как каркасные, так и CDR области образованы из человеческих иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии. В одном варианте изобретения человеческие моноклональные антитела продуцируются гибридомой, которая включает В клетку, полученную от трансгенного животного, отличного от человека, например, трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген человеческой тяжёлой цепи и трансген лёгкой цепи, слитую с иммортализованной клеткой.

Выражение "рекомбинантное человеческое антитело" по данному описанию включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантным методом, такие как

- (а) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которые являются трансгенными или "транс-хромосомными" по человеческим генам иммуноглобулинов, или полученные при их использовании гибридомы (подробнее описаны ниже),
- (б) антитела, выделенные при использовании клетки-хозяина, трансформированной с целью экспрессировать человеческое антитело, например трансфектомы,
- (в) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител, и
- (г) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими методами, которые включают сплайсинг последовательностей генов человеческих иммуноглобулинов с другими ДНК-последовательностями.

Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют вариабельные области, в которых каркасные и CDR области образованы из человеческих иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой

линии. Однако в некоторых вариантах изобретения такие рекомбинантные человеческие антитела могут подвергаться *in vitro* мутагенезу (или, если животное является трансгенным по человеческим Ig последовательностям, *in vivo* мутагенезу) и, следовательно, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, будучи образованы из последовательностей V_H и V_L человеческой зародышевой линии, могут не существовать в природе в спектре человеческих антител зародышевой линии *in vivo*.

Термин "изотип" относится к классу антител (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константной области тяжёлой цепи.

Выражения "антитело, узнающее (распознающее) антиген" и "антитело, специфическое к антигену" употребляются в данном описании взаимозаменяемо с выражением "антитело, которое специфически связывается с антигеном".

Выражение "производные человеческого антитела" относится к любой модифицированной форме человеческого антитела, например, конъюгату антитела и другому агенту или антителу.

Предполагается, что термин "гуманизированное антитело" относится к антителам, у которых последовательности CDR, образованные из зародышевой последовательностей млекопитающего другого вида, такого как мышь, привит к человеческим каркасным последовательностям. В человеческих каркасных последовательностях можно осуществить другие модификации каркасной области.

Предполагается, что термин "химерное антитело" относится к антителам, у которых последовательности вариабельной области получены из одного вида, а последовательности константной области получены из другого вида, например антитело, у которого последовательности вариабельной области получены из мышинового антитела, а последовательности константных областей получены из человеческого антитела.

Предполагается, что выражение по данному описанию "антитело, которое специфически связывает человеческий LAG-3" относится к антителу, которое связывается с человеческим белком LAG-3 (и, возможно, с белком LAG-3 одного или более других видов, отличных от человека), но практически не связывается с белками, отличными от белка LAG-3. Предпочтительно, антитело связывается с человеческим LAG-3 белком с "высокой аффинностью", а именно, с K_D 1×10^{-7} М или менее, более предпочтительно, 5×10^{-8} М или менее, более предпочтительно, 3×10^{-8} М или менее, более предпочтительно, 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 5×10^{-9} М или менее или даже более предпочтительно 1×10^{-9} М или менее.

Выражение по данному описанию "практически не связывается" с белком или клеткой означает: не связывается или не связывается с высокой аффинностью с белком или клеткой, т.е. связывается с белком или клеткой с K_D 1×10^{-6} М или более, более предпочтительно, 1×10^{-5} М или более, более предпочтительно, 1×10^{-4} М или более, более предпочтительно, 1×10^{-3} М или более, ещё более предпочтительно, 1×10^{-2} М или более.

Предполагается, что термин " K_{assoc} " или " K_a " по данному описанию относится к конкретному взаимодействию антитело- антиген, тогда как полагают, что термин " K_{dis} " или " K_d ", по данному описанию, относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело- антиген. Предполагается, что термин " K_D ", по данному описанию относится к константе диссоциации, которую получают из отношения K_d к K_a (т.е., K_d/K_a) и выражают в виде молярной концентрации (М). Величины K_D для антител можно определять методами, общепринятыми в уровне техники. Предпочтительным методом определения K_D антитела является метод поверхностного плазмонного резонанса, предпочтительно, с применением биосенсорной системы, такой как система Biacore®.

Термин "высокоаффинное" по отношению к IgG антителу, относится к антителу, имеющему K_D 1×10^{-7} М или менее, более предпочтительно, 5×10^{-8} М или менее, более предпочтительно, 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно, 5×10^{-9} М или менее, более предпочтительно, 1×10^{-9} М или менее по отношению к антигену-мишени. Однако, "высокоаффинное" связывание может меняться для других изотипов антител. Например, "высокоаффинное" для IgM изотипа относится к антителу, имеющему K_D 10^{-6} М или менее, более предпочтительно, 10^{-7} М или менее, ещё более предпочтительно, 10^{-8} М или менее.

Термин "субъект" включает человека или отличного от человека животного. Термин "отличное от человека животное" включает всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как нечеловекообразные приматы, овцы, собаки, крупный рогатый скот, кошки, лошади, куры, земноводные и рептилии, хотя предпочтительными являются млекопитающие, такие как нечеловекообразные приматы, овцы, собаки, кошки, крупный рогатый скот и лошади.

Различные аспекты изобретения более подробно описаны в нижеприведённых подразделах.

Антитела против LAG-3, обладающие специфическими функциональными свойствами

Антитела по изобретению характеризуются специфическими функциональными признаками или свойствами антител. Например, антитела специфически связываются с человеческим LAG-3 и могут связываться с LAG-3 некоторых других видов, например, LAG-3 обезьян (например, обезьян (макак) цино-молгус, макак-резус), но практически не связываются с LAG-3 некоторых других видов, например, мышинным LAG-3. Предпочтительно, антитело по изобретению связывается с человеческим LAG-3 с высокой аффинностью.

На способность антитела стимулировать иммунный ответ, такой как антигенспецифический Т-клеточный ответ, может указывать, например, способность антитела стимулировать продукцию интерлейкина-2 (IL-2) при антигенспецифическом Т-клеточном ответе. В некоторых вариантах изобретения антитело по изобретению связывается с человеческим LAG-3 и проявляет способность стимулировать антигенспецифический Т-клеточный ответ. В других вариантах изобретения антитело по изобретению связывается с человеческим LAG-3, но не проявляет способности стимулировать антигенспецифический Т-клеточный ответ. Другие способы определения способности антитела стимулировать иммунный ответ включают способность антитела ингибировать рост опухоли, например, как на *in vivo* модели трансплантата опухоли (см, например, пример 6), или способность антитела стимулировать аутоиммунный ответ, такую как способность инициировать (промотировать) развитие аутоиммунного заболевания на аутоиммунной модели, например, способность промотировать развитие диабета на NOD мышинной модели (см., например, пример 7).

Связывание антитела по изобретению с LAG-3 можно оценивать одним или более методами, общепринятыми в уровне техники. Например, в предпочтительном варианте изобретения антитело можно проверять методом проточной цитометрии, в котором антитело реагирует с линией клеток, экспрессирующих человеческий LAG-3, таких как клетки CHO, трансфицированные таким образом, чтобы экспрессировать LAG-3 (например, человеческий LAG-3 или обезьяний LAG-3 (например, макак-резус или циномоглус) или мышинный LAG-3) на своей клеточной поверхности (соответствующий анализ см., например, в примере 3А). Другие подходящие клетки для применения в методах проточной цитометрии включают стимулированные антителами против CD3 активированные CD4⁺ Т-клетки, которые экспрессируют нативный LAG-3. Помимо этого, или в качестве альтернативы, связывание антитела, включая кинетику связывания (например, величину K_D), можно определять с помощью анализов связывания BIAcore binding assays (соответствующие анализы см., например, в примере 3В). Другие подходящие анализы связывания включают методы ELISA, например, с использованием рекомбинантного LAG-3 белка (соответствующие анализы см., например, в примере 1).

Предпочтительно, антитело по изобретению связывается с LAG-3 белком с K_D 5×10^{-8} М или менее, связывается с LAG-3 белком с K_D 2×10^{-8} М или менее, связывается с LAG-3 белком с K_D 5×10^{-9} М или менее, связывается с LAG-3 белком с K_D 4×10^{-9} М или менее, связывается с LAG-3 белком с K_D 3×10^{-9} М или менее, связывается с LAG-3 белком с K_D 2×10^{-9} М или менее, связывается с LAG-3 белком с K_D 1×10^{-9} М или менее, связывается с LAG-3 белком с K_D 5×10^{-10} М или менее, или связывается с LAG-3 белком с K_D 1×10^{-10} М или менее.

Как правило, антитело по изобретению связывается с LAG-3 в лимфоидных тканях, таких как миндалины, селезёнка или вилочковая железа (тимус), что можно обнаружить иммуногистохимическими методами. Помимо этого, как описано далее в примере 8, некоторые антитела против LAG-3 по изобретению окрашивают ткань гипофиза (например, задерживаются в гипофизе), при иммуногистохимическом исследовании, тогда как другие антитела против LAG-3 по изобретению не окрашивают ткань гипофиза (например, не задерживаются в гипофизе), при иммуногистохимическом исследовании. Так, в одном варианте изобретения включает человеческое антитело против LAG-3, которое окрашивает ткань гипофиза при иммуногистохимическом исследовании, тогда как в другом варианте изобретения включает человеческое антитело против LAG-3, которое не окрашивает ткань гипофиза при иммуногистохимическом исследовании.

Предпочтительными антителами по изобретению являются человеческие моноклональные антитела. Помимо этого, или в качестве альтернативы, антитела могут представлять собой, например, химерные или гуманизированные антитела.

Моноклональные антитела 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5 Предпочтительными антителами по изобретению являются человеческие моноклональные антитела 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5, выделенные и структурно охарактеризованные как описано в примерах 1 и 2. VH аминокислотные последовательности антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5 показаны в SEQ ID NO: 37- 42, соответственно. VK аминокислотные последовательности антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5 показаны в SEQ ID NO: 43-48 соответственно.

С учётом того, что каждое из этих антител может связываться с человеческим LAG-3, последовательности V_H и V_L можно смешивать (технология "mixed and matched"), чтобы создать молекулы других связывающих антител против LAG-3 по изобретению. Предпочтительно, когда смешиваются цепи V_H и V_L , V_H последовательность в конкретной паре V_H/V_L заменяется на сходную по структуре V_H последовательность. Аналогично, предпочтительно, V_L последовательность в конкретной паре V_H/V_L заменяется на сходную по структуре V_L последовательность.

Соответственно, в одном аспекте данное изобретение включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий):

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 47-42; и

(б) вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбран-

ную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 43-48;

причём антитело специфически связывает человеческий LAG-3. Предпочтительные комбинации тяжёлой и лёгкой цепи включают:

(а) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43;

(б) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44;

(в) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45;

(г) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46;

(д) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47; или

(е) вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

В другом аспекте данное раскрытие включает антитела, которые содержат области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой и лёгкой цепей антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5, или их комбинации. Аминокислотные последовательности V_H CDR1 антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5 показаны в SEQ ID NO: 37-42 соответственно. Аминокислотные последовательности V_H CDR2 антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5 показаны в SEQ ID NO: 43-48 соответственно. Аминокислотные последовательности V_H CDR3 антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5 показаны в SEQ ID NO: 13-14, GGY и 16-18 соответственно. Аминокислотные последовательности V_K CDR1 антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5 показаны в SEQ ID NO: 19-24 соответственно. Аминокислотные последовательности V_K CDR2s антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5 показаны в SEQ ID NO: 25-30. Аминокислотные последовательности V_K CDR3 антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5 показаны в SEQ ID NO: 31-36, соответственно. Области CDR выделены (очерчены) с применением системы Kabat (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

С учётом того, что каждое из антител может связываться с человеческим LAG-3 и что специфическое связывание с антигеном обеспечивается прежде всего областями CDR1, CDR2 и CDR3, последовательности V_H CDR1, CDR2 и CDR3 и последовательности V_L CDR1, CDR2 и CDR3 можно смешивать ("mixed and matched") (т.е., можно смешивать области CDR из различных антител, хотя каждое антитело должно содержать V_H CDR1, CDR2 и CDR3 и V_L CDR1, CDR2 и CDR3), чтобы создать молекулы других связывающих антител против LAG-3 по изобретению. Связывание LAG-3 такими смешанными (спутанными) ("mixed and matched") антителами можно анализировать, используя описанные выше методы анализа и Примеры (например, анализы ELISA, Biacore®). Предпочтительно, когда последовательности V_H CDR смешиваются (смесь), последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной V_H последовательности заменяют на структурно аналогичную(ые) CDR последовательность(и). Аналогично, когда последовательности V_L CDR смешиваются, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной V_L последовательности, предпочтительно, заменяют на структурно аналогичную(ые) CDR последовательность(и). Опытному специалисту в данной области техники ясно, что новые V_H и V_L последовательности можно создать, заменяя последовательности одной или более областей CDR цепей V_H и/или V_L на сходные по структуре последовательности из CDR последовательностей, раскрываемых в данном описании для моноклональных антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5.

Соответственно в другом аспекте данное раскрытие включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий):

(а) домен CDR1 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-6;

(б) домен CDR2 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-12;

(в) домен CDR3 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-14, GGY и 16-18;

(г) домен CDR1 вариабельной области лёгкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19-24;

(д) домен CDR2 вариабельной области лёгкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-30; и

(е) домен CDR3 варибельной области лёгкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31-36;

причём антитело специфически связывает человеческий LAG-3.

В предпочтительном варианте изобретения антитело содержит:

- (а) домен CDR1 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 1;
- (б) домен CDR2 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 7;
- (в) домен CDR3 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 13;
- (г) домен CDR1 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 19;
- (д) домен CDR2 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 25; и
- (е) домен CDR3 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 31.

В другом предпочтительном варианте изобретения антитело содержит:

- (а) домен CDR1 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 2;
- (б) домен CDR2 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 8;
- (в) домен CDR3 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 14;
- (г) домен CDR1 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 20;
- (д) домен CDR2 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 26; и
- (е) домен CDR3 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 32.

В другом предпочтительном варианте изобретения антитело содержит:

- (а) домен CDR1 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 3
- (б) домен CDR2 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 9;
- (в) домен CDR3 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий GGY;
- (г) домен CDR1 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 21;
- (д) домен CDR2 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 27; и
- (е) домен CDR3 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 33.

В другом предпочтительном варианте изобретения антитело содержит:

- (а) домен CDR1 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 4;
- (б) домен CDR2 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 10;
- (в) домен CDR3 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 16;
- (г) домен CDR1 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 22;
- (д) домен CDR2 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 28; и
- (е) домен CDR3 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 34.

В другом предпочтительном варианте изобретения антитело содержит:

- (а) домен CDR1 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 5;
- (б) домен CDR2 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 11;
- (в) домен CDR3 варибельной области тяжёлой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17;
- (г) домен CDR1 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 23;
- (д) домен CDR2 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 29; и
- (е) домен CDR3 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 35.

В другом предпочтительном варианте изобретения антитело содержит:

- (а) домен CDR1 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 6;
- (б) домен CDR2 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 12;
- (в) домен CDR3 варибельной области тяжёлой цепи, содержащий SEQ ID NO: 18;
- (г) домен CDR1 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 24;
- (д) домен CDR2 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 30; и
- (е) домен CDR3 варибельной области лёгкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 36.

Хорошо известно в уровне техники, что домен CDR3, независимо от домена(ов) CDR1 и/или CDR2, один, может определять специфичность связывания антитела со "своим" антигеном и что на основе общей CDR3 последовательности можно с уверенностью получать несколько антител с одинаковой специфичностью связывания. См., например,

Klimka *et al.*, *British J. of Cancer* **83**(2): 252- 260 (2000); Beiboer *et al.*, *J.*

Mol. Biol. **296**: 833- 849 (2000); Rader *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 8910- 8915

(1998); Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 2161- 2162 (1994); Barbas *et al.*, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U.S.A. **92**: 2529- 2533 (1995); Ditzel *et al.*, *J. Immunol.* **157**: 739- 749 (1996);

Berezov *et al.*, *BIAjournal* **8**: Scientific Review 8 (2001); Igarashi *et al.*, *J. Biochem (Tokyo)*

117: 452- 7 (1995); Bourgeois *et al.*, *J. Virol* **72**: 807- 10 (1998); Levi *et al.*, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U.S.A. **90**: 4374- 8 (1993); Polymenis and Stoller, *J. Immunol.* **152**: 5218- 5329

(1994) и Xu and Davis, *Immunity* **13**: 37- 45 (2000). См. также патенты США No.

6951646; 6914128; 6090382; 6818216; 6156313; 6827925; 5833943; 5762905 и 5760185.

Каждый из этих ссылочных материалов вводится в данное описание ссылкой во всей полноте.

Соответственно, настоящее раскрытие включает моноклональные антитела, содержащие один или более CDR3 доменов тяжёлой и/или лёгкой цепи из антитела человека или отличного от человека животного, причём моноклональное антитело способно специфически связываться с человеческим LAG-3. В некоторых аспектах настоящее раскрытие включает моноклональные антитела, содержащие один или более CDR3 доменов тяжёлой и/или лёгкой цепи из нечеловеческого антитела, такого как антитело мыши или крысы, причём моноклональное антитело способно специфически связываться с человеческим LAG-3. В некоторых вариантах изобретения такие антитела по изобретению, содержащие один или более CDR3 доменов тяжёлой и/или лёгкой цепи из нечеловеческого антитела:

- (а) способны конкурировать за связывание с соответствующим исходным нечеловеческим антителом;
- (б) сохраняют функциональные характеристики соответствующего исходного нечеловеческого антитела;
- (в) связываются с тем же самым эпитопом, что и соответствующее исходное нечеловеческое антитело; и/или
- (г) имеют аффинность связывания, аналогичную аффинности связывания соответствующего исходного нечеловеческого антитела.

В других аспектах настоящее раскрытие включает моноклональные антитела, содержащие один или более CDR3 доменов тяжёлой и/или лёгкой цепи из человеческого антитела, например, такого, как человеческое антитело, полученное при использовании нечеловеческого животного, причём человеческое антитело способно специфически связываться с человеческим LAG-3. В других аспектах настоящее раскрытие включает моноклональные антитела, содержащие один или более CDR3 доменов тяжёлой и/или лёгкой цепи первого человеческого антитела, например, такого, как человеческое антитело, полученное при использовании нечеловеческого животного, причём человеческое антитело способно специфически связываться с человеческим LAG-3, а домен CDR3 из первого человеческого животного заменяет домен CDR3 в человеческом антителе, у которого отсутствует специфичность связывания с LAG-3, при этом получают второе человеческое антитело, которое способно специфически связываться с человеческим LAG-3. В некоторых вариантах изобретения такие антитела по изобретению, содержащие один или более CDR3 доменов тяжёлой и/или лёгкой цепи из первого человеческого антитела,

- (а) способны конкурировать за связывание с соответствующим исходным первым человеческим антителом;
- (б) сохраняют функциональные характеристики соответствующего исходного первого человеческого антитела;
- (в) связываются с тем же самым эпитопом, что и соответствующее исходное первое человеческое антитело и/или
- (г) имеют аффинность связывания, аналогичную аффинности связывания соответствующего исходного первого человеческого антитела.

Антитела, имеющие последовательности конкретной зародышевой линии

В некоторых вариантах изобретения антитела по изобретению содержат переменную область тяжёлой цепи, полученную при использовании гена тяжёлой цепи иммуноглобулина конкретной зародышевой линии и/или гена лёгкой цепи иммуноглобулина конкретной зародышевой линии.

Например, предпочтительный вариант изобретения включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) переменную область тяжёлой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_H 3-20, человеческого гена V_H 4-34, человеческого гена V_H 3-33 или человеческого гена V_H 1-24, причём антитело специфически связывает человеческий LAG-3. Другой предпочтительный вариант изобретения включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) переменную область лёгкой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_K L18, человеческого гена V_K L6 или человеческого гена V_K A27, причём антитело специфически связывает человеческий LAG-3 белок. Ещё один предпочтительный вариант изобретения включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) переменную область тяжёлой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_H 3-20 и включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) переменную область лёгкой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_K L18, причём антитело специфически связывает человеческий LAG-3 белок. Ещё один предпочтительный вариант изобретения включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) переменную область тяжёлой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_H 4-34, и включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) переменную область лёгкой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_K L6, причём антитело специфически связывает человеческий LAG-3 белок. Ещё один предпочтительный вариант изобретения включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) переменную область тяжёлой цепи, которая является продуктом или образована

при использовании человеческого гена V_H 3-33, и включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) вариабельную область лёгкой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_K A27, причём антитело специфически связывает человеческий LAG-3 белок. Ещё один предпочтительный вариант изобретения включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) вариабельную область тяжёлой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_H 1-24, и включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) вариабельную область лёгкой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_K L6, причём антитело специфически связывает человеческий LAG-3 белок. Ещё один предпочтительный вариант изобретения включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) вариабельную область тяжёлой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_H 3-33, и включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) вариабельную область лёгкой цепи, которая является продуктом или образована при использовании человеческого гена V_K L6, причём антитело специфически связывает человеческий LAG-3 белок.

Такие антитела могут иметь также одну или более функциональных характеристик, подробно описанных выше, таких как высокоаффинное связывание с человеческим LAG-3, связывание с обезьяньим LAG-3, отсутствие связывания с мышинным LAG-3, способность ингибировать связывание LAG-3 с молекулами ГКГ (МНС) Класа II и/или способность стимулировать антигенспецифические Т-клеточные реакции (ответы).

Примером антитела, у которого V_H и V_L представляют собой V_H 3-20 и V_K L18 соответственно, является антитело 25E3. Примерами антител, у которых V_H и V_L представляют собой V_H 4-34 и V_K L6 соответственно, являются антитела 25F7 и 8B7. Примером антитела, у которого V_H и V_L представляют собой V_H 3-33 и V_K A27 соответственно, является антитело 26H10. Примером антитела, у которого V_H и V_L представляют собой V_H 1-24 и V_K L6 соответственно, является антитело 11F2. Примером антитела, у которого V_H и V_L представляют собой V_H 3-33 и V_K L6 соответственно, является антитело 17E5.

В данном описании человеческое антитело содержит вариабельные области тяжёлой или лёгкой цепи, которые "являются продуктом" или "образованы при использовании" последовательности конкретной зародышевой линии, если вариабельные области антитела получают с помощью системы, которая использует гены человеческого иммуноглобулина. Такие системы включают иммунизацию трансгенных мышей, несущих гены человеческого иммуноглобулина с целевым антигеном или скрининг фаг-дисплейной библиотеки человеческого иммуноглобулина, визуализируемой целевым антигеном. Человеческое антитело, которое "является продуктом" или "образовано при использовании" генов зародышевой линии для человеческих иммуноглобулиновых последовательностей, можно идентифицировать, сравнивая аминокислотную последовательность человеческого антитела с аминокислотными последовательностями человеческих иммуноглобулинов зародышевой линии и отбирая последовательность человеческого иммуноглобулина зародышевой линии, наиболее близкую (т.е. имеющую наибольший % идентичности) последовательности человеческого антитела. Человеческое антитело, которое "является продуктом" или "образовано при использовании" генов зародышевой линии для человеческих иммуноглобулиновых последовательностей, могут содержать аминокислотные различия по сравнению с последовательностью зародышевой линии вследствие, например, природных соматических мутаций или "прицельного" введения сайт-направленной мутации. Однако, как правило, аминокислотная последовательность выбранного человеческого антитела по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, кодированной геном иммуноглобулина зародышевой линии, и содержит аминокислотные остатки, которые идентифицируют человеческое антитело именно как человеческое по сравнению с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии других видов (например, последовательностями зародышевой линии мыши). В некоторых случаях аминокислотная последовательность человеческого антитела может быть идентичной по меньшей мере на 95%, или даже по меньшей мере на 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности, кодированной геном иммуноглобулина зародышевой линии. Обычно, человеческое антитело, образованное из конкретной последовательности человеческой зародышевой линии, обнаруживает не более 10 аминокислотных различий по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодированной геном человеческого иммуноглобулина зародышевой линии. В некоторых случаях человеческое антитело может иметь не более 5 или даже не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотного различия по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодированной геном человеческого иммуноглобулина зародышевой линии.

