

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044026**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.18

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

(21) Номер заявки
201990927

(22) Дата подачи заявки
2017.10.11

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ LAG-3 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/406,766; 62/420,280

(32) 2016.10.11; 2016.11.10

(33) US

(43) 2019.10.31

(86) PCT/US2017/056078

(87) WO 2018/071500 2018.04.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЙДЖЕНУС ИНК. (US)

(56) S.-R. WOO ET AL.: "Immune Inhibitory Molecules LAG-3 and PD-1 Synergistically Regulate T-cell Function to Promote Tumoral Immune Escape", CANCER RESEARCH, vol. 72, no. 4, 15 February 2012 (2012-02-15), pages 917-927, XP055431013, US ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1620, abstract; anti-LAG-3 antibody 4-10-C9
WO-A2-2010019570
WO-A1-2016028672

(72) Изобретатель:
**Уилсон Николас Стюарт, Савицки
Дэвид Адам, Дженнингс Шон Майкл
(US), Ван Дейк Марк (NL), Мундт
Корнелия Анна (DE)**

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

(57) Изобретение предлагает антитела, которые специфически связываются с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и противодействуют функции LAG-3. Также предоставлены фармацевтические композиции, содержащие данные антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие данные антитела, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения указанных антител, и способы лечения субъекта с использованием указанных антител.

B1

044026

044026

B1

1. Связанные заявки

Заявка на данный патент испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/406766, поданной 11 октября 2016 г.; и 62/420280, поданной 10 ноября 2016 г., каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

2. Область техники

Данное изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с LAG-3 (например, LAG-3 человека), и к способам их применения.

3. Уровень техники

Ген активации лимфоцитов 3 (LAG-3 - lymphocyte activation gene 3), также известный как CD223, является мембранным белком типа I в суперсемействе иммуноглобулинов (Ig), который состоит из четырех внеклеточных доменов Ig и цитоплазматического домена, содержащего консервативный повторный мотив EP и один консервативный мотив KIEELE (Triebel et al., (1990) J Exp Med, 171: 1393-405; Workman et al., (2002) J Immunol, 169: 5392-5). LAG-3 экспрессируется на активированных эффекторных Т-лимфоцитах (Teff), активированных регуляторных Т-лимфоцитах (Treg), активированных В-лимфоцитах, подмножестве покоящихся естественных киллеров (NK) и покоящихся плазматоидных дендритных клетках (PDC) (Huang et al., (2004) Immunity, 21: 503-13; Workman et al., (2009) J Immunol, 182: 1885-91; Kisielow et al., (2005) Eur J Immunol, 35: 2081-8; Baixeras et al., (1992) J Exp Med, 176: 327-37; Workman et al., (2002) Eur J Immunol, 32: 2255-63). В условиях постоянного антигенного воздействия, такого как хронические патогенные инфекции или в микроокружении опухоли (TME - tumor microenvironment), экспрессия LAG-3 поддерживается на Т-регуляторных клетках типа 1 (Tr1) и так называемых истощенных антиген-специфических Т-клетках (Park et al., (2012) Cell Immunol, 278: 76-83; Gagliani et al., (2013) Nat Med, 19: 739-46; Blackburn et al., (2009) Nat Immunol, 10: 29-37).

LAG-3 функционирует таким образом, что негативно регулирует активированные Т-клетки. Лигандом для LAG-3 является ГКГС класса II, экспрессируемый на антигенпрезентирующих клетках (APC) и активированных Т-клетках (Roche and Furuta (2015) Nat Rev Immunol, 15: 203-16). Взаимодействие между LAG-3 и его лигандом ингибирует пролиферацию и секрецию цитокинов CD4+ и CD8+ клетками Teff (Macon-Lemaître and Triebel (2005) Immunology, 115: 170-8; Huard et al., (1997) Proc Natl Acad Sci USA, 94: 5744-9). LAG-3 в Treg и PDC способствует негативной регуляции функции Т-клеток (Huang et al., (2004) Immunity, 21: 503-13; Workman et al., (2009) J Immunol, 182: 1885-91). В соответствии с его ролью в поддержании иммунного гомеостаза, дефицит LAG-3 индуцировал летальный миокардит у мышей, также генетически дефицитных по PD-1 (Okazaki et al., (2011) J Exp Med, 208: 395-407). Кроме того, блокада in vivo моноклональным антителом против LAG-3 мыши в сочетании с блокадой PD-1, обеспечила синергический эффект для усиления противоопухолевого иммунитета на моделях опухолей сингенных мышей (Woo et al., (2012) Cancer Res, 72: 917-27).

Учитывая роль LAG-3 в модулировании иммунных реакций, терапевтические агенты, предназначенные для противодействия передаче сигналов LAG-3, имеют большие перспективы для лечения заболеваний, которые включают LAG-3-опосредованную иммунную супрессию.

4. Сущность изобретения

Данное изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и противодействуют функции LAG-3, например, LAG-3-опосредованной иммунной супрессии. Также предоставлены фармацевтические композиции, содержащие данные антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие данные антитела, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения данных антител, и способы лечения субъекта с использованием данных антител. Описанные в данном документе антитела особенно полезны для увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген (например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания) и/или для снижения Treg-опосредованной иммунной супрессии, и, следовательно, для лечения рака у субъекта, или лечения или профилактики инфекционного заболевания у субъекта.

Соответственно, в одном аспекте данное изобретение относится к антителу или выделенному антителу, содержащему переменную область тяжелой цепи, содержащую области, определяющие комплементарность CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую области, определяющие комплементарность CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность DX₁YX₂X₃ (SEQ ID NO: 140), где

X₁ представляет собой Т или N,

X₂ представляет собой I или M, а

X₃ представляет собой H, Y или D;

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность X₁IDPANX₂X₃X₄X₅X₆X₇PX₈X₉QX₁₀ (SEQ ID NO: 142), где

X₁ представляет собой E, R, S или K,

X₂ представляет собой D или G,

X₃ представляет собой N или H,

X₄ представляет собой Т или S,

X₅ представляет собой K или H,

X₆ представляет собой Y или F,
 X₇ представляет собой D или A,
 X₈ представляет собой K или R,
 X₉ представляет собой F или L, а
 X₁₀ представляет собой G или D;

(с) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность YX₁X₂X₃YX₄VGGX₅DY (SEQ ID NO: 144), где

X₁ представляет собой Y, F или S,
 X₂ представляет собой Y или D,
 X₃ представляет собой K или R,
 X₄ представляет собой D или E, а
 X₅ представляет собой F или C;

(d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SVSSX₁ISSSX₂LX₃ (SEQ ID NO: 147), где

X₁ представляет собой S или G,
 X₂ представляет собой N или T, а
 X₃ представляет собой H или Y;
 (е) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность GTSNLAS (SEQ ID NO: 104); а
 (f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность QQWX₁X₂YPX₃T (SEQ ID NO: 149), где
 X₁ представляет собой S, N или R,
 X₂ представляет собой S, T или R, а
 X₃ представляет собой F, L, H или W.

В другом аспекте в данном изобретении предложено антитело или выделенное антитело, которое специфически связывается с LAG-3 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую области, определяющие комплементарность CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области, определяющие комплементарность CDRL1, CDRL2 и CDRL3, в котором:

(а) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность DX₁YX₂X₃ (SEQ ID NO: 140), где

X₁ представляет собой T или N,
 X₂ представляет собой I или M, а
 X₃ представляет собой H, Y или D;

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность X₁IDPANX₂X₃X₄X₅X₆X₇PX₈X₉QX₁₀ (SEQ ID NO: 142), где

X₁ представляет собой E, R, S или K,
 X₂ представляет собой D или G,
 X₃ представляет собой N или H,
 X₄ представляет собой T или S,
 X₅ представляет собой K или H,
 X₆ представляет собой Y или F,
 X₇ представляет собой D или A,
 X₈ представляет собой K или R,
 X₉ представляет собой F или L, а
 X₁₀ представляет собой G или D;

(с) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность YX₁X₂X₃YX₄VGGX₅DY (SEQ ID NO: 144), где

X₁ представляет собой Y, F или S,
 X₂ представляет собой Y или D,
 X₃ представляет собой K или R,
 X₄ представляет собой D или E, а
 X₅ представляет собой F или C;

(d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SVSSX₁ISSSX₂LX₃ (SEQ ID NO: 147), где

X₁ представляет собой S или G,
 X₂ представляет собой N или T, а
 X₃ представляет собой H или Y;
 (е) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность GTSNLAS (SEQ ID NO: 104); а
 (f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность QQWX₁X₂YPX₃T (SEQ ID NO: 149), где
 X₁ представляет собой S, N или R,
 X₂ представляет собой S, T или R, а
 X₃ представляет собой F, L, H или W.

В определенных вариантах осуществления CDRH1 содержит аминокислотную последовательность DX₁YX₂X₃ (SEQ ID NO: 141), где X₁ представляет собой T или N; X₂ представляет собой I или M; а X₃

представляет собой H или Y. В определенных вариантах осуществления CDRH2 содержит аминокислотную последовательность $X_1IDPANX_2X_3X_4KX_5X_6PX_7FQX_8$ (SEQ ID NO: 143), где X_1 представляет собой E, R или S; X_2 представляет собой D или G; X_3 представляет собой N или H; X_4 представляет собой T или S; X_5 представляет собой Y или F; X_6 представляет собой D или A; X_7 представляет собой K или R; а X_8 представляет собой G или D. В определенных вариантах осуществления CDRH3 содержит аминокислотную последовательность $YX_1X_2X_3YDVGGX_4DY$ (SEQ ID NO: 145), где X_1 представляет собой Y, F или S; X_2 представляет собой Y или D; X_3 представляет собой K или R; а X_4 представляет собой F или C. В определенных вариантах осуществления CDRH3 содержит аминокислотную последовательность $YYYX_1YX_2VGGFDY$ (SEQ ID NO: 146), где X_1 представляет собой K или R; а X_2 представляет собой D или E. В определенных вариантах осуществления CDRL1 содержит аминокислотную последовательность $SVSSSISSNLX_1$ (SEQ ID NO: 148), где X_1 представляет собой H или Y. В определенных вариантах осуществления CDRL3 содержит аминокислотную последовательность $QQWX_1SYPX_2T$ (SEQ ID NO: 150), где X_1 представляет собой S, N или R; а X_2 представляет собой F, L или H.

В определенных вариантах осуществления:

- (a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность DTYIH (SEQ ID NO: 79);
- (b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность EIDPANDNTKYDPKFQG (SEQ ID NO: 90);
- (c) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность $YYYX_1YX_2VGGFDY$ (SEQ ID NO: 146), где X_1 представляет собой K или R; а X_2 представляет собой D или E;
- (d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность $SVSSSISSNLH$ (SEQ ID NO: 100);
- (e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность $GTSNLAS$ (SEQ ID NO: 104); а
- (f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность $QQWSSYPFT$ (SEQ ID NO: 105).

В определенных вариантах осуществления CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 79, 90 и 98 соответственно. В определенных вариантах осуществления вариационная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 и 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65 или 220. В определенных вариантах осуществления вариационная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65 или 220. В определенных вариантах осуществления вариационная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 220. В определенных вариантах осуществления вариационная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65. В определенных вариантах осуществления вариационная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 220. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 169.

В определенных вариантах осуществления CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 100, 104 и 105 соответственно. В определенных вариантах осуществления вариационная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 и 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 73 или 221. В определенных вариантах осуществления вариационная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 73 или 221. В определенных вариантах осуществления вариационная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 221. В определенных вариантах осуществления вариационная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В определенных вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228. В определенных вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 187.

В определенных вариантах осуществления CDRH1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 78-82. В определенных вариантах осуществления CDRH2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-93. В определенных вариантах осуществления CDRH3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 94-99. В определенных вариантах осуществления CDRL1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 100-103. В определенных вариантах осуществления CDRL3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 105-112.

В определенных вариантах осуществления CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно, представленные в SEQ ID NO: 78, 83 и 94; 78, 85 и 95; 78, 86 и 96; 78, 86 и 97; 78, 91 и 94; 78, 92 и 96; 79, 84 и 95; 79, 88 и 95; 79, 89 и 95; 79, 90 и 95; 79, 90 и 98; 79, 90 и 99; 80, 85 и 96; 81, 87 и 96 или 82, 93 и 95.

В определенных вариантах осуществления CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные по-

идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 73 или 221. В определенных вариантах осуществления вариabельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65 или 220, а вариabельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 73 или 221. В определенных вариантах осуществления вариabельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 220. В определенных вариантах осуществления вариabельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65. В определенных вариантах осуществления вариabельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 или 221. В определенных вариантах осуществления вариabельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

В другом аспекте в данном изобретении предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с LAG-3 человека, содержащее вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 или 220. В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 и 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 73 или 221. В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 73 или 221.

В другом аспекте в данном изобретении предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с LAG-3 человека, содержащее вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 или 221. В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 и 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65 или 220. В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65 или 220.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариabельную область тяжелой цепи, содержащую каркасные области последовательности вариabельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 151 или 222. В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151 или 222. В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариabельную область тяжелой цепи, содержащую каркасные области последовательности вариabельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 218 или 223. В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218 или 223. В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-72 и 220. В определенных вариантах осуществления вариabельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-72 и 220. В определенных вариантах осуществления вариabельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 220. В определенных вариантах осуществления вариabельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 168-186 и 225-227. В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариabельную область тяжелой цепи, имеющую каркасные области, полученные от человека. В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариabельную каркасную область тяжелой цепи, которая является или происходит от аминокислотной последовательности, кодируемой геном человека, причем указанная аминокислотная последовательность выбрана из группы, состоящей из IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 153), IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 154), IGHV1-3*01 (SEQ ID NO: 155), IGHV1-24*01 (SEQ ID NO: 156), IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 157), IGHV1-45*01 (SEQ ID NO: 158) и IGHV1-18*01 (SEQ ID NO: 159). В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариabельную каркасную область тяжелой цепи, которая получена из аминокислотной последовательности IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 153), причем по меньшей мере одна аминокислота в аминокислотной последовательности IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 153) замещена аминокислотой в аналогичном положении в соответствующей вариabельной каркасной области тяжелой цепи, полученной не от человека. В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена находится в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из 4, 5, 12, 23, 27, 28, 29, 30, 48, 69, 71, 75, 76, 80, 81 и 94, причем аминокислотное положение указано в соответствии с системой нумерации Kabat. В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена выбрана из группы, состоящей из 4M, 5K, 12V, 23T, 27F, 28N, 29I, 30K, 48I, 69I, 71A, 75S, 76N, 80L, 81Q и 94T, причем положение аминокислотной замены указано в соответствии с системой нумерации Kabat. В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена находится в аминокислотном положении,

выбранном из группы, состоящей из 4, 27, 28, 29, 30, 69, 71 и 94, причем аминокислотное положение указано в соответствии с системой нумерации Kabat. В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена выбрана из группы, состоящей из 4М, 27F, 28N, 29I, 30K, 69I, 71A и 94Т, причем положение аминокислотной замены указано в соответствии с системой нумерации Kabat.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую каркасные области последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 152 или 224. В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152 или 224. В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73-77 и 221. В определенных вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73-77 и 221. В определенных вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 221. В определенных вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В определенных вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 187-191. В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую каркасные области, полученные от человека. В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариабельную каркасную область легкой цепи, которая является или происходит от аминокислотной последовательности, кодируемой геном человека, причем указанная аминокислотная последовательность выбрана из группы, состоящей из IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 160), IGKV3D-15*01 (SEQ ID NO: 161), IGKV3-15*01 (SEQ ID NO: 161), IGKV3D-20*01 (SEQ ID NO: 162), IGKV3D-7*01 (SEQ ID NO: 163), IGKV1-9*01 (SEQ ID NO: 164) и IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 165). В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариабельную каркасную область легкой цепи, которая происходит из аминокислотной последовательности IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 160). В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариабельную каркасную область легкой цепи, которая получена из аминокислотной последовательности IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 160), причем по меньшей мере одна аминокислота в аминокислотной последовательности IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 160) замещена аминокислотой в аналогичном положении в соответствующей вариабельной каркасной области легкой цепи, полученной не от человека. В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена находится в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 22, 36, 43, 47, 58, 70 и 71, причем аминокислотное положение указано в соответствии с системой нумерации Kabat. В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена выбрана из группы, состоящей из 3L, 22Т, 36F, 43S, 47W, 58V, 70S и 71Y, причем положение аминокислотной замены указано в соответствии с системой нумерации Kabat.

В другом аспекте, данное изобретение относится к антителу или выделенному антителу, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-72 и 220. В определенных вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 220. В определенных вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 168-186 и 225-227. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 225. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 169. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 170.

В другом аспекте данное изобретение относится к антителу или выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 человека, причем антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-72 и 220. В определенных вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 220. В определенных вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 168-186 и 225-227. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 225. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяже-

В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело. В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой мышиное антитело. В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой химерное антитело. В определенных вариантах осуществления антитело является антагонистическим для LAG-3 человека. В определенных вариантах осуществления антитело дезактивирует, снижает или ингибирует активность LAG-3 человека. В определенных вариантах осуществления антитело ингибирует связывание LAG-3 человека с ГКГС класса II. В определенных вариантах осуществления антитело индуцирует выработку IL-2 мононуклеарными клетками периферической крови (МПКК), стимулированными энтеротоксином А стафилококка (SEA). В определенных вариантах осуществления антитело индуцирует выработку TNF α лимфоцитами, инфильтрирующими опухоль (TIL), стимулированными антителами против CD3 и против CD28.

В другом аспекте данное раскрытие относится к антителу или выделенному антителу, как описано в данном документе, конъюгированному с цитотоксическим агентом.

В другом аспекте данное раскрытие относится к антителу или выделенному антителу, как описано в данном документе, конъюгированному с цитостатическим агентом.

В другом аспекте данное раскрытие относится к антителу или выделенному антителу, как описано в данном документе, конъюгированному с токсином.

В другом аспекте данное раскрытие относится к антителу или выделенному антителу, как описано в данном документе, конъюгированному с радионуклидом.

В другом аспекте данное раскрытие относится к антителу или выделенному антителу, как описано в данном документе, конъюгированному с детектируемой меткой.

В другом аспекте данное раскрытие относится к антителу или выделенному антителу, как описано в данном документе, в котором N-концевой аминокислотный остаток вариабельной области тяжелой цепи представляет собой пироглутамат (например, в результате посттрансляционной циклизации свободной аминокислотной группы N-концевого остатка E или Q вариабельной области тяжелой цепи). В другом аспекте данное раскрытие относится к антителу или выделенному антителу, как описано в данном документе, в котором N-концевой аминокислотный остаток тяжелой цепи представляет собой пироглутамат (например, в результате посттрансляционной циклизации свободной аминокислотной группы N-концевого остатка E или Q тяжелой цепи).

В другом аспекте данное раскрытие относится к антителу или выделенному антителу, как описано в данном документе, в котором N-концевой аминокислотный остаток вариабельной области легкой цепи представляет собой пироглутамат (например, в результате посттрансляционной циклизации свободной аминокислотной группы N-концевого остатка E или Q вариабельной области легкой цепи). В другом аспекте данное раскрытие относится к антителу или выделенному антителу, как описано в данном документе, в котором N-концевой аминокислотный остаток легкой цепи представляет собой пироглутамат (например, в результате посттрансляционной циклизации свободной аминокислотной группы N-концевого остатка E или Q легкой цепи).