Гомологичные антитела

Ещё в одном варианте изобретения антитело по изобретению содержит вариабельные области тяжёлой и лёгкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, гомологичные аминокислотным последовательностям предпочтительных антител по данному описанию, и при этом антитела сохраняют необходимые функциональные свойства антител против LAG-3 по изобретению. Например, данное раскрытие включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, содержащее(ий) вариабельную область тяжёлой цепи и вариабельную область лёгкой цепи, отличающиеся

тем, что:

(а) вариабельная область тяжёлой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-42;

(b) вариабельная область лёгкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% гомологичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 43-48; и

(с) антитело специфически связывается с человеческим LAG-3.

Помимо этого или в качестве альтернативы антитело может обладать одним или более следующих функциональных свойств, обсуждавшихся выше, таких как высокоаффинное связывание с человеческим LAG-3, связывание с обезьяньим LAG-3, отсутствие связывания с мышинным LAG-3, способность ингибировать связывание LAG-3 с молекулами ГКГ (МНС) Класа II и/или способность стимулировать антигенспецифические Т-клеточные реакции (ответы).

В различных вариантах изобретения антитело может представлять собой, например, человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело.

В других вариантах изобретения V_H и/или V_L аминокислотные последовательности могут быть на 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% гомологичны представленным выше последовательностям. Антитело, имеющее последовательности V_H и V_L областей, обладающие с высокой гомологией (т.е., 80% или выше) с последовательностями V_H и V_L областей, представленными выше, можно получать мутагенезом (например, сайт-направленным или ПЦР-опосредованным мутагенезом) нуклеотидных молекул, кодирующих SEQ ID NO: 49-54 или 55-60, с последующим тестированием кодированного изменённого антитела на сохранённую функцию (т.е., на представленные выше функции) с применением функциональных анализов, представленных в данном описании.

В данном описании процент гомологии (степень гомологии в процентах) между двумя аминокислотными последовательностями эквивалентен проценту идентичности (степени идентичности в процентах) между двумя последовательностями. Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию числа идентичных положений, общих для последовательностей (т.е., % гомологии = $\frac{\text{число идентичных положений}}{\text{общее число положений}} \times 100$), с учётом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно провести, используя математический алгоритм, как описано в приведённых ниже неограничивающих примерах.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с помощью алгоритма Е. Майерса и У. Миллера (E. Meyers and W. Miller) (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988)), который включён в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу веса остатков PAM120, штраф за длину гэпа 12 и штраф за гэп 4. Помимо этого, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определять, используя алгоритм Нидельмана-Вунша (Needleman and Wunsch) (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)), который включён в программу GAP в программном обеспечении GCG (доступный по адресу <http://www.gcg.com>), используя либо матрицу Blossum 62, либо матрицу PAM250, вес (средневзвешенное) гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и средневзвешенное длины гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Помимо этого, или в качестве альтернативы, белковые последовательности по настоящему раскрытию можно дополнительно использовать в качестве "запрашиваемой последовательности" для проведения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такой поиск можно проводить, используя программу XBLAST (версия 2.0) Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10. Поиск BLAST белков можно осуществлять с помощью программы XBLAST, оценка=50, длина слова=3, получая аминокислотные последовательности, гомологичные молекулам антител по изобретению. Для проведения с применением гэпов с целью сравнения можно использовать программу Gapped BLAST, описанную Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST применяют параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. www.ncbi.nlm.nih.gov.

Антитела с консервативными модификациями

В некоторых вариантах изобретения антитела по изобретению содержат вариабельную область тяжёлой цепи, включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, вариабельную область лёгкой цепи, включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причём одна или более из этих CDR последовательностей содержат конкретные аминокислотные последовательности на основе предпочтительных антител, представленных в данном описании (например, 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2, 17E5), или их консервативные модификации, и при этом антитела сохраняют необходимые функциональные свойства антител против LAG-3 по изобретению. Из уровня техники ясно, что можно осуществить определённую модификацию консервативной последовательности, которая не затронет связывания с антигеном. См., например,

Brummell *et al.* (1993) *Biochem* 32: 1180- 8; de Wildt *et al.* (1997) *Prot. Eng.* 10: 835- 41; Komissarov *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 26864- 26870; Hall *et al.* (1992) *J. Immunol.* 149: 1605- 12; Kelley and O'Connell (1993) *Biochem.* 32: 6862- 35; Adib- Conquy *et al.* (1998) *Int. Immunol.* 10: 341- 6 и Beers *et al.* (2000) *Clin. Can. Res.* 6: 2835- 43.

Соответственно, данное раскрытие включает выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий участок, включающее(ий) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где:

(а) CDR3 последовательность переменной области тяжелой цепи представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 13-14, GGY и 16-18 и их консервативных модификаций;

(б) CDR3 последовательность переменной области легкой цепи представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 31-36 и их консервативных модификаций; и

(в) антитело специфически связывает человеческий LAG-3.

Помимо этого или в качестве альтернативы антитело может обладать одним или более следующих функциональных свойств, описанных выше, таких как высокоаффинное связывание с человеческим LAG-3, связывание с обезьяньим LAG-3, отсутствие связывания с мышинным LAG-3, способность ингибировать связывание LAG-3 с молекулами ГКГ (МНС) Класа II и/или способность стимулировать антигенспецифические Т-клеточные реакции (ответы).

В предпочтительном варианте изобретения CDR2 последовательность переменной области тяжелой цепи представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 7-12 и их консервативных модификаций; а CDR2 последовательность переменной области легкой цепи представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 25-30 и их консервативных модификаций. В другом предпочтительном варианте изобретения CDR1 последовательность переменной области тяжелой цепи представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-6 и их консервативных модификаций; а CDR1 последовательность переменной области легкой цепи представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 19-24.

В различных вариантах изобретения антитело может представлять собой, например, человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело.

Предполагается, что выражение "модификации консервативной последовательности" ("консервативные модификации") по данному описанию относится к аминокислотным модификациям, которые незначительно влияют или незначительно изменяют характеристики связывания антитела, содержащего эту аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации можно вводить в антитело по изобретению обычными методами, известными в уровне техники, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены представляют собой такие замены, при которых аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков со сходными (аналогичными) боковыми цепями определены в уровне техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков в CDR областях антитела по изобретению можно заменить на другие аминокислотные остатки из того же самого семейства боковых цепей, а измененное антитело можно тестировать на сохраненную функцию (т.е. функции, представленные выше) с помощью функциональных анализов по данному описанию.

Антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и антитела против LAG-3

В другом варианте изобретения включает антитела, которые связываются с тем же эпитопом на LAG-3, что и любое из моноклональных антител против LAG-3 по изобретению (т.е., антитела, обладающие способностью конкурировать за связывание с человеческим LAG-3 с любым из моноклональных антител по изобретению). В предпочтительных вариантах изобретения эталонное антитело для изучения конкурентных реакций может представлять собой одно из моноклональных антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5.

Такие конкурентные антитела можно идентифицировать на основании их способности конкурировать с 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и/или 17E5 в стандартных анализах связывания LAG-3. Например, можно использовать стандартные методы анализа ELISA, в которых рекомбинантный человеческий LAG-3 белок иммобилизуют на плашке, одно из антител метят флуоресцентной меткой и оценивают способность немеченых антител конкурировать с немеченым антителом за связывание. Кроме того, или в качестве альтернативы, для оценки способности антител конкурировать можно использовать анализ BIAcore. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание, например, 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и/или 17E5 антител с человеческим LAG-3 показывает, что тестируемое антитело может конкурировать с антителом 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и/или 17E5 за связывание с человеческим LAG-3 и, следовательно, связывается с тем же самым эпитопом на человеческом LAG-3, что и 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и/или 17E5. В предпочтительном варианте изобретения антитело, которое связывается с тем же самым эпитопом на человеческом LAG-3, что и 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 или 17E5, является человеческим моноклональным антителом. Такие человеческие моноклональные антитела можно получать и выделять как описано в примерах.

Как обсуждается далее в примере 3C, связывание 25E3, 25F7 и 8B7 с человеческим LAG-3 картировано в области "внешней петли (extra loop)" в первом внеклеточном домене человеческого LAG-3. Последовательность области внеклеточной (внешней) петли представлена в SEQ ID NO: 79. С помощью пептидного сканирования связывание 25E3 с областью внешней петли картировано в следующей аминокислотной последовательности: PGHPLAPG (SEQ ID NO: 76), тогда как связывание 25F7 с областью внешней петли картировано в следующей аминокислотной последовательности: HPAAPSSW (SEQ ID NO: 77), а связывание 8B7 с областью внешней петли картировано в следующей аминокислотной последовательности: PAAPSSWG (SEQ ID NO: 78). Соответственно, в предпочтительном варианте изобретения включает антитело против LAG-3, которое связывает эпитоп человеческого LAG-3, содержащий аминокислотную последовательность PGHPLAPG (SEQ ID NO: 76). В другом предпочтительном варианте изобретения включает антитело против LAG-3, которое связывает эпитоп человеческого LAG-3, содержащий аминокислотную последовательность HPAAPSSW (SEQ ID NO: 77) или PAAPSSWG (SEQ ID NO: 78).

Генно-инженерные и модифицированные антитела

Помимо этого, можно получать антитело по изобретению, используя антитело, имеющее одну или более последовательностей V_H и/или V_L по данному описанию, в качестве исходного материала для создания модифицированного антитела, причём это модифицированное антитело может иметь изменённые свойства по сравнению с исходным антителом. Антитело можно конструировать (создавать, получать), модифицируя один или более остатков в одной или в обеих переменных областях (т.е. V_H и/или V_L), например, в одном или более CDR доменов и/или в одной или более каркасных областей. Помимо этого, или в качестве альтернативы, антитело можно создавать (конструировать), модифицируя остатки в константной(ых) области(ях), например, с целью изменения эффекторной(ых) функции(й) антитела.

В некоторых вариантах изобретения для создания переменных областей антител можно использовать "CDR-прививку". Антитела взаимодействуют с целевыми антигенами, преимущественно, за счёт аминокислотных остатков, локализованных в шести гипервариабельных доменах (CDR) тяжёлой и лёгкой цепей. По этой причине аминокислотные последовательности в CDR индивидуальных антител более различны между собой, нежели последовательности вне CDR. Так как последовательности CDR отвечают за большинство взаимодействий антитело-антиген, то можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства специфических природных антител, конструируя экспрессирующие векторы, которые включают CDR последовательности из специфического природного антитела, привитые к каркасным последовательностям из другого антитела с другими свойствами (см., например, Riechmann et al. (1998) Nature 332: 323-327; Jones et al. (1986) Nature 321: 522-525; Queen et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033; патенты США No. 5225539; 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370.)

Соответственно, другой вариант изобретения относится к выделенному моноклональному антителу, или его антигенсвязывающему участку, содержащему переменную область тяжёлой цепи, включающую последовательности CDR1, CDR2, и CDR3, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-6, SEQ ID NO: 7-12, и SEQ ID NO: 13-14, GGY и 16-18 соответственно, и переменную область лёгкой цепи, включающую последовательности CDR1, CDR2, и CDR3, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19-24, SEQ ID NO: 25-30, и SEQ ID NO: 31-36 соответственно. Таким образом, эти антитела, содержащие V_H V_L CDR последовательности моноклональных антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5, могут содержать каркасные последовательности, отличные от этих антител.

Такие каркасные последовательности можно получать из общедоступной базы данных ДНК или из опубликованных ссылочных материалов, которые включают последовательности генов антител зародышевой линии. Например, ДНК-последовательности зародышевой линии для генов переменных областей тяжёлой и лёгкой цепи можно найти в базе данных последовательности зародышевой линии человека "VBase" (находящейся в Интернете на сайте www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), а также в Kabat et al. (1991), см. выше; Tomlinson et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty

Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227-776-798; и Cox et al. (1994) "A Directory of Human Germ- line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24: 827-836; содержание каждого из этих материалов однозначно вводится в данное описание в качестве ссылки. В качестве другого примера, ДНК-последовательности зародышевой линии для человеческих генов варибельных областей тяжёлой и лёгкой цепи можно найти в базе данных Genbank. Например, следующие последовательности зародышевой линии для тяжёлой цепи, найденные в HCo7 HuMAb мыши, имеются в Genbank под прилагаемыми регистрационными No.: 1- 69 (NG_0010109, NT_024637 & BC070333), 3- 33 (NG_0010109 & NT_024637) и 3- 7 (NG_0010109 & NT_024637).

В качестве другого примера, следующие последовательности зародышевой линии для тяжёлой цепи, найденные в HCo7 HuMAb мыши, имеются в Genbank под прилагаемыми регистрационными No.: 1- 69 (NG_0010109, NT_024637 & BC070333), 5-

51 (NG_0010109 & NT_024637), 4- 34 (NG_0010109 & NT_024637), 3- 30.3 (CAJ556644)

& 3- 23 (AJ406678).

Белковые последовательности антитела сравнивают с собранной базой данных белковых последовательностей, используя один из методов поиска сходства последовательностей, называемый Gapped BLAST (Altschul et al. (1997), *supra*), общеизвестный в уровне техники.

Предпочтительными каркасными последовательностями для применения в антителах по изобретению являются последовательности, аналогичные по структуре с каркасными последовательностями, используемыми в выбранных антителах по изобретению, например, аналогичные каркасным последовательностям V_H 3-20 (SEQ ID NO: 69), V_H 4-34 (SEQ ID NO: 61), V_H 3-33 (SEQ ID NO: 65) или каркасным последовательностям V_H 1-24 (SEQ ID NO: 73) и/или каркасным последовательностям V_K L18 (SEQ ID NO: 71), V_K L6 (SEQ ID NO: 63) или V_K A27 (SEQ ID NO: 67), используемым в предпочтительных моноклональных антителах по изобретению. Последовательности V_H CDR1, CDR2 и CDR3 и последовательности V_K CDR1, CDR2 и CDR3 можно "привить" к каркасным областям, имеющим последовательность, идентичную последовательности, имеющейся в гене иммуноглобулина зародышевой линии, из которого происходит эта каркасная последовательность, или CDR последовательности можно "привить" к каркасным областям, которые содержат одну или более мутаций по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, найдено, что в некоторых случаях целесообразно осуществлять мутацию остатков в каркасных областях, чтобы сохранить или повысить антигенсвязывающую способность антитела (см., например, патенты США No. 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370).

Другой тип модификации варибельной области представляет собой мутацию аминокислотных остатков в V_H и/или V_L CDR1, CDR2 и/или CDR3 областях с целью повысить одно или более связывающих свойств (например, аффинность целевого антитела). Можно осуществлять сайт-направленный или ПЦР-опосредованный мутагенез для введения мутации(ий), а влияние на связывание или другое целевое функциональное свойство антитела можно определять с помощью анализов *in vitro* или *in vivo*, представленных в данном описании и включённых в примеры. Предпочтительно вводят консервативные мутации (обсуждавшиеся выше). Мутации могут представлять собой аминокислотные замены, добавления или делеции, но предпочтительно они являются заменами. Помимо этого, как правило в CDR области изменяют не более одного, двух, трёх, четырёх или пяти остатков.

Соответственно другой вариант изобретения включает выделенные моноклональные антитела против LAG-3, или их антигенсвязывающие участки, содержащие варибельную область тяжёлой цепи, имеющую:

(а) V_H CDR1 домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-6, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 1-6;

(б) V_H CDR2 домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-12, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 7-12;

(в) V_H CDR3 домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-14, GGY и 16-18, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 13-14, GGY и 16-18;

(г) V_L CDR1 домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19-24, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 19-24;

(д) V_L CDR2 домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-30, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 25-30; и

(е) V_L CDR3 домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31-36, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 31-36.

Генно-инженерные (созданные) антитела по изобретению включают такие антитела, в которых сделаны модификации в каркасных остатках в V_H и/или V_L , например, с целью улучшить свойства антитела. Как правило, такие модификации каркасной последовательности делают, чтобы понизить иммуногенность антитела. Например, один метод представляет собой "обратную мутацию" одного или более каркасных остатков в соответствующую последовательность зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое подвергается соматической мутации, может содержать каркасные остатки, отличающиеся от последовательности зародышевой линии, из которой образовано антитело. Такие остатки можно идентифицировать, сравнивая каркасные последовательности антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых образовано антитело.

Например, в табл. А показаны области, в которых аминокислотное положение в каркасной области (используется система нумерации Kabat) отличается от зародышевой линии и какую обратную мутацию в зародышевую линию можно осуществить в этом положении с помощью указанных замен:

Таблица А. Типичные обратные мутации

Область	Аминокислотное положение в каркасной области (Нумерация по Kabat)	Обратная мутация
25E3 V_H	72	G72R
25E3 V_H	95	Y95H
25E3 V_H	97	T97A
25E3 V_H	98	T98R
25F7 V_H	69	L69I
25F7 V_H	71	L71V
25F7 V_H	83	R83S
25F7 V_H	97	F97R
8B7 V_H	76	K76N
8B7 V_H	79	A79S
8B7 V_H	83	N83S
8B7 V_H	112	P112Q
11F2 V_H	3	D3A
17E5 V_H	3	H3Q
8B7 V_H	59	C59Y
8B7 V_H	59	C59S

Другой тип каркасной модификации включает мутацию одного или более остатков в каркасной области, или даже в одной или более CDR областей, для удаления Т-клеточных эпитопов с целью понизить потенциальную иммуногенность антитела. Этот метод также называется "деиммунизацией", он более подробно описан в опубликованной патентной заявке США № 20030153043.

Помимо, или в качестве альтернативы, модификациям в каркасной или CDR областях, можно создавать (конструировать) антитела по изобретению, которые включают модификации в F_c области, как правило, с целью изменить одно или более функциональных свойств антитела, таких как сывороточный период полужизни, фиксацию комплемента, F_c рецепторное связывание и/или антигензависимую клеточную цитотоксичность. Помимо этого антитело по изобретению можно модифицировать химическими методами (например, одну или более химических групп можно связать с антителом), или его можно модифицировать, изменяя его гликозилирование, чтобы изменить одно или более функциональных свойств антитела.

Каждый из этих вариантов изобретения более подробно описан ниже. Нумерация остатков в F_c области соответствует EU указателю Kabat.

В предпочтительном варианте изобретения антитело представляет собой антитело IgG4 изотипа, содержащее мутацию серина в пролин в положении, соответствующем положению 228 (S228P; EU указатель) на шарнирном участке константной области тяжелой цепи. Сообщалось, что эта мутация вызывает отмену гетерогенности межцепных дисульфидных мостиков в шарнирной области (Angal et al. см. выше; положение 241 соответствует системе нумерации Kabat). Например, в различных вариантах изобретения антитело против LAG-3 по изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи антитела 25F7 (SEQ ID NO: 37) или 26H10 (SEQ ID NO: 38), связанную с константным доменом человеческого IgG4, в котором серин в положении, соответствующем положению 241, описанному Angal et al., см. выше, мутировал в пролин. Так, в переменных областях тяжелой цепи антител 25F7 и 26H10, связанных с константной областью IgG4, эта мутация соответствует мутации S228P по EU index (указателю).

В одном варианте изобретения шарнирную область домена C_H1 модифицируют таким образом, чтобы число цистеиновых остатков в шарнирной области менялось, например, увеличивалось или уменьшалось. Данный метод подробнее описан в патенте США № 5677425. Число цистеиновых остатков в шарнирной области домена C_H1 изменяют, например, с целью способствовать сборке легкой и тяжелой цепей или повысить или понизить устойчивость антитела.

В другом варианте изобретения осуществляют мутации в F_c шарнирной области антитела, чтобы повысить или понизить биологический период полужизни антитела. Более конкретно одну или более

аминокислотных мутаций вводят в область границы раздела C_{H2} - C_{H3} доменов Fc-шарнирного фрагмента таким образом, чтобы связывание антитела со стафилококковым белком А (SpA) ослаблялось по сравнению со связыванием нативного Fc-шарнирного домена с SpA. Этот метод описан более подробно в патенте США № 6165745.

В другом варианте изобретения антитело модифицируют для повышения его биологического периода полужизни. Возможны различные подходы. Например, можно ввести одну или более нижеприведённых мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375. Или же для повышения биологического периода полужизни антитело можно изменять в C_{H1} или C_L области таким образом, чтобы оно содержало эпитоп связывания с рецептором-"мусорщиком", образованный с помощью двух петель C_{H2} домена Fc области IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022.

В других вариантах изобретения Fc область меняют, заменяя по меньшей мере один аминокислотный остаток на другой аминокислотный остаток, чтобы изменить эффекторную(ые) функцию(и). Например, одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322 можно заменить другим аминокислотным остатком таким образом, чтобы антитело изменяло аффинность к эффекторной молекуле - лиганду, но сохраняло антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, может представлять собой, например, Fc рецептор или C1 компонент комплемента. Этот подход описан более подробно в патентах США №№ 5624821 и 5648260.

В другом примере одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322, можно заменить на другой аминокислотный остаток таким образом, чтобы антитело изменяло C1q связывание и/или снижало или отменяло комплементзависимую цитотоксичность (K3C, CDC). Подробнее такой подход описан в патенте США № 6194551.

В другом примере изменяют один или более аминокислотных остатков в аминокислотных положениях 231 и 239, при этом меняется способность антитела фиксировать комплемент. Этот метод более подробно описан в опубликованной Международной заявке PCT WO 94/29351.

Ещё в одном примере Fc область модифицируют для повышения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ, ADCC) и/или для повышения аффинности антитела к Fcγ рецептору за счёт модификации одной или более аминокислот в следующих положениях:

238, 239, 248,

249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286,

289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324,

326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389,

398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439.

Более подробно этот метод в опубликованной Международной заявке PCT WO 00/42072. Помимо этого на человеческом IgG1 были картированы сайты связывания с FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn и описаны варианты с повышенным связыванием (см. Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276: 6591-6604). Показано, что специфические мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 повышают связывание с FcγRIII. Помимо этого, показано, что следующие комбинированные мутанты повышают связывание FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A.

Ещё в одном варианте изобретения модифицируют гликозилирование антитела. Например, можно получать "негликозилированное (агликозилированное)" антитело (т.е. гликозилирование антитела отсутствует). Гликозилирование можно изменять, например, чтобы повысить аффинность антитела к антигену. Такие углеводные модификации можно осуществлять, например, изменяя один или более сайтов гликозилирования в аминокислотной последовательности. Например, можно провести одну или более аминокислотных замен, в результате чего элиминируется один или более сайтов гликозилирования в каркасном участке варибельной области, тем самым исключается гликозилирование по этому сайту. Такое "агликозилирование" (отсутствие гликозилирования) может повысить аффинность антитела к антигену. См., например, патенты США №№ 5714350 и 6350861.

Помимо этого, или в качестве альтернативы, можно получать антитело с изменённым типом гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело, имеющее пониженное число фукозильных остатков, или антитело, имеющее улучшенные структуры GlcNAc с бисекторной плоскостью. Показано, что такие изменённые паттерны гликозилирования повышают ADCC способность антител. Такие углеводные модификации можно осуществлять, например, экспрессируя антитело в клетке-хозяине с изменённым механизмом гликозилирования. Клетки с изменённым механизмом гликозилирования описаны в уровне техники и могут использоваться в качестве клеток-хозяев для экспрессии в них рекомбинантных антител по изобретению с целью продуцировать таким образом антитело с изменённым паттерном гликозилирования. Например, в линиях клеток Ms704, Ms705 и Ms709 отсутствует ген фукозилтрансферазы, FUT8 ($\alpha(1,6)$ -фукозилтрансферазы), так среди углеводов антител, экспрессированных в клеточных линиях Ms704, Ms705 и Ms709, отсутствует фукоза. Клеточные линии Ms704, Ms705 и Ms709 FUT8^{-/-} получают нацеленным распадом (разрушением) гена FUT8 в клетках CHO/DG44, используя два замещающих

вектора (Опубликованная патентная заявка США № 20040110704 и Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87: 614-22). Другой пример, в Европейском патенте EP 1176195 описывается линия клеток с нарушенной функцией гена FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, поэтому наблюдается гипофукозилирование антител, экспрессированных в такой линии клеток за счёт уменьшения или исключения фермента с α -1,6 связью. В Европейском патенте EP 1176195 также описываются линии клеток, обладающих пониженной ферментной активностью в реакции присоединения фукозы к N-глюкозамину, который связывается с Fc областью антитела, или не обладающих активностью, например, линия клеток миеломы YB2/0 (ATCC CRL 1662). В опубликованной Международной патентной заявке PCT WO 03/035835 описывается вариант CHO клеточной линии, клетки Lec13, с пониженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессированных в этой клетке-хозяине (см. также Shields et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Антитела с модифицированным профилем гликозилирования также можно получать в куриных яйцах, как описано в опубликованной Международной патентной заявке PCT WO 06/089231. Или же, антитела с модифицированным профилем гликозилирования можно получать в растительных клетках, таких как Lemna. Методы получения антител в растительной системе раскрываются в патентной заявке США, соответствующей заявке с регистрационным номером в патентном реестре Alston & Bird LLP No. 040989/314911, поданной 11 августа 2006 г. В опубликованной Международной патентной заявке PCT WO 99/54342 описываются линии клеток, созданные таким образом, чтобы экспрессировать гликопротеин-модифицирующие гликозилтрансферазы (например, β (1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnTIII)), так что у этих антител, экспрессированных в генно-инженерных линиях клеток, наблюдаются усовершенствованные GlcNac структуры с бисекторной плоскостью, что вызывает повышенную ADCC активность антител (см. также Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17: 176-180). Или же фукозные остатки антитела можно отщеплять, используя фермент глюкозидазу; например, фукозидаза α -L-фукозидаза удаляет фукозильные остатки из антител (Tarentino et al. (1975) *Biochem.* 14: 5516-23).

Другой модификацией антител по данному описанию, рассматриваемой в данном раскрытии, является пегилирование. Антитело можно пегилировать, например, для повышения биологического (например, сывороточного) периода полужизни. Для пегилирования антитела, или его фрагмент, как правило, реагирует с полиэтиленгликолем (ПЭГ, PEG), таким как реакционноспособное сложноэфирное или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, в которых одна или более групп ПЭГ присоединяется к антителу или к фрагменту антитела. Предпочтительно, пегилирование осуществляют реакцией ацилирования или алкилирования реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Предполагается, что термин "полиэтиленгликоль" по данному описанию охватывает любую из форм ПЭГ, которую используют для дериватизации других белков, такую как моно (C_1 - C_{10}) алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. В некоторых вариантах изобретения пегилируемое представляет собой негликозилированное (агликозилированное) антитело. Методы пегилирования белков известны в уровне техники и могут применяться для пегилирования антител по изобретению См., например, Европейские патенты EP 0154316 и EP 0401384.

Физические свойства антител

Антитела по данному изобретению можно характеризовать различными физическими свойствами, чтобы их детектировать и/или дифференцировать различные классы антител.

Антитела по настоящему изобретению могут содержать один или более сайтов гликозилирования в каждой вариабельной области лёгкой или тяжёлой цепи. Такие сайты гликозилирования могут вызывать повышенную иммуногенность антитела или изменение pK антитела вследствие изменения связывания с антигеном (Marshall et al. (1972) *Аппи Rev Biochem* 41: 673-702; Gala and Morrison (2004) *J Immunol* 172: 5489-94; Wallick et al. (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12: 43R-56R; Parekh et al. (1985) *Nature* 316: 452-7; Mimura et al. (2000) *Mol Immunol* 37: 697-706). Известно, что гликозилирование происходит в мотивах, содержащих последовательность N-X-S/T. В некоторых случаях предпочтительно иметь антитело против LAG-3, которое не является гликозилированным в вариабельной области. Этого можно достичь отбором антител, которые не содержат мотива гликозилирования в вариабельной области, или мутацией остатков в области гликозилирования.

В предпочтительном варианте изобретения антитела по настоящему раскрытию не содержат сайтов изомерии аспарагина. Деамидирование аспарагина может происходить по последовательностям N-G или D-G, приводя к образованию остатка изоаспарагиновой кислоты, которая вызывает изгиб (петлю) полипептидной цепи и снижает её устойчивость (эффект изоаспарагиновой кислоты).

Каждое антитело имеет уникальную изоэлектрическую точку (pI), которая обычно находится в интервале pH между 6 и 9.5. pI для антитела IgG1, как правило, попадает в интервал pH 7-9.5, а pI для антитела IgG4, как правило, попадает в интервал pH 6-8. Существует гипотеза, что антитела с pI вне интервала нормальных значений pH могут до некоторой степени претерпевать раскручивание и неустойчивость в условиях *in vivo*. Таким образом, предпочтительно иметь антитело против LAG-3, значение pI которого попадает в интервал нормальных значений pH. Этого можно достичь либо отбором антител со значением pI в интервале нормальных значений pH, либо мутацией заряженных поверхностных остатков.

Каждое антитело имеет характеристическую температуру плавления, причём более высокая температура плавления указывает на повышенную общую стабильность (устойчивость) *in vivo* (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3: 361-71). Как правило, предпочтительно, чтобы T_m (температура начального раскручивания) была выше 60°C, предпочтительно выше 65°C, ещё более предпочтительно, выше 70°C. Точку плавления антитела можно определять методом дифференциальной сканирующей калориметрии (Chen et al. (2003) *Pharm Res* 20: 1952-60; Ghirlando et al. (1999) *Immunol Lett* 68: 47-52) или методом кругового дихроизма (Murray et al. (2002) *J. Chromatogr Sci* 40: 343-9).

В предпочтительном варианте изобретения выбирают антитела, которые не распадаются быстро. Распад антитела можно количественно определять методами капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS (Alexander AJ and Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67: 3626-32).

В другом предпочтительном варианте изобретения выбирают антитела с минимальным агрегационным эффектом, который может привести к запуску нежелательного иммунного ответа и/или изменённым или нежелательным фармакокинетическим свойствам. Как правило, приемлемыми являются антитела с агрегацией 25% или менее, предпочтительно, 20% или менее, ещё более предпочтительно 15% или менее, ещё более предпочтительно 10% или менее и ещё более предпочтительно 5% или менее. Агрегацию количественно определяют несколькими методами, включая колоночную высокоэффективную гель-хроматографию (SEC), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ, HPLC) и рассеяние света.

Методы инжиниринга антител

Как обсуждается выше, антитела против LAG-3, имеющие V_H и V_L последовательности по данному описанию, можно использовать для создания новых антител против LAG-3 модификацией последовательностей V_H и/или V_L или связанных с ними константных областей. Так, в другом аспекте изобретения структурные признаки антитела против LAG-3 по изобретению, например, 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5, используют для создания родственных по структуре антител против LAG-3, которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство антител по изобретению, такое как связывание с человеческим LAG-3. Например, одну или более областей CDR антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5, или их мутанты, можно объединять методами рекомбинантной ДНК с известными каркасными областями и/или другими CDR с целью создания дополнительных, полученных методами рекомбинантной ДНК антител против LAG-3 по изобретению, обсуждавшихся выше. Другие типы модификации включают типы модификации, описанные в предыдущем разделе. Исходным материалом для метода инжиниринга является одна или более последовательностей V_H и/или V_L по данному описанию, или их один или более CDR доменов. Для создания генно-инженерного антитела нет необходимости действительно получать (т.е. экспрессировать в виде белка) антитело, имеющее одну или более последовательностей V_H и/или V_L по данному описанию или её один или более CDR доменов. Скорее информация, содержащаяся в последовательности(ях), используется как исходный материал для создания последовательности(ей) "второго поколения", образованной(ых) из оригинальной(ых) последовательности(ей), а затем последовательность(и) "второго поколения" получают и экспрессируют в виде белка.

Соответственно, другой вариант изобретения включает способ получения антитела против LAG-3, содержащий:

(а) предоставление:

(i) последовательности варибельной области тяжёлой цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-6, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-12, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-14, GGY и 16-18; и/или

(ii) последовательности варибельной области лёгкой цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19-24, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-30, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31-36;

(б) изменение по меньшей мере одного аминокислотного остатка в последовательности варибельной области тяжёлой цепи антитела и/или последовательности варибельной области лёгкой цепи для создания по меньшей мере одной изменённой последовательности антитела и

(в) экспрессирование изменённой последовательности антитела в виде белка.

Для получения и экспрессии антитела с изменённой последовательностью можно применять стандартные методы молекулярной биологии.

Предпочтительно антитело, кодированное изменённой(ыми) последовательность(ями) гена антитела, представляет собой антитело, которое сохраняет одно, некоторые или все функциональные свойства антител против LAG-3 по данному описанию, причём эти функциональные свойства включают, но без ограничения:

(i) высокоаффинное связывание с человеческим LAG-3;

(ii) связывание с LAG-3 обезьян;

(iii) отсутствие связывания с мышинным LAG-3;

(iv) способность ингибировать связывание LAG-3 с молекулами МНС класса II и

(v) способность стимулировать иммунный ответ (например, антигенспецифический Т-клеточный ответ).

Функциональные свойства изменённых антител можно оценивать стандартными методами анализа, известными в уровне техники и/или представленными в данном описании, такими, как методы, приведённые в примерах.

В некоторых вариантах методов инжиниринга антител по изобретению можно вводить мутации, случайно или селективно, в последовательность, кодирующую целое антитело или участок антитела, а полученные модифицированные антитела против LAG-3 можно подвергнуть скринингу на связывающую активность и/или другие функциональные свойства по данному описанию. Мутационные методы описаны в уровне техники (см., например, опубликованные Международные заявки PCT WO 02/092780 и WO 03/074679).

Нуклеотидные молекулы, кодирующие антитела по изобретению

Другой аспект изобретения относится к нуклеотидным молекулам, которые кодируют антитела по изобретению. Нуклеиновые кислоты могут находиться в целых клетках, клеточном лизате или в частично очищенном или практически чистом виде. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "приведённой в практически чистое состояние", если она очищена от других клеточных компонентов или других примесей, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, стандартными методами, включая обработку в щелочной электрофоретической системе с SDS, центрифугирование в растворах CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие методы, общеизвестные в уровне техники. См. Ausubel, et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Нуклеиновая кислота по изобретению может представлять собой ДНК, РНК и может содержать или не содержать интронные последовательности или не содержать их. В предпочтительном варианте изобретения нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

Нуклеиновые кислоты по изобретению можно получать обычными методами молекулярной биологии. В случае антител, экспрессируемых гибридами (например, гибридами, полученными от трансгенных мышей, несущих гены человеческих иммуноглобулинов, подробнее описанные ниже), кДНК кодирующие лёгкую и тяжёлую цепи антитела, продуцируемого гибридомой, можно получать стандартной ПЦР-амплификацией или клонированием кДНК. В случае антител, получаемых из библиотеки генов иммуноглобулинов (например, с применением методов фагового дисплея), нуклеиновую кислоту, кодирующую такие антитела, можно выделять из библиотеки генов.

Предпочтительные нуклеотидные молекулы по изобретению представляют собой такие нуклеотидные молекулы, которые кодируют V_H и V_L последовательности моноклональных антител 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 и 17E5. Последовательности ДНК, кодирующие V_H последовательности 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 и 17E5, показаны в SEQ ID NO: 49-54 соответственно. Последовательности ДНК, кодирующие V_L последовательности антител 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 и 17E5, показаны в SEQ ID NO: 55-60 соответственно.

Когда получены ДНК-фрагменты, кодирующие сегменты V_H и V_L , эти ДНК-фрагменты можно далее обрабатывать обычными методами ркомбинантной ДНК, например, чтобы превратить гены вариабельной области в гены полноразмерного антитела, в гены фрагмента Fab или в ген scFv. При этом ДНК-фрагмент, кодирующий V_L - или V_H -, функционально связывают с другим ДНК-фрагментом, кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. Предполагается, что выражение "функционально связанный" в данном контексте означает, что два фрагмента ДНК связываются таким образом, чтобы аминокислотные последовательности, кодируемые двумя фрагментами ДНК оставались в рамке считывания.

Выделенную ДНК, кодирующую область V_H , можно превратить в ген полноразмерной тяжёлой цепи, функционально связывая ДНК, кодирующую V_H , с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжёлой цепи (C_H1 , C_H2 и C_H3). Последовательности генов константных областей тяжёлой цепи известны в уровне техники (например, см. выше, Kabat et al. (1991)), а фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получать обычной ПЦР-амплификацией. Константная область тяжёлой цепи может представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, но наиболее предпочтительно является константной областью IgG1 или IgG4. Для гена тяжёлой цепи фрагмента Fab ДНК, кодирующая V_H , может функционально связываться с молекулой другой ДНК, кодирующей только константную область C_H1 тяжёлой цепи.

Выделенную ДНК, кодирующую область V_L , можно превратить в ген полноразмерной лёгкой цепи (а также ген лёгкой цепи Fab) за счёт функционального связывания ДНК, кодирующей V_L , с молекулой другой ДНК, кодирующей константную область лёгкой цепи, C_L . Последовательности человеческих генов константной области лёгкой цепи известны в уровне техники (например, Kabat et al., см. выше), а ДНК-фрагменты, охватывающие эти области, можно получать обычной ПЦР-амплификацией. В предпочтительных вариантах изобретения константная область лёгкой цепи может представлять собой константную область каппа или лямбда.

Для создания scFv гена ДНК-фрагменты, кодирующие V_H - и V_L -области, функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующий аминокислотную последова-

тельность (Gly₄-Ser)₃, так что последовательности V_H и V_L могут экспрессироваться в виде непрерывного одноцепочечного белка, в котором области V_L и V_H связаны гибким линкером (см., например, Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883; McCafferty et al. (1990) *Nature* 348: 552-554).

Получение моноклональных антител по изобретению

Моноклональные антитела (mAbs) по настоящему раскрытию можно получать хорошо известным методом гибридизации соматических клеток (методом гибридом) Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Другие варианты получения моноклональных антител включают трансформацию В лимфоцитов с помощью вирусов или онкогенов и методы фагового дисплея. Химерные или гуманизированные антитела также общеизвестны в уровне техники. См., например, Патенты США №№ 4816567; 5225539; 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, содержание которых специально вводится в данное описание ссылкой во всей полноте.

В предпочтительном варианте изобретения антитела по изобретению представляют собой человеческие моноклональные антитела. Такие человеческие моноклональные антитела, специфические к человеческому LAG-3, можно получать, используя трансгенных или "транс-хромосомных" мышей, несущих скорее компоненты иммунной системы человека, нежели компоненты мышинной системы. Эти трансгенные и "транс-хромосомные" мыши включают мышей, называемых в данном описании "мышь HuMAb" (HuMAb Mouse®) и мышь KM (KM Mouse®) соответственно, и в целом называемых в данном описании "мыши, с (несущие) Ig человека."

Мыши HuMAb (Medarex®, Inc.) содержат минилокусы неаранжированных генов человеческого иммуноглобулина, которые кодируют человеческие последовательности тяжёлой (μ и γ) и лёгкой цепи к иммуноглобулина, совместно с нацеленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы μ и κ цепей (см., например, Lonberg et al. (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859). Соответственно, у этих мышей наблюдается пониженная экспрессия мышинового IgM или κ цепи, и, в ответ на иммунизацию, введенные человеческие трансгены тяжёлой и лёгкой цепи вызывают переключение класса антител и соматическую мутацию, генерируя высокоаффинные человеческие моноклональные антитела IgGκ (Lonberg et al. (1994), см. выше; обзор в

Lonberg (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101; Lonberg, N. and

Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, и Harding and Lonberg (1995) *Ann. N.Y.*

Acad. Sci. 764: 536-546).

Получение и использование мышей HuMAb Mouse® и геномные модификации, которые несут эти мыши, подробнее описаны в

Taylor et al.

(1992) *Nucleic Acids Research* 20: 6287-6295; Chen et al. (1993) *International Immunology*

5: 647-656; Tuaillon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3720-3724; Choi et al.

(1993) *Nature Genetics* 4: 117-123; Chen et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon et al.

(1994) *J. Immunol.* 152: 2912-2920; Taylor et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-

591; и Fishwild et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851,

содержание всех этих материалов вводится специально в данное описание ссылкой во всей полноте. Помимо этого, см. патенты США №№ 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; 5770429; и 5545807; опубликованные Международные патентные заявки PCT №№ WO 92/03918; WO 93/12227; WO 94/25585; WO 97/13852; WO 98/24884; WO 99/45962 и WO 01/14424, содержание которых вводится в данное описание ссылкой во всей полноте.

В другом варианте изобретения можно вызвать образование человеческих антител по изобретению, используя мышь, которая несёт последовательности генов человеческого иммуноглобулина на трансгенах и "транс-хромосомах", такую как мышь, которая несёт трансген человеческой тяжёлой цепи и "транс-хромосому" человеческой лёгкой цепи. Такую мышь в данном описании называют "KM mouse®," она подробно описана в опубликованной Международной патентной заявке PCT WO 02/43478. Модифицированная форма этой мыши, которая дополнительно включает дизрупцию гена эндогенного FcγRIIB рецептора в гомозиготном состоянии, также описана в опубликованной Международной патентной заявке PCT WO 02/43478 и называется в данном описании мышью "KM/FCGR2D mouse®." Помимо этого, можно использовать мышей с трансгенами тяжёлой цепи либо HCo7, либо HCo12.

Другие варианты трансгенных животных включают XenoMouse (Abgenix, Inc., патенты США №№ 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963). Другие варианты изобретения включают "ТС мышей" (Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727) и коров (крупный рогатый скот), несущих "транс-хромосомы" человеческой тяжёлой и лёгкой цепи (Kuroiwa et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20: 889-894; опубликованная Международная заявка PCT WO 02/092812). Содержание этих патентов и опубликованной патентной заявки вводится специально в данное описание ссылкой во всей полноте.

В одном варианте изобретения человеческие моноклональные антитела по изобретению получают методами фагового дисплея для скрининга библиотек генов человеческого иммуноглобулина. См., например, патенты США №№ 5223409; 5403484; 5571698; 5427908; 5580717; 5969108; 6172197; 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081, содержание которых вводится в данное описание ссылкой во всей полноте.

Человеческие моноклональные антитела по изобретению можно получать, используя мышей SCID, в которых проведена такая реконституция человеческих иммунных клеток, что при иммунизации вырабатываются человеческие антитела (антительный ответ). См., например, патенты США №№ 5476996 и 5698767, содержание которых вводится в данное описание ссылкой во всей полноте.

В другом варианте изобретения человеческие антитела против LAG-3 получают методом фагового дисплея, в котором фаги содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, вырабатываемые в организме трансгенных животных, заранее иммунизированных белком LAG-3. В предпочтительном варианте изобретения трансгенное животное представляет собой мышь HuMab, KM или Kirin. См., например, патент США № 6794132, содержание которого вводится в данное описание ссылкой во всей полноте.

Иммунизация мышей, несущих человеческий Ig (Human Ig)

В одном варианте изобретения мышей с человеческим Ig иммунизируют очищенным или обогащенным препаратом LAG-3 антигена, рекомбинантного белка LAG-3 или клетками, экспрессирующими белок LAG-3. Например, Lonberg et al. (1994), см. выше; Fishwild et al. (1996), см. выше; опубликованные Международные заявки PCT WO 98/24884 или WO 01/14424, содержание которых вводится в данное описание ссылкой во всей полноте. В предпочтительном варианте изобретения мышей в возрасте 6-16 недель иммунизируют, вводя 5-50 мкг белка LAG-3. Или же используют участок LAG-3, слитый с отличным от LAG-3 полипептидом.

В одном варианте изобретения трансгенных мышей иммунизируют интраперитонеально (IP) или внутривенно (IV, в.в.) LAG-3 антигеном в полном адъюванте Фрейнда с последующей IP или IV иммунизацией в неполном адъюванте Фрейнда. В других вариантах изобретения используют адъюванты, отличные от адъюванта Фрейнда, или целые клетки в отсутствие адъюванта. Плазму можно подвергнуть скринингу методом ELISA, а клетки мышей с удовлетворительными титрами человеческого иммуноглобулина против LAG-3 можно использовать для слияния.

Получение гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела по изобретению

Для получения гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела по изобретению, спленоциты и/или клетки лимфатических узлов иммунизированных мышей можно выделять и сливать с соответствующей линией immortalized клеток, такой как линия клеток мышинной миеломы. Полученные гибридомы можно подвергнуть скринингу на продукцию антигенспецифических антител. Получение гибридом хорошо известно в уровне техники. См., например, Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York.

Получение трансфектом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела по изобретению

Антитела по изобретению можно также продуцировать в клетках-хозяевах-трансфектомах, используя, например, комбинацию методов рекомбинантной ДНК и трансфекции генов, хорошо известных в уровне техники (e.g., Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202). В одном варианте изобретения ДНК, кодирующую частичную или полноразмерную лёгкую и тяжёлую цепь, полученную обычными методами молекулярной биологии, встраивают в один или более экспрессирующих векторов таким образом, чтобы гены функционально связывались с последовательностями, регулируемыми (регуляторными) транскрипцией и трансляцией. Предполагается, что в этом контексте выражение "функционально связанный" означает, что ген антитела сшивают с вектором таким образом, чтобы последовательности контроля транскрипции и трансляции в векторе служили их заданной функции регуляции транскрипции и трансляции гена антитела.

Предполагается, что термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепи антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel (*Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих включают вирусные элементы, которые контролируют высокий уровень экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян 40 (SV40), аденовируса (например, главный поздний промотор аденовируса (AdMLP) и вируса полиомы. Или же можно использовать невирусные регуляторные последовательности, такие как промотор убиквитина или промотор β -глобина. Помимо этого регуляторные элементы, состоящие из последовательностей из разных источников, такие как промоторная система промотора SR α , которая содержит последовательности из раннего промотора SV40 и длинный концевой повтор вируса T-

клеточного лейкоза типа 1 (Takebe et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466-472). Экспрессирующий вектор и последовательности контроля экспрессии выбирают таким образом, чтобы они были совместимы с используемой для экспрессии клеткой-хозяином.

Ген лёгкой цепи антитела и ген тяжёлой цепи антитела можно встроить в один и тот же экспрессирующий вектор или в разные экспрессирующие векторы. В предпочтительных вариантах изобретения переменные области используют для создания генов полноразмерных антител любого изотипа путём встраивания их в экспрессирующие векторы, уже кодирующие константные области тяжёлой и лёгкой цепи заданного изотипа, так чтобы V_H сегмент функционально связывался с C_H сегментом (сегментами) в векторе, а V_L сегмент функционально связывался с C_L сегментом в векторе. Помимо этого или в качестве альтернативы, вектор для экспрессии рекомбинантных генов может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции цепи антитела клеткой-хозяином. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор таким образом, чтобы сигнальный пептид связывался в рамке считывания с аминоконцом цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (например, сигнальный пептид из неиммуноглобулинового белка).

Помимо генов цепи антитела и регуляторных последовательностей, вектор для экспрессии рекомбинантных генов по изобретению могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, ориджины репликации) и селективные маркерные гены. Селективный маркерный ген способствует селекции клеток-хозяев, в которые вводят вектор (см., например, патенты США №№ 4399216; 4634665 и 5179017). Например, как правило, селективный маркерный ген придаёт устойчивость к лекарствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую водится вектор. Предпочтительные селективные маркерные гены включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в селекции/амплификации в dhfr-клетках хозяев в присутствии метотрексата) и ген пео (для G418 селекции).