В другом аспекте данное раскрытие относится к антителу или выделенному антителу, как описано в данном документе, в котором тяжелая цепь является гликозилированной.

В другом аспекте данное раскрытие относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело, раскрытое в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

В другом аспекте данное раскрытие относится к полинуклеотиду или выделенному полинуклеотиду, кодирующему тяжелую и/или легкую цепь антитела, как описано в данном документе. В другом аспекте данное раскрытие относится к вектору, содержащему полинуклеотид. В другом аспекте данное изобретение относится к рекомбинантной клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид. В другом аспекте данное изобретение относится к рекомбинантной клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид. В другом аспекте данное раскрытие относится к способу получения антитела, как раскрыто в данном документе, причем способ включает культивирование клетки-хозяина, так что полинуклеотид экспрессируется и продуцируется антителом. В одном варианте осуществления способ представляет собой способ *in vitro*.

В одном варианте осуществления данное изобретение относится к антителу по изобретению, или фармацевтической композиции по изобретению, или к полинуклеотиду по изобретению, или к вектору по изобретению, или к рекомбинантной клетке-хозяину по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

В одном варианте осуществления данное изобретение относится к антителу по изобретению, или фармацевтической композиции по изобретению, или к полинуклеотиду по изобретению, или к вектору по изобретению, или к рекомбинантной клетке-хозяину по изобретению для применения в диагностике.

В другом аспекте данное раскрытие относится к способу увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, как описано в данном документе. В другом аспекте данное изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления вышеизложенных способов антитело или фармацевтическую композицию вводят подкожно. В определенных вариантах осуществления вышеизложенных способов антитело или фармацевтическую композицию вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления вышеизложенных способов антитело или фармацевтическую композицию вводят внутриопухолево. В определенных вариантах осуществления вышеупомянутых способов антитело или фармацевтическую композицию доставляют в лимфатический узел, дренирующий опухоль. В определенных вариантах осуществления вышеизложенных способов антитело или фармацевтическую композицию вводят внутриартериально. В определенных вариантах осуществления вышеизложенных способов антитело или фармацевтическую композицию вводят интраназально.

В другом аспекте данное изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по данному изобретению для применения в способе увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген.

В одном аспекте данное изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по данному изобретению для применения в способе увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта.

В одном аспекте данное изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по данному изобретению для применения в способе увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, включающем введение субъекту эффективного количества антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции по изобретению.

В одном аспекте данное изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по данному изобретению для применения в способе лечения рака.

В одном аспекте данное изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по данному изобретению для применения в способе лечения рака у субъекта.

В одном аспекте данное изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по данному изобретению для применения в способе лечения рака у субъекта, включающем введение субъекту эффективное количество антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции по изобретению.

В одном варианте осуществления антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантная клетка-хозяин и/или фармацевтическая композиция для применения по данному изобретению, антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию вводят подкожно или внутривенно. В одном варианте осуществления антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантная клетка-хозяин и/или фармацевтическая композиция для применения по данному изобретению, антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию вводят внутриопухолево или внутриартериально. В одном варианте осуществления антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантная клетка-хозяин и/или фармацевтическая композиция для применения по данному изобретению, антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию вводят интраназально.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутые способы дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического агента. Следовательно, в одном варианте осуществления антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции для применения в способе по данному изобретению способ дополнительно включает введение субъекту дополнительного терапевтического агента.

В одном аспекте данное изобретение относится к (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по данному изобретению и (b) дополнительному терапевтическому агенту для применения в качестве лекарственного средства.

В одном аспекте данное изобретение относится к (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по данному изобретению и (b) дополнительному терапевтическому агенту для применения в способе лечения рака.

В одном аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или набору частей, содержащему (а) антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию по данному изобретению и (b) дополнительный терапевтический агент.

В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтическое средство. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой радиотерапевтическое средство.

В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой агент, нацеленный на контрольные точки. В определенных вариантах осуществления агент, нацеленный на контрольные точки, выбирают из группы, состоящей из антагонистического антитела против PD-1, антагонистического антитела против PD-L1, антагонистического антитела против PD-L2, антагонистического антитела против CTLA-4, антагонистического антитела против TIM-3, антагонистического антитела против LAG-3, антагонистического антитела против CEACAM1, агонистического антитела против GITR, агонистического антитела против OX40, антагонистического антитела против TIGIT, агонистического антитела против CD137, антагонистического антитела против VISTA, антагонистического антитела против CD73 и антагонистического антитела против CD96. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело против PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой пембролизумаб. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой ниволумаб. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело против PD-L1. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело против CTLA-4.

В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент содержит ма-

лую молекулу. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой низкомолекулярный ингибитор метаболического пути PD-1. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой низкомолекулярный ингибитор PD-1 или PD-L1.

В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). В определенных вариантах осуществления ингибитор выбирают из группы, состоящей из эпакадостата BMS-986205 (также известного как F001287, см. пример 19 WO 2016/073770, который полностью включен в данное описание посредством ссылки), индоксимода и NLG919. В определенных вариантах осуществления ингибитор представляет собой эпакадостат. В определенных вариантах осуществления ингибитор представляет собой BMS-986205. В определенных вариантах осуществления ингибитор представляет собой индоксимод. В определенных вариантах осуществления ингибитор представляет собой NLG919.

В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор ARG, LSD1, CD112, CD112R или VEGF. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой агонист стимулятора генов интерферона (STING). В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой белок CD80-FC.

В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой вакцину. В определенных вариантах осуществления вакцина содержит пептидный комплекс белка теплового шока (HSPPC), содержащий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. В определенных вариантах осуществления белок теплового шока представляет собой hsc70 и образует комплекс с опухолеассоциированным антигенным пептидом. В определенных вариантах осуществления белок теплового шока представляет собой gr96 и образует комплекс с опухолеассоциированным антигенным пептидом, причем HSPPC получают из опухоли, полученной от субъекта. В определенных вариантах осуществления белок теплового шока представляет собой gr96 и образует комплекс с опухолеассоциированным антигенным пептидом, причем HSPPC получают из опухоли, полученной от субъекта. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент содержит TCR (Т-клеточный рецептор). В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой растворимый TCR. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой клетку, экспрессирующую TCR. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело, которое специфически связывается с комплексом пептид-ГКГС. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой адъювант. В одном аспекте данное изобретение относится к (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по данному изобретению и (b) вакцине для применения в качестве лекарственного средства, например, для применения в способе лечения рака, при этом вакцина содержит пептидный комплекс белка теплового шока (HSPPC), содержащим белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. В одном аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или набору частей, содержащих (а) антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию по данному изобретению и (b) вакцине, необязательно при этом вакцина содержит пептидный комплекс белка теплового шока (HSPPC), содержащий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом.

5. Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А, 1В и 1С представляют собой набор гистограмм, показывающих связывание Fab против LAG-3 с клетками Jurkat дикого типа или клетками Jurkat, сконструированными для экспрессии LAG-3 человека, по данным проточной цитометрии. Fab против LAG-3, протестированные в данном исследовании, включают P01A12, P01C09, P05E01, P13A04, P13A06, P13B01, P13B02, P13B03, P13B11, P13C06, P13C08, P13C10, P13D04, P13D05, P13E02, P13F01, P13F02, P13F06, P13F09, P13G01, P13G04, P13G05, P13H05, P14A04, P14B07, P14C04, P14F01, P14F06, P14G01, P14G03, P15B06, P15C02, P15E06, P15F06, P15G05, P16D04 и P16H05.

Фиг. 2А и 2В представляют собой графики, показывающие результаты анализов, в которых проверяется способность Fab против LAG-3 или Fab отрицательного контроля, не специфичных для LAG-3, блокировать связывание поперечно-связанного рекомбинантного LAG-3-6His с клетки Раджи, экспрессирующими ГКГС класса II. Фиг. 2А представляет собой гистограмму, показывающую процент блокирования, опосредованного отрицательным контролем Fab или Fab против LAG-3 P13B02, P13C08, P13C10, P13E02, P13F02, P01A12, P13B01, P05E01 или P01C09. Фиг. 2В представляет собой линейный график, показывающий процент связывания LAG-3 в присутствии дозы титрования Fab против LAG-3 P01A12, P13A06, P13B01, P13B02, P13C06, P13C08, P13C10, P13E02 или P14C04, или Fab отрицательного контроля.

Фиг. 3 представляет собой линейный график, аналогичный графику, показанному на фиг. 2В, на котором представлен процент связывания LAG-3 с титрованием дозы полноразмерного химерного антите-

ла против LAG-3 P13A06, P13B01, P13B02, P13C06, P13C08, или P13E02 или антитела контрольного изотипа.

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий продукцию IL-2 в мононуклеарных клетках периферической крови человека (МКПК) при стимуляции энтеротоксином А стафилококка (SEA) в отсутствие какого-либо антитела или в присутствии антитела изотипического контроля или химерного антитела против LAG-3 P13B02.

Фиг. 5А и 5В представляют собой выравнивания последовательностей гуманизированных переменных областей с соответствующими мышиными последовательностями и последовательностями зародышевой линии человека. На фиг. 5А показано выравнивание последовательностей, сравнивающих переменные области гуманизированной тяжелой цепи H0-H4 (SEQ ID NO: 56-60 соответственно), переменную область тяжелой цепи мышиного антитела P13B02 (SEQ ID NO: 15) и последовательности зародышевой линии человека IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 153) и IGHJ1*01 (SEQ ID NO: 200). На фиг. 5В показано выравнивание последовательностей, сравнивающих переменные области гуманизированной легкой цепи L0-L4 (SEQ ID NO: 73-77 соответственно), переменную область легкой цепи мышиного антитела P13B02 (SEQ ID NO: 16) и последовательности зародышевой линии человека IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 160) и IGKJ1*01 (SEQ ID NO: 201). Точки представляют остатки, идентичные соответствующим остаткам в H0 (фиг. 5А) или L0 (фиг. 5В). Черточки обозначают отсутствие аминокислотных остатков по сравнению с H0 (фиг. 5А) или L0 (фиг. 5В).

Фиг. 6А и 6В представляют собой графики, показывающие связывание антител против LAG-3 с Т-клетками человека, активированными энтеротоксином А стафилококка (SEA), при измерении с помощью проточной цитометрии. Фиг. 6А представляет собой набор гистограмм, тестирования химерного антитела P13B02 (IgG₁) и гуманизированных антител P13B02-06 (IgG₁), P13B02-07 (IgG₁), P13B02-16 (IgG₁), P13B02-25 (IgG₁), P13B02-26 (IgG₁), P13B02-27 (IgG₁), P13B02-30 (IgG₁ Gm17 N297A) и P13B02-30 (IgG₄). Фиг. 6В представляет собой график, показывающий связывание антитела против LAG-3 P13B02-16 (IgG₁) или антитела изотипического контроля с активированными первичными человеческими CD4⁺ Т-клетками. Значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) представлены в зависимости от концентрации антител.

Фиг. 7А и 7В представляют собой линейные графики, аналогичные тем, которые показаны на фиг. 2В, на которых представлен процент связывания LAG-3 против различных доз изотипического контрольного антитела, химерного антитела P13B02 (IgG₁), гуманизированного антитела P13B02-06 (IgG₁), P13B02-07 (IgG₁), P13B02-16 (IgG₁), P13B02-26 (IgG₁) или P13B02-27 (IgG₁) (фиг. 7А) или гуманизированного антитела P13B02-30 (IgGV G1m17 N297A) (фиг. 7В).

Фиг. 8А и 8В представляют собой графики, показывающие продукцию IL-2, индуцированную антителом против LAG-3 или антителом контрольного изотипа в мононуклеарных клетках периферической крови человека (МКПК) при стимуляции энтеротоксином А человека (SEA). На фиг. 8А протестированное антитело против LAG-3 представляет собой P13B02-30 (IgG₁). На фиг. 8В антитело против LAG-3 P13B02-16 (IgG₁) или антитело изотипического контроля тестировали в присутствии или в отсутствие антитела против PD-1, пембролизумаба (Пембро) или ниволумаба (Ниво), антитела против PD-L1 № 1, 2 или 3 или антитела против CTLA-4 ипилимумаба (Ипи).

Фиг. 9А и 9В представляют собой графики, показывающие продукцию TNFα первичными опухолевыми инфильтрирующими лимфоцитами (TIL), индуцированными антителом против LAG-3 P13B02-30 (IgG₁ G1m3 N297A) или антителом изотипического контроля, отдельно или в сочетании с антителом против PD-1 пембролизумаба (Пембро). TIL были выделены из опухолей почечно-клеточной карциномы (фиг. 9А) или колоректального рака (фиг. 9В) и активированы микрошариками против CD3/CD28.

Фиг. 10А и 10В представляют собой графики, показывающие, что антитела против LAG-3 P13B02-30 (IgG₁ G1m3 N297A) усиливали активацию Т-клеток в анализе подавления клеток, опосредованных LAG-3. Клетки Jurkat-NFAT-люцифераза-LAG-3 инкубировали в присутствии титров секстулетной дозы либо антитела против LAG-3 (черные точки), либо антитела изотипического контроля (белые точки), фиксированной концентрации клеток Raji и фиксированной концентрации энтеротоксина Е стафилококка (SEE). В первом эксперименте были протестированы концентрации антител 0,2-50 мкг/мл (фиг. 10А). Во втором эксперименте были протестированы концентрации антител 0,1-100 мкг/мл (фиг. 10В). Безотносительные световые единицы люциферазного репортера.

6. Подробное описание

Данное изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и противодействуют функции LAG-3, например, LAG-3-опосредованной супрессии. Также предоставлены фармацевтические композиции, содержащие данные антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие данные антитела, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения данных антител, и способы лечения субъекта с использованием данных антител. Описанные в данном документе антитела особенно полезны для увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген (например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания) и, следовательно, для лечения рака у субъекта или лечения или профилактики инфекционного заболевания у субъекта. Все случаи "выделенных антител", описанных в данном документе, дополнительно рассматриваются как антитела, ко-

которые могут быть, но не обязательно, выделенными. Все случаи "выделенных полинуклеотидов", описанных в данном документе, дополнительно рассматриваются как полинуклеотиды, которые могут быть, но не обязательно, выделенными. Все случаи "антител", описанных в данном документе, дополнительно рассматриваются как антитела, которые могут быть, но не обязательно, выделенными. Все случаи "полинуклеотидов", описанных в данном документе, дополнительно рассматриваются как полинуклеотиды, которые могут быть, но не обязательно, выделенными.

6.1. Определения.

Используемые в данном документе термины "около" и "приблизительно", когда они используются для изменения числового значения или числового диапазона, указывают, что отклонения от 5 до 10% больше (например, до 5 до 10% больше) и на 5-10% меньше (например, на 5-10% меньше) от значения или диапазона остаются в пределах предполагаемого значения приведенного значения или диапазона.

Используемый в данном документе термин "LAG-3" относится к гену активации лимфоцитов 3 (также известному как CD223). Используемый в данном документе термин "LAG-3 человека" относится к белку LAG-3 человека, кодируемому геном LAG-3 человека дикого типа, например, номер доступа GenBank™ NM_002286.5. Пример незрелой аминокислотной последовательности LAG-3 человека представлен как SEQ ID NO: 166. Типичные зрелые аминокислотные последовательности LAG-3 человека представлены как SEQ ID NO: 167 и SEQ ID NO: 210.

Используемые в данном документе термины "антитело" и "антитела" включают полноразмерные антитела, антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных антител и молекулы, содержащие CDR антитела, области VH или области VL. Примеры антител включают моноклональные антитела, рекомбинантно продуцируемые антитела, моноспецифические антитела, полиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, мышинные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелой цепи и две молекулы легкой цепи, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легкой цепи антитела, димер тяжелой цепи антитела, пару тяжелая цепь антитела-легкая цепь антитела, интратела, гетероконъюгатные антитела, конъюгаты антитело-лекарственное средство, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), верблужки антитела, аффитела, фрагменты Fab, фрагменты F(ab')₂, дисульфид-связанные Fv (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-анти-Id-антитела) и антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеуказанных. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, относятся к популяциям поликлональных антител. Антитела могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любой класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂) или любого подкласса (например, IgG_{2a} или IgG_{2b}) молекулы иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, представляют собой антитела IgG или их класс (например, IgG₁ или IgG₄ человека) или подкласс. В конкретном варианте осуществления антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело. В другом конкретном варианте осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело человека.

Используемые в данном документе термины "область VH" и "область VL" относятся к вариабельным областям тяжелой и легкой цепи одного антитела, соответственно, содержащим FR (каркасные области) 1, 2, 3 и 4 и CDR (области, определяющие комплементарность) 1, 2 и 3 (см. Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), которая полностью включена в данное описание посредством ссылки).

Используемый в данном документе термин "CDR" или "область, определяющая комплементарность" означает сайты смежных антигенных соединений, обнаруженные в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эти конкретные области были описаны в Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) and Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), в Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) и в MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), все из которых включены в данное описание посредством ссылки в полном объеме, причем определения включают перекрывающиеся или подгруппы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. В определенных вариантах осуществления термин "CDR" представляет собой CDR, как определено в Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) and Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991). В определенных вариантах осуществления термин "CDR" представляет собой CDR, как определено в Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987). В определенных вариантах осуществления термин "CDR" представляет собой CDR, как определено в MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) и Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," в Antibody Engineering, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001).

Используемый в данном документе термин "аминокислотные остатки каркаса (FR)" относится к аминокислотам в каркасной области цепи иммуноглобулина. Термин "каркасная область" или "область FR", используемый в данном документе, включает аминокислотные остатки, которые являются частью вариабельной области, но не являются частью CDR (например, с использованием определения CDR Kabat или Chothia).

Используемые в данном документе термины "вариабельная область" и "вариабельный домен" ис-

пользуются взаимозаменяемо и являются общими в данной области техники. Варибельная область обычно относится к части антитела, как правило, к части легкой или тяжелой цепи, обычно к аминоконцу от 110 до 125 аминокислот в зрелой тяжелой цепи и от около 90 до 115 аминокислот в зрелой легкой цепи, которые сильно различаются по последовательности среди антител и используются в связывании и специфичности конкретного антитела для его конкретного антигена. Изменчивость в последовательности сконцентрирована в тех областях, которые называются областями, определяющими комплементарность (CDR), в то время как более высоко консервативные области в варибельном домене называются каркасными областями (FR). Не желая быть связанными каким-либо конкретным механизмом или теорией, полагают, что CDR легкой и тяжелой цепей несут основную ответственность за взаимодействие и специфичность антитела с антигеном. В определенных вариантах осуществления варибельная область представляет собой варибельную область человека. В определенных вариантах осуществления варибельная область включает CDR грызунов или мыши и каркасные области человека (FR). В конкретных вариантах осуществления варибельная область представляет собой варибельную область примата (например, примата, отличного от человека). В определенных вариантах осуществления варибельная область включает CDR грызунов или мышей и каркасные области (FR) приматов (например, приматов, отличных от человека).

Термины "VL" и "домен VL" используются взаимозаменяемо для обозначения варибельной области легкой цепи антитела.

Термины "VH" и "домен VH" используются взаимозаменяемо для обозначения варибельной области тяжелой цепи антитела.