Для экспрессии лёгкой и тяжёлой цепей экспрессирующий(е) вектор(ы), кодирующий(е) тяжёлую и лёгкую цепи, трансфецируют в клетку-хозяина стандартными методами. Предполагается, что различные формы термина "трансфекция" охватывают широкий ряд методов, обычно используемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например электропорацию, осаждение фосфатом кальция, трансфекцию с использованием полимера ДЭАЭ (DEAE)-декстрана и т.п. Хотя теоретически возможно экспрессировать антитела по изобретению как в прокариотических, так и в эукариотических клетках-хозяевах, экспрессия антител в эукариотических клетках, и наиболее предпочтительно, в клетках-хозяевах млекопитающих, является наиболее предпочтительной, потому, что такие эукариотические клетки, и в частности, клетки млекопитающих, скорее чем прокариотические клетки, собирают и секретируют соответствующим образом сложенное (имеющее подходящую пространственную структуру) и иммунологически активное антитело.

Предпочтительны клетки-хозяева млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO клетки) (включая dhfr⁻ CHO клетки, описанные в Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, применяемые с DHFR селективным маркером, например, как описано в R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159: 601-621), NSO миеломные клетки, клетки COS и клетки SP2. В частности, другая предпочтительная система экспрессии для применения с NSO миеломными клетками представляет собой GS систему экспрессии генов, раскрываемую в Международных патентных заявках WO 87/04462, WO 89/01036 и в Европейском патенте EP 338841. Если векторы для рекомбинантной экспрессии, кодирующие гены антител, вводят в клетки-хозяева млекопитающих, антитела продуцируются при культивировании клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для экспрессии антитела в клетках-хозяевах или, более предпочтительно, для секреции антитела в культуральную среду, в которой выращиваются клетки-хозяева. Антитела можно выделять из культуральной среды обычными методами очистки белков.

Характеристика связывания антитела с антигеном

Антитела по изобретению можно тестировать на связывание с человеческим LAG-3, например, стандартными методами ELISA. Человеческие IgG против LAG-3 можно дополнительно проверять на реактивность в отношении LAG-3 антигена Вестерн-блоттингом. Специфичность связывания антитела по изобретению можно также определять, проводя мониторинг связывания антитела с клетками, экспрессирующими белок LAG-3, например, методами проточной цитометрии. Эти методы известны в уровне техники. См., например, Harlow and Lane (1988), *supra*.

Иммуноконъюгаты

Антитела по данному изобретению могут конъюгироваться с терапевтическим агентом с образованием иммуноконъюгата, такого как конъюгат антитело-лекарство (ADC). Подходящие терапевтические агенты включают антиметаболиты, алкилирующие агенты, связывающие малых бороздок ДНК, ДНК интеркаляторы, ДНК кросс-линкеры, ингибиторы деацетилазы гистонов, ингибиторы экспорта из ядра, ингибиторы протеасом, ингибиторы топоизомеразы I или II, ингибиторы белков теплового шока, ингибиторы тирозинкиназ, антибиотики и антимитотические агенты. В ADC антитело и терапевтический агент, предпочтительно, конъюгируются с помощью отщепляемого линкера, такого как пептидильный, дисульфидный или гидразоновый линкер. Более предпочтительно, линкер представляет собой пептидиль-

ный линкер, такой как

Val- Cit, Ala- Val, Val-Ala-Val, Lys- Lys, Pro-Val-Gly-
Val-Val (SEQ ID NO: 15), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit- Cit, Val- Lys, Lys,
Cit, Ser или Glu.

Конъюгаты ADC можно получать как описано в патентах США №№ 7087600; 6989452 и 7129261; опубликованных Международных заявках PCT WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312 и WO 08/103693; опубликованных патентных заявках США 20060024317; 20060004081 и 20060247295; раскрытие которых вводится в данное описание в качестве ссылки.

Биспецифические молекулы

В другом аспекте настоящее раскрытие включает биспецифические молекулы, содержащие антитело против LAG-3, связанное по меньшей мере с одной отличной функциональной молекулой, например, с другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом для рецептора), образуя биспецифическую молекулу, которая связывается, по меньшей мере, с двумя различными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Таким образом, "биспецифическая молекула" по данному описанию включает молекулы, которые имеют три или более специфичностей. В предпочтительном варианте изобретения биспецифическая молекула содержит первую специфичность связывания с LAG-3 и вторую специфичность связывания с молекулой, обладающей триггерными свойствами, которая рекрутирует цитотоксические эффекторные клетки, способные убивать экспрессирующую LAG-3 клетку-мишень. Примерами подходящих триггерных (запускающих, иницирующих) молекул являются CD64, CD89, CD16 и CD3. См., например, Kufer et al., *TRENDS in Biotechnology*, 22 (5), 238-244 (2004).

В одном варианте изобретения биспецифическая молекула содержит третью специфичность, помимо специфичности связывания против Fc и специфичности связывания против LAG-3. Третья специфичность может представлять собой специфичность к антифактору усиления (EF), например, к молекуле, связывающейся с поверхностным белком, который задействован в цитотоксической активности и тем самым усиливает иммунный ответ против клетки- мишени. Например, антифактор усиления может связывать цитотоксическую Т-клетку (например, с помощью CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40 или ICAM-1) или другую иммунную клетку, вызывая в результате усиленный иммунный ответ против клетки- мишени.

Биспецифические молекулы могут быть различных форматов и размеров. Одну крайность представляют собой биспецифические молекулы, сохраняющие обычный формат антитела за исключением того, что вместо двух связывающих плеч с идентичной специфичностью они имеют два связывающих плеча с различной специфичностью. Другую крайность представляют собой биспецифические молекулы, состоящие из двух фрагментов одноцепочечного антитела (scFv), связанных пептидной цепью, так называемая конструкция Bs(scFv)₂. Биспецифические молекулы промежуточного размера включают два различных фрагмента F(ab), связанных пептидным линкером. Биспецифические молекулы этих и других форматов можно получать генной инженерией (методами рекомбинантной ДНК), соматической гибридизацией или химическими методами. См., например, Kufer et al., *supra*; Cao and Suresh, *Bioconjugate Chemistry*, 9 (6), 635-644 (1998); и van Spriell et al., *Immunology Today*, 21 (8), 391-397 (2000), и приведённые в этих материалах ссылки.

Фармацевтические композиции

В другом аспекте настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую антитело по настоящему раскрытию, приготовленное совместно с фармацевтически приемлемым носителем. Она (композиция) может содержать один или более фармацевтически активных ингредиентов, таких как другое антитело или лекарство. Фармацевтические композиции по изобретению можно также применять в комбинированной терапии, например, с другим иммуностимулирующим агентом, противоопухолевым агентом и антивирусным агентом или вакциной, с тем, чтобы антитело против LAG-3 усиливало иммунный ответ против вакцины.

Фармацевтическая композиция может содержать некоторое число эксципиентов. Эксципиенты, которые можно использовать, включают носители, поверхностно-активные агенты, загустители или эмульгаторы, твёрдые связующие, диспергирующие или суспендирующие агенты, солюбилизаторы, красители, корригенты вкуса или запаха, покрытия, разрыхлители, смазки, подсластители, консерванты, изотонические агенты и их комбинации. Выбор и применение подходящих эксципиентов описаны в руководстве-справочнике Gennaro, ed., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003), раскрытие которого вводится ссылкой в данное описание.

Предпочтительно фармацевтическая композиция применима для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, в виде инъекции или инфузии (вливания)). В зависимости от способа введения активное соединение можно покрывать материалом для его защиты от действия кислой и от других естественных условий, которые могут его инактивировать. Выражение "парентеральное введение" по данному описанию означает способы введения, отличные от энтерального (тонкокишечного) и местного введения, обычно в виде инъекций, и включает, но без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную

(подоболочечную), внутрикапсульную, интраорбитальную (внутриглазничную), внутрисердечную, интрадермальную, интраперитонеальную (внутрибрюшинную), транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсульную, субарахноидальную, интраспинальную и подкожную (надчревную) инъекцию и инфузию. Или же антитело по изобретению можно вводить непарентеральным путём, таким как топический (локальный, местный), эпидермальный или чресслизистый (в слизистую оболочку) путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально (подъязычно) или местно.

Фармацевтические соединения по изобретению могут быть в виде фармацевтически приемлемых солей. Выражение "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет нужную биологическую активность исходного соединения и не вызывает нежелательных токсикологических эффектов. Примеры таких солей включают соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Соли присоединения кислоты включают соли, образованные из нетоксических неорганических кислот, таких как хлористоводородная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая и т.п., а также из нетоксических органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещённые алкановые кислоты, гидроксикарбоновые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т.п. Соли присоединения основания включают соли, образованные из щелочных и щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также из нетоксических органических аминов, таких как N,N-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Фармацевтические композиции могут быть в виде стерильных водных растворов или дисперсий. Их можно приготовить также в виде микроэмульсий, липосом или других упорядоченных структур, применимых для высоких концентраций лекарства.

Количество активного ингредиента, которое можно смешивать с материалом носителя для получения разовой (стандартной) лекарственной формы, меняется в зависимости от субъекта, проходящего лечение, и конкретного способа введения и обычно представляет собой количество композиции, которое вызывает терапевтический эффект. Как правило, из 100% это количество составляет примерно от 0.01%, примерно до 99% активного ингредиента, предпочтительно примерно 0.1-70%, наиболее предпочтительно примерно 1-30% активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Схемы приёма лекарственного средства корректируют таким образом, чтобы вызвать оптимальный заданный ответ (например, терапевтический ответ). Например, можно вводить единичный болюс, можно вводить несколько небольших доз через определённые промежутки времени, или дозу можно пропорционально снижать или увеличивать в зависимости от терапевтической ситуации. Особенно предпочтительно готовить композиции для парентерального введения в виде стандартной (однократной) лекарственной дозы для простоты введения и однородности доз. Выражение "разовая" (однократная) лекарственная доза по данному описанию относится к физически дискретным единицам, применимым в качестве единичной лекарственной формы для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное на достижение заданного терапевтического эффекта, в сочетании с нужным фармацевтическим носителем. Или же, антитело можно вводить в виде препарата с пролонгированным высвобождением, в этом случае требуется не такое частое введение.

Вводимые дозы антитела составляют примерно 0.0001-100 мг/кг, чаще 0.0-5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозы могут быть 0.3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела, или 10 мг/кг массы тела или составлять интервал 1-10 мг/кг. Типичная схема лечения включает введение один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в месяц, один раз в 3 месяца или один раз через каждые 3-6 месяцев. Предпочтительные схемы введения антитела против LAG-3 по изобретению включают введение 1 мг/кг массы тела или 3 мг/кг массы тела внутривенно, причём антитело дают, используя одну из нижеприведённых схем введения доз:

- (i) шесть доз каждые четыре недели, затем каждые три месяца;
- (ii) каждые три недели;
- (iii) 3 мг/кг массы тела однократно, затем 1 мг/кг массы тела каждые три недели.

В некоторых методах дозу корректируют таким образом, чтобы достичь концентрации антитела в плазме примерно 1-1000 мкг/мл, а в некоторых методах около 25-300 мкг/мл.

"Терапевтически эффективная доза" антитела против LAG-3 по изобретению, предпочтительно, вызывает снижение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждение ухудшения состояния или нетрудоспособности вследствие болезни. Например, у лечения носителей опухолей "терапевтически эффективная доза" предпочтительно ингибирует рост опухоли, по меньшей мере, примерно на 20%, более предпочтительно, по меньшей мере, примерно, на 40%, ещё более предпочтительно, по меньшей мере, примерно, на 60%, и ещё более предпочтительно, по меньшей мере, примерно, на 80% по сравнению с непролеченными субъектами. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшить размер опухоли или иным образом уменьшить интенсивность симптомов у субъекта, которым, как правило, является человек или может быть другое млекопитающее.

Фармацевтическая композиция может представлять собой препарат с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пэтки (пластыри) и системы доставки микроинкапсулированных продуктов. Можно применять биоразрушаемые, биосовместимые полимеры, такие как этилен - винилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэферы и полимолочная кислота. См., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, таких как:

- (1) безыгольные гиподермические инъекторы (см., например, патенты США 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 и 4596556);
- (2) микроинфузионные насосы (патент США 4487603);
- (3) устройства для трансдермальной доставки (патент США 4486194);
- (4) инфузионные аппараты (патенты США 4447233 и 4447224) и
- (5) осмотические устройства (патенты США 4439196 и 4475196);

раскрытие этих патентов вводится в данное описание ссылкой.

В некоторых вариантах изобретения человеческие моноклональные антитела по изобретению можно приготовить таким образом, чтобы гарантировать необходимое распределение *in vivo*. Например, чтобы гарантировать, что терапевтическое соединение по изобретению проникает через гематоэнцефалический барьер, их можно приготовить в липосомах, которые, помимо этого, могут содержать нацеливающие частицы для активизации селективного переноса к конкретным клеткам или органам. См., например, патенты США 4522811; 5374548; 5416016 и 5399331; V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685; Umezawa et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038; Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357: 140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180; Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134; Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269: 9090; Keinänen and Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123 и Killian and Fidler (1994) Immunomethods 4: 273.

Применение и методы по изобретению

Антитела, композиции антител и методы по настоящему изобретению имеют различную *in vitro* и *in vivo* полезность, включая, например, обнаружение LAG-3 или усиление иммунного ответа с помощью блокады LAG-3. В предпочтительном варианте изобретения антитела по настоящему изобретению представляют собой человеческие антитела. Например, эти молекулы можно вводить в клетки в культуре *in vitro* или *ex vivo*, или людям, например, *in vivo*, для повышения иммунитета в различных ситуациях. Соответственно, в одном аспекте изобретение включает метод модификации иммунного ответа у субъекта, заключающийся во введении субъекту антитела, или его антигенсвязывающего участка, по изобретению таким образом, чтобы иммунный ответ у субъекта модифицировался. Предпочтительно ответ усиливается, стимулируется или апрегулируется.

Предпочтительные субъекты включают больных людей, нуждающихся в усилении иммунного ответа. Методы особенно применимы для лечения больных людей с расстройством, которое можно лечить, усиливая (повышая) иммунный ответ (например, опосредованный Т-клетками иммунный ответ). В конкретном варианте изобретения методы особенно пригодны для лечения рака *in vivo*. Для достижения антигенспецифического усиления иммунитета антитела против LAG-3 можно вводить вместе с целевым антигеном или антиген может уже присутствовать в организме подлежащего лечению субъекта (например, субъект-носитель опухоли или носитель вируса). Когда антитела к LAG-3 вводят вместе с другим агентом, два агента можно вводить в любом порядке или одновременно.

Помимо этого, изобретение включает методы обнаружения (детекции) человеческого LAG-3 антигена в образце, или количественное определения человеческого LAG-3 антигена, заключающиеся в контактировании образца, и контрольного образца, с человеческим моноклональным антителом, или его антигенсвязывающим участком, которое(ый) специфически связывается с человеческим LAG-3 в условиях, которые способствуют образованию комплекса между антителом или его антигенсвязывающим участком и человеческим LAG-3. Затем детектируют образование комплекса, причём различие в образовании комплекса между образцом по сравнению с контрольным образцом свидетельствует о присутствии человеческого LAG-3 антигена в образце. Более того, антитела против LAG-3 по изобретению можно использовать для очистки человеческого LAG-3 с помощью иммуноаффинной хроматографии.

Принимая во внимание способность антител против LAG-3 по изобретению ингибировать связывание LAG-3 с молекулами ГКГ (МНС) класса II и стимулировать антигенспецифический Т-клеточный ответ, изобретение также включает *in vitro* и *in vivo* методы применения антител по изобретению для стимуляции, усиления или апрегуляции антигенспецифических Т-клеточных реакций (ответов). Например, изобретение включает метод стимуляции антигенспецифического Т-клеточного ответа, заключающийся в контактировании указанной Т-клетки с антителом по изобретению таким образом, чтобы стимулировался антигенспецифический Т-клеточный ответ. Для количественного определения антигенспецифического Т-клеточного ответа можно использовать любой подходящий индикатор антигенспецифического Т-клеточного ответа. Неограничивающие примеры подходящих индикаторов (указателей) включают повышенную пролиферацию Т-клеток в присутствии антитела и/или повышение продукции цитокинов в присутствии антитела. В предпочтительном варианте изобретения антигенспецифический Т-

клеточный ответ стимулирует продукцию интерлейкина-2.

Изобретение включает также метод стимуляции иммунного ответа (например, антигенспецифического Т-клеточного ответа) у субъекта, заключающийся во введении антитела по изобретению субъекту таким образом, чтобы у субъекта стимулировался иммунный ответ (например, антигенспецифический Т-клеточный ответ). В предпочтительном варианте изобретения субъектом является носитель опухоли, а стимулируется иммунный ответ против опухоли. В другом предпочтительном варианте изобретения субъектом является носитель вируса, а стимулируется иммунный ответ против вируса.

В другом аспекте изобретение включает метод ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, заключающийся во введении субъекту антитела по изобретению таким образом, чтобы у субъекта ингибировался рост опухоли. Ещё в одном аспекте изобретение включает метод лечения вирусной инфекции у субъекта, заключающийся во введении субъекту антитела по изобретению таким образом, чтобы проводилось лечение инфекции у субъекта.

Эти и другие методы по изобретению подробнее обсуждаются ниже.

Рак

Блокада LAG-3 антителами может усилить иммунный ответ на раковые клетки у пациента. В одном аспекте настоящее изобретение относится к лечению субъекта *in vivo* с помощью антитела против LAG-3 таким образом, чтобы ингибировался рост раковых опухолей. Антитело против LAG-3 можно использовать самостоятельно для ингибирования роста раковых опухолей. Или же антитело против LAG-3 можно использовать в сочетании с другими иммуногенными агентами, обычными противораковыми лекарственными средствами или другими антителами, как описывается ниже.

Соответственно в одном варианте изобретение включает метод ингибирования роста раковых клеток у субъекта, заключающийся во введении субъекту терапевтически эффективного количества антитела против LAG-3, или его антигенсвязывающего участка. Предпочтительно, антитело представляет собой человеческое антитело против LAG-3 (такое, как любое из человеческих антител против человеческого LAG-3 по данному описанию). Помимо этого, или в качестве альтернативы, антитело может являться химерным или гуманизированным антителом против LAG-3.

Предпочтительные раковые опухоли, рост которых можно ингибировать, используя антитела по изобретению, включают раковые опухоли, как правило, восприимчивые к иммунотерапии. Неограничивающие примеры предпочтительных для лечения раковых заболеваний включают меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), рак почки (например, светлоклеточную карциному), рак предстательной железы (например, гормон-резистентную аденокарциному предстательной железы), рак молочной железы, рак толстой кишки и рак лёгкого (например, немелкоклеточный рак лёгкого). Помимо этого изобретение включает стойкие (резистентные или рецидивирующие злокачественные опухоли, рост которых может ингибироваться под действием антител по изобретению).

Примеры других раковых заболеваний, которые можно лечить методами по изобретению, включают рак кости, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак матки, рак яичника, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, тестикулярный рак, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному наружных половых органов, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак парашитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягкой ткани, рак уретры, рак пениса, хронические или острые лейкозы, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, солидные опухоли у детей, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, опухоль центральной нервной системы (ЦНС, CNS), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухолей, опухоль позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак. Т-клеточную лимфому, раковые заболевания, вызванные экологическими причинами, включая раковые заболевания, вызванные асбестозом, и комбинации указанных раковых заболеваний. Настоящее изобретение применимо также для лечения метастатических форм рака, в частности, метастатической раковой опухоли, экспрессирующей PD-L1 (Iwai et al. (2005) *Int. Immunol.* 17: 133-144).

Необязательно, антитела к LAG-3 можно объединять с иммуногенным агентом, таким как раковые клетки, очищенные опухолевые антигены (включая молекулы рекомбинантных белков, пептидов и углеводов), клетки и клетки, трансфецированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173: 4919-28). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые можно использовать, включают пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, MAGE антигенов, Tgr-2, MART1 и/или тирозиназы, или опухолевые клетки, трансфецированные для экспрессии цитокина GM-CSF (подробно обсуждается ниже).

Показано, что у людей некоторые опухоли являются иммуногенными, такие как меланомы. Повышая порог активации Т-клеток с помощью блокады LAG-3, можно активировать ответ (реакцию) хозяина на опухоль.

По-видимому, блокада LAG-3 является более эффективной в сочетании с протоколом вакцинации. Разработано множество экспериментальных методик (стратегий) вакцинации против опухолей

(см. Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60- 62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730- 738; см. также Restifo, N. и Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023- 3043 в DeVita *et al.* (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition).

По одной из этих методик вакцину готовят, используя аутологичные или аллогенные опухолевые клетки. Показано, что эти клеточные вакцины наиболее эффективны, если опухолевые клетки трансфицированы таким образом, чтобы экспрессировать GM-CSF. Обнаружено, что GM-CSF является мощным активатором презентации антигенов для вакцинации против опухолей (Dranoff *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3539-43).

Изучение экспрессии генов и примеров крупномасштабной экспрессии генов различных опухолях позволило дать определение так называемых опухолеспецифических антигенов (Rosenberg, SA (1999) *Immunity* 10: 281-7). Во многих случаях эти опухолеспецифические антигены представляют собой дифференцировочные антигены, экспрессируемые в опухолях и в клетке, из которой образована опухоль, например, меланоцитарные антигены gp100, MAGE антигены и Tip-2. Более того, можно показать, что многие из этих антигенов представляют собой мишени опухолеспецифических Т-клеток, обнаруживаемых у хозяина. Блокаду LAG-3 можно использовать в сочетании с группой рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессируемых в опухоли, чтобы выработать иммунный ответ на эти белки. Эти белки в норме рассматриваются иммунной системой как аутоантигены и, следовательно, к ним поддерживается толерантность. Опухолевый антиген может включать белок теломеразы, который требуется для синтеза теломеров хромосом и который экспрессируется более чем в 85% случаев раковых заболеваний человека и лишь в ограниченном числе соматических тканей (Kim *et al.* (1994) *Science* 266: 2011-2013). (Эти соматические ткани могут быть защищены от иммунной атаки различными способами). Опухолевый антиген может также представлять собой "неоантиген", экспрессирующийся в раковых клетках вследствие соматических мутаций, которые изменяют белковую последовательность, или создавать слитые белки между двумя несвязанными последовательностями (т.е. bcr-abl в филадельфийской хромосоме (хромосоме Philadelphia)), или идиотип из В-клеточных опухолей.

Другие опухолевые вакцины могут включать белки вирусов, органически связанных с раковыми заболеваниями человека, таких как вирусы папилломы человека (ВПЧ, HPV), вирусы гепатита (ВГВ (HBV) и ВГС (HCV)) и вирус герпеса, ассоциированный с саркомой Капоши (ВГСК, KHSV). Другим видом опухолеспецифического антигена, который можно использовать в сочетании с блокадой LAG-3, являются очищенные белки теплового шока (БТШ, HSP), выделенные из самой опухолевой ткани. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток и эти HSP являются высокоэффективными при доставке к антигенпрезентирующим клеткам для выявления иммунитета к опухолям (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269: 1585-1588; Tamura *et al.* (1997) *Science* 278: 117-120).

Дендритные клетки (ДК, DC) представляют собой мощные антигенпрезентирующие клетки, которые можно использовать для того, чтобы вызвать антигенспецифический ответ. DC могут быть получены *ex vivo* и нагружены различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). DC можно также трансфицировать генетическими методами с целью экспрессировать эти опухолевые антигены. Для иммунизации DC также непосредственно сливали с опухолевыми клетками (Kugler *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6: 332-336). В качестве эффективного метода вакцинации с целью активации более мощного противоопухолевого ответа можно использовать DC иммунизацию в сочетании с блокадой LAG-3.

Блокаду LAG-3 можно также комбинировать с обычными противораковыми терапевтическими средствами. Блокаду LAG-3 можно эффективно сочетать с химиотерапией. В этих случаях можно снизить дозу назначаемого химиотерапевтического агента (Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Примером такого сочетания является применение антитела против LAG-3 в комбинации с дакарбазином для лечения меланомы. Другим примером такой комбинации является комбинация антитела против LAG-3 с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научным объяснением комбинированного применения блокады LAG-3 и химиотерапии является то, что гибель клеток, являющаяся следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна вызвать повышенные уровни опухолевого антигена на пути презентации антигена. Другими видами терапевтических средств, которые в комбинации с блокадой LAG-3 могут оказывать синергическое действие за счёт гибели клеток, является облучение, хирургическая операция и гормональная депривация. Каждый из этих протоколов создаёт источник опухолевого антигена в организме хозяина. Ингибиторы ангиогенеза также можно сочетать с блокадой LAG-3. Ингибирование ангиогенеза приводит к смерти опухолевых клеток, что может обеспечить поступление (подпитку) опухолевого антигена на пути презентации антигена хозяина.

Антитела, блокирующие LAG-3, можно также применять в комбинации с биспецифическими анти-

телями, которые нацеливают эффекторные клетки, экспрессирующие Fc α или Fc γ рецептор, на опухолевые клетки (см., например, патенты США №№ 5922845 и 5837243). Биспецифические антитела можно применять для нацеливания на два отдельных антигена. Например, биспецифические антитела против Fc рецептора/против опухолевого антигена (например, Her-2/neu) можно применять для нацеливания макрофагов на участки опухоли. Это нацеливание может более эффективно активировать опухолеспецифические реакции. Т-клеточная составляющая ("плечо") этих ответов усиливается при использовании блокады LAG-3. Или же, антиген можно доставлять непосредственно к DC, применяя биспецифические антитела, которые связываются с опухолевым антигеном и специфическим маркером клеточной поверхности дендритных клеток.

Опухоли уклоняются от иммунного контроля, используя целый ряд механизмов. Многие из этих механизмов можно преодолеть с помощью инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые обладают иммуносупрессорной активностью. Эти белки включают, среди прочих, TGF- β (Kehrl et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), и Fas лиганд (Hahne et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). Антитела к этим структурам можно использовать в комбинации с антителом против LAG-3 для противодействия действию иммуносупрессора и содействия иммунному ответу хозяина на опухоль.

В комбинации с антителом против LAG-3 можно применять другие антитела, которые активируют иммунный ответ хозяина. Эти антитела включают молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют DC функцию и презентацию антигена. Антитела против CD40 способны эффективно замещать хелперную активность Т-клеток (Ridge et al. (1998) *Nature* 393: 474-478) и могут применяться в сочетании с антителами против LAG-3 (Ito et al. (2000) *Immunobiology* 201 (5) 527-40). Активирующие антитела к коstimуляторным молекулам Т-клеток, таким как CTLA-4 (например, патент США № 5811097), OX-40 (Weinberg et al. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero et al. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997) и ICOS (Hutloff et al. (1999) *Nature* 397: 262-266), также могут обеспечивать повышенный уровень активации Т-клеток. В настоящее время трансплантация костного мозга применяется для лечения различных опухолей гемопоэтического происхождения. Хотя последствием этого лечения является гомологичная болезнь (трансплантата-против-хозяина), ответ трансплантата на опухоль может принести терапевтическую пользу. Блокаду LAG-3 можно применять для повышения эффективности пересаженных донорских опухолеспецифических Т-клеток.

Имеются также некоторые экспериментальные протоколы лечения, которые включают ex vivo активацию и экспансию антигенспецифических Т-клеток и адоптивный перенос этих клеток реципиентам с целью стимулировать антигенспецифические Т-клетки против опухоли (Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546-51). Эти методы также можно применять для активации Т-клеточных реакций на инфекционные агенты, такие как CMV. Ex vivo активация в присутствии антител против LAG-3 может повысить частоту и активность адоптивно перенесенных Т-клеток.

Инфекционные заболевания

Другие методы по изобретению применяются для лечения пациентов, подвергшихся действию конкретных токсинов или патогенов. Соответственно другой аспект изобретения включает метод лечения инфекционного заболевания у субъекта, заключающийся во введении субъекту антитела против LAG-3, или его антигенсвязывающего участка, таким образом, чтобы проводилось лечение инфекционного заболевания. Предпочтительно, антитело представляет собой человеческое антитело против человеческого LAG-3 (такое как любое из человеческих антител против LAG-3 по данному описанию). Помимо этого или в качестве альтернативы, антитело может представлять собой химерное или гуманизированное антитело.

Подобно обсуждавшемуся выше применению для лечения опухолей, антителоопосредованная блокада LAG-3 может применяться индивидуально (самостоятельно), или в качестве адъюванта в комбинации с вакцинами для стимуляции иммунного ответа на патогенные, токсины и аутоантигены. Примеры патогенов, в отношении которых этот терапевтический метод может быть особенно полезен, включают патогены, эффективная вакцина против которых в настоящее время отсутствует, или патогены, против которых обычные вакцины недостаточно эффективны. Эти патогены включают, но без ограничения ВИЧ, гепатит (А, В, & С), грипп, герпес, лямблиоз, малярию, лейшманиоз, золотистый стафилококк, синегнойную палочку (*Pseudomonas aeruginosa*). Блокада LAG-3 особенно применима против устойчивых инфекций агентами, такими как ВИЧ, которые презентуют изменяющиеся антигены в процессе инфицирования. Эти новые эпитопы распознаются как чужеродные во время введения антитела против человеческого LAG-3, тем самым вызывается сильный Т-клеточный ответ, который не ослабляется (не гасится) негативными сигналами с помощью LAG-3.

Некоторые примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, восприимчивые к лечению методами по изобретению, включают ВИЧ, гепатит (А, В или С), герпес-вирус (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV, вирус Эпштейна-Барр), аденовирус, вирус гриппа, флавивirus, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, коронавирус, респираторно-синцитиальный вирус, вирус свинки, ротавирус, вирус кори, вирус коревой краснухи, вирус парвовирус, вирус коровьей оспы, HTLV вирус, вирус денге, вирус

папилломы, вирус контагиозного моллюска, вирус полиомы, вирус бешенства, вирус JC и вирус арбовирусного энцефалита.

Некоторые примеры патогенных бактерий, вызывающих инфекции, восприимчивые к лечению методами по настоящему изобретению, включают хламидии, риккетсиозные микроорганизмы, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и гонококки, клебсиеллу, протей, серратию, *pseudomonas*, легионеллы, дифтерийные бактерии, сальмонеллу, палочковидные бактерии, бактерии-возбудители холеры (холерный вибрион), столбняка, ботулизма, сибирской язвы, чумы, лептоспироза и болезни Лайма.

Некоторые примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, восприимчивые к лечению методами по изобретению, включают грибы *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, аспергиллы (*Aspergillus*) (*A. fumigatus*, *A. niger*, etc.), грибы семейства муконовых (Genus *Mucorales*) (рода *mucor*, *absidia*, *rhizopus*), грибы *Sporothrix schenckii*, бластомицеты *Blastomyces dermatitidis*, возбудитель бластомикоза *Paracoccidioides brasiliensis*, возбудитель кокцидиоидоза *Coccidioides immitis* и возбудитель гистоплазмоза *Histoplasma capsulatum*.

Некоторые примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, восприимчивые к лечению методами по изобретению, включают дизентерийную амёбу (*Entamoeba histolytica*), инфузории *Balantidium coli* (*Balantidium coli*), амёбы *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., лямблии или жидарии (*Giardia lamblia*), криптоспоридии (*Cryptosporidium* sp.), возбудитель пневмоцистоза *Pneumocystis carinii*, возбудитель малярии *Plasmodium vivax*, бабезии *Babesia microti*, трипаномы вида *Trypanosoma brucei*, вида *Trypanosoma cruzi*, лейшмания вида *Leishmania donovani*, токсоплазму (*Toxoplasma gondii*), нематоду *Nippostrongylus brasiliensis*.

Во всех вышеуказанных методах блокаду LAG-3 можно комбинировать с другими формами иммунотерапии, такой как лечение цитокинами (например, интерферонами, GM-CSF, G-CSF, IL-2), или терапией биспецифическими антителами, что обеспечивает повышенную презентацию опухолевых антигенов (см., например, Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2: 1121-1123).

Аутоиммунные реакции

Антитела против LAG-3 могут вызывать и усиливать аутоиммунные реакции. Действительно, индукция противоопухолевых реакций с использованием опухолевой клетки и пептидных вакцин показывает, что многие противоопухолевые реакции включают "антиаутореактивность" (реакцию против аутоантигенов) (van Elsas et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194: 481-489; Overwijk, et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 2982-2987; Hurwitz, (2000), см. выше; Rosenberg & White (1996) *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol* 29 (1): 81-4). Следовательно, можно рассматривать применение блокады антителами против LAG-3 в сочетании с различными собственными белками для разработки протоколов вакцинации с целью эффективной выработки иммунных реакций против этих собственных белков для лечения заболевания. Например, болезнь Альцгеймера включает неадекватную аккумуляцию Aβ пептида в амилоидных отложениях в головном мозге; антителы против Aβ пептида способны устранить эти амилоидные отложения (Schenk et al. (1999) *Nature* 400: 173-177).

Другие собственные белки можно также использовать в качестве мишеней, таких как IgE, для лечения аллергии и астмы, и TNFα для лечения ревматоидного артрита. Наконец, антителы против LAG-3. Нейтрализующий антителы против репродуктивных гормонов можно использовать для контрацепции. Нейтрализующий антителы против гормонов и другие растворимые факторы, необходимые для роста конкретных опухолей, также можно рассматривать как возможные мишени вакцинации.

Методы, аналогичные вышеописанным методам применения антитела против LAG-3, можно применять для индукции терапевтического аутоиммунного ответа с целью лечения пациентов с неадекватной аккумуляцией других аутоантигенов, такой как амилоидные отложения, включая Aβ-пептид при болезни Альцгеймера, цитокины, такие как TNFα, и IgE.

Вакцины

Антитела против LAG-3 можно применять для стимуляции антигенспецифических иммунных реакций, используя совместное введение антитела против LAG-3 с целевым антигеном (например, вакцину). Соответственно, в другом аспекте изобретение включает метод усиления иммунного ответа на антиген у субъекта, заключающийся во введении субъекту:

- (i) антигена и
- (ii) антитела против LAG-3, или его антигенсвязывающего участка, таким образом, чтобы иммунный ответ на антиген усиливался.

Предпочтительно антитело является человеческим антителом против человеческого LAG-3 (таким как любое из человеческих антител против LAG-3 по данному описанию). Помимо этого или в качестве альтернативы, антитело может представлять собой химерное или гуманизированное антитело. Антиген может представлять собой, например, опухолевый антиген, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген из патогенна. Неограничивающие примеры таких антигенов включают антигены, обсуж-

дававшиеся в предыдущем разделе, такие как опухолевые антигены (или опухолевые вакцины), обсуждавшиеся выше, или антигены из вирусов, бактерий или других патогенов, описанных выше.

Соответствующие пути введения композиций антитела (например, человеческих моноклональных антител, мультиспецифических (полиспецифических) и биспецифических молекул и иммуноконъюгатов) по изобретению *in vivo* и *in vitro* общеизвестны в уровне техники, и их может выбирать рядовой специалист. Например, композиции антител можно вводить с помощью инъекции (например, внутривенной или подкожной). Соответствующие применяемые дозы молекул зависят от возраста и массы тела субъекта и концентрации и/или состава композиции антитела.

Как описывается выше, человеческие антитела против LAG-3 по изобретению можно вводить совместно с одним или более других терапевтических агентов, например, с цитотоксическим агентом, радиотоксическим агентом или иммуносупрессором (иммунодепрессантом). Антитело может быть связано с агентом (в виде иммунокомплекса) или его можно вводить отдельно от агента. В последнем случае (раздельное введение) антитело можно вводить до, после введения агента или одновременно с введением агента, или его можно вводить совместно с другими терапевтическими средствами, например, с противораковой терапией, например, облучением. Такие терапевтические агенты включают, среди прочего, противоопухолевые агенты, такие как доксорубин (адриамицин), цисплатин, блеомицин сульфат, кармустин, хлорамбуцил, дакарбазин и циклофосфамид, гидроксимочевина, которые, самостоятельно, эффективны только при уровнях, токсических или субтоксических для пациента. Цисплатин вводят внутривенно в виде дозы 100 мг/мл один раз в четыре недели, а адриамицин вводят внутривенно в виде дозы 60-75 мг/мл раз через 21 день. Совместное введение человеческих антител против LAG-3, или их антигенсвязывающих фрагментов, по настоящему изобретению с химиотерапевтическим агентом обеспечивает два противораковых агента, которые действуют по различным механизмам, это оказывает цитотоксическое действие на человеческие опухолевые клетки. Такое совместное введение позволяет решить проблемы, вызванные развитием резистентности к лекарствам или изменением антигенности опухолевых клеток, которые могли бы сделать их нереакционноспособными в отношении антитела.

Также в объём настоящего изобретения входят наборы, содержащие композиции антител по изобретению (например, человеческих антител, биспецифических или мультиспецифических молекул, или иммуноконъюгатов) и инструкции для применения. Кроме того, набор может содержать дополнительный реагент, или одно или более дополнительных человеческих антител по изобретению (например, человеческое антитело, имеющее дополнительную активность, которое связывается с эпитопом на LAG-3 антигене, отличным от первого человеческого антитела). Наборы как правило включают этикетку, указывающую на предполагаемое применение содержимого набора. Термин этикетка включает любую документацию или письменный материал, поставляемые на наборе или с набором, или иным способом сопровождающие набор.

Комбинированная терапия

В другом аспекте изобретение включает метод комбинированной терапии, в котором антитело против LAG-3 вводят совместно с одним или более дополнительными антителами, эффективно стимулирующих иммунный ответ, тем самым дополнительно усиливают, стимулируют или апрегулируют иммунный ответ у субъекта. Например, изобретение включает метод стимуляции иммунного ответа у субъекта, заключающийся во введении субъекту антитела против LAG-3 и одного или более дополнительных иммуностимулирующих антител, таких как антитело против PD-1, антитело против PD-L1 и/или антитело против CTLA-4, таким образом, чтобы у субъекта стимулировался иммунный ответ, например, ингибировался рост опухоли или стимулировался противовирусный ответ. В одном варианте изобретения субъекту вводят антитело против LAG-3 и антитело против PD-1. В другом варианте изобретения субъекту вводят антитело против LAG-3 и антитело против PD-L1. Ещё в одном варианте изобретения субъекту вводят антитело против LAG-3 и антитело против CTLA-4. В одном варианте изобретения антитело против LAG-3 представляет собой человеческое антитело, такое как антитело по данному раскрытию. Или же, антитело против LAG-3 может представлять собой, например, химерное или гуманизированное антитело (например, полученное из мышиного mAb против LAG-3). В другом варианте изобретения по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело (например, антитело против PD-1, против PD-L1 и/или против CTLA-4) представляет собой человеческое антитело. Или же, по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело может представлять собой, например, химерное или гуманизированное антитело (например, полученное из мышиного антитела против PD-1, против PD-L1 и/или против CTLA-4).

В одном варианте настоящее изобретение включает метод лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), заключающийся во введении антитела к LAG-3 и антитела к CTLA-4. В других вариантах изобретения антитело против LAG-3 вводят в субтерапевтической дозе, антитело против CTLA-4 вводят в субтерапевтической дозе, или оба антитела вводят в субтерапевтической дозе. В другом варианте изобретения настоящее изобретение включает метод изменения побочных явлений, ассоциированных с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим агентом, содержащий введение антитела против LAG-3 и субтерапевтической дозы антитела против CTLA-4 субъекту. В некоторых вариантах изобретения антитело против CTLA-4 представляет собой моноклональное антитело с

человеческой последовательностью 10D1 (описанное в опубликованной Международной патентной заявке PCT WO 01/14424), а антитело против LAG-3 представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, такое как 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5 по данному описанию. Другие антитела против CTLA-4, охватываемые методами по настоящему изобретению включают, например, антитела, раскрываемые в: Международных патентных заявках WO 98/42752; WO 00/37504; патенте США № 6207156; Hurwitz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(17): 10067-10071; Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology 22(145): Abstract № 2505 (антитело CP-675206) и Mokyr et al. (1998) Cancer Res. 58: 5301-5304. В некоторых вариантах изобретения антитело против CTLA-4 связывается с человеческим CTLA-4 с K_D 5×10^{-8} М или менее, связывается с человеческим CTLA-4 с K_D 1×10^{-8} М или менее, связывается с человеческим CTLA-4 с K_D 5×10^{-9} М или менее, или связывается с человеческим CTLA-4 с K_D от 1×10^{-8} М до 1×10^{-10} М или менее.

В одном варианте настоящее изобретение включает метод лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), заключающийся во введении антитела к LAG-3 и антитела к PD-1. В других вариантах изобретения антитело против LAG-3 вводят в субтерапевтической дозе, антитело против PD-1 вводят в субтерапевтической дозе, или оба антитела вводят в субтерапевтической дозе. В другом варианте изобретения настоящее изобретение включает метод изменения побочных явлений, ассоциированных с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим агентом, содержащий введение антитела против LAG-3 и субтерапевтической дозы антитела против PD-1 субъекту. В некоторых вариантах изобретения субъектом является человек. В некоторых вариантах изобретения антитело против PD-1 представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью и антитело против LAG-3 представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, такое как 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5 по данному описанию. Примеры антител против PD-1 с человеческой последовательностью включают антитела 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 и 4A11, описанные в опубликованной Международной патентной заявке PCT WO 06/121168. В некоторых вариантах изобретения антитело против PD-1 связывается с человеческим PD-1 с K_D 5×10^{-8} М или менее, связывается с человеческим PD-1 с K_D 1×10^{-8} М или менее, связывается с человеческим PD-1 с K_D 5×10^{-9} М или менее или связывается с человеческим PD-1 с величиной K_D между 1×10^{-8} М и 1×10^{-10} М или менее.

В одном варианте настоящее изобретение включает метод лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), заключающийся во введении антитела к LAG-3 и антитела к PD-L1. В других вариантах изобретения антитело против LAG-3 вводят в субтерапевтической дозе, антитело против PD-L1 вводят в субтерапевтической дозе, или оба антитела вводят в субтерапевтической дозе. В другом варианте изобретения настоящее изобретение включает метод изменения побочных явлений, ассоциированных с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим агентом, содержащий введение антитела против LAG-3 и субтерапевтической дозы антитела против PD-L1 субъекту. В некоторых вариантах изобретения субъектом является человек. В некоторых вариантах изобретения антитело против PD-L1 представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью и антитело против LAG-3 представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, такое как 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5 по данному описанию. Примеры антител против PD-L1 с человеческой последовательностью включают антитела 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4, описанные в опубликованной Международной патентной заявке PCT WO 07/005874. В некоторых вариантах изобретения антитело против PD-L1 связывается с человеческим PD-L1 с K_D 5×10^{-8} М или менее, связывается с человеческим PD-L1 с K_D 1×10^{-8} М или менее, связывается с человеческим PD-L1 с K_D 5×10^{-9} М или менее или связывается с человеческим PD-L1 с величиной K_D между 1×10^{-8} М и 1×10^{-10} М или менее.

Блокада LAG-3 и одного или более вторых целевых антигенов, таких как CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 антителами может усилить иммунный ответ на раковые клетки у пациента. Раковые клетки, рост которых может ингибироваться с помощью антител по настоящему раскрытию, включают раковые клетки, как правило, отвечающие на иммунотерапию. Репрезентативные примеры раковых заболеваний для лечения комбинированной терапией по настоящему раскрытию включают раковые заболевания, конкретно перечисленные выше при обсуждении монотерапии с помощью антител против LAG-3.

В некоторых вариантах изобретения комбинацию терапевтических антител, обсуждаемую в данном описании, можно вводить одновременно в виде единой композиции в фармацевтически приемлемом носителе, или одновременно в виде отдельных композиций с каждым антителом в фармацевтически приемлемом носителе. В одном варианте изобретения комбинацию терапевтических антител можно вводить последовательно. Например, антитело против CTLA-4 и антитело против LAG-3 можно вводить последовательно, таким образом, что антитело против CTLA-4 вводится первым, а антитело против LAG-3 вторым, или антитело против LAG-3 вводится первым, а антитело против CTLA-4 вторым. Помимо этого или в качестве альтернативы, антитело против PD-1 и антитело против LAG-3 можно вводить последовательно, так что антитело против PD-1 вводится первым, а антитело против LAG-3 вторым, или антитело против LAG-3 вводится первым, а антитело против PD-1 вторым. Помимо этого или в качестве альтернативы, антитело против PD-L1 и антитело против LAG-3 можно вводить последовательно, так что антите-

ло против PD-L1 вводится первым, а антитело против LAG-3 вторым, или антитело против LAG-3 вводится первым, а антитело против PD-L1 вторым.

Далее, если более одной дозы комбинированного терапевтического препарата вводят последовательно, порядок последовательного введения можно изменить на обратный или оставить тот же самый порядок введения в каждой временной точке, последовательное введение можно совмещать с одновременным введением или использовать любую их комбинацию. Например, первое введение комбинации антитела против CTLA-4 и антитела против LAG-3 может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, причём антитело против CTLA-4 вводят первым, а антитело против LAG-3 вторым, а третье введение может быть последовательным, причём антитело против LAG-3 вводят первым, а антитело против CTLA-4 вторым, и т.д. Помимо этого или в качестве альтернативы, первое введение комбинации антитела против PD-1 и антитела против LAG-3 может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, причём антитело против PD-1 вводят первым, а антитело против LAG-3 вторым, а третье введение может быть последовательным, причём антитело против LAG-3 вводят первым, а антитело против PD-1 вторым, и т.д. Помимо этого или в качестве альтернативы, первое введение комбинации антитела против PD-L1 и антитела против LAG-3 может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, причём антитело против PD-L1 вводят первым, а антитело против LAG-3 вторым, а третье введение может быть последовательным, причём антитело против LAG-3 вводят первым, а антитело против PD-L1 вторым, и т.д. Другая типичная схема введения лекарственного средства может включать первое введение, являющееся последовательным, причём антитело против LAG-3 вводят первым, а антитело против CTLA-4 (и/или против PD-1 и/или против PD-L1) вторым, а последующие введения могут быть одновременными (конкурентными).

Необязательно, комбинацию антитела против LAG-3 и одного или более дополнительных антител (например, антител против CTLA-4 и/или против PD-1 и/или против PD-L1) можно далее объединять с иммуногенным агентом, таким как раковые клетки, очищенные опухолевые антигены (включая молекулы рекомбинантных белков, пептидов и углеводов), клетки и клетки, трансфецированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173: 4919-28). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые можно использовать, включают пептиды или меланомные антигены, такие как пептиды белка gp100, MAGE антигенов, Trp-2, MART1 и/или тирозиназы, или опухолевые клетки, трансфецированные таким образом, чтобы экспрессировать цитокин GM-CSF (подробнее обсуждающийся ниже). Комбинированную блокаду LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 можно далее совмещать с протоколом вакцинации, таким как любой из протоколов вакцинации, подробно обсуждавшихся выше при описании монотерапии антителами против LAG-3.

Комбинированную блокаду LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 можно далее совмещать со стандартными противораковыми терапевтическими средствами. Например, комбинированную блокаду LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 можно далее совмещать с химиотерапевтическими схемами. В этих случаях возможно снизить дозу другого химиотерапевтического реагента, вводимого с комбинацией по настоящему раскрытию (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Примером такой комбинации является комбинация антител против LAG-3 и антител против CTLA-4 и/или антител против PD-1 и/или антител против PD-L1 в сочетании с дакарбазином для лечения меланомы. Другим примером является комбинация антител против LAG-3 и антител против CTLA-4 и/или антител против PD-1 и/или антител против PD-L1 в сочетании с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научным объяснением комбинированного применения блокады LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 совместно с химиотерапией является то, что гибель клеток, являющаяся следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна вызвать повышенные уровни опухолевого антигена на пути презентации антигена. Другие виды комбинированной терапии, которые в комбинации с комбинированной блокадой LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 могут оказывать синергическое действие за счёт гибели клеток, включают облучение, хирургическую операцию или гормональную депривацию. Каждый из этих протоколов создаёт источник опухолевого антигена в организме хозяина. Ингибиторы ангиогенеза также можно сочетать с блокадой LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1. Ингибирование ангиогенеза приводит к смерти опухолевых клеток, что может обеспечить поступление (подпитку) опухолевого антигена на пути презентации антигена хозяина.