Используемые в данном документе термины "константная область" и "константный домен" являются взаимозаменяемыми и распространены в данной области техники. Константная область представляет собой часть антитела, например карбоксильную концевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая не участвует непосредственно в связывании антитела с антигеном, но которая может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором (например, Fc гамма-рецептором). Константная область молекулы иммуноглобулина обычно имеет более консервативную аминокислотную последовательность относительно варибельного домена иммуноглобулина.

Используемый в данном документе термин "тяжелая цепь" при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основе аминокислотной последовательности константного домена, которая приводит к классам антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая подклассы IgG, например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄.

Используемый в данном документе термин "легкая цепь" при использовании в отношении антитела может относиться к любому другому типу, например, каппа (κ) или лямбда (λ) на основе аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области техники.

Используемый в данном документе термин "система нумерации EU" относится к соглашению о нумерации EU для константных областей антитела, как описано в Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) и Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Термин "аффинность связывания" обычно относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антителом) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, используемая в данном документе "аффинность связывания" относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к своему партнеру Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность может быть измерена и/или выражена несколькими способами, известными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, константу равновесной диссоциации (K_D) и константу равновесной ассоциации (K_A). K_D рассчитывается как частное k_{off}/k_{on} , в то время как K_A рассчитывается как частное k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, например, антитела к антигену, а k_{off} относится к константе скорости диссоциации, например, антитела к антигену. k_{on} и k_{off} может быть определено методами, известными специалисту в данной области, такими как BIAcore® или KinExA. Используемый в данном документе термин "более низкая аффинность" относится к большей K_D .

Используемые в данном документе термины "специфически связывает", "специфически распознает", "иммуноспецифически связывает" и "иммуноспецифически распознает" являются аналогичными терминами в контексте антител и относятся к молекулам, которые связываются с антигеном (например, эпитопом или иммунный комплексом) в таком значении, как понимает специалист в данной области техники. Например, молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, как правило, с более низкой аффинностью, как определено, например, иммуноанализом, BIAcore®, KinExA 3000 instrument (Sapidyne Instruments, Бойсе, штат Айдахо),

или другим анализом, известным в данной области техники. В конкретном варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с антигеном, связываются с антигеном с K_A , которая составляет по меньшей мере $2 \log$ (т.е. коэффициентом 10), $2,5 \log$, $3 \log$, $4 \log$ или больше, чем K_A , когда молекулы связываются неспецифично к другому антигену.

В другом конкретном варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с антигеном, не перекрестно реагируют с другими белками при сходных условиях связывания. В другом конкретном варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с LAG-3, не вступают в перекрестную реакцию с другими He-LAG-3 белками. В конкретном варианте осуществления в данном документе представлено антитело, которое связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека) с более высокой аффинностью, чем с другим неродственным антигеном. В определенных вариантах осуществления в данном документе представлено антитело, которое связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека) с 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или более высокой аффинностью, чем к другому, не связанному антигену, как измерено, например, радиоиммуноанализом, поверхностным плазмонным резонансом или анализом кинетического исключения. В конкретном варианте осуществления степень связывания антитела против LAG-3, описанного в данном документе, с неродственным белком, не являющимся LAG-3, составляет менее 10, 15 или 20% от связывания антитела с LAG-3 белка, как измерено, например, радиоиммуноанализом.

Используемый в данном документе термин "афукозилирование" или "афукозилирование" в контексте Fc относится к существенному недостатку фукозы, ковалентно присоединенной, прямо или косвенно, к остатку 297 области Fc IgG₁ человека, пронумерованной согласно системе нумерации EU, или соответствующий остаток в иммуноглобулинах, отличных от IgG₁ или IgG₁ человека. Таким образом, в композиции, содержащей множество афукозилированных антител, по меньшей мере 70% антител не будут фукозилированы, прямо или косвенно (например, через промежуточные сахара) в остатке 297 области Fc антител, и в некоторых вариантах осуществления в по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% не будут фукозилированы, прямо или косвенно, в остатке 297 области Fc.

Используемый в данном документе термин "эпитоп" является термином в данной области и относится к локализованной области антигена, с которой антитело может специфически связываться. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп) или эпитоп, например, могут объединяться из двух или более несмежных областей полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). В некоторых вариантах осуществления эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, исследований рентгеновской дифракционной кристаллографии, анализов ELISA, обмена водород/дейтерий в сочетании с масс-спектрометрией (например, масс-спектрометрией с жидкостной хроматографией, электрораспылительной масс-спектрометрией), матричным анализом на основе олигопептидного сканирования (например, ограничение пептидов с использованием CLIPS (химическая связь пептидов с каркасами) для картирования прерывистых или конформационных эпитопов и/или картирование мутагенеза (например, картирование сайт-направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии кристаллизация может быть выполнена с использованием любого из известных в данной области методов (например, Giegé R et al., (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Кристаллы антитело:антиген могут быть изучены с использованием хорошо известных методов дифракции рентгеновских лучей и могут быть уточнены с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, распространяется Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth Enzymol* (1985) vol. 114 & 115, eds Wyckoff HW et al.; U.S. 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P et al., (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323), все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Исследования картирования мутагенеза могут быть выполнены с использованием любого метода, известного специалисту в данной области техники. См., например, Champe M et al., (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 и Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме для описания методик мутагенеза, включая методики аланинового сканирующего мутагенеза. CLIPS (Химическая связь пептидов с каркасами) представляет собой технологию для представления одного или более пептидов в структурно ограниченной конфигурации, которые ведут себя как функциональные имитаторы сложных белковых доменов. См., например, публикации патентов США № US 2008/0139407 A1 и US 2007/099240 A1, и патент США № 7972993, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В конкретном варианте осуществления эпитоп антитела определяют с использованием исследований аланинового сканирующего мутагенеза.

В конкретном варианте осуществления эпитоп антитела определяют с использованием обмена водород/дейтерий в сочетании с масс-спектрометрией. В конкретном варианте осуществления эпитоп антитела определяют с использованием технологии картирования эпитопов CLIPS от Pepscan Therapeutics.

Используемый в данном документе термин "эпитоп, расположенный в области LAG-3 человека", состоящей из конкретной аминокислотной последовательности или набора аминокислотных остатков, относится к эпитопу, содержащему один или более аминокислотных остатков указанной области, при этом указанная область содержит первый указанный аминокислотный остаток и последний указанный аминокислотный остаток области LAG-3 человека. В определенных вариантах осуществления эпитоп содержит каждый из аминокислотных остатков, расположенных в указанной области. В определенных вариантах осуществления один или более дополнительных аминокислотных остатков LAG-3 человека вне указанной области связываются с антителом вместе с эпитопом, расположенным в указанной области.

Используемые в данном документе термины "рецептор Т-клеток" и "TCR" используются взаимозаменяемо и относятся к полноразмерным гетеродимерным TCR $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$, антигенсвязывающим фрагментам полноразмерных TCR и молекулам, содержащим CDR TCR или вариабельные области. Примеры TCR включают, но не ограничиваются ими, полноразмерные TCR, антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных TCR, растворимые TCR, лишенные трансмембранных и цитоплазматических областей, одноцепочечные TCR, содержащие вариабельные области TCR, присоединенные гибким линкером, цепи TCR связанные с помощью сконструированной дисульфидной связи, моноспецифические TCR, мультиспецифические TCR (включая биспецифические TCR), слитые TCR, человеческие TCR, гуманизированные TCR, химерные TCR, рекомбинантно полученных TCR и синтетические TCR. Термин охватывает TCR дикого типа и TCR генетически сконструированного (например, химерный TCR, содержащий химерную цепь TCR, которая содержит первую часть от TCR первого вида и вторую часть от TCR второго вида).

Используемые в данном документе термины "главный комплекс гистосовместимости" и "ГКГС" используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле ГКГС класса I и/или молекуле ГКГС класса II.

Используемый в данном документе термин "пептид-комплекс ГКГС" относится к молекуле ГКГС (ГКГС класса I или ГКГС класса II) с пептидом, связанным в известном в данной области пептидсвязывающем кармане ГКГС.

Используемый в данном документе термин "лечить", "лечение" и "процесс лечения" относится к терапевтическим или профилактическим мерам, описанным в данном документе. Способы "лечения" включают введение антитела субъекту, имеющему заболевание или расстройство, или предрасположенному к такому заболеванию или расстройству, для предотвращения, лечения, задержки, уменьшения тяжести или ослабления одного или более симптомов заболевания или расстройства или рецидивирующего заболевания или расстройства, или для того, чтобы продлить выживаемость субъекта сверх ожидаемого в отсутствие такого лечения.

Используемый в данном документе термин "эффективное количество" в контексте введения лекарственного средства субъекту относится к количеству лекарственного средства, которое достигает желаемого профилактического или терапевтического эффекта.

Используемый в данном документе термин "субъект" включает любого человека или животное, не являющееся человеком. В одном варианте осуществления субъект представляет собой человека или млекопитающее, отличное от человека. В одном варианте осуществления субъект представляет собой человека.

Определение "процентной идентичности" между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот) может быть выполнено с использованием математического алгоритма. Конкретным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin S & Altschul SF (1990) PNAS 87: 2264-2268, модифицированный как в Karlin S & Altschul SF (1993) PNAS 90: 5873-5877, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST Altschul SF et al., (1990) J Mol Biol 215: 403, который включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме. Поиск нуклеотидов BLAST может быть выполнен с набором параметров нуклеотидной программы NBLAST, например, для показателя=100, длины слова=12, чтобы получить нуклеотидные последовательности, гомологичные молекулам нуклеиновой кислоты, описанным в данном документе. Поиск белка BLAST может быть выполнен с установленными параметрами программы XBLAST, например, для оценки 50, длина слова=3, чтобы получить аминокислотные последовательности, гомологичные описанной в данном документе молекуле белка. Для получения выравнивания с геном для сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul SF et al., (1997) Nuc Acids Res 25: 3389-3402, который включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме. Альтернативно, PSI BLAST может использоваться для выполнения итеративного поиска, который обнаруживает отдаленные отношения между молекулами (Id). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI Blast можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., например, Национальный центр биотехнологической информации (NCBI) во всемирной сети ncbi.nlm.nih.gov). Другим конкретным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers and Miller, 1988, CABIOS 4: 11-17, который полностью включен в данное описание.

ние посредством ссылки. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения для выравнивания последовательности GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весовых остатков PAM120, штраф за удлинение гэта, равный 12 и штраф за гэта, равный 4.

Процент идентичности между двумя последовательностями может быть определен с использованием методик, аналогичных описанным выше, с или без учета гэпов. При расчете процента идентичности обычно учитываются только точные совпадения.

6.2. Антитела против LAG-3.

В одном аспекте данное изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и противодействуют функции LAG-3. Аминокислотные последовательности типичных антител приведены в данном документе в табл. 1-7.

Специалист поймет, что N-концевой аминокислотный остаток E или Q может при определенных условиях самопроизвольно превращаться в пироглутамат" путем посттрансляционной циклизации свободной аминогруппы с образованием лактама. Соответственно, в определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к антителам, содержащим переменную область тяжелой цепи антитела или переменную область легкой цепи, раскрытые в данном документе (например, SEQ ID NO: 56-72 и 73-77, соответственно) или полноразмерную тяжелую цепь или легкую цепь, раскрытые в данном документе (например, SEQ ID NO: 168-186 и 187-191, соответственно), причем N-концевой аминокислотный остаток E или Q превращен в пироглутамат (например, в результате посттрансляционной циклизации свободной аминогруппы N-концевого остатка E или Q).

Таблица 1

Аминокислотные последовательности типичных антител против LAG-3

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
1	VH P01C09	QVQLKQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMYWVK QRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKLGKATITADTSS NTVYQLSSLTSEDYAVFYCVIYSYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
2	VL P01C09, VL P13F01, VL P13G05, VL P05E03	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQ QKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
3	VH P05E01	DVQLVESGAELVKPGASVKLSCTASGFTIKDTYIHVK

		QRPEQGLEWIGEIDPANGNTKYDPKFQ GKATITADTSS NTAYLQLSSLTSED TAVYYCATY YRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
4	VL P05E01	DIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWFQ QKSGTSPKLWIYGTSNLAGV PVRFSGSGSGTSYSLT I SNMEAEDAATYYCQQWNSYPLTFGAGTKLELK
5	VH P01A12	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMYWVK QRPEQGLDWIGRIDPANGNTKFD PKFQ GKATITADTSS NTAYLQLSSLTSED TAVYYCSTY YRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
6	VL P01A12	DIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQ QKSGTSPKLWIYGTSNLAGV PVRFSGSGSGTSYSLT I SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
7	VH P13B01	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIYWVK QRPERGLEWIGRIDPANGNTKFD PKFQ GTATITADTSS NTAYLQLSSLTSED TAVYYCTTYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
8	VL P13B01, VL P14C04, VL P14B07	ENVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQ QKSGTSPKLWIYGTSNLAGV PVRFSGSGSGTSYSLT I SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
9	VH P13C10, VH P15C02, VH P16D04, VH P13G05, VH P13F06, VH P14F01, VH P16H01	QVQLQQSGAELVKPGASVELSCTASGFNIRDYMYWVK QRPEQGLEWIGRIDPANGNTKFD PKFQ DRATMTADTSS NTAYLQLSSLTSED TAVYYCTTYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
10	VL P13C10, VL P13E02, VL P13F02, VL P13B03, VL P13H05, VL P13G04	ENVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWFQ QKSGTSPKLWIYGTSNLAGV PVRFSGSGSGTSYSLT I SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
11	VH P13C08	QVQLKQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDNYIHWVK QRPEQGLEWIGSIDPANGNTKYDPKFQ GKASITADTSS NTAYLQLSSLTSED TAVYYCASYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
12	VL P13C08	DVVMQTQPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWFQ QKSGTSPKLWIYGTSNLAGV PVRFSGSGSGTSYSLT I

		SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
13	VH P13E02	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCTVSGFNKDTYIHVWK QRPEQGLEWIGEIDPANGNSKYAPRFQGKATITADTSS NTAYLQLSSLTSEDVAVYYCATYYYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
14	VH P13F02	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHVWK QRPEQGLDWGEIDPANGHTKYDPKFQGKATITADTSS NTAYLQLSSLTSEDVAVYYCATYYYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
15	VH P13B02	QVQMKQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHVWK QRPEQGLEWIGEIDPANDNTKYDPKFQGKATITADTSS NTAYLQLSSLTSEDVAVYYCATYYYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
16	VL P13B02	EILLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSNLHWFQ QKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
17	VH P13A06	QVQLKQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMYWVK QRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSS NTVYLQLSSLTSEDVAVFYCVIYSYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
18	VL P13A06	ENVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSNLHWYQ QKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPHTFGGGTKLEIK
19	VH P14C04	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMYWVK QRPEQGLDWIGRIDPANGNTHFDPKFQGKATITADTSS NTAYLQLSSLTSEDVAVYYCSTYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
20	VH P14A04, VH P13F01, VH P15E06	QVQLQQPGAELVKPGASVELSCTASGFNIRDYMYWVK QRPEQGLEWIGRIDPANGNTKFDPKFQDRATMTADTSS NTAYLQLSSLTSEDVAVYYCTTYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
21	VL P14A04, VL P14G01	DIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSNLHWFQ QKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
22	VH P15F06	QVQLKQSGAELVKPGASVELSCTASGFNIRDYMYWVK

		QRPEQGLEWIGRIDPANGNTKFDPKFQDRATMTADTSS NTAYLQLSSLTSED TAVYYCTTYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
23	VL P15F06	ENVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSTLHWQ QKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPWTFGGGKLEIK
24	VH P13B03	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHWVK QRPEQGLEWIGEIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSS NTAYLQLSSLTSED TAVYYCATYYYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
25	VL P15C02	DVVMQTTPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQ QKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
26	VL P16D04, VL P16H01	ENVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQ QKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGAGTKLELK
27	VH P13A04	QVQLQQPGAELVKPGASVELSCTASGFNIRDITYMYWVK QRPEQGLEWIGRIDPANGNTKFDPKFQDRATMTADTSS NTAYLQLSSLTSAD TAVYYCTTYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
28	VL P13A04	DIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQ QKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SNMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
29	VH P16H05	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDNYYIHWVK QRPEQGLEWIGSIDPANGNTKYDPKFQGKASITADTSS NTAYLQLSSLTSED TAVYYCASYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
30	VL P16H05	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQ QKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPHTFGGGKLEIK
31	VH P13F09	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDNYYIHWVK QRPEQGLEWIGSIDPANGNTKYDPKFQGKASITADTSS NTAYLQLSSLTSEGTAVYYCASYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
32	VL P13F09, VL	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWQ

	P14F06	QKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
33	VH P13G01, VH P15G05	EVQLQQSGAELVKPGASVELSCTASGFNIRDYMYWVK QRPEQGLEWIGRIDPANGNTKFDPKFQDRATMTADTSS NTAYLQLSSLTSEDVAVYYCTTYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
34	VL P13G01	QIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQ QKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
35	VH P13H05	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHWVK QRPEQGLEWIGEIDPANDNTKYDPKFQGKATITADTSS NTAYLQLSSLTSEDVAVYYCATYYYYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
36	VH P13D04	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDNMDWVK QRPEQGLEWIGKIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSS NTAYLQLSSLTSEDVAVYYCATYYYYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
37	VL P13D04	DIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQ QKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
38	VH P14G01, VH P05E03	QVQLKESGAELVKPGASVELSCTASGFNIRDYMYWVK QRPEQGLEWIGRIDPANGNTKFDPKFQDRATMTADTSS NTAYLQLSSLTSEDVAVYYCTTYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
39	VH P14G03	QVQMKQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHWVK QRPGQGLEWIGEIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSS NTAYLQLSSLTSEDVAVYYCATYYYYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
40	VL P14G03	DIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLYWFQ QKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
41	VL P13F06	EILLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQ QKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
42	VH P13B11	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDNMDWVK

		QRPEQGLEWIGKIDPANGNTKYDPKFQGGKATITADTSS NTAYLQLSSLTSEDVAVYYCATYYYYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
43	VL P13B11	QIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWQ QKSGTSPKLWIYGTSNLAGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
44	VL P14F01	ENVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQ QKSGTSPKLWIYGTSNLAGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSTYPFTFGSGTKLEIK
45	VH P14F06	QVQMKQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDNYYHWK QRPEQGLEWIGSIDPANGNTKYDPKFQGGKASITADTSS NTAYLQLSSLTSEDVAVYYCASYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
46	VH P13D05	QVQLQQPGAELVKPGASVELSCTASGFNIRDITYMYWVK QRPEQGLGWIGRIDPANGNTKFDPKFQDRATMTADTSS NTAYLQLSSLTSEDVAVYYCTTYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
47	VL P13D05	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWFR QKSGTSPKLWIYGTSNLAGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGSGTKLEIK
48	VH P13G04	EVKLMEGAELVKPGASAELSCTASGFNIRDITYMYWVK QRPEQGLEWIGRIDPANGNTKFDPKFQDRATMTADTSS NTAYLQLSSLTSEDVAVYYCTTYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
49	VL P15E06	ENVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSGISSSNLHWYQ QKSGTSPKLWIYGTSNLAGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSRYPWTFGGGTKLEIK
50	VL P15G05	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQ QKSGTSPKLWIYGTSNLAGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGAGTKLELK
51	VH P15B06	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMYWVK QRPEQGLDWIGRIDPANGNTHFDPKFQGGKATITADTSS NTAYLQLSSLTSEDVAVYYCSTYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
52	VL P15B06	QILLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQ

		QKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGAGTKLELK
53	VH P14B07	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDNYYHWVK QRPEQGLEWIGSIDPANGNTKYDPKFQKGASITADTSS NTAYLQLSSLTSEDTTVYYCASYFYRYDVGGFDYWGQG TTLTVS
54	VH P13C06	QVQMKQSGAELVKPGASVELSCTASGFNITDTYMYWVK QRPEQGLEWIGRIDPANGNTKFDPKFQDRATMTADTSS NTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTTYFDKYDVGGCDYWGQG TTLTVS
55	VL P13C06	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLYWFQ HKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMDAENAATYYCQQWRSYPFTFGSGTKLEIK
56	H0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTMTRDTST STVYMESSLRSEDTAVYYCARYYYRYDVGGFDYWGQG TLVTVSS
57	H1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMESSLRSEDTAVYYCATYYYRYDVGGFDYWGQG TLVTVSS
58	H2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTSS NTVYMESSLRSEDTAVYYCATYYYRYDVGGFDYWGQG TLVTVSS
59	H3	QVQMKQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTSS NTVYMESSLRSEDTAVYYCATYYYRYDVGGFDYWGQG TLVTVSS
60	H4	QVQMKQSGAEVVKPGASVKVSCASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWIGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTSS NTVYLQLSSLRSEDTAVYYCATYYYRYDVGGFDYWGQG TLVTVSS
61	H4_R98K	QVQMKQSGAEVVKPGASVKVSCASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWIGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTSS

		NTVYLQLSSLRSEDТАVYYCATYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSS
62	H4_D100E	QVQMKQSGAEVVKPGASVKVSCТАSGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWIGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTSS NTVYLQLSSLRSEDТАVYYCATYYYRYEVGGFDYWGQG TLVTVSS
63	H1_R98K	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCКАSGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMEЛSSLRSEDТАVYYCATYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSS
64	H1_R98K_K23T	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCТАSGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMEЛSSLRSEDТАVYYCATYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSS
65	H1_R98K_L4M	QVQMVQSGAEVKKPGASVKVSCКАSGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMEЛSSLRSEDТАVYYCATYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSS
220	H1_R98K_L4M	XVQMVQSGAEVKKPGASVKVSCКАSGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMEЛSSLRSEDТАVYYCATYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSS, где X=глутамин (Q) или пироглутамат (pE)
66	H1_R98K_L4M_K23T	QVQMVQSGAEVKKPGASVKVSCТАSGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMEЛSSLRSEDТАVYYCATYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSS
67	H1_R98K_L4M_V5K	QVQMKQSGAEVKKPGASVKVSCКАSGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMEЛSSLRSEDТАVYYCATYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSS
68	H1_R98K_L4M_V5K_K23T	QVQMKQSGAEVKKPGASVKVSCТАSGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMEЛSSLRSEDТАVYYCATYYYKYDVGGFDYWGQG

		TLVTVSS
69	H1_R98K_V5K	QVQLKQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCATYYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSS
70	H1_R98K_V5K_K23T	QVQLKQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCATYYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSS
71	H2_R98K	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTSS NTVYMELSSLRSEDTAVYYCATYYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSS
72	H3_R98K	QVQMKQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTSS NTVYMELSSLRSEDTAVYYCATYYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSS
73	L0	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCSVSSSISSSNLHWYQ QKPGQAPRLLIYGTSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLT SRLEPEDFAVYYCQQWSSYPFTFGQGTKVEIK
221	L0	XIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCSVSSSISSSNLHWYQ QKPGQAPRLLIYGTSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLT SRLEPEDFAVYYCQQWSSYPFTFGQGTKVEIK, где X=глутамат (E) или пироглутамат (pE)
74	L1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCSVSSSISSSNLHWYQ QKPGQAPRLLIYGTSNLASGIPDRFSGSGSGTSYTLTI SRLEPEDFAVYYCQQWSSYPFTFGQGTKVEIK
75	L2	EILLTQSPGTLSLSPGERATLSCSVSSSISSSNLHWYQ QKPGQAPRLLIYGTSNLASGIPDRFSGSGSGTSYTLTI SRLEPEDFAVYYCQQWSSYPFTFGQGTKVEIK
76	L3	EILLTQSPGTLSLSPGERATLSCSVSSSISSSNLHWYQ QKPGQAPRLWIYGTSNLASGVPDRFSGSGSGTSYTLTI SRLEPEDFAVYYCQQWSSYPFTFGQGTKVEIK
77	L4	EILLTQSPGTLSLSPGERATLTCSVSSSISSSNLHWYQ QKPGQSPRLWIYGTSNLASGVPDRFSGSGSGTSYTLTI

		SRLEPEDFAVYYCQQWSSYPFTFGQGTKVEIK
78	CDRH1	DTYMY
79	CDRH1	DTYIH
80	CDRH1	DTYIY
81	CDRH1	DNYIH
82	CDRH1	DNYMD
83	CDRH2	RIDPANGNTKYDPKLQG
84	CDRH2	EIDPANGNTKYDPKFQG
85	CDRH2	RIDPANGNTKFDPKFQG
86	CDRH2	RIDPANGNTKFDPKFQD
87	CDRH2	SIDPANGNTKYDPKFQG
88	CDRH2	EIDPANGNSKYAPRFQG
89	CDRH2	EIDPANGHTKYDPKFQG
90	CDRH2	EIDPANDNTKYDPKFQG
91	CDRH2	RIDPANGNTKYDPKFQG
92	CDRH2	RIDPANGNTHFDPKFQG
93	CDRH2	KIDPANGNTKYDPKFQG
94	CDRH3	YSRYDVGGFDY
95	CDRH3	YYYRYDVGGFDY
96	CDRH3	YFYRYDVGGFDY
97	CDRH3	YFDKYDVGGCDY
98	CDRH3	YYYKYDVGGFDY
99	CDRH3	YYYRYEVGGFDY
100	CDRL1	SVSSSISSSNLH
101	CDRL1	SVSSSISSSTLH
102	CDRL1	SVSSSISSSNLY
103	CDRL1	SVSSGISSSNLH
104	CDRL2	GTSNLAS
105	CDRL3	QQWSSYPFT
106	CDRL3	QQWNSYPLT
107	CDRL3	QQWSSYPHT
108	CDRL3	QQWSSYPWT
109	CDRL3	QQWSSYPLT
110	CDRL3	QQWSTYPFT

111	CDRL3	QQWSRYPWT
112	CDRL3	QQWRSYPFT
113	FR1 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIK
114	FR1 VH	QVQMKQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIK
115	FR1 VH	QVQMKQSGAEVVKPGASVKVSCASGFNIK
116	FR1 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIK
117	FR1 VH	QVQMVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIK
118	FR1 VH	QVQMVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIK
119	FR1 VH	QVQMKQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIK
120	FR1 VH	QVQLKQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIK
121	FR1 VH	QVQLKQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIK
122	FR2 VH	WVRQAPGQGLEWMG
123	FR2 VH	WVRQAPGQGLEWIG
124	FR3 VH	RVTMTRDTSTSTVMELSSLRSEDNAVYYCAR
125	FR3 VH	RVTITADTSTSTVMELSSLRSEDNAVYYCAT
126	FR3 VH	RVTITADTSSNTVMELSSLRSEDNAVYYCAT
127	FR3 VH	RVTITADTSSNTVYLQLSSLRSEDNAVYYCAT
128	FR4 VH	WGQGTLLVTVSS
129	FR1 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC
130	FR1 VL	EILLTQSPGTLSSLSPGERATLSC
131	FR1 VL	EILLTQSPGTLSSLSPGERATLTC
132	FR2 VL	WYQQKPGQAPRLLIY
133	FR2 VL	WFQQKPGQAPRLLIY
134	FR2 VL	WFQQKPGQAPRLWIY
135	FR2 VL	WFQQKPGQSPRLWIY
136	FR3 VL	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
137	FR3 VL	GIPDRFSGSGSGTSYTLTISRLEPEDFAVYYC
138	FR3 VL	GVPDRFSGSGSGTSYTLTISRLEPEDFAVYYC
139	FR4 VL	FGQGTKVEIK
140	консенсус CDRH1	DX ₁ YX ₂ X ₃ , где: X ₁ представляет собой T или N; X ₂ представляет собой I или M; а X ₃ представляет собой H, Y или D
141	консенсус CDRH1	DX ₁ YX ₂ X ₃ , где:

		X₁ представляет собой Т или N; X₂ представляет собой I или M; а X₃ представляет собой H или Y
142	консенсус CDRH2	X₁IDPANX₂X₃X₄X₅X₆X₇PX₈X₉QX₁₀, где: X₁ представляет собой E, R, S или K; X₂ представляет собой D или G; X₃ представляет собой N или H; X₄ представляет собой T или S; X₅ представляет собой K или H; X₆ представляет собой Y или F; X₇ представляет собой D или A; X₈ представляет собой K или R; X₉ представляет собой F или L, а X₁₀ представляет собой G или D
143	консенсус CDRH2	X₁IDPANX₂X₃X₄KX₅X₆PX₇FQX₈, где: X₁ представляет собой E, R или S; X₂ представляет собой D или G; X₃ представляет собой N или H; X₄ представляет собой T или S; X₅ представляет собой Y или F; X₆ представляет собой D или A; X₇ представляет собой K или R, а X₈ представляет собой G или D
144	консенсус CDRH3	YX₁X₂X₃YX₄VGGX₅DY, где: X₁ представляет собой Y, F или S; X₂ представляет собой Y или D; X₃ представляет собой K или R; X₄ представляет собой D или E, а X₅ представляет собой F или C
145	консенсус CDRH3	YX₁X₂X₃YDVGGX₄DY, где: X₁ представляет собой Y, F или S; X₂ представляет собой Y или D; X₃ представляет собой K или R, а X₄ представляет собой F или C
146	консенсус CDRH3	YYYX₁YX₂VGGFDY, где:

		X_1 представляет собой K или R, а X_2 представляет собой D или E, а
147	консенсус CDRL1	SVSSX ₁ ISSX ₂ LX ₃ , где: X_1 представляет собой S или G; X_2 представляет собой N или T, а X_3 представляет собой H или Y
148	консенсус CDRL1	SVSSSISSSNLX ₁ , где: X_1 представляет собой H или Y
149	консенсус CDRL3	QQWX ₁ X ₂ YPX ₃ T, где: X_1 представляет собой S, N или R; X_2 представляет собой S, T или R, а X_3 представляет собой F, L, H или W
150	консенсус CDRL3	QQWX ₁ SYPX ₂ T, где: X_1 представляет собой S, N или R, а X_2 представляет собой F, L или H
151	Гуманизированный консенсус VH	QVQX ₁ X ₂ QSGAEVX ₃ KPGASVKVSCASGFNIKDTYIHW VRQAPGQGLEWX ₅ GEIDPANDNTKYDPKFQGRVTX ₆ TX ₇ DTSX ₈ X ₉ TVYX ₁₀ X ₁₁ LSSLRSEDTAVYYCAX ₁₂ YYYX ₁₃ Y X ₁₄ VGGFDYWGQGLTVTVSS, где: X_1 представляет собой M или L; X_2 представляет собой V или K; X_3 представляет собой K или V; X_4 представляет собой K или T; X_5 представляет собой M или I; X_6 представляет собой I или M; X_7 представляет собой A или R; X_8 представляет собой T или S, X_9 представляет собой S или N; X_{10} представляет собой M или L; X_{11} представляет собой E или Q; X_{12} представляет собой T или R; X_{13} представляет собой K или R, а X_{14} представляет собой D или E
218	Гуманизированный консенсус VH	QVQX ₁ X ₂ QSGAEVX ₃ KPGASVKVSCX ₄ ASGFNIKDTYIH WVRQAPGQGLEWX ₅ GEIDPANDNTKYDPKFQGRVTX ₆ T

		$X_7DTSX_8X_9TVYX_{10}X_{11}LSSLRSED TAVYYCAX_{12}YYYX_{13}YX_{14}VGGFDYWGQGLTVTVSS$, где: X_1 представляет собой М или L; X_2 представляет собой V или K; X_3 представляет собой K или V; X_4 представляет собой K или T; X_5 представляет собой М или I; X_6 представляет собой I или M; X_7 представляет собой A или R; X_8 представляет собой T или S, X_9 представляет собой S или N; X_{10} представляет собой М или L; X_{11} представляет собой E или Q; X_{12} представляет собой T или R; X_{13} представляет собой K или R, а X_{14} представляет собой D или E
222	Гуманизированный консенсус VH	$X_1VQX_2X_3QSGAEVX_4KPGASVKVSC KASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEW X_5GEIDPANDNTKYDPKFQGRVTX_6TX_7DTSX_8X_9TVYX_{10}X_{11}LSSLRSED TAVYYCAX_{12}YYYX_{13}YX_{14}VGGFDYWGQGLTVTVSS$, где: X_1 представляет собой Q или pE (пироглутамат) X_2 представляет собой М или L; X_3 представляет собой V или K; X_4 представляет собой K или V; X_5 представляет собой М или I; X_6 представляет собой I или M; X_7 представляет собой A или R; X_8 представляет собой T или S, X_9 представляет собой S или N; X_{10} представляет собой М или L; X_{11} представляет собой E или Q; X_{12} представляет собой T или R; X_{13} представляет собой K или R, а X_{14} представляет собой D или E

223	Гуманизированный консенсус VH	X₁VQX₂X₃QSGAEVX₄KPGASVKVSCX₅ASGFNIKDTYI HWVRQAPGQGLEWX₆GEIDPANDNTKYDPKFQGRVTX₇ TX₈DTSX₉X₁₀TVYX₁₁X₁₂LSSLRSEDYAVYYCAX₁₃YYY X₁₄YX₁₅VGGFDYWGQGLTVTVSS, где: X₁ представляет собой Q или pE (пироглутамат) X₂ представляет собой M или L; X₃ представляет собой V или K; X₄ представляет собой K или V; X₅ представляет собой K или T; X₆ представляет собой M или I; X₇ представляет собой I или M; X₈ представляет собой A или R; X₉ представляет собой T или S; X₁₀ представляет собой S или N; X₁₁ представляет собой M или L; X₁₂ представляет собой E или Q; X₁₃ представляет собой T или R; X₁₄ представляет собой K или R, а X₁₅ представляет собой D или E
152	Гуманизированный консенсус VL	EIX₁LTQSPGTLSPGERATLX₂CSVSSSISSSNLHW X₃QQKPGQX₄PRLX₅IYGTSNLAGSX₆PDRFSGSGSGTX ₇X₈TLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPFTFGQGTKVEI K, где: X₁ представляет собой V или L; X₂ представляет собой S или T; X₃ представляет собой Y или F; X₄ представляет собой A или S; X₅ представляет собой L или W; X₆ представляет собой I или V; X₇ представляет собой D или S; а X₈ представляет собой F или Y
224	Гуманизированный консенсус VL	X₁IX₂LTQSPGTLSPGERATLX₃CSVSSSISSSNLHW X₄QQKPGQX₅PRLX₆IYGTSNLAGSX₇PDRFSGSGSGTX ₈X₉TLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPFTFGQGTKVEI

		K, где: X₁ представляет собой E или pE (пироглутамат) X₂ представляет собой V или L; X₃ представляет собой S или T; X₄ представляет собой Y или F; X₅ представляет собой A или S; X₆ представляет собой L или W; X₇ представляет собой I или V; X₈ представляет собой D или S; a X₉ представляет собой F или Y
168	тяжелая цепь полноразмерного IgG ₁ H1_R98K_L4M	QVQMVGSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMEISSLRSEDYAVYYCATYYYYKYDVGDFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
225	тяжелая цепь полноразмерного IgG ₁ H1_R98K_L4M	XVQMVGSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMEISSLRSEDYAVYYCATYYYYKYDVGDFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,

		где X=глутамин (Q) или пироглутамат (pE)
169	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H1_R98K_L4M	QVQMVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMELSSLRSEDТАVYYCATYYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
226	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H1_R98K_L4M	XVQMVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMELSSLRSEDТАVYYCATYYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG, где X=глутамин (Q) или пироглутамат (pE)
170	тяжелая цепь S228P полноразмерного IgG ₄ H1_R98K_L4M	QVQMVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMELSSLRSEDТАVYYCATYYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVKPKCDKTH PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD

		VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG
227	тяжелая цепь S228P полноразмерного IgG ₄ H1_R98K_L4M	XVQMVSQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVR QAPGGGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMESSLRSEDТАVYYCATYYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG, где X=глутамин (Q) или пироглутамат (pE)
171	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVR QAPGGGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTMTTRDTST STVYMESSLRSEDТАVYYCARYYYRYDVGGFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
172	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVR QAPGGGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMESSLRSEDТАVYYCATYYYYRYDVGGFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD

		YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
173	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTSS NTVYMESSLRSEDТАVYYCATYYYYRYDVGGFDYWGG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
174	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H3	QVQMKQSGAEVKKPGASVKVSTASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTSS NTVYMESSLRSEDТАVYYCATYYYYRYDVGGFDYWGG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
175	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H4	QVQMKQSGAEVVKPGASVKVSTASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWIGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTSS NTVYLQLSSLRSEDТАVYYCATYYYYRYDVGGFDYWGG

		TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
176	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H4_R98K	QVQMKQSGAEVVKPGASVKVCTASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWIGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTSS NTVYLQLSSLRSEDYAVYYCATYYYKYDVGGFYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
177	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H4_D100E	QVQMKQSGAEVVKPGASVKVCTASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWIGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTSS NTVYLQLSSLRSEDYAVYYCATYYYRYEVGGFYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
178	тяжелая цепь N297A полноразмерного	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST

	IgG ₁ H1_R98K	STVYMESSLRSEDТАVYYCATYYYKYDVGGFDYWGG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
179	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H1_R98K_K23T	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMESSLRSEDТАVYYCATYYYKYDVGGFDYWGG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
180	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H1_R98K_L4M_K23T	QVQMVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMESSLRSEDТАVYYCATYYYKYDVGGFDYWGG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
181	тяжелая цепь N297A	QVQMKQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVR

	полноразмерного IgG ₁ H1_R98K_L4M_V5K	QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMELSSLRSEDТАVYYCATYYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
182	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H1_R98K_L4M_V5K_K2 3T	QVQMKQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMELSSLRSEDТАVYYCATYYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
183	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H1_R98K_V5K	QVQLKQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMELSSLRSEDТАVYYCATYYYYKYDVGGFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

184	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H1_R98K_V5K_K2 3T	QVQLKQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTST STVYMEISSLRSEDTAVYYCATYYYKYDVGGFYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
185	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H2_R98K	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTSS NTVYMEISSLRSEDTAVYYCATYYYKYDVGGFYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
186	тяжелая цепь N297A полноразмерного IgG ₁ H3_R98K	QVQMKQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDTYIHWVR QAPGQGLEWMGEIDPANDNTKYDPKFQGRVTITADTSS NTVYMEISSLRSEDTAVYYCATYYYKYDVGGFYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK

		SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
187	полноразмерная легкая цепь L0	EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCSVSSSISSSNLHWYQ QKPGQAPRLLIYGTSLASGIPDRFSGSGSGTDFTLT SRLEPEDFAVYYCQQWSSYPFTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
228	полноразмерная легкая цепь L0	XIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCSVSSSISSSNLHWYQ QKPGQAPRLLIYGTSLASGIPDRFSGSGSGTDFTLT SRLEPEDFAVYYCQQWSSYPFTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC, где X=глутамат (E) или пироглутамат (pE)
188	полноразмерная легкая цепь L1	EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCSVSSSISSSNLHWYQ QKPGQAPRLLIYGTSLASGIPDRFSGSGSGTSYTLTI SRLEPEDFAVYYCQQWSSYPFTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
189	полноразмерная легкая цепь L2	EILLTQSPGTLTLSPGERATLSCSVSSSISSSNLHWYQ QKPGQAPRLLIYGTSLASGIPDRFSGSGSGTSYTLTI SRLEPEDFAVYYCQQWSSYPFTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
190	полноразмерная легкая цепь L3	EILLTQSPGTLTLSPGERATLSCSVSSSISSSNLHWYQ QKPGQAPRLWIYGTSLASGVPDRFSGSGSGTSYTLTI SRLEPEDFAVYYCQQWSSYPFTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
191	полноразмерная легкая цепь L4	EILLTQSPGTLTLSPGERATLTCSVSSSISSSNLHWYQ QKPGQSPRLWIYGTSLASGVPDRFSGSGSGTSYTLTI

		SRLEPEDFAVYYCQQWSSYPFTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
192	Аллотип G1m3 IgG ₁ человека (без C- концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCTPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
193	Аллотип G1m3 IgG ₁ человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCTPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
208	Аллотип G1m17 IgG ₁ человека (без C- концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCTPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
209	Аллотип G1m17 IgG ₁ человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCTPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE

		DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
194	N297A IgG ₁ (без С- концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
195	N297A IgG ₁	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
196	S228P IgG ₄ (без С- концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVEPKSGPPCPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
197	S228P IgG ₄	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVEPKSGPPCPCPAPEF

		LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
198	Аллотип Km3 константной области легкой цепи каппа человека IGKC*01	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
219	Аллотип Km3 константной области легкой цепи каппа человека IGKC*01	GTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Таблица 2

Аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи типичных антител против LAG-3 *

VH	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
VH P01C09	DTYMY (78)	RIDPANGNTKYDPKLQG (83)	YSYRYDVGGFDY (94)
VH P05E01	DTYIH (79)	EIDPANGNTKYDPKFQG (84)	YYYRYDVGGFDY (95)
VH P01A12	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQG (85)	YYYRYDVGGFDY (95)
VH P13B01	DTYIY (80)	RIDPANGNTKFDPKFQG (85)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P13C10	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P13C08	DNYIH (81)	SIDPANGNTKYDPKFQG (87)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P13E02	DTYIH (79)	EIDPANGNSKYAPRFQG (88)	YYYRYDVGGFDY (95)
VH P13F02	DTYIH (79)	EIDPANGHTKYDPKFQG	YYYRYDVGGFDY

		(89)	(95)
VH P13B02	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYRYDVGGFDY (95)
VH P13A06	DTYMY (78)	RIDPANGNTKYDPKFQG (91)	YSYRYDVGGFDY (94)
VH P14C04	DTYMY (78)	RIDPANGNTHFDPKFQG (92)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P14A04	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P15F06	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P13B03	DTYIH (79)	EIDPANGNTKYDPKFQG (84)	YYYRYDVGGFDY (95)
VH P15C02	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P16D04	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P13F01	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P13A04	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P16H05	DNYIH (81)	SIDPANGNTKYDPKFQG (87)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P13F09	DNYIH (81)	SIDPANGNTKYDPKFQG (87)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P13G01	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P13H05	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYRYDVGGFDY (95)
VH P13D04	DNYMD (82)	KIDPANGNTKYDPKFQG (93)	YYYRYDVGGFDY (95)
VH P14G01	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P14G03	DTYIH (79)	EIDPANGNTKYDPKFQG (84)	YYYRYDVGGFDY (95)

VH P13G05	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P13F06	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P13B11	DNYMD (82)	KIDPANGNTKYDPKFQG (93)	YYYRYDVGGFDY (95)
VH P14F01	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P14F06	DNYIH (81)	SIDPANGNTKYDPKFQG (87)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P13D05	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P13G04	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P15E06	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P15G05	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P15B06	DTYMY (78)	RIDPANGNTHFDPKFQG (92)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P14B07	DNYIH (81)	SIDPANGNTKYDPKFQG (87)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P05E03	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFYRYDVGGFDY (96)
VH P13C06	DTYMY (78)	RIDPANGNTKFDPKFQD (86)	YFDKYDVGGCDY (97)
H0	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYRYDVGGFDY (95)
H1	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYRYDVGGFDY (95)
H2	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYRYDVGGFDY (95)
H3	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYRYDVGGFDY (95)
H4	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG	YYYRYDVGGFDY

		(90)	(95)
H4_R98K	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYKYDVGGFDY (98)
H4_D100E	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYRYEVGGFDY (99)
H1_R98K	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYKYDVGGFDY (98)
H1_R98K_K23T	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYKYDVGGFDY (98)
H1_R98K_L4M	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYKYDVGGFDY (98)
H1_R98K_L4M_K23T	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYKYDVGGFDY (98)
H1_R98K_L4M_V5K	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYKYDVGGFDY (98)
H1_R98K_L4M_V5K_ K23T	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYKYDVGGFDY (98)
H1_R98K_V5K	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYKYDVGGFDY (98)
H1_R98K_V5K_K23T	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYKYDVGGFDY (98)
H2_R98K	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYKYDVGGFDY (98)
H3_R98K	DTYIH (79)	EIDPANDNTKYDPKFQG (90)	YYYKYDVGGFDY (98)

* Определяется в соответствии с системой нумерации Kabat.

Таблица 3
Аминокислотные последовательности CDR легкой цепи типичных антител против LAG-3 *

VL	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
VL P01C09	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P05E01	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWNSYPLT (106)
VL P01A12	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
	(100)		
VL P13B01	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P13C10	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P13C08	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P13E02	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P13F02	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P13B02	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P13A06	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPHT (107)
VL P14C04	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P14A04	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P15F06	SVSSSISSSTLH (101)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPWT (108)
VL P13B03	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P15C02	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P16D04	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPLT (109)
VL P13F01	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P13A04	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P16H05	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPHT (107)
VL P13F09	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)

VL P13G01	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P13H05	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P13D04	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P14G01	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P14G03	SVSSSISSSNLY (102)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P13G05	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P13F06	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P13B11	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P14F01	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSTYPFT (110)
VL P14F06	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P13D05	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P13G04	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P15E06	SVSSGISSSNLH (103)	GTSNLAS (104)	QQWSRYPWT (111)
VL P15G05	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPLT (109)
VL P15B06	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPLT (109)
VL P14B07	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P05E03	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
VL P13C06	SVSSSISSSNLY (102)	GTSNLAS (104)	QQWRSYPFT (112)
	(102)		
L0	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
L1	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
L2	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
L3	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)
L4	SVSSSISSSNLH (100)	GTSNLAS (104)	QQWSSYPFT (105)

* Определяется в соответствии с системой нумерации Kabat.

Таблица 4

Каркасные (FR) аминокислотные последовательности тяжелой цепи типичных антител против LAG-3 *

VH	FR1 VH (SEQ ID NO:)	FR2 VH (SEQ ID NO:)	FR3 VH (SEQ ID NO:)	FR4 VH (SEQ ID NO:)
H0	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGFN IK (113)	WVRQAPG QGLEWMG (122)	RVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDТАVYYC AR (124)	WGQGTЛV TVSS (128)
H1	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGFN IK (113)	WVRQAPG QGLEWMG (122)	RVTITADTSTSTVYM ELSSLRSEDТАVYYC AT (125)	WGQGTЛV TVSS (128)
H2	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGFN IK (113)	WVRQAPG QGLEWMG (122)	RVTITADTSSNTVYM ELSSLRSEDТАVYYC AT (126)	WGQGTЛV TVSS (128)
H3	QVQMKQSGAEVKKP GASVKVSCТАSGFN IK (114)	WVRQAPG QGLEWMG (122)	RVTITADTSSNTVYM ELSSLRSEDТАVYYC AT (126)	WGQGTЛV TVSS (128)
H4	QVQMKQSGAEVVKP GASVKVSCТАSGFN IK (115)	WVRQAPG QGLEWIG (123)	RVTITADTSSNTVYL QLSSLRSEDТАVYYC AT (127)	WGQGTЛV TVSS (128)
H4_R98K	QVQMKQSGAEVVKP GASVKVSCТАSGFN IK (115)	WVRQAPG QGLEWIG (123)	RVTITADTSSNTVYL QLSSLRSEDТАVYYC AT (127)	WGQGTЛV TVSS (128)

H4_D100E	QVQMKQSGAEVVKP GASVKVSCASGFN IK (115)	WVRQAPG QGLEWIG (123)	RVTITADTSSNTVYL QLSSLRSEDТАVYYC AT (127)	WGQGTЛV TVSS (128)
H1_R98K	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCASGFN IK (113)	WVRQAPG QGLEWMG (122)	RVTITADTSTSTVYM ELSSLRSEDТАVYYC AT (125)	WGQGTЛV TVSS (128)
H1_R98K_K23T	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCASGFN IK (116)	WVRQAPG QGLEWMG (122)	RVTITADTSTSTVYM ELSSLRSEDТАVYYC AT (125)	WGQGTЛV TVSS (128)
H1_R98K_L4M	QVQMVQSGAEVKKP GASVKVSCASGFN IK (117)	WVRQAPG QGLEWMG (122)	RVTITADTSTSTVYM ELSSLRSEDТАVYYC AT (125)	WGQGTЛV TVSS (128)
H1_R98K_L4M_K23 T	QVQMVQSGAEVKKP GASVKVSCASGFN IK (118)	WVRQAPG QGLEWMG (122)	RVTITADTSTSTVYM ELSSLRSEDТАVYYC AT (125)	WGQGTЛV TVSS (128)
H1_R98K_L4M_V5K	QVQMKQSGAEVKKP GASVKVSCASGFN IK (119)	WVRQAPG QGLEWMG (122)	RVTITADTSTSTVYM ELSSLRSEDТАVYYC AT (125)	WGQGTЛV TVSS (128)
H1_R98K_L4M_V5K _K23T	QVQMKQSGAEVKKP GASVKVSCASGFN IK (114)	WVRQAPG QGLEWMG (122)	RVTITADTSTSTVYM ELSSLRSEDТАVYYC AT (125)	WGQGTЛV TVSS (128)
H1_R98K_V5K	QVQLKQSGAEVKKP GASVKVSCASGFN IK (120)	WVRQAPG QGLEWMG (122)	RVTITADTSTSTVYM ELSSLRSEDТАVYYC AT (125)	WGQGTЛV TVSS (128)
H1_R98K_V5K_K23 T	QVQLKQSGAEVKKP GASVKVSCASGFN IK (121)	WVRQAPG QGLEWMG (122)	RVTITADTSTSTVYM ELSSLRSEDТАVYYC AT (125)	WGQGTЛV TVSS (128)
H2_R98K	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCASGFN IK (113)	WVRQAPG QGLEWMG (122)	RVTITADTSSNTVYM ELSSLRSEDТАVYYC AT (126)	WGQGTЛV TVSS (128)
H3_R98K	QVQMKQSGAEVKKP GASVKVSCASGFN IK (114)	WVRQAPG QGLEWMG (122)	RVTITADTSSNTVYM ELSSLRSEDТАVYYC AT (126)	WGQGTЛV TVSS (128)

* Каркасные области тяжелой цепи, описанные в табл. 4, определяются на основе границ системы нумерации Kabat для CDR. Другими словами, CDR VH определяются с помощью Kabat, а каркасные области представляют собой аминокислотные остатки, окружающие CDR в варибельной области в формате FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Таблица 5

Каркасные (FR) аминокислотные последовательности легкой цепи типичных антител против LAG-3 *

VL	FR1 VL (SEQ ID NO:)	FR2 VL (SEQ ID NO:)	FR3 VL (SEQ ID NO:)	FR4 VL (SEQ ID NO:)
L0	EIVLTQSPGTLSSL PGERATLSC (129)	WYQQKPGQAPR LLIY (132)	GIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYC (136)	FGQGTKVEI K (139)
L1	EIVLTQSPGTLSSL PGERATLSC (129)	WYQQKPGQAPR LLIY (132)	GIPDRFSGSGSGTSTYT LTISRLEPEDFAVYYC (137)	FGQGTKVEI K (139)
L2	EIVLTQSPGTLSSL PGERATLSC (130)	WFQQKPGQAPR LLIY (133)	GIPDRFSGSGSGTSTYT LTISRLEPEDFAVYYC (137)	FGQGTKVEI K (139)
L3	EIVLTQSPGTLSSL PGERATLSC (130)	WFQQKPGQAPR LWIY (134)	GVPDRFSGSGSGTSTYT LTISRLEPEDFAVYYC (138)	FGQGTKVEI K (139)
L4	EIVLTQSPGTLSSL PGERATLTC (131)	WFQQKPGQSPR LWIY (135)	GVPDRFSGSGSGTSTYT LTISRLEPEDFAVYYC (138)	FGQGTKVEI K (139)

* Каркасные области легкой цепи, описанные в табл. 5, определяются на основе границ системы нумерации Kabat для CDR. Другими словами, CDR VL определяются с помощью Kabat, а каркасные области представляют собой аминокислотные остатки, окружающие CDR в варибельной области в формате FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Таблица 6

Типичные мышинные антитела против LAG-3

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи SEQ ID NO:
P01C09	1	2
P05E01	3	4
P01A12	5	6
P13B01	7	8
P13C10	9	10
P13C08	11	12
P13E02	13	10
P13F02	14	10
P13B02	15	16
P13A06	17	18
P14C04	19	8
P14A04	20	21
P15F06	22	23
P13B03	24	10
P15C02	9	25
P16D04	9	26
P13F01	20	2
P13A04	27	28
P16H05	29	30

P13F09	31	32
P13G01	33	34
P13H05	35	10
P13D04	36	37
P14G01	38	21
P14G03	39	40
P13G05	9	2
P13F06	9	41
P13B11	42	43
P14F01	9	44
P14F06	45	32
P13D05	46	47
P13G04	48	10
P15E06	20	49
P15G05	33	50
P15B06	51	52
P14B07	53	8
P05E03	38	2
P13C06	54	55

Таблица 7

Типичные гуманизированные антитела против LAG-3

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:)	Варибельная область легкой цепи SEQ ID NO:)
P13B02-01	H0 (56)	L0 (73)
P13B02-02	H0 (56)	L1 (74)
P13B02-03	H0 (56)	L2 (75)
P13B02-04	H0 (56)	L3 (76)
P13B02-05	H0 (56)	L4 (77)
P13B02-06	H1 (57)	L0 (73)
P13B02-07	H1 (57)	L1 (74)
P13B02-08	H1 (57)	L2 (75)
P13B02-09	H1 (57)	L3 (76)
P13B02-10	H1 (57)	L4 (77)
P13B02-11	H2 (58)	L0 (73)
P13B02-12	H2 (58)	L1 (74)
P13B02-13	H2 (58)	L2 (75)
P13B02-14	H2 (58)	L3 (76)
P13B02-15	H2 (58)	L4 (77)
P13B02-16	H3 (59)	L0 (73)
P13B02-17	H3 (59)	L1 (74)
P13B02-18	H3 (59)	L2 (75)
P13B02-19	H3 (59)	L3 (76)
P13B02-20	H3 (59)	L4 (77)
P13B02-21	H4 (60)	L0 (73)
P13B02-22	H4 (60)	L1 (74)

P13B02-23	H4 (60)	L2 (75)
P13B02-24	H4 (60)	L3 (76)
P13B02-25	H4 (60)	L4 (77)
P13B02-26	H4_R98K (61)	L4 (77)
P13B02-27	H4_D100E (62)	L4 (77)
P13B02-28	H1_R98K (63)	L0 (73)
P13B02-29	H1_R98K_K23T (64)	L0 (73)
P13B02-30	H1_R98K_L4M (65)	L0 (73)
P13B02-31	H1_R98K_L4M_K23T (66)	L0 (73)
P13B02-32	H1_R98K_L4M_V5K (67)	L0 (73)
P13B02-33	H1_R98K_L4M_V5K_K23T (68)	L0 (73)
P13B02-34	H1_R98K_V5K (69)	L0 (73)
P13B02-35	H1_R98K_V5K_K23T (70)	L0 (73)
P13B02-36	H2_R98K (71)	L0 (73)
P13B02-37	H3_R98K (72)	L0 (73)

Таблица 8
Последовательности зародышевой линии человека

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
153	IGHV1-46*01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVW RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDТАVYYCAR
154	IGHV1-69-2*01	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVW QQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVTITADT STDTAYMELSSLRSEDТАVYYCAT
155	IGHV1-3*01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMHVW RQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQGRVTITRDT SASTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR
156	IGHV1-24*01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHVW RQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAEKFQGRVTMTEDT STDTAYMELSSLRSEDТАVYYCAT
157	IGHV1-2*01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHVW RQAPGQGLEWMGRINPNSGGTNYAQKFQGRVTSTRDT SISTAYMELSRLSDDTVVYYCAR
158	IGHV1-45*01	QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTYRYLHVW RQAPGQALEWMGWITPFNGNTNYAQKFQDRVTITRDR SMSTAYMELSSLRSEDТАMYCAR
159	IGHV1-18*01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWV RQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDT

		STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
200	IGHJ1*01	AEYFQHWGQGTLTVTSS
160	IGKV3-20*01	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP
161	IGKV3D-15*01 или IGKV3-15*01	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP
162	IGKV3D-20*01	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWY QQKPGGLAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP
163	IGKV3D-7*01	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLSWY QQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPP
164	IGKV1-9*01	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCRASQGISSYLAWYQ QKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPEDFATYYCQQLNSYP
165	IGKV3-11*01	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRSNWP
201	IGKJ1*01	WTFGQGTKVEIK

Таблица 9

Иллюстративные последовательности LAG-3

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
166	Незрелый белок LAG-3 человека (P18627-1)	MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAIEVPVWVWQEG APAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAA APGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGLRS GRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYR AAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWV ILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPIHHHLA ESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTV LGLPEPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLLTA KWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVSAQAGTYTC HIHLQEQLNATVTLAIITVTPKSFSGPSGLKLLCE VTPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLS

		QPWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGA LPAGHLLLFLILGVLSLLLVTGAFGFHLWRRQWRPR RFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEP EPEPEQL
167	Зрелый белок LAG-3 человека	VPVVWAQEGAPQLPCSTIPLQDLSLLRRAGVTWQH QPDGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVL SVGPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPA RRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMTASPP GSLRASDWILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPV RESPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFN VSIMYNLTVLGLEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAG VGTRSFLLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVS QAQAGTYTCHIHLEQQLNATVTLAIITVTPKSFSGP GSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWL EAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPGA QRSGRAPGALPAGHLLLFLILGVLSLLLVTGAFGFH LWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPE PEPEPEPEPEPEPEQL
210	Зрелый белок LAG-3 человека	LQPGAEPVVWAQEGAPQLPCSTIPLQDLSLLRRA GVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRP RRYTVLSVGPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFS LWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQAS MTASPPGSLRASDWILNCSFSRPDRPASVHWFRNRG QGRVPVRESPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILT YRDGFNVSIMYNLTVLGLEPPTPLTVYAGAGSRVGLP CRLPAGVGTRSFLLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTL RLEDVSAQAGTYTCHIHLEQQLNATVTLAIITVTP KSFSGPSGLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRS FSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTE LSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLLFLILGVLSLLLVT GAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELE QEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL
217	Фрагмент LAG-3 человека	LQPGAEPVVWAQEGAPQLPCSTIPLQDLSLLRRA GVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRP RRYTVLSVGPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFS

		LWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQAS MTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPPDRPASVHWFRNRG QGRVPVRESPPHHLLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILT YRDGFNVSIMYNLTVLGLPEPTPLTVYAGAGSRVGLP CRLPAGVGTRSFLLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTL RLEDVSSQAQAGTYTCHIHLQEQLNATVTLAIITVTP KSGFGSPGSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRS FSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAYFTE LSSPGAQRSGRAPGALPAGHL
199	Петля из 30 аминокислот LAG- 3 человека	GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY
211	эпитоп LAG-3	PTIPLQD
212	эпитоп LAG-3	SPTIPLQD
213	эпитоп LAG-3	SPTIPLQDL
214	эпитоп LAG-3	SPTIPLQDLS
215	эпитоп LAG-3	SPTIPLQDLSL
216	эпитоп LAG-3	SPTIPLQDLSLL

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем данное антитело содержит домен VH, содержащий одну, две или все три из CDR домена VH, указанных в табл. 1, 2, 6 и 7 в данном документе. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRH1 одного из доменов VH, указанных в табл. 1, 2, 6 и 7. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRH2 одного из доменов VH, указанных в табл. 1, 2, 6 и 7. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRH3 одного из доменов VH, указанных в табл. 1, 2, 6 и 7.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем данное антитело содержит домен VL, содержащий одну, две или все три из CDR домена VL, указанных в табл. 1, 3, 6 и 7 в данном документе. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRL1 одного из доменов VL, указанных в табл. 1, 3, 6 и 7. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRL2 одного из доменов VL, указанных в табл. 1, 3, 6 и 7. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRL3 одного из доменов VL, указанных в табл. 1, 3, 6 и 7.