Комбинацию блокирующих антител к LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 можно также применять в сочетании с биспецифическими антителами, которые нацеливают эффекторные клетки, экспрессирующие Fc α или Fc γ рецептор, на опухолевые клетки (см., например, патенты США №№ 5922845 и 5837243). Биспецифические антитела можно применять для нацеливания на два отдельных антигена. Т-клеточная составляющая ("плечо") этих ответов усиливается при использовании комбинированной блокады LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1.

В другом примере комбинацию антител против LAG-3 и против CTLA-4 и/или антител против PD-1 и/или антител против PD-L1 можно использовать в сочетании с противоопухолевыми антителами, такими как ритуксан® (ритуксимаб), герцептин® (трастузумаб), бексар (Веххаг®, тозитумомаб), зевалин® (ибритумомаб), КЭМПАС (Campath®, алемтузумаб), Lymphocide® (эпратузумаб), авастин® (бевацизумаб).

маб) и тарцева (Tarceva®, эрлотиниб) и т.п. В качестве примера и не желая связывать себя теорией, лечение противораковым антителом или противораковым антителом, конъюгированным с токсином, может вызвать смерть раковых клеток (например, опухолевых клеток), что могло бы усиливать иммунный ответ, опосредованный CTLA-4, PD-1, PD-L1 или LAG-3. Типичный пример лечения гиперпролиферативного заболевания (например, раковой опухоли) может включать противораковое антитело в комбинации с антителами против LAG-3 и антителами против CTLA-4 и/или антителами против PD-1 и/или антителами против PD-L1, одновременно или последовательно, или в комбинации одновременного и последовательного введения, что может усиливать противоопухолевый иммунный ответ хозяина.

Опухоли уклоняются от иммунного контроля, используя целый ряд механизмов. Многие из этих механизмов можно преодолеть с помощью инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые обладают иммуносупрессорной активностью. Эти белки включают, среди прочих, TGF- β (Kehrl et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), и Fas лиганд (Hahne et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). В другом примере антитела к каждой из этих структур можно далее объединять с комбинацией антител против LAG-3 и против CTLA-4 и/или против PD-1 и/или против PD-L1 для противодействия действию иммуносупрессора и содействия иммунному ответу хозяина на опухоль.

С комбинацией антител против LAG-3 и против CTLA-4 и/или против PD-1 и/или против PD-L1 можно дополнительно применять другие антитела, которые активируют иммунный ответ хозяина. Эти антитела включают молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют DC функцию и презентацию антигена. Антитела против CD40 (Ridge et al., см. выше) могут применяться в сочетании с комбинацией антител против LAG-3 и против CTLA-4 и/или против PD-1 и/или против PD-L1 (Ito et al., см. выше (2000)). Другие активирующие антитела к костимуляторным молекулам Т клеток (Weinberg et al., см. выше, Melero et al., см. выше, Hutmoff et al. (1999), см. выше) также могут обеспечивать повышенный уровень активации Т-клеток.

Как обсуждается выше, в настоящее время трансплантация костного мозга применяется для лечения различных опухолей гемопоэтического происхождения. Комбинированную блокаду LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 можно применять для повышения эффективности пересаженных донорских опухолеспецифических Т-клеток.

Имеются также некоторые экспериментальные протоколы лечения, которые включают ex vivo активацию и экспансию антигенспецифических Т-клеток и адоптивный перенос этих клеток реципиентам с целью стимулировать антигенспецифические Т-клетки против опухоли (Greenberg & Riddell, см. выше). Эти методы также можно применять для активации Т-клеточных реакций на инфекционные агенты, такие как CMV. Можно предполагать, что ex vivo активация в присутствии антител против LAG-3 и против CTLA-4 и/или против PD-1 и/или против PD-L1 может повысить частоту и активность адоптивно перенесенных Т-клеток.

Некоторые варианты настоящего изобретения включают метод изменения побочного явления, ассоциированного с лечением гиперпролиферативного заболевания (например, рака) иммуностимулирующим агентом, содержащий введение субъекту антитела против LAG-3 и субтерапевтической дозы антитела против CTLA-4 и/или против PD-1 и/или против PD-L1. Например, методы по настоящему изобретению включают метод снижения частоты колита или диареи, вызываемых иммуностимулирующим терапевтическим антителом, введением пациенту не всасываемого в ЖКТ стероида. Так как у любого пациента, получающего иммуностимулирующее терапевтическое антитело, имеется повышенный риск появления колита или диареи, вызываемых таким антителом, для всей этой группы пациентов применима терапия методами по настоящему изобретению. Хотя стероиды применяются для лечения воспалительного заболевания кишечника (IBD) и для предупреждения рецидива (обострения) IBD, их можно применять для предупреждения (снижения частоты) IBD у пациентов, которым не поставлен диагноз IBD. Заметные побочные эффекты, обусловленные стероидами, даже невсасываемыми стероидами, препятствуют их применению с целью профилактики.

В других вариантах комбинация блокады LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 (т.е. иммуностимулирующие терапевтические антитела против LAG-3 и против CTLA-4 и/или против PD-1 и/или против PD-L1) можно дополнительно комбинировать с применением невсасываемого стероида. Термин "невсасываемый стероид" означает глюкокортикоид, у которого наблюдается интенсивный пресистемный метаболизм, при котором, после метаболизма в печени, биодоступность стероида является низкой, а именно ниже примерно 20%. В одном варианте изобретения невсасываемый стероид представляет собой буденозид. Буденозид представляет собой глюкокортикостероид местного действия, который, после перорального приёма, подвергается интенсивному метаболизму в печени. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) представляет собой pH- и время-зависимый пероральный препарат буденозида, разработанный таким образом, чтобы оптимизировать доставку лекарства в подвздошную кишку и на всём протяжении толстой кишки. Препарат ENTOCORT EC® одобрен в США для лечения болезни Крона в степени от слабой до умеренной, затрагивающей подвздошную кишку и/или прилегающую толстую кишку. Обычная пероральная доза ENTOCORT EC® для лечения болезни Крона составляет 6-9 мг/день. ENTOCORT EC®

высвобождается в кишечнике перед тем, как он всасывается и сохраняется в слизистой кишечника. При прохождении целевой ткани слизистой кишечника ENTOCORT EC® подвергается интенсивному метаболизму под действием системы цитохрома P450 в печени до метаболитов с незначительной глюкокортикоидной активностью. Поэтому биодоступность является низкой (около 10%). В результате низкой биодоступности терапевтический индекс буденозида является низким по сравнению с другими глюкокортикоидами с менее интенсивным пресистемным метаболизмом. Буденозид вызывает меньше побочных эффектов, включая меньшую гипоталамо-гипофизарную недостаточность, чем у системных стероидов. Однако, постоянное применение ENTOCORT EC® может вызвать системные глюкокортикоидные эффекты, такие как гиперкортицизм и подавление функции надпочечников. См. PDR 58th ed. 2004; 608-610.

В других вариантах изобретения комбинация блокады LAG-3 и CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1 (т.е. иммуностимулирующие терапевтические антитела против LAG-3 и против CTLA-4 и/или против PD-1 и/или против PD-L1) в сочетании с применением невосасываемого стероида можно далее комбинировать с салицилатом. Салицилаты включают агенты 5-ASA, например, такие как: сульфасалазин (AZULFIDINE®, Pharmacia & UpJohn); осалазин (DIPENTUM®, Pharmacia & UpJohn); балсалазид (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); и месаламин (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

В соответствии с методами по настоящему изобретению схема применения салицилата, вводимого в комбинации с антителами против LAG-3 и против CTLA-4 и/или против PD-1 и/или против PD-L1 и невосасываемым стероидом, может включать любое перекрывающееся (по времени) или последовательное введение салицилата и невосасываемого стероида с целью снижения частоты колита, вызываемого иммуностимулирующими антителами. Так например, методы снижения частоты заболевания колитом, вызванным иммуностимулирующими антителами по настоящему изобретению, охватывают введения салицилата и невосасываемого стероида одновременно или последовательно (например, салицилат вводят через 6 ч после невосасываемого стероида) или в любой их комбинации. Далее в соответствии с настоящим изобретением салицилат и невосасываемый стероид можно вводить тем же путём (например, оба вводятся перорально) или различными путями (например, салицилат вводят перорально, а невосасываемый стероид вводят ректально), которые могут отличаться от пути (путей) введения антител против LAG-3 и против CTLA-4 и/или против PD-1 и/или против PD-L1.

Настоящее изобретение иллюстрируется далее нижеприведёнными примерами, которые не следует рассматривать как дополнительно ограничивающие. Содержание всех фигур и всех ссылочных материалов, последовательностей из Genbank, патентов и опубликованных патентных заявок однозначно вводится в данное описание в качестве ссылки. В частности, раскрытие опубликованных Международных заявок PCT WO 09/045957, WO 09/073533, WO 09/073546 и WO 09/054863 однозначно вводится в данное описание в качестве ссылки.

Пример 1. Получение человеческих моноклональных антител против LAG-3

Человеческие моноклональные антитела против LAG-3 получают от трансгенных мышей, которые экспрессируют гены антител, как указано ниже.

Антигены

Слитые белки рекомбинантного человеческого LAG-3 используют в качестве иммуногена для выработки антител против человеческого LAG-3. В некоторых схемах иммунизации в качестве иммуногена используют слитый белок, содержащий полную внеклеточную область (домены 1-4) человеческого LAG-3, слитую с Fc доменом человеческого иммуноглобулина (R&D Systems, Catalog #2319-L3) (D1-D4 hFc) или Fc доменом мышиного иммуноглобулина (D1-D4 mFc). В других схемах иммунизации в качестве иммуногена используют слитый белок, содержащий только первые два внеклеточных домена человеческого LAG-3, слитые с Fc доменом мышиного иммуноглобулина (D1-D2 mFc). Слитые белки LAG-3 получают обычными методами рекомбинантной ДНК

Линии трансгенных транс-хромосомных мышей KM Mouse™ и KM/FCGR2D Mouse™

Полностью человеческие моноклональные антитела к человеческому LAG-3 получают от мышей трансгенных транс-хромосомных линий KM Mouse™ и KM/FCGR2D Mouse™, которые экспрессируют гены человеческих антител.

У мышей линии KM Mouse™ эндогенный мышиный ген лёгкой цепи каппа подвергают гомозиготной дизрупции как описано в Chen et al. (1993) EMBO J. 12: 811-820, а эндогенный мышиный ген тяжёлой цепи подвергают гомозиготной дизрупции как описано в примере 1 опубликованной патентной заявки PCT WO 01/09187. Помимо этого, эта линия мышей несёт трансген человеческой лёгкой цепи каппа, KCo5, описанный в Fishwild et al., см. выше. Мыши этой линии несут также транс-хромосому SC20, которая имеет локус тяжёлой цепи человеческого Ig, как описано в опубликованной Международной заявке PCT WO 02/43478. Линия KM/FCGR2D Mouse™ аналогична линии KM Mouse™ за исключением того, что её геном также содержит гомозиготную дизрупцию эндогенного гена FcγRIIB. Линии мышей KM Mouse™ и KM/FCGR2D Mouse™ подробно описаны также в опубликованной патентной заявке США № 20020199213.

Иммунизация мышей линий KM Mouse™ и KM/FCGR2D Mouse™

Чтобы получить полностью моноклональные антитела к LAG-3, мышей линий KM Mouse™ и KM/FCGR2D Mouse™ иммунизируют одним из трёх описанных выше различных слитых белков рекомбинантного LAG-3 (D1-D4 hFc, D1-D4 mFc, D1-D2, mFc). Общие схемы иммунизации описаны в Lonberg et al. (1994), см. выше; Fishwild et al., см. выше; и в опубликованной Международной заявке PCT WO 98/24884. Перед первой инфузией антитела возраст мышей составляет 6-16 недель. Мышей иммунизируют интраперитонеально (в брюшную полость) (IP) и/или подкожно (SC). Мышей иммунизируют раз в две недели четыре раза, вводя 10 мкг слитого белка рекомбинантного LAG-3, затем дважды иммунизируют, вводя 20 мкг того же иммуногена, используя Ribl в качестве адъюванта. Иммунный ответ контролируют, отбирая пробу крови из ретроорбитального синуса. Скрининг плазмы проводят методом ELISA (как описано ниже), и мышей с удовлетворительными титрами анти-LAG-3 человеческого иммуноглобулина используют для слияний. Мышам внутривенно и интраперитонеально вводят бустерную дозу, 20 мкг, антигена с последующим внутривенным введением бустерной дозы, 20 мкг, антигена, затем умерщвляют и удаляют селезёнку.

Отбор мышей KM и KM/FCGR2D, продуцирующих антитела против LAG-3

Для отбора мышей, продуцирующих антитела, связывающие белок LAG-3, сыворотку мышей, иммунизированных слитым белком D1-4 hFc, тестируют модифицированным методом ELISA, как первоначально описано Fishwild et al. (1996). Коротко говоря, на микротитрационных планшетах иммобилизуют слитый белок рекомбинантного LAG-3 с концентрацией 1 мкг/мл в PBS, 50 мкл/лунка, инкубируют при 4°C в течение ночи, затем блокируют с 200 мкл/лунка 5% BSA в PBS. Разведения плазмы мышей, иммунизированных LAG-3, добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение 1-2 ч при комнатной температуре. Планшеты отмывают в PBS/Tween, а затем инкубируют с поликлональным антителом козы против лёгкой цепи каппа человеческого иммуноглобулина, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), 1 ч при комнатной температуре. Планшеты отмывают, обрабатывают субстратом ABTS и анализируют на спектрофотометре при OD₄₀₅.

Сыворотку мышей, иммунизированных слитыми белками D1-D4 mFc или D1-D2 mFc, анализируют непрямым методом ELISA, используя антитело козы против мышиного IgG для иммобилизации на планшетах в течение одного часа перед иммобилизацией антигена для того, чтобы исключить неспецифическое связывание с мышиным Fc участком. Затем проводят те же стадии ELISA, которые описаны выше.

Мыши которых обрабатывали наивысшими титрами антител против LAG-3, используют для слияний. Слияния осуществляют как описано ниже, а супернатанты гибридных клеток испытывают на активность против LAG-3 методом ELISA.

Получение гибридных клеток, продуцирующих человеческие моноклональные антитела против белков LAG-3

Мышиные спленоциты, выделенные из мышей KM или KM/FCGR2D, сливают методом электрослияния под действием электрического поля, используя электропоратор с большими кюветными камерами для слияния клеток Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD) для линии клеток мышиной миеломы. Полученные гибридомы затем подвергают скринингу на продукцию антигенспецифических антител. Суспензии одиночных клеток лимфоцитов селезёнки иммунизированных мышей сливают с одной четвёртой частью от числа P3X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580) несекретирующих миеломных клеток мыши. Клетки засевают при плотности, примерно, 1×10^5 /лунка в плоскодонный микротитрационный планшет, а затем около двух недель инкубируют в селективной среде, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, дополненной геном ori (IGEN) в RPMI, L-глутамином, пируватом натрия, HEPES, пенициллином, стрептомицином, гентамицином, $1 \times \text{HAT}$ и β -меркаптоэтанолом. Через 1-2 недели клетки культивируют в среде, в которой HAT заменяют на HT. Затем отдельные лунки подвергают скринингу методом ELISA (описанным выше) на человеческие моноклональные IgG антитела против LAG-3. Когда начинается интенсивный рост гибридом, обычно через 10-14 дней, контролируют среду. Гибридомы, секретирующие антитела, пересевают, снова подвергают скринингу и, если они всё ещё позитивны в отношении человеческого IgG, моноклональные антитела против LAG-3 субклонируют по меньшей мере дважды методом серийных разведений. Стабильные субклоны затем культивируют *in vitro* для получения малых количеств антитела в тканевой культуральной среде для дальнейшего изучения.

Клоны гибридных клеток 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5 отбирают для дальнейшего анализа и секвенирования.

Пример 2. Структурные характеристики человеческих моноклональных антител против LAG-3 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 and 17E5

Последовательности кДНК кодирующие переменные области тяжёлой и лёгкой цепей mAbs, экспрессируемых клонами 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5, описанными в примере 1, секвенируют в соответствии со следующим протоколом. Тотальную РНК получают, используя 5×10^6 гибридных клеток с применением набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). кДНК получают в соответствии с протоколом 5'-RACE с набором для амплификации кДНК SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech

Laboratories, Inc., Mountain View, CA) и Superscript II обратной транскриптазой (Invitrogen, Carlsbad, CA). V-области каждого антитела амплифицируют, используя 3'-праймер, к человеческой константной области 3'-праймер, специфический к константной области человеческого иммуноглобулина, в паре с 5'-RACE универсальной смесью праймеров. Продукты ПЦР, содержащие V-область, клонируют в вектор pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) и переносят в штамм *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Готовят образцы либо ДНК miniprep, либо Templiphi (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, USA) и подвергают ДНК-секвенированию ДНК (Sequetech, Mountain View, CA). Полученные последовательности ДНК анализируют на реаранжировки в рамке считывания и другие характеристики. Экспрессированные белки исследуют обычными методами химии белков. Найдено, что клоны 25E3, 25F7 и 26H10 экспрессируют антитело, содержащее тяжёлую цепь и каппа лёгкую цепь IgG1, тогда как клоны 8B7 и 17E5 экспрессируют антитело, содержащее тяжёлую цепь и каппа лёгкую цепь IgG4, а клон 11F2 экспрессирует антитело, содержащее тяжёлую цепь и каппа лёгкую цепь IgG2.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области тяжёлой цепи 25F7 показаны на фиг. 1А и в SEQ ID NO: 49 и 37, соответственно. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области лёгкой цепи каппа 25F7 показаны на фиг. 1В и в SEQ ID NO: 55 и 43 соответственно. Сравнение последовательности тяжёлой цепи иммуноглобулина 25F7 с известными последовательностями тяжёлой цепи иммуноглобулина зародышевой линии (фиг. 7) показывает, что тяжёлая цепь 25F7 использует V_H сегмент из человеческой зародышевой линии V_H 4-34 (SEQ ID NO: 61) и J_H сегмент из человеческой зародышевой линии J_H 5b (SEQ ID NO: 62). Более подробный анализ последовательности 25F7 V_H с применением системы Kabat определения области CDR позволяет изобразить области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, показанные на фиг. 1А и в SEQ ID NO: 1, 7 и 13, соответственно. Сравнение последовательности лёгкой цепи иммуноглобулина 25F7 с известными последовательностями лёгкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии (фиг. 8) показывает, что лёгкая цепь каппа 25F7 использует V_K сегмент из человеческой зародышевой линии V_K L6 (SEQ ID NO: 63) и J_K сегмент из человеческой зародышевой линии J_K 2 (SEQ ID NO: 64). Более подробный анализ последовательности 25F7 V_K с применением системы Kabat определения области CDR позволяет изобразить области CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, показанные на фиг. 1В и в SEQ ID NO: 19, 25 и 31 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области тяжёлой цепи 26H10 показаны на фиг. 2А и в SEQ ID NO: 50 и 38, соответственно. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области лёгкой цепи 26H10 показаны на фиг. 2В и в SEQ ID NO: 56 и 44, соответственно. Сравнение последовательности тяжёлой цепи иммуноглобулина 26H10 с известными последовательностями тяжёлой цепи иммуноглобулина зародышевой линии (фиг. 9) показывает, что тяжёлая цепь 26H10 использует V_H сегмент из человеческой зародышевой линии V_H 3-33 (SEQ ID NO: 65) и J_H сегмент из человеческой зародышевой линии J_H 6B (SEQ ID NO: 66). Более подробный анализ последовательности 26H10 V_H с применением системы Kabat определения области CDR позволяет изобразить области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, показанные на фиг. 2А и в SEQ ID NO: 2, 8 и 14 соответственно. Сравнение последовательности лёгкой цепи иммуноглобулина 26H10 с известными последовательностями лёгкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии (фиг. 10) показывает, что лёгкая цепь каппа 26H10 использует V_K сегмент из человеческой зародышевой линии V_K A27 (SEQ ID NO: 67) и J_K сегмент из человеческой зародышевой линии J_K 3 (SEQ ID NO: 68). Более подробный анализ последовательности 26H10 V_K с применением системы Kabat определения области CDR позволяет изобразить области CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, показанные на фиг. 2В и в SEQ ID NO: 20, 26 и 32 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области тяжёлой цепи 25E3 показаны на фиг. 3А и в SEQ ID NO: 51 и 39, соответственно. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области лёгкой цепи 25E3 показаны на фиг. 3В и в SEQ ID NO: 57 и 45, соответственно. Сравнение последовательности тяжёлой цепи иммуноглобулина 25E3 с известными последовательностями тяжёлой цепи иммуноглобулина зародышевой линии (фиг. 11) показывает, что тяжёлая цепь 25E3 использует V_H сегмент из человеческой зародышевой линии V_H 3-20 (SEQ ID NO: 69) и J_H сегмент из человеческой зародышевой линии J_H 4B (SEQ ID NO: 70). Более подробный анализ последовательности 25E3 V_H с применением системы Kabat определения области CDR позволяет изобразить области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, показанные на фиг. 3А и в SEQ ID NO: 3, 9 и GGY, соответственно. Сравнение последовательности лёгкой цепи иммуноглобулина 25E3 с известными последовательностями лёгкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии (фиг. 12) показывает, что лёгкая цепь каппа 25E3 использует V_K сегмент из человеческой зародышевой линии V_K L18 (SEQ ID NO: 71) и J_K сегмент из человеческой зародышевой линии J_K 2 (SEQ ID NO: 64). Более подробный анализ последовательности 25E3 V_K с применением системы Kabat определения области CDR позволяет изобразить области CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, показанные на фиг. 3В и в SEQ ID NO: 21, 27 и 33 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области тяжёлой цепи 8B7 показаны на фиг. 4А и в SEQ ID NO: 52 и 40 соответственно. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области лёгкой цепи 8B7 показаны на фиг. 4В и в SEQ ID NO: 58 и 46, соответственно. Сравнение последовательности тяжёлой цепи иммуноглобулина 8B7 с известными последова-

тельностями тяжёлой цепи иммуноглобулина зародышевой линии (фиг. 13) показывает, что тяжёлая цепь 8B7 использует V_H сегмент из человеческой зародышевой линии V_H 4-34 (SEQ ID NO: 61) и JH сегмент из человеческой зародышевой линии JH 5B (SEQ ID NO: 62). Более подробный анализ последовательности 8B7 V_H с применением системы Kabat определения области CDR позволяет изобразить области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, показанные на фиг. 4A и в SEQ ID NO: 4, 10 и 16 соответственно. Сравнение последовательности лёгкой цепи иммуноглобулина 8B7 с известными последовательностями лёгкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии (фиг. 14) показывает, что лёгкая цепь каппа 8B7 использует V_K сегмент из человеческой зародышевой линии V_K L6 (SEQ ID NO: 63) и J_K сегмент из человеческой зародышевой линии J_K 4 (SEQ ID NO: 72). Более подробный анализ последовательности 8B7 V_K с применением системы Kabat определения области CDR позволяет изобразить области CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, показанные на фиг. 4B и в SEQ ID NO: 22, 28 и 34 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности варибельной области тяжёлой цепи 11F2 показаны на фиг. 5A и в SEQ ID NO: 53 и 41 соответственно. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности варибельной области лёгкой цепи 11F2 показаны на фиг. 5B и в SEQ ID NO: 59 и 47 соответственно. Сравнение последовательности тяжёлой цепи иммуноглобулина 11F2 с известными последовательностями тяжёлой цепи иммуноглобулина зародышевой линии (фиг. 15) показывает, что тяжёлая цепь 11F2 использует V_H сегмент из человеческой зародышевой линии V_H 1-24 (SEQ ID NO: 73), D сегмент из человеческой зародышевой линии 2-15 и JH сегмент из человеческой зародышевой линии JH 4B (SEQ ID NO: 70). Более подробный анализ последовательности 11F2 V_H с применением системы Kabat определения области CDR позволяет изобразить области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, показанные на фиг. 13A и в SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно. Сравнение последовательности лёгкой цепи иммуноглобулина 11F2 с известными последовательностями лёгкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии (фиг. 16) показывает, что лёгкая цепь каппа 11F2 использует V_K сегмент из человеческой зародышевой линии V_K L6 (SEQ ID NO: 63) и J_K сегмент из человеческой зародышевой линии J_K 1 (SEQ ID NO: 72). Более подробный анализ последовательности 11F2 V_K с применением системы Kabat определения области CDR позволяет изобразить области CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, показанные на фиг. 5B и в SEQ ID NO: 23, 29 и 35 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности варибельной области тяжёлой цепи 17E5 показаны на фиг. 6A и в SEQ ID NO: 54 и 42 соответственно. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности варибельной области лёгкой цепи 17E5 показаны на фиг. 6B и в SEQ ID NO: 60 и 48, соответственно. Сравнение последовательности тяжёлой цепи иммуноглобулина 17E5 с известными последовательностями тяжёлой цепи иммуноглобулина зародышевой линии (фиг. 17) показывает, что тяжёлая цепь 17E5 использует V_H сегмент из человеческой зародышевой линии V_H 3-33 (SEQ ID NO: 65), D сегмент из человеческой зародышевой линии 2-2 и JH сегмент из человеческой зародышевой линии JH 4B (SEQ ID NO: 70). Более подробный анализ последовательности 17E5 V_H с применением системы Kabat определения области CDR позволяет изобразить области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, показанные на фиг. 6A и в SEQ ID NO: 6, 12 и 19 соответственно. Сравнение последовательности лёгкой цепи иммуноглобулина 17E5 с известными последовательностями лёгкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии (фиг. 18) показывает, что лёгкая цепь каппа 17E5 использует V_K сегмент из человеческой зародышевой линии V_K L6 (SEQ ID NO: 63) и J_K сегмент из человеческой зародышевой линии J_K 5 (SEQ ID NO: 75). Более подробный анализ последовательности 17E5 V_K с применением системы Kabat определения области CDR позволяет изобразить области CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, показанные на фиг. 6B и в SEQ ID NO: 24, 30 и 36 соответственно.

Варибельные области антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5 можно превратить в полноразмерные антитела любого нужного изотипа стандартными методами рекомбинантной ДНК. Например, ДНК, кодирующую области V_H и V_L , можно клонировать в экспрессирующий вектор, который несёт константные области тяжёлой и лёгкой цепей так, чтобы варибельные области функционально связывались с константными областями. Или же, для экспрессии полноразмерной тяжёлой цепи и полноразмерной лёгкой цепи можно применять отдельные векторы. Неограничивающие примеры применения экспрессирующих векторов для создания полноразмерных антител включают векторы pIE, описанные в опубликованной патентной заявке США № 20050153394.

Пример 3. Характеристики связывающих свойств моноклональных антител против LAG-3

В данном примере методом проточной цитометрии изучают связывание человеческих антител против LAG-3 с LAG-3 (человеческим, обезьяньим и мышинным LAG-3) клеточной поверхности. Помимо этого, изучают кинетику связывания с LAG-3 с применением оптического биосенсора BIACORE. Кроме того, проводят эпитопное картирование методом пептидного сканирования.

A. Исследование методом проточной цитометрии 1.

Связывание клеток CHO-человеческий LAG-3

Для проверки способности антител связываться с LAG-3 белком клеточной поверхности антитела инкубируют с линией клеток CHO, трансфицированной таким образом, чтобы экспрессировать человеческий LAG-3 на поверхности клетки. Делают серийные разведения моноклональных антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5 в холодном $1\times$ PFAE буфере ($1\times$ PBS+2% FBS, 0.02% азида натрия, 2мМ Na

EDTA). Для реакции связывания 50 мкл разведённого раствора антитела прибавляют к 50 мкл клеточной суспензии, содержащей 2×10^5 клеток, и смесь инкубируют на льду в течение 30 мин. Затем клетки отмывают дважды $1 \times$ PFAE буфером. Добавляют меченное FITC антитело козы против лёгкой цепи каппа человеческого иммуноглобулина (Bethyl Laboratories, Inc., Cat. # A80- 115F) в разведении 1:100 и смесь инкубируют в течение 30 мин при 4°C , а затем дважды отмывают холодным $1 \times$ PFAE буфером. После последней отмывки к каждому раствору прибавляют 150 мкл холодного $1 \times$ PFAE буфера, содержащего 10 мкг/мл пропидия йодида (Roche Applied Science, Cat #1348639) и проводят анализ связывания антитела проточной цитометрией на проточном питомере FACScalibur (BD Bioscience).

Результаты анализа с помощью проточной цитометрии суммированы ниже, в табл. 1, в которой приводятся значения EC_{50} для связывания с CHO-человеческий LAG-3, показывающие, что антитела 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 и 17E5 эффективно связываются с человеческим LAG-3 клеточной поверхности, причём значение EC_{50} антитела 25F7, примерно, в 20 раз ниже, чем EC_{50} для 25E3, но приблизительно эквивалентно EC_{50} для антител 8B7 и 26H10. Значения EC_{50} для 11F2 и 17E5 находятся в том же интервале, что и для 25E3.

Таблица 1. Связывание антител против LAG-3 с клетками CHO, экспрессирующими человеческий LAG-3

<u>Антитело</u>	<u>EC_{50} (нМ)</u>
25F7	0.45 – 2.52
8B7	1.93 – 4.44
26H10	1.81 – 3.64
11F2	15.12
25E3	14.9 – 25.39
17E5	12.3

2. Связывание активированных человеческих CD4^+ Т-клеток

Для проверки способности антител связываться с нативным LAG-3 на поверхности активированных человеческих Т-клеток, покоящиеся CD4^+ Т-клетки выделяют из очищенных мононуклеарных клеток периферической крови и подвергают стимуляции в течение трёх дней комбинацией антител против CD3 и против CD28, фиксированных на полистирольных гранулах. Делают серийные разведения моноклональных антител 25F7, 8B7 и 26H10 в холодном $1 \times$ PFAE буфере ($1 \times$ PBS+2% FBS, 0.02% азида натрия, 2 мМ Na EDTA). Для реакции связывания 50 мкл разведённого раствора антитела смешивают с 50 мкл меченного PE антитела против человеческого CD4 (BD Bioscience, Cat # 555347). Активированные Т-клетки обрабатывают в соответствии с приведённым выше протоколом. Анализ связывания антитела проводят как описано выше.

Результаты анализа с помощью проточной цитометрии суммированы ниже, в табл. 2, в которой приводятся значения EC_{50} для связывания с активированными человеческими CD4^+ Т-клетками, показывающие, что все три антитела аналогично связываются с человеческим LAG-3 клеточной поверхности.

Таблица 2. Связывание антител против LAG-3 с активированными человеческими CD4^+ Т клетками

<u>Антитело</u>	<u>EC_{50} (нМ)</u>
25F7	0.27 – 0.45
26H10	0.41 – 0.84
8B7	0.69 – 1.80

3. Связывание мышинного LAG-3 антигена

Для того, чтобы определить, вступают ли антитела против LAG-3 в перекрёстную реакцию с мышинным LAG-3, последовательность кДНК клонируют методом RT-PCR с использованием препарата пула кДНК, полученной обратной транскрипцией РНК из коллекции тканевых образцов макак циномолгус и резус. Последовательность сначала амплифицируют с использованием пула кДНК с помощью праймеров (5'-прямой праймер: 5Mcyn1408; 5'-atgtggaggctcagttctg-3' (SEQ ID NO: 91) & 3'-обратный праймер: 3Mcyn1408a; 5'-gtcagagctgctccggctc-3' (SEQ ID NO: 92)) с применением обогащенной GC ПЦР-амплификационной системы (Roche) и клонируют в ТОРО клонирующий вектор реципиента (Invitrogen) для анализа последовательности. Клоны, соответствующие эталонной последовательности LAG-3 макак-резус в Genbank (Genbank Accession No. XM_001108923), затем повторно амплифицируют при использовании клонирующего ДНК вектора ТОРО с применением второго набора праймеров, которые вводят сайты рестриктаз для направленного клонирования в векторе, экспрессирующем в клетках млекопитающего.

Клон ра23-5 с обезьяньим LAG-3 выделяют и секвенируют. Выделенная обезьянья последовательность на 99.6% идентична эталонной последовательности LAG-3 макак-резус в Genbank. Сравнение аминокислотной последовательности кДНК клона ра23-3 (SEQ ID NO: 93) с последовательностью LAG-3 макак-резус (SEQ ID NO: 94) из Genbank (Accession No. XM_001108923) показано на фиг. 19. Две последовательности идентичны за исключением одного аминокислотного различия в положении 419 (аргинин в клоне ра23-5 по сравнению с треонином в последовательности макак-резус в Genbank), и на основании

этого делают вывод, что кДНК клон ра23-5 представляет собой последовательность гена LAG-3 макак-резус.

кДНК клон ра23-5 вводят в экспрессирующую конструкцию, которую трансфецируют суспензию клеток CHO-S с помощью нуклеофекции (Амаха). Экспрессию LAG-3 макак-резус отсортированными, отобранными по устойчивости к лекарства клонами проверяют FACS анализом. Эту клональную CHO-клеточную линию, сверхэкспрессирующую LAG-3 макак-резус, используют в FACS анализах, аналогичных описанным выше, для количественного определения перекрёстной реактивности к обезьяньему белку. Коротко говоря, делают серийные разведения моноклональных антител 25F7, 8B7 и 26H10 в холодном 1×PFAE буфере (1×PBS+2% FBS, 0.02% азида натрия, 2 мМ Na EDTA). Для реакции связывания 50 мкл разведённого раствора антитела прибавляют к 50 мкл клеточной суспензии, содержащей 2×10^5 клеток, и смесь инкубируют на льду в течение 30 мин. Клетки обрабатывают в соответствии с вышеописанным протоколом. Анализ связывания антитела проводят как описано выше.

В отдельном эксперименте антитела проверяют на связывание с LAG-3 обезьян циномолгус, используя активированные Т-клетки этих обезьян. In vitro активацию этих обезьяньих Т-клеток осуществляют обработкой Т-клеток антителами против CD3/против CD28 практически в соответствии с тем же самым протоколом, описанным выше для in vitro активации человеческих Т-клеток, с последующим анализом методом проточной цитометрии, осуществляемым как описано выше для окрашивания in vitro активированных человеческих CD4⁺ Т-клеток.

Результаты анализа методом проточной цитометрии с применением CHO-резус LAG-3 клеток и активированных Т-клеток обезьян циномолгус суммированы ниже в табл. 3, где представлены значения EC₅₀ для связывания с двумя различными типами клеток, экспрессирующих обезьяньих LAG-3. Эти результаты показывают, что все антитела эффективно связываются как с LAG-3 на активированных Т-клетках обезьян циномолгус, так и с LAG-3 макак-резус (SEQ ID NO: 93), трансфецированным в клетки CHO. Однако, существует "иерархия", шкала аффинностей связывания, причём клон 26H10 проявляет наивысшую аффинность, которая, примерно, в 2.5 и в 6 раз выше, чем у клонов 8B7 и 25F7, соответственно. Различия в порядке (иерархии) связывания между двумя типами клеток может отражать различия между аминокислотными последовательностями белков LAG-3 макак резус и циномолгус.

Таблица 3. Связывание антител против LAG-3 с LAG-3 обезьян

<u>Антитело</u>	<u>EC₅₀ (нМ)</u>	<u>EC₅₀ (нМ)</u>
	<u>Активированные Суно CD4⁺ Т</u>	<u>CHO- резус LAG3</u>
26H10	5.19	4.684
25F7	14.18	22.72
8B7	30.45	10.01

4. Связывание мышинового LAG-3 антигена

Чтобы определить, вступают ли антитела в перекрёстную реакцию с мышинным LAG-3, проводят исследования методом проточной цитометрии, аналогичные описанным выше, используя в качестве клеток-мишеней линию мышинных Т-клеточных гибридом (3A9), трансфецированных таким образом, чтобы экспрессировать мышинный LAG-3 на поверхности клеток, с последующим FACS анализом для детекции связывания антитела, analysis to detect antibody binding. Результаты показывают, что, в отличие от контрольного антитела против мышинового LAG-3, которое даёт интенсивное окрашивание, ни одно из человеческих антител 25E3, 25F7, 8B7 или 26H10 не показывает связывания выше фоновых уровней с мышинным LAG-3, т.е. ни одно из этих антител не вступает в перекрёстную реакцию с мышинным LAG-3.

Б. Анализ с помощью системы BIACORE

Связывание антител 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 и 17E5 с рекомбинантным LAG-3 белком изучают с помощью системы BIACore™, используя метод "захвата. Каждое из антител, 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 и 17E5, иммобилизуют (захватывают), используя антитело к C_H1 (анти-C_H1), антитело-реагент, специфическое к константной области 1 тяжёлой цепи человеческого антитела (Zymed, Clone HP6045, Исходная конц. 1.0 мг/мл). Анти-C_H1 наносят на чип CM5 (BR-1000-14, для научно-исследовательских работ) с высокой плотностью (9700-11500RU (относительных единиц)). Нанесение проводят обычным методом иммобилизации, рекомендованным производителем. Затем очищенное антитело 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 или 17E5, с концентрацией в интервале 0.5-3 мкг/мл, иммобилизуют ("захватывают") на поверхности, покрытой анти-C_H1, при скорости потока 10 мкл/мин в течение 1 мин. Слитый белок рекомбинантного человеческого LAG-3 с единственной концентрацией (20 нМ) инъецируют выше антитела (пропускают через антитело) в течение 3 мин при скорости потока 25 мкг/мл. Антиген оставляют диссоциировать в течение 7.5 мин. Поверхность биосенсора (чипа) регенерируют после каждого цикла, промывая её с помощью 25 мкл 25 мМ раствора NaOH, а затем 30 мкл HBS-EP. Контроль изотипа наносят на чип, полученные результаты применяют, чтобы вычесть неспецифическое связывание. Все эксперименты проводят на приборе поверхностного плазмонного резонанса Biacore 3000, используя Управляющую программу BIACore v 3.2. Анализ данных, используя программу BiaEvaluation v3.2. Результаты показаны ниже, в табл. 4. Результаты BIACore анализа для 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 и 17E5 подтверждают результаты, полученные методом проточной цитометрии, что все пять антител способны связываться с человеческим

LAG-3 с высокой аффинностью.

Таблица 4. Кинетика связывания антитела против LAG-3 с рекомбинантным человеческим LAG-3

<u>Антитело</u>	<u>$K_D \times 10^{-9}$ (M)</u>
25E3	0.09
8B7	0.09
26H10	0.10
25F7	0.47
17E5	4.53

В. Эпитопное картирование

В белке LAG-3 иммуноглобулиноподобный первый домен внеклеточной области содержит экспонированную (открытую) "внеклеточную петлю", имеющую аминокислотную последовательность: GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY (SEQ ID NO: 79). Для изучения связывания антител 25E3, 25F7, 8B7 и 26H10 с этой областью LAG-3 и картирования эпитопа, связываемого каждым антителом по всей этой области проводят пептидное сканирование. Получают группу из 10 перекрывающихся пептидов, которые сканируют (просматривают) по полной последовательности внешней петли, и конъюгируют их с биотином. Для анализа ELISA используют микротитрационные планшеты с предварительно иммобилизованным стрептавидином (Sigma-Aldrich, Cat # M5432) используют для "захвата" конъюгатов биотинилированных пептидов петли, которые наносят в объёме 100 мкл с концентрацией 2 мкг/мл, и инкубируют 18 ч при 4°C, после чего планшеты отмывают 3 раза и блокируют при комнатной температуре в течение 1 ч блокирующим буфером (1× PBS+10% FBS). Затем в планшеты помещают 3-кратные серийные разведения человеческих антител против LAG-3 в блокирующем буфере, исходя из начальной концентрации 10 мкг/мл, и планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 2 ч, а затем трижды отмывают. Для детекции связанного человеческого антитела конъюгированное с HRP антитела козы против лёгкой цепи каппа человеческого иммуноглобулина (Bethyl Laboratories, Cat #A80-115P) разводят до концентрации 1 мкг/мл в блокирующем буфере и помещают в лунки для анализа на 1 ч, а затем трижды отмывают и наносят субстрат TMB (eBioscience, Cat #00-4201-56). Оптическую плотность определяют при длине волны 650 нм на спектрофотометре Spectramax 340PC (Molecular Dynamics, Inc.). Результаты пептидного сканирования представлены в табл. 5.

Таблица 5. Связывание антител против LAG с пептидным сканированием внеклеточной петли (Extra Loop) LAG-3

Пептидное сканирование внешней петли LAG-3	SEQ				
GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY	79	25E3	8B7	25F7	26H10
GPPAAAPGHPLA	80	-	-	-	-
PAAAPGHPLAPG	81	++	-	-	-
AAPGHPLAPGPH	82	++	-	-	-
PGHPLAPGPHPA	83	+	-	-	-
HPLAPGPHPAAP	84	±	-	-	-
LAPGPHPAAPSS	85	-	-	-	-
PGPHPAAPSSWG	86	-	++	++	-
PHPAAPSSWGPR	87	-	++	++	-
PAAPSSWGPRPR	88	-	++	+	-
APSSWGPRPRRY	89	-	-	-	-

На основании этих результатов определяют, что антитело 25E3 узнаёт область во внеклеточной петле, содержащую аминокислотную последовательность PGHPLAPG (SEQ ID NO: 76), тогда как антитело 25F7 узнаёт область во внеклеточной петле, содержащую аминокислотную последовательность HPAAPSSW (SEQ ID NO: 77), а 8B7, по-видимому, узнаёт область во внеклеточной петле, содержащую аминокислотную последовательность PAAPSSWG (SEQ ID NO: 78). Напротив, нельзя обнаружить никакого связывания полноразмерного петлевидного пептида или любого из более коротких сканирующих пептидов антителом 26H10.

Области, идентифицированные в данном исследовании, подчёркнуты в полноразмерной последовательности внеклеточной петли:



Таким образом, результаты пептидного сканирования показывают, что антитела 25E3, 25F7 и 8B7 связываются с различными, хотя близко расположенными эпитопами в человеческом LAG-3.

Для более подробного изучения связывания этих антител с областью пептида внешней петли проводят дополнительные анализы ELISA. В анализе ELISA с применением человеческого полноразмерного пептида внеклеточной петли (Extra Loop) (SEQ ID NO: 79) определяют значения EC_{50} для связывания 25E3, 25F7 и 8B7. Помимо этого аналогичный пептидный анализ ELISA проводят, используя полнораз-

мерную последовательность пептида внеклеточной петли (Extra Loop) белка LAG-3 макака-резус, имеющей последовательность GPPAPAPGHPPAPGHRPAAP YSWGPRPRRY (SEQ ID NO: 90), и значения EC_{50} для связывания определяют для антител 25F7 и 8B7. Результаты представлены ниже, в табл. 6. Эти результаты подтверждают, что антитела 25E3, 25F7 и 8B7 способны узнавать пептид области человеческого белка LAG-3. Кроме того, антитела 25F7 и 8B7 также связываются с пептидной последовательностью внеклеточной петли белка LAG-3 макака-резус, хотя и хуже, чем с человеческой последовательностью, что может быть вызвано расхождением последовательности данного полипептида, связанным с видом. Результаты также подтверждают, что антитело 26H10 не способно узнавать пептид внеклеточной петли белка LAG-3.

Таблица 6. Связывание антител против LAG-3 с пептидом внеклеточной петли белка LAG-3 человека и макака-резус

Антитело	EC_{50} (нМ) человеческая внеклеточная петля	EC_{50} (нМ) внеклеточная петля макака-резус
25E3	0.55	Не проверяли
25F7	0.29-0.95	13.09
8B7	0.28-1.35	0.60
26H10	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует

Пример 4. Ингибирование связывания LAG-3 с молекулами ГКГ (МНС) Класа II с помощью антител против LAG-3

Для проверки способности антител против LAG-3 ингибировать связывание LAG-3 с молекулами ГКГ (МНС) Класа II проводят анализ связывания *in vitro*, в котором слитый белок LAG-3, содержащий внеклеточный домен человеческого LAG-3, слитый с мышиным Fc (hLAG-3-mIg), реагирует с клетками Дауди, экспрессирующими молекулы антигенов главного комплекса гистосовместимости (ГКГ, МНС) Класа II человека.

Для тестирования ингибирования антителом связывания LAG-3 с МНС Класа II делают серийные разведения антител 25E3, 25F7, 8B7 и 26H10, начиная с концентрации 20 мкг/мл в PFAE буфере, и к этим серийным разведениям прибавляют 1 мкг/мл слитого белка hLAG-3-mIg. Эту смесь инкубируют в течение 20 мин при комнатной температуре, а затем добавляют к 2×10^5 клеток Дауди, отмытых в $1 \times$ PFAE. Смесь инкубируют при 4°C в течение 30 мин. Клетки осаждают центрифугированием (3 мин, $400 \times g$), отмывают один раз $1 \times$ PFAE буфером и снова осаждают центрифугированием, и определяют связывание hLAG-3-mIg с клетками Дауди с помощью PE-меченного вторичного антитела (реагента) против mIgG Fcy. Анализ связывания LAG-3-mIg проводят на проточном цитометре FACScalibur (BD Bioscience). Результаты представлены ниже, в табл. 7, в которой приводятся значения IC_{50} в нМ.

Таблица 7. Ингибирование связывания LAG-3 с МНС Класа II антителами против LAG-3

Антитело	IC_{50} (нМ)
25E3	0.8 - 6.78
25F7	0.12 - 0.92
8B7	0.19 - 0.95
26H10	0.10

Результаты показывают, что все четыре антитела эффективно ингибируют связывание LAG-3 с молекулами антигенов ГКГ (МНС) Класа II, причём величины IC_{50} для 25F7, 8B7 и 26H10 примерно, в 7-13 раз меньше, чем для 25E3.

Пример 5. Стимуляция антигенспецифического Т-клеточного ответа с помощью mAbs против LAG-3

Для проверки способности антител против LAG-3 стимулировать антигенспецифический Т-клеточный ответ, применяют анализ стимуляции 3A9 Т-клеток пептидами (см., например, Workman et al. (2003) J. Immunol. 169: 5392-5395; Workman et al. (2002) Eur. J. Immunol. 32: 2255- 2263).

В этом анализе мышиные Т-клеточные гибридомы, 3A9, специфические к пептиду HEL₄₈₋₆₂, используют в качестве иммунореактивной Т-клетки.

Иммунореактивную 3A9 Т-клетку трансдуцируют с помощью ретровируса таким образом, чтобы она экспрессировала либо человеческий LAG-3, либо мышиный LAG-3 на своей поверхности. Антиген-презентирующей клеткой (APC), используемой для представления HEL₄₈₋₆₂ пептидного антигена клеткам 3A9, является линия клеток LK35.2 мыши, позитивная к МНС Класа II. В отдельном исследовании определяют, что слитый белок человеческого LAG-3 способен связываться с молекулами ГКГ (МНС) Класа II мыши, тем самым подтверждается правильность применения LK35.2 мышиных APC в данном анализе. На антигенспецифическую стимуляцию клеток 3A9 указывает продукция интерлейкина-2 (IL-2), секрецию которого количественно определяют с помощью ELISA (набор с мышиным IL-2 OptEIA kit, BD Bioscience, Cat #555148 в соответствии с рекомендациями изготовителя).

Эктопическая экспрессия человеческого или мышиного LAG-3 на 3A9 Т-клетках, в отсутствие какого-либо антитела, оказывает ингибирующее действие на антигенспецифические реакции, если трансфицированные Т-клетки инкубируют с LK35.2 APC, представляющими HEL₄₈₋₆₂ пептидный антиген, на что указывает увеличение количества пептидного антигена, необходимого для стимуляции продукции IL-2 клетками 3A9, по сравнению с профилем доза пептида - эффект контрольных 3A9 Т-клеток.