В определенных вариантах осуществления CDR антитела могут быть определены согласно Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) и Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest (1991), каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем это антитело содержит CDR VH Kabat из VH, раскрытые в табл. 1, 6 и 7 в данном документе. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем это антитело содержит CDR VL Kabat из VL, раскрытые в табл. 1, 6 и 7 в данном документе. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем данное антитело содержит CDR VH Kabat и CDR VL Kabat антитела, раскрытые в табл. 1, 6 и 7 в данном документе.

В определенных вариантах осуществления CDR антитела могут быть определены в соответствии со схемой нумерации Chothia, которая относится к расположению структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B et al., (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C et al., (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A et al., (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82 и патент США № 7709226, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Как правило, при использовании соглашения о нумерации Kabat петля CDRH1 Chothia присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 26-32, 33 или 34, петля CDRH2 Chothia присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 52-56, и петля CDRH3 Chothia присутствует в аминокислотах тяжелой цепи с 95 по 102, в то время как петля CDRL1 Chothia присутствует в аминокислотах легкой цепи 24-34, петля CDRL2 Chothia присутствует в аминокислотах легкой цепи 50-56, а петля CDRL3 Chothia присутствует в аминокислотах легкой цепи от 89-97. Конец петли CDRH1 Chothia при нумерации с использованием соглашения о нумерации Kabat варьирует между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что схема нумерации Kabat размещает инсерции в H35A и H35B; если нет ни 35A, ни 35B,

петля заканчивается на 32, если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют оба 35A и 35B, петля заканчивается на 34).

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем это антитело содержит CDR VH Chothia из VH, раскрытые в табл. 1, 6 и 7 в данном документе. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем это антитело содержит CDR VL Chothia из VL, раскрытые в табл. 1, 6 и 7 в данном документе. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем данное антитело содержит CDR VH Chothia и CDR VL Chothia антитела, раскрытые в табл. 1, 6 и 7 в данном документе. В определенных вариантах осуществления антитела, которые специфически связываются с LAG-3 (например, LAG-3 человека), содержат одну или более CDR, в которых CDR Chothia и Kabat имеют одинаковую аминокислотную последовательность. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и содержит комбинации CDR Kabat и CDR Chothia.

В определенных вариантах осуществления CDR антитела могут быть определены в соответствии с системой нумерации IMGT, как описано в Lefranc M-P, (1999) *The Immunologist* 7: 132-136 и Lefranc M-P et al., (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме. Согласно схеме нумерации IMGT, CDRH1 находится в положениях 26-35, CDRH2 находится в положениях 51-57, CDRH3 находится в положениях 93-102, CDRL1 находится в положениях 27-32, CDRL2 находится в положениях 50-52 и CDRL3 находится в положениях 89-97.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и содержат CDR антитела, раскрытые в табл. 1, 6 и 7, как определено системой нумерации IMGT, например, как описано в Lefranc MP (1999) выше и Lefranc MP et al. (1999) выше.

В определенных вариантах осуществления CDR антитела могут быть определены в соответствии со схемой нумерации AbM, которая относится к гипервариабельным областям AbM, которые представляют собой компромисс между CDR Kabat и структурными петлями Chothia, и используются программным обеспечением Oxford Molecular для моделирования антител AbM (Oxford Molecular Group, Inc.). В конкретном варианте осуществления данное изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и содержат CDR антитела, раскрытые в табл. 1, 6 и 7, как определено схемой нумерации AbM. В определенных вариантах осуществления CDR антитела могут быть определены в соответствии с MacCallum RM et al., (1996) *J Mol Biol* 262: 732-745, который включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме. См. также, например, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," в *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001), который включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме. В конкретном варианте осуществления данное изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и содержат CDR антитела, раскрытые в табл. 1, 6 и 7, как описано в MacCallum RM et al., (1996) выше.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности области CDRH1, CDRH2 и CDRH3 домена VH, указанные в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 19, 20, 22, 24, 27, 29, 31, 33, 35, 36, 38, 39, 42, 45, 46, 48, 51, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 или 72, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности области CDRL1, CDRL2 и CDRL3 домена VL, указанные в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18, 21, 23, 25, 26, 28, 30, 32, 34, 37, 40, 41, 43, 44, 47, 49, 50, 52, 55, 73, 74, 75, 76 или 77, причем каждая CDR определена в соответствии с определением Kabat, определением Chothia, комбинацией определения Kabat и определением Chothia, системой нумерации IMGT, определением AbM или определением CDR MacCallum.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело содержит:

- (a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность $DX_1YX_2X_3$ (SEQ ID NO: 140), где
 - X_1 представляет собой Т или N,
 - X_2 представляет собой I или M, а
 - X_3 представляет собой H, Y или D; и/или
- (b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность $X_1IDPANX_2X_3X_4X_5X_6X_7PX_8X_9QX_{10}$ (SEQ ID NO: 142), где
 - X_1 представляет собой E, R, S или K,
 - X_2 представляет собой D или G,
 - X_3 представляет собой N или H,
 - X_4 представляет собой T или S,
 - X_5 представляет собой K или H,

X₆ представляет собой Y или F,
 X₇ представляет собой D или A,
 X₈ представляет собой K или R,
 X₉ представляет собой F или L, а
 X₁₀ представляет собой G или D; и/или

(с) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность YX₁X₂X₃YX₄VGGX₅DY (SEQ ID NO: 144), где

X₁ представляет собой Y, F или S,
 X₂ представляет собой Y или D,
 X₃ представляет собой K или R,
 X₄ представляет собой D или E, а
 X₅ представляет собой F или C; и/или

(d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SVSSX₁ISSSX₂LX₃ (SEQ ID NO: 147), где

X₁ представляет собой S или G,
 X₂ представляет собой N или T, а
 X₃ представляет собой H или Y; и/или

(е) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность GTSNLAS (SEQ ID NO: 104); и/или

(f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность QQWX₁X₂YPX₃T (SEQ ID NO: 149), где

X₁ представляет собой S, N или R,
 X₂ представляет собой S, T или R, а
 X₃ представляет собой F, L, H или W.

В определенных вариантах осуществления CDRH1 содержит аминокислотную последовательность DX₁YX₂X₃ (SEQ ID NO: 141), где X₁ представляет собой T или N; X₂ представляет собой I или M; а X₃ представляет собой H или Y. В определенных вариантах осуществления CDRH2 содержит аминокислотную последовательность X₁IDPANX₂X₃X₄KX₅X₆PX₇FQX₈ (SEQ ID NO: 143), где X₁ представляет собой E, R или S; X₂ представляет собой D или G; X₃ представляет собой N или H; X₄ представляет собой T или S; X₅ представляет собой Y или F; X₆ представляет собой D или A; X₇ представляет собой K или R; а X₈ представляет собой G или D. В определенных вариантах осуществления CDRH3 содержит аминокислотную последовательность YX₁X₂X₃YDVGGX₄DY (SEQ ID NO: 145), где X₁ представляет собой Y, F или S; X₂ представляет собой Y или D; X₃ представляет собой K или R; а X₄ представляет собой F или C. В определенных вариантах осуществления CDRH3 содержит аминокислотную последовательность YYYX₁YX₂VGGFDY (SEQ ID NO: 146), где X₁ представляет собой K или R; а X₂ представляет собой D или E. В определенных вариантах осуществления CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SVSSSISSSNLX₁ (SEQ ID NO: 148), где X₁ представляет собой H или Y. В определенных вариантах осуществления CDRL3 содержит аминокислотную последовательность QQWX₁SYPX₂T (SEQ ID NO: 150), где X₁ представляет собой S, N или R; а X₂ представляет собой F, L или H.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело содержит:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность DTYIH (SEQ ID NO: 79); и/или

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность EIDPANDNTKYDPKFQG (SEQ ID NO: 90); и/или

(с) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность YYYX₁YX₂VGGFDY (SEQ ID NO: 146), где X₁ представляет собой K или R; а X₂ представляет собой D или E; и/или

(d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SVSSSISSSNLH (SEQ ID NO: 100); и/или

(е) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность GTSNLAS (SEQ ID NO: 104); и/или

(f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность QQWSSYPFT (SEQ ID NO: 105).

В определенных вариантах осуществления CDRH1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 78-82. В определенных вариантах осуществления CDRH2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83-93. В определенных вариантах осуществления CDRH3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 94-99. В определенных вариантах осуществления CDRL1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 100-103. В определенных вариантах осуществления CDRL3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 105-112.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело содержит домен VH, содержащий аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 78, 83 и 94; 78, 85 и 95; 78, 86 и 96; 78, 86 и 97; 78, 91 и 94; 78, 92 и 96; 79, 84 и 95; 79, 88 и 95; 79, 89 и 95; 79, 90 и 95; 79, 90 и 98; 79, 90 и 99; 80, 85 и 96; 81, 87 и 96 или 82, 93 и 95 соответственно. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антите-

лу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело содержит домен VH, содержащий аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 79, 90 и 95 соответственно. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело содержит домен VH, содержащий аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 79, 90 и 98 соответственно.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело содержит домен VL, содержащий аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, представленные в SEQ ID NO: 100, 104 и 105; 100, 104 и 106; 100, 104 и 107; 100, 104 и 109; 100, 104 и 110; 101, 104 и 108; 102, 104 и 105; 102, 104 и 112 или 103, 104 и 111 соответственно. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело содержит домен VL, содержащий аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, представленные в SEQ ID NO: 100, 104 и 105 соответственно.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем области CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 78, 83, 94, 100, 104 и 105; 78, 85, 95, 100, 104 и 105; 78, 86, 96, 100, 104 и 105; 78, 86, 96, 100, 104 и 109; 78, 86, 96, 100, 104 и 110; 78, 86, 96, 101, 104 и 108; 78, 86, 96, 103, 104 и 111; 78, 86, 97, 102, 104 и 112; 78, 91, 94, 100, 104 и 107; 78, 92, 96, 100, 104 и 105; 78, 92, 96, 100, 104 и 109; 79, 84, 95, 100, 104 и 105; 79, 84, 95, 100, 104 и 106; 79, 84, 95, 102, 104 и 105; 79, 88, 95, 100, 104 и 105; 79, 89, 95, 100, 104 и 105; 79, 90, 95, 100, 104 и 105; 79, 90, 98, 100, 104 и 105; 79, 90, 99, 100, 104 и 105; 80, 85, 96, 100, 104 и 105; 81, 87, 96, 100, 104 и 105; 81, 87, 96, 100, 104 и 107 или 82, 93, 95, 100, 104 и 105 соответственно. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем области CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 79, 90, 95, 100, 104 и 105 соответственно. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем области CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 79, 90, 98, 100, 104 и 105 соответственно.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую одну, две или все три из CDR VH антитела в табл. 1, 2, 6 и 7. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит одну, две, три или все четыре каркасных области VH, описанных в данном документе. В конкретных вариантах осуществления антитело содержит одну, две, три или все четыре из каркасных областей (FR) VH, указанных в табл. 4 (например, одну, две, три или четыре каркасных области в одном ряду в табл. 4). В определенных вариантах осуществления антитело содержит одну, две, три или все четыре каркасных области последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 151 или 222. В определенных вариантах осуществления антитело содержит одну, две, три или все четыре каркасных области последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 218 или 223. В определенных вариантах осуществления антитело содержит одну, две, три или четыре каркасных области последовательности переменной области тяжелой цепи, которые на по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 95 или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичны одной, двум, трем или четверем каркасным областям последовательности переменной области тяжелой цепи, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-72 и 220. В определенных вариантах осуществления антитело содержит переменную каркасную область тяжелой цепи, которая является или происходит из аминокислотной последовательности, кодируемой геном человека, причем аминокислотная последовательность выбрана из группы, состоящей изIGHV1-46 (например,IGHV1-46*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153),IGHV1-69-2 (например,IGHV1-69-2*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154),IGHV1-3 (например,IGHV1-3*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155),IGHV1-24 (например,IGHV1-24*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156),IGHV1-2 (например,IGHV1-2*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157),IGHV1-45 (например,IGHV1-45*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158), иIGHV1-18 (например,IGHV1-18*01,

например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159). В конкретных вариантах осуществления вариабельная каркасная область тяжелой цепи, которая получена из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности, с присутствием до 20 аминокислотных замен, делеций и/или инсерций, предпочтительно до 20 аминокислотных замен. В конкретном варианте осуществления вариабельная каркасная область тяжелой цепи, которая получена из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных остатков, заменяющих аминокислоту, найденную в аналогичном положении в соответствующей вариабельной каркасной области тяжелой цепи, полученной не от человека. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную каркасную область тяжелой цепи, которая получена из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153), причем по меньшей мере одна аминокислота в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153 замещена аминокислотой в аналогичном положении в соответствующей вариабельной области тяжелой цепи, полученной не от человека. В конкретном варианте осуществления аминокислотная замена находится в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из 4, 5, 12, 23, 27, 28, 29, 30, 48, 69, 71, 75, 76, 80, 81 и 94, причем аминокислотное положение указано в соответствии с системой нумерации Kabat. В конкретных вариантах осуществления аминокислотная замена выбрана из группы, состоящей из 4M, 5K, 12V, 23T, 27F, 28N, 29I, 30K, 48I, 69I, 71A, 75S, 76N, 80L, 81Q и 94T, причем положение аминокислотной замены указано в соответствии с системой нумерации Kabat. В другом конкретном варианте осуществления аминокислотная замена находится в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из 4, 27, 28, 29, 30, 69, 71 и 94, причем аминокислотное положение указано в соответствии с системой нумерации Kabat. В конкретном варианте осуществления аминокислотная замена выбрана из группы, состоящей из 4M, 27F, 28N, 29I, 30K, 69I, 71A и 94T, причем положение аминокислотной замены указано в соответствии с системой нумерации Kabat.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело содержит вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую одну, две или все три из CDR VL антитела в табл. 1, 3, 6 и 7. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит одну, две, три или все четыре каркасных области VL, описанных в данном документе. В конкретных вариантах осуществления антитело содержит одну, две, три или все четыре из каркасных областей (FR) VL, указанных в табл. 5 (например, одну, две, три или четыре каркасных области в одном ряду в табл. 5). В определенных вариантах осуществления антитело содержит одну, две, три или все четыре каркасных области последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 152 или 224. В определенных вариантах осуществления антитело содержит одну, две, три или четыре каркасных области последовательности вариабельной области легкой цепи, которые на по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 95 или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичны одной, двум, трем или четырем каркасным областям последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73-77. В определенных вариантах осуществления антитело содержит вариабельную каркасную область легкой цепи, которая является или происходит из аминокислотной последовательности, кодируемой геном человека, причем аминокислотная последовательность выбрана из группы, состоящей из IGKV3-20 (например, IGKV3-20*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160), IGKV3D-15 (например, IGKV3D-15*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161), IGKV3-15 (например, IGKV3-15*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161), IGKV3D-20 (например, IGKV3D-20*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162), IGKV3D-7 (например, IGKV3D-7*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163), IGKV1-9 (например, IGRV1-9*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164), и IGKV3-11 (например, IGKV3-11*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165). В конкретных вариантах осуществления вариабельная каркасная область легкой цепи, которая получена из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности, с присутствием до 20 аминокислотных замен, делеций и/или инсерций, предпочтительно до 20 аминокислотных замен. В конкретном варианте осуществления вариабельная каркасная область легкой цепи, которая получена из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных остатков, заменяющих аминокислоту, найденную в аналогичном положении в соответствующей вариабельной каркасной области легкой цепи, полученной не от человека. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную каркасную область легкой цепи, которая получена из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 160, причем по меньшей мере одна аминокислота в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 160 замещена аминокислотой в аналогичном положении в соответствующей вариабельной области легкой цепи, полученной не от человека. В конкретном варианте осуществления аминокислотная замена находится в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 22, 36, 43, 47, 58, 70 и 71, причем аминокислотное положение указано в соответствии с системой нумерации Kabat. В конкретном варианте осуществления аминокислотная замена вы-

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело содержит домен VH, содержащий аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 79, 90 и 95; или 79, 90 и 98 соответственно. В определенных вариантах осуществления антитело содержит одну, две, три или все четыре каркасных области VH, полученных из VH антитела человека или примата. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит каркасные области VH антитела, представленные в табл. 4.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем области CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 79, 90, 95, 100, 104 и 105 или 79, 90, 98, 100, 104 и 105 соответственно. В определенных вариантах осуществления антитело содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VH, полученные из VH антитела человека или приматов, и одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из VL антитела человека или приматов. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит каркасные области VH и каркасные области VL антитела, представленные в табл. 4 и 5 соответственно.

- 65 -

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложено выделенное антигено, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151 или 222, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152 или 224. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложено выделенное антигено, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218 или 223, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152 или 224. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антигену, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), содержащему вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 95 или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 220, 66, 67, 68, 69, 70, 71 или 72, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 73, 221, 74, 75, 76 или 77. В определенных вариантах осуществления антигено содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 220, 66, 67, 68, 69, 70, 71 или 72, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, 221, 74, 75, 76 или 77. В определенных вариантах осуществления антигено содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 56 и 73; 56 и 74; 56 и 75; 56 и 76; 56 и 77;

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое связывается с тем же самым или перекрывающимся эпитопом LAG-3 (например, эпитопом LAG-3 человека), как антитело, описанное в данном документе, например антитело, содержащее тяжелый и легкий аминокислотные последовательности варибельной области цепи, представленные в SEQ ID NO:

1 и 2; 3 и 4; 5 и 6; 7 и 8; 9 и 10; 11 и 12; 13 и 10; 14 и 10; 15 и 16; 17 и 18; 19 и 8; 20 и 21; 22 и 23; 24 и 10; 9 и 25; 9 и 26; 20 и 2; 27 и 28; 29 и 30; 31 и 32; 33 и 34; 35 и 10; 36 и 37; 38 и 21; 39 и 40; 9 и 2; 9 и 41; 42 и 43; 9 и 44; 45 и 32; 46 и 47; 48 и 10; 20 и 49; 33 и 50; 51 и 52; 53 и 8; 38 и 2 или 54 и 55 соответственно. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое связывается с тем же самым или перекрывающимся эпитопом LAG-3 (например, эпитопом LAG-3 человека), как антитело, описанное в данном документе, например антитело, содержащее тяжелый и легкий аминокислотные последовательности варибельной области цепи, представленные в SEQ ID NO: 56 и 73; 56 и 74; 56 и 75; 56 и 76; 56 и 77; 57 и 73; 57 и 74; 57 и 75; 57 и 76; 57 и 77; 58 и 73; 58 и 74; 58 и 75; 58 и 76; 58 и 77; 59 и 73; 59 и 74; 59 и 75; 59 и 76; 59 и 77; 60 и 73; 60 и 74; 60 и 75; 60 и 76; 60 и 77; 61 и 77; 62 и 77; 63 и 73; 64 и 73; 65 и 73; 220 и 73; 65 и 221; 220 и 221; 66 и 73; 67 и 73; 68 и 73; 69 и 73; 70 и 73; 71 и 73 или 72 и 73 соответственно. В некоторых вариантах осуществления эпитоп антитела, может быть определен, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore®), исследований рентгеновской дифракционной кристаллографии, анализов ELISA, обмена водород/дейтерий в сочетании с масс-спектрометрией (например, масс-спектрометрией с жидкостной хроматографией, электрораспылительной масс-спектрометрией), матричным анализом на основе олигопептидного сканирования и/или картирование мутагенеза (например, картирование сайт-направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии кристаллизация может быть выполнена с использованием любого из известных в данной области методов (например, Giegé R et al., (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Кристаллы антитело:антиген могут быть изучены с использованием хорошо известных методов дифракции рентгеновских лучей и могут быть уточнены с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, распространяется Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth Enzymol* (1985) vol. 114 & 115, eds Wyckoff HW et al.; публикация США № 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49 (Pt. 1):37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P et al., (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323), все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Исследования картирования мутагенеза могут быть выполнены с использованием любого метода, известного специалисту в данной области техники. См., например, Champe M et al., (1995) выше и Cunningham BC & Wells JA (1989) выше для описания методов мутагенеза, включая методы мутагенеза аланинового сканирования. В конкретном варианте осуществления эпитоп антитела определяют с использованием исследований аланинового сканирующего мутагенеза. Кроме того, антитела, которые распознают и связываются с одинаковыми или перекрывающимися эпитопами LAG-3 (например, LAG-3 человека), могут быть идентифицированы с помощью рутинных методов, таких как иммуноанализ, например, путем демонстрации способности одного антитела к блокировать связывание другого антитела с антигеном-мишенью, т.е. анализ конкурентного связывания. Анализы конкурентного связывания также можно использовать для определения того, имеют ли два антитела сходную специфичность связывания эпитопа. Конкурентное связывание может быть определено в анализе, в котором тестируемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как LAG-3 (например, LAG-3 человека). Известны многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуоферментный анализ (EIA), сэндвич-конкурентный анализ (см. Stahl C et al., (1983) *Methods Enzymol* 9: 242-253); твердофазный прямой биотин-авидин EIA (см. Kirkland TN et al., (1986) *J Immunol* 137: 3614-9); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный анализ с прямым мечением (см. Harlow E & Lane D, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный RIA с прямым мечением с использованием метки I-125 (см. Morel GA et al., (1988) *Mol Immunol* 25(1): 7-15); твердофазный EIA с прямым мечением (см. Cheung RC et al., (1990) *Virology* 176: 546-52) и RIA с прямым мечением (см. Moldenhauer G et al., (1990) *Scand J Immunol* 32: 77-82), все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Обычно такой анализ включает использование очищенного антигена (например, LAG-3, такого как LAG-3 человека), связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих любой из них, немеченый тестовый иммуноглобулин и меченый контрольный иммуноглобулин. Конкурентное ингибирование может быть измерено путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого иммуноглобулина. Обычно тест на иммуноглобулин присутствует в избытке. Обычно, когда конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно будет ингибировать специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или более. Анализ конкурентного связывания может быть сконфигурирован в большом количестве различных форматов с использованием либо меченого антигена, либо меченого антитела. В обычной версии этого анализа антиген иммобилизован на 96-луночном планшете. Способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител с антигеном затем измеряют с использованием радиоактивных или ферментных меток. Для получения дополнительной информации см., например, Wagener C et al., (1983) *J Immunol* 130: 2308-2315; Wagener C et al., (1984) *J Immunol Methods* 68: 269-274; Kuroki M

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 187, 228, 188, 189, 190 или 191, необязательно, при этом аминокислотный остаток в положении 1 легкой цепи превращен в пироглутамат. В определенных вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 187. В определенных вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 228. В определенных вариантах осуществления X в SEQ ID NO: 228 представляет собой E. В определенных вариантах осуществления X в SEQ ID NO: 228 представляет собой пироглутамат. В определенных вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 188. В определенных вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность,

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело, содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 192, 193, 194, 195, 196, 197, 208 или 209. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело, содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело, содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело, содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело, содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219.

- 72 -

ные замены) вводят в Fc-область антитела, описанного в данном документе (например, домен CH2 (остатки 231-340 IgG₁ человека) и/или домен CH3 (остатки 341-447 IgG₁ человека) и/или шарнирную область, нумерованную в соответствии с системой нумерации EU для изменения одного или более функциональных свойств антитела, таких как период полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или антиген-зависимая клеточная цитотоксичность.

В определенных вариантах осуществления одну, две или более мутаций (например, аминокислотные замены) вводят в шарнирную область Fc-области (домен CH1) так, что количество остатков цистеина в шарнирной области изменяется (например, увеличено или уменьшено), как описано, например, в патенте США № 5677425. Количество остатков цистеина в шарнирной области домена CH1 может быть изменено, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для изменения (например, увеличения или уменьшения) стабильности антитела.

В конкретном варианте осуществления одну, две или более аминокислотных мутаций (например, замен, инсерций или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно фрагмент домена Fc или шарнир-Fc) для изменения (например, уменьшения или увеличения) периода полужизни антитела *in vivo*. См., например, международные публикации № WO 02/060919; WO 98/23289 и WO 97/34631, и патенты США № 5869046, 6121022, 6277375 и 6165745, все из которых включены в данное описание в качестве ссылки в полном объеме, для примеров мутаций, которые изменяют (например, уменьшают или увеличивают) период полужизни антитела *in vivo*. В определенных вариантах осуществления одну, две или более аминокислотных мутаций (например, замен, инсерций или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно фрагмент домена Fc или шарнир-Fc) для уменьшения периода полужизни антитела *in vivo*. В других вариантах осуществления одну, две или более аминокислотных мутаций (например, замен, инсерций или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно фрагмент домена Fc или шарнир-Fc) для увеличения периода полужизни антитела *in vivo*. В конкретном варианте осуществления антитела могут иметь одну или более аминокислотных мутаций (например, замен) во втором константном (CH2) домене (остатки 231-340 IgG₁ человека) и/или в третьем константном (CH3) домене (остатки 341-447 IgG₁ человека), пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В конкретном варианте осуществления константная область IgG₁ антитела, описанного в данном документе, содержит замену метионина (M) на тирозин (Y) в положении 252, замену серина (S) на треонин (T) в положении 254 и треонин (T) заменой глутаминовой кислоты (E) в положении 256, пронумерованной в соответствии с системой нумерации EU. См. патент США № 7658921, который полностью включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме. Было показано, что этот тип мутантного IgG, называемого "мутантом YTE", проявляет четырехкратное увеличение периода полужизни по сравнению с версиями того же антитела дикого типа (см. Dall'Acqua WF et al., (2006) J Biol Chem. 281: 23514-24, которая включена в данное описание посредством ссылки в полном объеме). В определенных вариантах осуществления антитело содержит константный домен IgG, содержащий одну, две, три или более аминокислотных замен аминокислотных остатков в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления, одну, две или более мутаций (например, аминокислотные замены) вводят в Fc-область антитела, описанного в данном документе (например, домен CH2 (остатки 231-340 IgG₁ человека) и/или домен CH3 (остатки 341-447 IgG₁ человека) и/или шарнирную область, нумерованную в соответствии с системой нумерации EU для увеличения или уменьшения сродства антитела к Fc-рецептору (например, активированному Fc-рецептору) на поверхности эффекторной клетки. Мутации в Fc-области антитела, которые уменьшают или увеличивают сродство антитела к Fc-рецептору, и способы введения таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент известны специалисту в данной области техники. Примеры мутаций в Fc-рецепторе антитела, которые могут быть сделаны для изменения аффинности антитела к Fc-рецептору, описаны, например, в Smith P et al., (2012) PNAS 109: 6181-6186, патенте США № 6737056, и международных публикациях № WO 02/060919; WO 98/23289 и WO 97/34631, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В дополнительном варианте осуществления одну, две или более аминокислотных замен вводят в Fc-область константного домена IgG, чтобы изменить эффекторную функцию(и) антитела. Например, одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU, можно заменить другим аминокислотным остатком, так что антитело получит измененную аффинность к эффекторному лиганду, но сохранит антигенсвязывающую способность родительского антитела. Эффекторный лиганд, к которому изменяется аффинность, может быть, например, Fc-рецептором или компонентом комплемента C1. Этот подход более подробно описан в патентах США № 5624821 и 5648260, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или других средств) домена константной области может снизить связывание Fc-рецептора циркулирующего антитела, тем самым увеличивая локализацию опухоли. См., например, патенты США № 5585097 и 8591886, каждый из которых включен в данное описание посредством ссылки в полном объеме, для описания мутаций, которые удаляют или инактивируют кон-

стантный домен и тем самым увеличивают локализацию опухоли. В определенных вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен могут быть введены в Fc-область антитела, описанного в данном документе, для удаления потенциальных сайтов гликозилирования в Fc-области, которые могут снижать связывание с Fc-рецептором (см., например, Shields RL et al., (2001) J Biol Chem 276: 6591-604, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме). В различных вариантах осуществления может быть осуществлена одна или более из следующих мутаций в константной области антитела, описанного в данном документе: замена N297A; замена N297Q; замена L235A и замена L237A; замена L234A и замена L235A; замена E233P; замена L234V; замена L235A; удаление C236; замена P238A; замена D265A; замена A327Q; или замена P329A, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления мутация, выбранная из группы, состоящей из D265A, P329A и их комбинации, может быть осуществлена в константной области антитела, описанного в данном документе.

В конкретном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, содержит константный домен IgG₁ с аминокислотной заменой N297Q или N297A, пронумерованный в соответствии с системой нумерации EU. В одном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, содержит константный домен IgG₁ с мутацией, выбранной из группы, состоящей из D265A, P329A и их комбинации, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU. В другом варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, содержит константный домен IgG₁ с мутацией, выбранной из группы, состоящей из L234A, L235A и их комбинации, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления аминокислотные остатки в константной области антитела, описанные в данном документе, в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG₁ человека, пронумерованные в соответствии с индексом нумерации EU, не являются L, L и D соответственно. Этот подход подробно описан в международной публикации № WO 14/108483, которая полностью включена в данное описание посредством ссылки. В конкретном варианте осуществления аминокислоты, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG₁ человека, представляют собой F, E и A; или A, A и A соответственно.

В определенных вариантах осуществления одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322 в константной области антитела, описанной в данном документе, пронумерованной в соответствии с системой нумерации EU, можно заменить другим аминокислотным остатком, так что антитело получит измененное связывания C1q и/или уменьшит или отменит комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Этот подход более подробно описан в патентах США № 6194551 (Idusogie et al.), который включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления один или более аминокислотных остатков в аминокислотных положениях с 231 по 238 в N-концевой области домена CH2 антитела, описанного в данном документе, изменены, чтобы тем самым изменить способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход подробно описан в международной публикации № WO 94/29351, которая полностью включена в данное описание посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления Fc-область антитела, описанного в данном документе, модифицирована для увеличения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для увеличения аффинности антитела к рецептору Fcγ путем мутации одной или более аминокислоты (например, вводя аминокислотные замены) 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, 328, 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, пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. Этот подход подробно описан в международной публикации № WO 00/42072, которая полностью включена в данное описание посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, содержит константную область антитела IgG₄, и серин в аминокислотном остатке 228 тяжелой цепи, пронумерованный в соответствии с системой нумерации EU, замененный на пролин. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело, содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196. В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем антитело, содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197.

В определенных вариантах осуществления любые мутации или модификации константной области, описанные в данном документе, могут быть введены в одну или обе константные области тяжелой цепи антитела, описанного в данном документе, имеющего две константные области тяжелой цепи.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и функционирует в качестве антагониста.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу,

которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и снижает активность LAG-3 (например, LAG-3 человека) по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, оцениваемые способами, описанными в данном документе и/или известными специалисту в данной области техники, относительно активности LAG-3 (например, LAG-3 человека) без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антитело, которое специфически не связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека)).

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и снижает активность LAG-3 (например, LAG-3 человека) в по меньшей мере около 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз, что оценивается способами, описанными в данном документе и/или известными специалисту в данной области техники, относительно LAG-3 (например, LAG-3 человека) активность без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антитело, которое специфически не связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека)). Неограничивающие примеры активности LAG-3 (например, LAG-3 человека) могут включать LAG-3 (например, LAG-3 человека) сигналинг, LAG-3 (например, LAG-3 человека) связывание с лигандом LAG-3 (например, LAG-3 человека) (например, ГКГС класса II), и ингибирование продукции цитокинов (например, IL-2 и/или TNF- α). В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и дезактивирует, снижает или ингибирует активность LAG-3 (например, LAG-3 человека). В конкретных вариантах осуществления снижение активности LAG-3 (например, LAG-3 человека) оценивают, как описано в примерах ниже.

В конкретных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и уменьшает связывание LAG-3 (например, LAG-3 человека) с его лигандом (например, ГКГС класса II) на по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, как оценивается с помощью способов, описанных в данном документе (см. примеры ниже), или известных специалисту в данной области техники, относительно LAG-3 (например, LAG-3 человека) связывается со своим лигандом (например, ГКГС класса II) без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека)). В конкретных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и уменьшает связывание LAG-3 (например, человеческого LAG-3) с его лигандом (например, ГКГС класса II) в по меньшей мере около 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, что оценивают с помощью способов, описанных в данном документе (см. примеры ниже) или известных специалисту в данной области техники, относительно связывания LAG-3 (например, LAG-3 человека) с его лигандом (например, ГКГС класса II) без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека)).

В конкретных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и увеличивает продукцию цитокинов (например, IL-2 и/или TNF- α) на по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, как оценивается с помощью способов, описанных в данном документе (см. примеры ниже) или известных специалисту в данной области техники, относительно продукции цитокинов без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека)). В конкретных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и увеличивает продукцию цитокинов (например, IL-2 и/или TNF- α) в по меньшей мере около 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, что оценивают с помощью способов, описанных в данном документе (см. примеры ниже) или известных специалисту в данной области техники, относительно продукции цитокинов без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека)).

В конкретных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и либо отдельно, либо в сочетании с антителом против PD-1 (например, пембролизумабом или ниволумабом), антителом против PD-L1 (например, авелумаб, дурвалумаб или атезолизумаб) или антителом против CTLA-4 (например, ипилимумаб) увеличивает продукцию IL-2 в мононуклеарных клетках периферической крови человека (МПКК) в ответ на стимуляцию энтеротоксином А стафилококка (SEA) в по меньшей мере около 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз, что оценивают с помощью способов, описанных в данном документе (см. примеры ниже) или известных специалисту в данной области техники, относительно продукции IL-2 без какого-либо антитела или с неродственным антителом.

(например, антителом, которое специфически не связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека)).

В определенных вариантах осуществления моноклеарные клетки периферической крови человека (МКПК), стимулированные энтеротоксином А стафилококка (SEA) в присутствии антитела, описанного в данном документе, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), имеют повышенный уровень продуцирования IL-2 в по меньшей мере около 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз, что оценивают с помощью способов, описанных в данном документе (см. примеры ниже) или известных специалисту в данной области техники, относительно PBMC стимулированных только SEA без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека)), как оценивается способами, описанными в данном документе (см. примеры ниже) или известными специалисту в данной области техники.

В конкретных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и либо отдельно, либо в сочетании с антителом против PD-1 (например, пембролизумабом или ниволумабом) увеличивает продукцию TNF α в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TIL) в ответ на стимуляцию антител против CD3 и антител против CD28 в по меньшей мере около 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз, что оценивают с помощью способов, описанных в данном документе (см. примеры ниже) или известных специалисту в данной области техники, относительно продукции TNF α без какого-либо антитела, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека). В одном варианте осуществления TIL представляют собой опухоль почечно-клеточной карциномы. В другом варианте осуществления TIL представляют собой опухоль колоректального рака.

В некоторых вариантах осуществления лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL), стимулированные антителами против CD3 и против CD28 в присутствии антитела, описанного в данном документе, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), имеют повышенное продуцирование TNF α в по меньшей мере около 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз относительно TIL, стимулированных только антителами против CD3 и против CD28 без антитела, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), как оценивают с помощью способов, описанных в данном документе (см. примеры ниже) или известных специалисту в данной области техники. В одном варианте осуществления TIL представляют собой опухоль почечно-клеточной карциномы. В другом варианте осуществления TIL представляют собой опухоль колоректального рака.

6.3. Фармацевтические композиции.

В данном документе представлены композиции (например, фармацевтические композиции), содержащие антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанное в данном документе, имеющее желаемую степень чистоты в физиологически приемлемом носителе, наполнителе или стабилизаторе (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сыrovоточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEENTM, PLURONICSTM или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В определенных вариантах осуществления композиция содержит одно или более антител против LAG-3 (например, LAG-3 человека), как описано в данном документе, где в части антител N-концевой аминокислотный остаток (остатки) тяжелой цепи и/или легкой цепи был превращен в пироглутамат (например, как результат посттрансляционной циклизации свободной аминогруппы N-концевого остатка E или Q). В определенных вариантах осуществления N-концевой аминокислотный остаток по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%) тяжелых цепей в композиции был превращен в пироглутамат. В определенных вариантах осуществления N-концевой аминокислотный остаток не более чем 50% (например, не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 40%) легких цепей в композиции был превращен в пироглутамат. В определенных вариантах осуществления N-концевой аминокислотный остаток по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%) тяжелых цепей в композиции было превращено в пироглутамат, а N-концевой аминокислотный остаток не более чем 50% (например, не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25,

30 или 40%) легких цепей в композиции были превращены в пироглутамат.