Для проверки стимуляции антигенспецифического Т-клеточного ответа APC (2.5×10^4 клеток) сначала преинкубируют с антигенным пептидом (200 нМ) в течение 30 мин при 37°C, а 3A9 Т-клетки (5.0×10^4 клетки, экспрессирующие mLAG-3, hLAG-3 или контрольные клетки) преинкубируют с антителом против hLAG-3 (25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2, 17E5), в трёхкратном серийном разведении, начиная с 25 мкг/мл) в течение 15 мин при 37°C. Затем клетки 3A9 Т прибавляют к активированным антигеном APC и культуры инкубируют в течение 24 ч при 37°C. Затем супернатанты собирают и количественно определяют продукцию мышиного IL-2. Результаты для 3A9 Т-клеток, экспрессирующих человеческий LAG-3, представлены в табл. 8, в которой приводятся значения IC_{50} в нМ.

Таблица 8. Стимуляция антигенспецифического Т-клеточного ответа антителами против LAG-3

<u>Антитело</u>	<u>3A9-hLAG-3 пептидный анализ</u>
	<u>IC_{50} (нМ)</u>
25F7	0.14 – 1.94
26H10	1.45 – 6.49
8B7	3.25 – 13.90
25E3	3.88 – 70.78
11F2	81.50 – 240
17E5	Ингибирование отсутствует

Результаты показывают, что антитела 25F7, 8B7 и 26H10, и в меньшей степени 25E3, способны стимулировать продукцию IL-2 в анализе антигенспецифического Т-клеточного ответа, тогда как антитело 11F2 проявляет минимальную способность ингибировать, а антитело 17E5 не является активным в этом анализе. Ни одно из антител не изменяет количественно определённую продукцию IL-2 контрольными 3A9 Т-клетками или клетками 3A9 Т, трансфицированными мышиным LAG-3 белком, это демонстрирует специфичность этого эффекта.

Пример 6. Ингибирование роста опухоли с помощью mAb против LAG-3, самостоятельно или в комбинации

Для проверки способности антитела против LAG-3, самостоятельно или в комбинации с другим иммуностимулирующим антителом, ингибировать рост опухолевых клеток *in vivo*, используют две различных мышиных модели сингенных опухолевых трансплантатов. На первой модели используют клетки мышиной фибросаркомы Sa1N. На второй модели используют мышиную линию клеток рака толстой кишки MC38.

В первом эксперименте каждой мыши (A/J линии) имплантируют 2×10^6 клеток фибросаркомы Sa1N в день 0 и опухолевые клетки оставляют расти в течение семи дней. На 7, 10 и 12 дни после имплантации мышам вводят 10 мг/кг либо одного mAb против LAG-3 (антитело крысы против мышиного LAG-3, mAb C9B7W; eBioscience, Cat. No. 14- 2231), одного антитела против PD-L1 (мышиное антитело против PD-L1, mAb 14D8), антитело против LAG-3 и антитело против PD-L1 в комбинации, либо контрольное антитело IgG1 изотипа. mAb 14D8 представляет собой антитело крысы против мышиного PD-L1, которое превращено в химерное антитело таким образом, чтобы содержать константные области мышиного IgG1 и мышиной капша цепи.

Объёмы опухолей у мышей измеряют в течение более чем 50 дней после имплантации и определяют средние и срединные (медианные) объёмы опухолей. Рассчитывают среднее ингибирование роста опухоли (с учётом того, что ингибирование контрольного антитела изотипа IgG1 составляет 0%). Результаты на 24 день после имплантации представлены ниже, в табл. 9.

Таблица 9. Среднее ингибирование роста опухоли на модели опухоли Sa1N

<u>День</u>	<u>IgG1</u>	<u>LAG-3</u>	<u>PD-L1</u>	<u>Combo</u>
24	-	68	74.9	95.8

Таким образом, введение лишь одного антитела против LAG3, или лишь одного антитела против PD-L1 приводит к ингибированию роста опухоли, тогда как комбинация обоих антител вызывает значительно ещё более значительное ингибирование роста опухоли. Что касается экспериментальных групп, к концу эксперимента у 4 из 10 мышей, получавших только антитело против LAG3, опухоли отсутствуют, тогда как только у 1 из 10 мышей, пролеченных контрольным IgG1 антителом, к концу эксперимента отсутствует опухоль. Аналогично, у 4 из 11 мышей, пролеченных одним антителом против PD-L1, опухоль отсутствует. Лечение мышей комбинацией антитела против LAG3 и антитела против PD-L1 приводит к тому, что у 9 из 10 мышей опухоли отсутствуют; у последней мыши остаётся медленно заживающая опухоль, которая остаётся маленькой в течение исследования.

В двух дополнительных исследованиях подопытным мышам имплантируют мышиные клетки линии MC38 рака толстой кишки. В первом эксперименте в день 0 каждой мыши C57B1/6 имплантируют 2×10^6 MC38 клеток и на 7, 10 и 12 день после имплантации вводят по 200 мкг/доза одного антитела против LAG-3 (C9B7W mAb), одного антитела против PD-1 (4H2 mAb) или комбинацию антитела против LAG-3 и антитела против PD-1. В качестве контрольного антитела использую антитело, родственное по IgG1 изотипу, в количестве 400 мкг/доза. 4H2 mAb представляет собой антитело крысы против мышиного PD-L1, которое превращено в химерное антитело таким образом, чтобы содержать константные об-

ласти мышиногo IgG1 и мышиногo каппа цепи.

Средний объём опухоли, срединный (медианный) объём опухоли и % выживаемости определяют через 80 дней после имплантации. Результаты показывают, что на этой модели опухоли (MC38) монотерапия антителом против LAG-3 показывает слабую активность или не показывает активности в отношении ингибирования роста опухоли, и ни одна из пролеченных мышей не выжила в ходе эксперимента. Напротив, в случае монотерапии антителом против PD-1 наблюдается значительная активность, так что к концу эксперимента у 4 из 10 мышей опухоль исчезает. Помимо этого, аналогично результатам, полученным на SalN модели опухоли, комбинированная терапия антителом против LAG-3 плюс антитело против PD-1 более эффективна, чем терапия любым одним антителом, к концу эксперимента у 7 из 8 мышей опухоль отсутствует.

Во втором эксперименте на MC38 модели в день 0 каждой мыши C57B1/6 имплантируют 2×10^6 MC38 клеток, а на 5, 8 и 11 день после имплантации вводят по 200 мкг/доза тестируемого антитела и/или 400 мкг/доза контрольного IgG антитела следующим образом:

- (i) контрольное IgG1 антитело;
- (ii) mAb против LAG-3 (C9B7W mAb) совместно с контрольным IgG1 антителом;
- (iii) антитело против PD-1 (4H2) совместно с контрольным IgG1 антителом;
- (iv) антитело против CTLA-4 (мышинное mAb 9D9 против мышиногo CTLA-4) совместно с контрольным IgG1 антителом;
- (v) mAb против LAG-3 совместно с mAb против PD-1 или
- (vi) mAb против LAG-3 совместно с mAb против CTLA-4.

9D9 mAb представляет собой мышинное антитело против мышиногo CTLA-4, вырабатывающееся у мыши, "нокаутированной" по эндогенному мышинному CTLA-4.

Средний объём опухоли, срединный (медианный) объём опухоли и % выживаемости определяют через 100 дней после имплантации. Результаты аналогичны результатам первого эксперимента, а именно, монотерапия, направленная против LAG-3, имеет слабую активность или неактивна в отношении ингибирования роста опухоли MC38, и ни одна из пролеченных мышей не выжила в ходе эксперимента. В случае монотерапии антителом против CTLA-4 также имеет слабую активность или неактивна в отношении ингибирования роста опухоли MC38, и ни одна из пролеченных мышей не выжила в ходе эксперимента. Напротив, при монотерапии антителом против PD-1 наблюдается значительная активность, так что к концу эксперимента у 4 из 10 мышей опухоль исчезает. Помимо этого, опять же комбинированная терапия более эффективна, чем монотерапия. В группе мышей, пролеченных комбинацией антитела против LAG-3 и антитела против CTLA-4, к концу эксперимента у 3 из 10 отсутствует опухоль, а в группе мышей, пролеченных комбинацией антитела против LAG-3 и антитела против PD-1, у 8 из 10 мышей исчезает опухоль к концу эксперимента.

Таким образом, вышеописанные *in vivo* исследования трансплантатов опухолевых клеток показывают, что, по меньшей мере, на некоторых моделях опухолей лечение одним антителом против LAG приводит к заметному ингибированию роста опухоли *in vivo*. Кроме того, на моделях сложных опухолей комбинированная терапия антителом против LAG-3 совместно либо с антителом против PD-1, либо с антителом против PD-L1, либо с антителом против CTLA-4 имеет ещё более высокую противоопухолевую активность, чем одна монотерапия.

Пример 7. Стимуляция аутоиммунитета у NOD мышей путём ингибирования моноклональными антителами (mAb) против LAG-3

Для проверки способности антитела против LAG-3 стимулировать иммунный ответ, свидетельствующий о развитии аутоиммунитета, используют NOD мышиную модель диабета. Известно, что NOD мыши предрасположены к развитию аутоиммунного диабета. За прогрессированием диабета у самок NOD мышей следят, количественно определяя сывороточную глюкозу. Таким образом изучают влияние лечения антителом против LAG-3, одним или в комбинации с любым иммуностимулирующим антителом, на развитие диабета у самок NOD мышей.

Самкам NOD мышей в день 0, на 2 и 5 день вводят 250 мкг/доза реагента следующим образом:

- (i) контрольное IgG1 антитело;
- (ii) одно mAb против LAG-3 (C9B7W mAb);
- (iii) одно антитело против PD-1 (4H2 mAb);
- (iv) одно mAb против CTLA-4 (9D9 mAb);
- (v) mAb против LAG-3 совместно с mAb против PD-1 или
- (vi) mAb против LAG-3 совместно с mAb против CTLA-4.

Результаты показывают, что обработка только антителом против LAG-3 или только антителом против PD-1 treatment alone (но не обработка только антителом против CTLA 4) увеличивает число мышей, превращающихся в диабетический фенотип. Кроме того, комбинированная обработка антителом против LAG-3 плюс антитело против PD-1, или антитело против LAG-3 плюс антитело против CTLA-4 ещё более эффективно превращает мышей в диабетический фенотип.

Таким образом, результаты показывают, что блокада взаимодействия LAG-3 со своим рецептором накладывается на негативный иммунорегуляторный сигнал, что способствует более высокой иммуноло-

гической активности NOD мышей, и эту более высокую иммунологическую активность у мышей, получавших LAG-3, можно повысить с помощью комбинированного введения либо с антителом против PD-1, либо с антителом против CTLA-4.

Пример 8. Иммуногистохимическое исследование с применением mAbs против LAG-3

В данном эксперименте флуоресцентно меченные человеческие антитела против LAG-3 используют в иммуногистохимических исследованиях. Используются следующие FITC-меченные человеческие антитела против LAG-3: 25F7-FITC (F:P= 2.9; IgG1 вариант); 25F7-G4-FITC (F:P=2.7; IgG4 вариант); 8B7-FITC (F:P=2.6) и 26H10- FITC (F:P=3.4). Изучают панель лимфоидных тканей, конкретно миндалин (два образца), селезёнки (два образца) и тимуса (два образца), наряду с тканью гипофиза (четыре образца). Трансфецированные с помощью LAG-3 клетки CHO используют также в качестве контроля. Используют криостатные срезы, фиксированные в ацетоне. Срезы окрашивают FITC- меченным антителом против LAG-3 (0.2-5 мкг/мл), а затем окрашивают кроличьим анти-FITC антителом в качестве мостикового (соединяющего) антитела, а затем проводят визуализацию, используя набор для визуализации кроличьих антител EnVision™+System Kit (Dako USA, Carpinteria, CA). Результаты приводятся в табл. 10.

Таблица 10. Иммуногистохимические исследования с применением mAbs против LAG-3

Ткань	25F7- FITC	25F7- G4- FITC	8B7- FITC	26H10- FITC
CHO/LAG-3 Клетки	+	+	+	+
Миндалины (n=2)	(сильное; редкое в отдельных LC, 2/2)	(сильное; редкое в отдельных LC, 2/2)	(сильное; редкое в отдельных LC, 2/2)	(сильное; редкое в отдельных LC, 2/2)
Селезёнка (n=2)	+	+	+	+
	(очень слабое, главным образом в красной пульпе, 2/2)	(очень слабое, главным образом в красной пульпе, 2/2)	(очень слабое, главным образом в красной пульпе, 2/2)	(очень слабое, главным образом в красной пульпе, 2/2)
Тимус (n=2)	+	+	+	+
	(сильное; очень редкое в отдельных LC, 1/2)	(сильное; очень редкое в отдельных LC, 1/2)	(сильное; очень редкое в отдельных LC, 1/2)	(сильное; очень редкое в отдельных LC, 1/2)
Гипофиз (n=4)	+	+	—	+
	(сильное; эпизодическое в аденогипофизе, 3/4)	(сильное; эпизодическое в аденогипофизе, 3/4)		(сильное; эпизодическое в аденогипофизе, 3/4; слабо- умеренное, редкое, 1/4)

LC=лимфоцит;

+ = позитивное окрашивание;

- = негативное окрашивание

Как ожидалось, экспрессию LAG-3 детектируют на панели лимфоидной ткани. Помимо того, для двух из трёх изученных антител против LAG-3, 25F7 (IgG1 и IgG4 варианты) и 26H10, наблюдается удержание в ткани гипофиза, тогда как для одного из изученных антител, 8B7, не наблюдается такое удержание в гипофизарной ткани. Таким образом, иммуногистохимические исследования позволяют идентифицировать две субпопуляции антител против LAG-3, причём одна субпопуляция удерживается в гипофизарной ткани, а другая субпопуляция не удерживается в гипофизарной ткани.

Сводный список последовательностей

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>Последовательность</u>	<u>SEQ ID NO:</u>	<u>Последовательность</u>
1	V _H CDR1 a.a. 25F7	49	V _H n.t. 25F7
2	V _H CDR1 a.a. 26H10	50	V _H n.t. 26H10
3	V _H CDR1 a.a. 25E3	51	V _H n.t. 25E3
4	V _H CDR1 a.a. 8B7	52	V _H n.t. 8B7
5	V _H CDR1 a.a. 11F2	53	V _H n.t. 11F2
6	V _H CDR1 a.a. 17E5	54	V _H n.t. 17E5
7	V _H CDR2 a.a. 25F7	55	V _K n.t. 25F7
8	V _H CDR2 a.a. 26H10	56	V _K n.t. 26H10
9	V _H CDR2 a.a. 25E3	57	V _K n.t. 25E3
10	V _H CDR2 a.a. 8B7	58	V _K n.t. 8B7
11	V _H CDR2 a.a. 11F2	59	V _K n.t. 11F2
12	V _H CDR2 a.a. 17E5	60	V _K n.t. 17E5
13	V _H CDR3 a.a. 25F7	61	V _H 4-34 зародышевой линии a.a.
14	V _H CDR3 a.a. 26H10	62	V _H JH5b зародышевой линии a.a.
15	PVGVV	63	V _K L6 зародышевой линии a.a.
16	V _H CDR3 a.a. 8B7	64	V _K JK2 зародышевой линии a.a.
17	V _H CDR3 a.a. 11F2	65	V _H 3-33 зародышевой линии a.a.
18	V _H CDR3 a.a. 17E5	66	V _H JH6b зародышевой линии a.a.
		67	V _K A 27 зародышевой линии a.a.
19	V _K CDR1 a.a. 25F7	68	V _K JK3 зародышевой линии a.a.
20	V _K CDR1 a.a. 26H10	69	V _H 3-20 зародышевой линии a.a.
21	V _K CDR1 a.a. 25E3		
22	V _K CDR1 a.a. 8B7	70	V _H JH4b зародышевой линии a.a.
23	V _K CDR1 a.a. 11F2	71	V _K L-18 зародышевой линии a.a.
24	V _K CDR1 a.a. 17E5	72	V _K JK4 зародышевой линии a.a.

		73	V _H 1-24 зародышевой линии а.а.
25	V _K CDR2 а.а. 25F7	74	V _K JK1 зародышевой линии а.а.
26	V _K CDR2 а.а. 26H10	75	V _K JK5 зародышевой линии а.а.
27	V _K CDR2 а.а. 25E3		
28	V _K CDR2 а.а. 8B7	76	PGHPLAPG
29	V _K CDR2 а.а. 11F2	77	HPAAPSSW
30	V _K CDR2 а.а. 17E5	78	PAAPSSWG
		79	GPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSW GPRPRRY
31	V _K CDR3 а.а. 25F7	80	GPPAAAPGHPLA
32	V _K CDR3 а.а. 26H10	81	PAAAPGHPLAPG
33	V _K CDR3 а.а. 25E3	82	AAPGHPLAPGPH
34	V _K CDR3 а.а. 8B7	83	PGHPLAPGHPA
35	V _K CDR3 а.а. 11F2	84	HPLAPGHPAAP
36	V _K CDR3 а.а. 17E5	85	LAPGHPAAPSS
		86	PGHPAAPSSWG
37	V _H а.а. 25F7	87	PHPAAPSSWGPR
38	V _H а.а. 26H10	88	PAAPSSWGPRPR
39	V _H а.а. 25E3	89	APSSWGPRPRRY
40	V _H а.а. 8B7	90	GPPAPAPGHPPAPGHRP AAPYSWGPRPRRY
41	V _H а.а. 11F2		
42	V _H а.а. 17E5	91	atgtgggaggctcagttcctg
		92	gtcagagctgctccggctc
43	V _K а.а. 25F7	93	LAG-3 макак- резус клон pa23-5 а.а.
44	V _K а.а. 26H10	94	LAG-3 макак- резус (XM_001108923)
45	V _K а.а. 25E3		
46	V _K а.а. 8B7		
47	V _K а.а. 11F2		
48	V _K а.а. 17E5		

а.а.=аминокислота;

н.т.=нуклеотид

Термин "содержащий", используемый в данном описании и формуле изобретения означает "состоящий по крайней мере в части". При интерпретации предложений в данном описании и формуле изобретения, которые включают термин "содержащий", другие признаки, кроме признаков, подразумеваемых под этим термином, также могут присутствовать в каждом предложении. Связанные термины, такие как "содержит" и "состоит из" следует интерпретировать аналогичным образом.

В этом описании, где была сделана ссылка на описания патентов, других внешних документов или других источников информации, как правило с целью создания контекста для обсуждения признаков изобретения. Если специально не указано иное, ссылка на такие внешние документы не должна быть истолкована как признание того, что такие документы, или такие источники информации, в любой юрисдикции, являются уровнем техники, или являются частью общепринятых сведений в данной области техники.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака у субъекта, подлежащего лечению, включающий в себя введение субъекту выделенного человеческого моноклонального антитела или его антигенсвязывающего участка, которое связывает человеческий ген активации лимфоцитов-3 (LAG-3), причем антитело содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 95% гомологичные последовательностям SEQ ID NO: 37 и 43 соответственно.

2. Способ по п.1, в котором антитело или его антигенсвязывающий участок, которое связывает человеческий LAG-3, содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 98% гомологичные последовательностям SEQ ID NO: 37 и 43 соответственно.

3. Способ по п.1 или 2, в котором антитело или его антигенсвязывающий участок, которое связывает человеческий LAG-3, содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи, содержащие аминокис-

лотные последовательности, по меньшей мере на 99% гомологичные последовательностям SEQ ID NO: 37 и 43 соответственно.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором антитело или его антигенсвязывающий участок, которое связывает человеческий LAG-3, содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, 7 и 13 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 CDR3 варибельной области легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 19, 25 и 31 соответственно.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором антитело или его антигенсвязывающий участок, которое связывает человеческий LAG-3, содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

6. Способ по любому из пп.1-5, где антитело представляет собой полноразмерное антитело.

7. Способ по п.6, где полноразмерное антитело представляет собой IgG1, IgG2 или IgG4 изотип.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором антитело или его антигенсвязывающий участок, которое связывает человеческий LAG-3, представляет собой химерное, гуманизированное или человеческое антитело.

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий участок, которое связывает человеческий LAG-3, проявляет по меньшей мере одно из нижеследующих свойств:

- a) стимулирует антигенспецифический Т-клеточный ответ;
- b) стимулирует продуцирование интерлейкина-2 (IL-2) при антигенспецифическом Т-клеточном ответе;
- c) ингибирует связывание LAG-3 с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГ, МНС) класса II;
- d) стимулирует противоопухолевый ответ;
- e) ингибирует рост опухолевых клеток *in vivo*;
- f) связывается с человеческим LAG-3 с K_D 1×10^{-7} М или менее;
- g) связывается с LAG-3 обезьян;
- h) не связывается с мышинным LAG-3.

10. Способ по п.9, в котором антитело или его антигенсвязывающий участок, которое связывает человеческий LAG-3, проявляет по меньшей мере два свойства (a)-(h).

11. Способ по п.9, в котором антитело или его антигенсвязывающий участок, которое связывает человеческий LAG-3, проявляет все свойства (a)-(h).

12. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий участок связывает человеческий белок LAG-3 с K_D 1×10^{-9} М или менее.

13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий участок связывает человеческий белок LAG-3 с K_D 5×10^{-10} М или менее.

14. Способ по любому из пп.1-13, предусматривающий введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного иммуностимулирующего антитела или его антигенсвязывающего участка.

15. Способ по п.14, в котором по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело или его антигенсвязывающий участок представляет собой антитело против PD-1, антитело против PD-L1 и/или антитело против CTLA-4 или его антигенсвязывающий участок.

16. Способ по п.15, в котором по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело или его антигенсвязывающий участок представляет собой антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий участок.

17. Способ по п.16, в котором антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий участок содержит области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой и легкой цепи антитела 5C4.

18. Способ по п.16 или 17, в котором анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий участок содержит варибельные области тяжелой и легкой цепи антитела 5C4.

19. Способ по любому из пп.14-18, в котором по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело представляет собой полноразмерное антитело.

20. Способ по любому из пп.14-19, где полноразмерное антитело представляет собой IgG1, IgG2 или IgG4 изотип.

21. Способ по любому из пп.14-20, в котором по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело или его антигенсвязывающий участок представляет собой химерное, гуманизированное или человеческое антитело.

22. Способ по любому из пп.14-21, где антитело, которое связывает человеческий LAG-3, и по меньшей мере одно иммуностимулирующее антитело представляет собой полноразмерное, IgG4 изотипа, человеческое антитело.

23. Способ по любому из пп.14-22, в котором антитело или его антигенсвязывающий участок, которое связывает человеческий LAG-3, и по меньшей мере одно иммуностимулирующее антитело или его

антигенсвязывающий участок находится в молекуле биспецифического типа.

24. Способ по любому из пп.14-22, в котором антитело или его антигенсвязывающий участок, которое связывает человеческий LAG-3, и по меньшей мере одно иммуностимулирующее антитело или его антигенсвязывающий участок вводят одновременно в виде отдельных композиций с каждым антителом в фармацевтически приемлемом носителе.

25. Способ по любому из пп.14-22, в котором антитело или его антигенсвязывающий участок, которое связывает человеческий LAG-3, и по меньшей мере одно иммуностимулирующее антитело или его антигенсвязывающий участок вводятся одновременно в виде единой композиции в фармацевтически приемлемом носителе.

26. Способ по любому из пп.14-22, в котором антитело или его антигенсвязывающий участок, которое связывает человеческий LAG-3, и по меньшей мере одно иммуностимулирующее антитело или его антигенсвязывающий участок вводятся последовательно.

27. Способ по любому из пп.1-26, дополнительно предусматривающий введение химиотерапевтического агента.

28. Способ по любому из пп.1-27, дополнительно предусматривающий введение ингибитора ангиогенеза.

29. Способ по любому из пп.1-28, где раком является меланома, метастатическая злокачественная меланома, рак почки, светлоклеточная карцинома, рак предстательной железы, гормон-резистентная аденокарцинома предстательной железы, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак легких или немелкоклеточный рак лёгкого.

30. Способ по любому из пп.1-29, в котором раком является резистентная или рецидивирующая злокачественная опухоль или метастатический рак.

31. Способ по любому из пп.1-30, в котором субъект является человеком.