В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции содержат антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанное в данном документе, и, необязательно, один или более дополнительных профилактических или терапевтических агентов в фармацевтически приемлемом носителе. В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции содержат эффективное количество антитела, описанного в данном документе, и, необязательно, один или более дополнительных профилактических или терапевтических агентов в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления антитело является единственным активным ингредиентом, включенным в фармацевтическую композицию. Описанные в данном документе фармацевтические композиции могут быть полезны для ингибирования активности LAG-3 (например, LAG-3 человека) и лечения состояния, такого как рак или инфекционное заболевание.

Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают водные носители, неводные носители, антимикробные агенты, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие агенты, эмульгирующие агенты, изолирующие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных носителей включают инъекционный раствор хлорида натрия, инъекционный раствор Рингера, инъекционный раствор изотонической декстрозы, стерильную воду для инъекций, инъекционный раствор декстрозы и лактата Рингера. Неводные парентеральные носители включают жирные масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. Антимикробные агенты в бактериостатических или фунгистатических концентрациях могут быть добавлены к парентеральным препаратам, упакованным в контейнеры с несколькими дозами, которые включают фенолы или крезолы, ртутные соединения, бензиловый спирт, эфиры хлорбутанола, метил и пропил п-гидроксибензойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Изотонические агенты включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфатный и цитратный. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают гидрохлорид прокаина. Суспендирующие и диспергирующие агенты включают натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгирующие агенты включают полисорбат 80 (TWEEN® 80). Секвестрирующий или хелатообразующий агент ионов металлов включает ЭДТА. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешивающихся с водой носителей; и гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для регулирования pH.

Фармацевтическая композиция может быть составлена для любого пути введения субъекту. Конкретные примеры путей введения включают интраназальный, пероральный, легочный, трансдермальный, интрадермальный и парентеральный.

Парентеральное введение, характеризующееся либо подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекцией, также рассматривается в данном документе. Инъекционные препараты могут быть приготовлены в обычных формах, либо в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для раствора или суспензии в жидкости перед инъекцией, либо в виде эмульсий. Инъекционные, растворы и эмульсии также содержат один или более эксципиентов. Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин или этанол. Кроме того, если желательно, фармацевтические композиции для введения могут также содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-буферные агенты, стабилизаторы, усилители растворимости и другие такие агенты, как, например, натрий, ацетат, сорбитанмолаурат, триэтаноламин олеат и циклодекстрины.

Препараты для парентерального введения антитела включают стерильные растворы, готовые к инъекции, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые к объединению с растворителем непосредственно перед использованием, включая таблетки для подкожных инъекций, стерильные суспензии, готовые к инъекции, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые к использованию вместе с носителем непосредственно перед использованием и стерильные эмульсии. Растворы могут быть водными или неводными.

При внутривенном введении подходящие носители включают физиологический солевой раствор или физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS) и растворы, содержащие загущающие и солюбилизующие агенты, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль, и их смеси.

Смеси для местного применения, содержащие антитело, готовят, как описано для местного и системного введения. Полученная смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию или тому подобное и может быть составлена в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, настоек, паст, пен, аэрозолей, ирригационных средств, спреев, суппозитория, повязок, кожных пластырей или любых других составов, подходящих для местного применения.

Антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанное в данном документе, может быть приготовлено в виде аэрозоля для местного применения, например, путем ингаляции (см., например, патенты США № 4044126, 4414209 и 4364923, которые описывают аэрозоли для поставка стероида, полезного для лечения воспалительных заболеваний, в частности астмы, и включенных посредством ссылки в

полном объеме). Эти составы для введения в дыхательные пути могут быть в форме аэрозоля или раствора для небулайзера или в виде мелкодисперсного порошка для инсуффляций, отдельно или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы препарата в одном варианте осуществления будут иметь диаметры менее 50 микрон, в одном варианте осуществления менее 10 микрон.

Описанное в данном документе антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека) может быть приготовлено для местного или локального применения, например, для местного применения на коже и слизистых оболочках, таких как глаза, в форме гелей, крема и лосьона и для нанесения на глаза, или для интрацестерального или интраспинального применения. Местное введение предназначено для трансдермальной доставки, а также для введения в глаза или слизистую оболочку или для ингаляционной терапии. Можно также вводить назальные растворы антитела отдельно или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Чрескожные пластыри, включая ионофоретические и электрофоретические устройства, хорошо известны специалистам в данной области техники и могут использоваться для введения антитела. Например, такие пластыри раскрыты в патентах США № 6267983, 6261595, 6256533, 6167301, 6024975, 6010715, 5985317, 5983134, 5948433 и 5860957, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая антитело, описанное в данном документе, представляет собой лиофилизированный порошок, который может быть восстановлен для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Это может также быть восстановлено и сформулировано как твердые вещества или гели. Лيوфилизированный порошок получают растворением антитела, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемого производного в подходящем растворителе. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный порошок является стерильным. Растворитель может содержать эксципиент, который улучшает стабильность, или другой фармакологический компонент порошка или восстановленного раствора, приготовленного из порошка. Эксципиенты, которые могут быть использованы, включают, но не ограничиваются ими, декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другой подходящий агент. Растворитель может также содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия, или другой такой буфер, известный специалистам в данной области техники, в одном варианте осуществления с приблизительно нейтральным pH. Последующая стерильная фильтрация раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области техники, дает желаемый состав. В одном варианте осуществления полученный раствор будет распределен во флаконы для лиофилизации. Каждый флакон будет содержать одну дозу или несколько доз соединения. Лيوфилизированный порошок можно хранить в подходящих условиях, например при температуре от около 4°C до комнатной температуры. Восстановление этого лиофилизированного порошка водой для инъекций обеспечивает состав для применения при парентеральном введении. Для восстановления лиофилизированный порошок добавляют в стерильную воду или другой подходящий носитель. Точное количество зависит от выбранного соединения. Такое количество может быть определено опытным путем.

Антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанные в данном документе, и другие композиции, представленные в данном документе, также могут быть составлены так, чтобы быть нацеленными на конкретную ткань, рецептор или другую область тела субъекта, подлежащего лечению. Многие такие способы нацеливания хорошо известны специалистам в данной области техники. Все такие способы нацеливания рассматриваются в данном документе для использования в быстрорастворимых композициях. Неограничивающие примеры способов нацеливания см., например, в патентах США № 6316652, 6274552, 6271359, 6253872, 6139865, 6131570, 6120751, 6071495, 6060082, 6048736, 6039975, 6004534, 5985307, 5972366, 5900252, 5840674, 5759542 и 5709874, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В конкретном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, нацелено на опухоль.

Композиции, используемые для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Это легко достигается путем фильтрации через, например, стерильные фильтрующие мембраны.

6.4. Способы использования и применение.

В другом аспекте данное изобретение относится к способу лечения субъекта с использованием антител против LAG-3 (например, LAG-3 человека), раскрытых в данном документе. Любое заболевание или расстройство у субъекта, которое получило бы пользу от ингибирования функции LAG-3 (например, LAG-3 человека), можно лечить с использованием антител против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанных в данном документе. Антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека), раскрытые в данном документе, особенно полезны для ингибирования устойчивости иммунной системы к опухолям и, соответственно, могут использоваться в качестве иммунотерапии для субъектов, больных раком. Например, в определенных вариантах осуществления данное изобретение предоставляет способ увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека) или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления данное изобрете-

ние относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, как описано в данном документе.

Раки, которые можно лечить с помощью антител против LAG-3 (например, LAG-3 человека) или фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе, включают, без ограничения, солидную опухоль, гематологический рак, лейкоз, лимфому, остеосаркому, рабдомиосаркому, нейробластому, рак почки, рак почечных переходных клеток, рак мочевого пузыря, рак Вильма, рак яичников, панкреатический рак, рак молочной железы (например, характеризующийся мутацией в BRCA1 и/или BRCA2), рак простаты, рак кости, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого), рак желудка, колоректальный рак, рак шейки матки, синовиальную саркому, рак головы и шеи, плоскоклеточный рак, множественную миелому, почечно-клеточный рак, ретинобластому, гепатобластому, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, рабдоидную опухоль почки, саркому Юинга, хондросаркому, рак мозга, глиобластому, менингиому, аденому гипофиза, вестибулярную шванному, примитивную нейроэктодермальную опухоль, медуллобластому, астроцитому, анапластическую астроцитому, олигодендроглиому, эпендимому, папилломы сосудистой оболочки, полицитемию вера, тромбоцитемию, идиопатический миелфиброз, саркому мягких тканей, рак щитовидной железы, рак эндометрия, рак карциноида, рак печени, рак эпителия и рак брюшины. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой метастатический рак, например, разновидностей, описанных выше.

В определенных вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль, гематологический рак (например, лейкоз, лимфому, миелому) и их метастатическое поражение. В одном варианте осуществления рак представляет собой солидную опухоль. Примеры солидных опухолей включают злокачественные новообразования, например саркомы и карциномы (например, аденокарциномы) различных систем органов, такие как поражающие легкие, молочную железу, лимфоидные, желудочно-кишечные или колоректальные, половые органы и мочеполовые пути (например, клетки почек, уротелия, мочевого пузыря), глотка, ЦНС (например, мозг, нервные или глиальные клетки), кожа (например, меланома), голова и шея (например, плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSC)) и поджелудочная железа. Например, меланома, рак толстой кишки, рак желудка, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак, рак молочной железы (например, рак молочной железы, который не экспрессирует один, два или все рецепторы эстрогена, рецептор прогестерона или Her2/neu, например, тройной негативный рак молочной железы), рак печени, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого (HNSC)) (например, HNSC с плоскоклеточной и/или плоскоклеточной гистологией) или мелкоклеточный рак легкого), рак простаты, рак головы и шеи (например, ВПЧ+ плоскоклеточный рак), рак тонкой кишки и рак пищевода.

В одном варианте осуществления рак представляет собой гематологический рак, например лейкоз, лимфому или миелому. В одном варианте осуществления рак представляет собой лейкоз, например, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый миелогенный лейкоз (ОМЛ), острый миелобластный лейкоз (ОМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), хронический миелоид лейкоз (ХМЛ), хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) или волосатоклеточный лейкоз. В одном варианте осуществления рак представляет собой лимфому, например, В-клеточную лимфому, диффузную крупную В-клеточную лимфому (DLBCL), активированную В-клеточную (ABC) диффузную крупную В-клеточную лимфому, В-клеточный зародышевый центр (ГКБ), диффузную большую В-клеточную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рецидивирующую неходжкинскую лимфому, рефрактерную неходжкинскую лимфому, рецидивирующую фолликулярную неходжкинскую лимфому, лимфому

Беркитта, малую лимфатическую лимфому, фолликулярную лимфому, лимфопластическую лимфому или внеузловую лимфому краевой зоны. В одном варианте осуществления рак представляет собой миелому, например множественную миелому.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к способу профилактики или лечения инфекционного заболевания у субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека) или его фармацевтической композиции, как раскрыто в данном документе. В одном варианте осуществления в данном документе предложены способы предотвращения и/или лечения инфекции (например, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции, инфекции, вызванной простейшими или паразитарной инфекции). Инфекция, предотвращаемая и/или лечаемая в соответствии со способами, может быть вызвана инфекционным агентом, идентифицированным в данном документе. В конкретном варианте осуществления антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанное в данном документе, или его композиция является единственным активным агентом, вводимым субъекту. В некоторых вариантах осуществления антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанное в данном документе, или его композиция используется в комбинации с противоифекционными вмешательствами (например, противовирусными, антибактериальными, противогрибковыми или противоглистными средствами) для лечения инфекционных заболеваний.

Инфекционные заболевания, которые можно лечить и/или предотвращать с помощью антител против LAG-3 (например, LAG-3 человека) или фармацевтических композиций, описанных в данном доку-

менте, вызываются инфекционными агентами, включая, но не ограничиваясь ими, бактерии, паразиты, грибки, простейшие и вирусы. В конкретном варианте осуществления инфекционное заболевание, которое лечат или предотвращают при помощи антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человеческого человека) или фармацевтической композиции, раскрытых в данном документе, вызвано вирусом. Вирусные заболевания или вирусные инфекции, которые можно предотвратить и/или лечить в соответствии со способами, описанными в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, заболевания, вызванные гепатитом типа А, гепатитом типа В, гепатитом типа С, гриппом (например, гриппом А или гриппом В), ветряной оспой, аденовирусом, вирусом простого герпеса I типа (HSV-I), вирусом простого герпеса II типа (HSV-II), чумой крупного рогатого скота, риновирусом, эховирусом, ротавирусом, респираторно-синцитиальным вирусом, вирусом папилломы, вирусом папова, цитомегаловирусом, эхиновирусом, арбовирусом, хунтавирусом, вирусом Коксаки, вирусом эпидемического паротита, вирусом кори, вирусом краснухи, вирусом полиомиелита, оспой, вирусом Эпштейна-Барр, вирусом иммунодефицита человека типа I (ВИЧ-I), вирусом иммунодефицита человека типа II (ВИЧ-II) и агенты вирусных заболеваний, таких как вирусный менингит, энцефалит, лихорадка денге или оспа.

Бактериальные инфекции, которые можно предотвратить и/или лечить, включают инфекции, вызываемые *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериальные заболевания, вызываемые бактериями (например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*), которые можно предотвратить и/или лечить в соответствии со способами, описанными в данном документе, включают без ограничения: *Mycobacteria rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (болезнь Лайма), *Bacillus anthracis* (сибирская язва), столбняк, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, микобактерии, коклюш, холеру, чуму, дифтерию, хламидиоз, *S. aureus* и легионеллу.

Протозойные заболевания или протозойные инфекции, вызванные простейшими, которые можно предупреждать и/или лечить в соответствии с описанными в данном документе способами, включают, но не ограничиваются ими, лейшманиоз, кокцидиоз, трипаномоз, шистомоз или малярию. Паразитарные заболевания или паразитарные инфекции, вызванные паразитами, которые можно предотвратить и/или лечить в соответствии со способами, описанными в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, хламидиоз и риккетсию.

Заболевания, вызванные грибами или грибные инфекции, которые можно предотвращать и/или лечить в соответствии со способами, описанными в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, инфекции, вызванные *Candida*, зигомикоз, кандидозный мастит, прогрессирующий диссеминированный трихоспороноз с латентной трихоспорономией, диссеминированный кандидоз, легочные заболевания, паракокцидиомикоз, легочный аспергиллез, пневмоцистную пневмонию, криптококковый менингит, кокцидиоидальный менингоэнцефалит и спинномозговой васкулит, инфекции, вызванные *Aspergillus niger*, *Fusarium keratitis*, микозы параназального синуса, эндокардит, вызванный *Aspergillus fumigatus*, большеберцовую дисхондроплазию, вагинит, вызванный *Candida glabrata*, кандидоз ротоглотки, Х-связанный хронический гранулематоз, дермофитию стопы, кожный кандидоз, микотический плацентит, диссеминированный трихоспороноз, аллергический бронхолегочный аспергиллез, микотический кератит, инфекции, вызванные *Cryptococcus neoformans*, грибковый перитонит, инфекции, вызванные *Curvularia geniculata*, стафилококковый эндофтальмит, споротрихоз и дерматофитоз.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает способ предотвращения или лечения заболевания или расстройства нервной системы у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека) или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе. В некоторых вариантах заболевание или расстройство нервной системы представляет собой синуклеинопатию. В некоторых вариантах заболевание или расстройство нервной системы представляет собой болезнь Паркинсона.

В некоторых вариантах осуществления данные способы дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического агента. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент, радиотерапевтический агент или агент, нацеленный на контрольные точки. В определенных вариантах осуществления химиотерапевтический агент представляет собой гипометилирующий агент (например, азацитидин). В определенных вариантах осуществления агент, нацеленный на контрольные точки, выбирают из группы, состоящей из антагонистического антитела против CTLA-4, антагонистического антитела против PD-L1, антагонистического антитела против PD-L2, антагонистического антитела против PD-1, антагонистического антитела против TIM-3, антагонистического антитела против LAG-3, антагонистического антитела против CEACAM1, агонистического антитела против GITR, агонистического антитела против OX40, антагонистического антитела против TIGIT, агонистического антитела против CD137, антагонистического антитела против VISTA, антагонистического антитела против CD73 и антагонистического антитела против CD96.

В одном варианте осуществления данное изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по данному изобретению для применения в способе по данному изобретению, причем

способ дополнительно включает введение дополнительного терапевтического агента субъекту. В одном варианте осуществления данное изобретение относится к (а) антителу и/или фармацевтической композиции по данному изобретению и (b) дополнительному терапевтическому агенту для применения в качестве лекарственного средства. В одном варианте осуществления данное изобретение относится к (а) антителу и/или фармацевтической композиции по данному изобретению и (b) дополнительному терапевтическому агенту для применения в способе лечения рака. В другом варианте осуществления данное изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или набору частей, содержащему (а) антителу и/или фармацевтическую композицию по данному изобретению и (b) дополнительный терапевтический агент. В одном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент, радиотерапевтический агент или агент, нацеленный на контрольные точки.

В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 используют в способах, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой ниволумаб, также известный как BMS-936558 или MDX1106, разработанный Bristol-Myers Squibb. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой пембролизумаб, также известный как ламбролизумаб или MK-3475, разработанный Merck & Co. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой пидилизумаб, также известный как CT-011, разработанный CureTech. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой MEDI0680, также известный как AMP-514, разработанный Medimmune. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой PDR001, разработанный Novartis Pharmaceuticals. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой REGN2810, разработанный Regeneron Pharmaceuticals. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой PF-06801591, разработанный Pfizer. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой BGB-A317, разработанный BeiGene. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой TSR-042, разработанный AnaptysBio и Tesaro. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой SHR-1210, разработанный Hengrui.

Дополнительные неограничивающие примеры антител против PD-1, которые можно использовать в способах лечения, раскрытых в данном документе, раскрыты в следующих патентах и патентных заявках, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме: патент США № 6808710; патент США № 7332582; патент США № 7488802; патент США № 8008449; патент США № 8114845; патент США № 8168757; патент США № 8354509; патент США № 8686119; патент США № 8735553; патент США № 8747847; патент США № 8779105; патент США № 8927697; патент США № 8993731; патент США № 9102727; патент США № 9205148; публикация США № US 2013/0202623 A1; публикация США № US 2013/0291136 A1; публикация США № US 2014/0044738 A1; публикация США № US 2014/0356363 A1; публикация США № US 2016/0075783 A1 и публикация PCT № WO 2013/033091 A1; публикация PCT № WO 2015/036394 A1; публикация PCT № WO 2014/179664 A2; публикация PCT № WO 2014/209804 A1; публикация PCT № WO 2014/206107 A1; публикация PCT № WO 2015/058573 A1; публикация PCT № WO 2015/085847 A1; публикация PCT № WO 2015/200119 A1; публикация PCT № WO 2016/015685 A1 и публикация PCT № WO 2016/020856 A1.

В определенных вариантах осуществления антитело против PD-L1 используют в способах, раскрытых в данном документе. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-L1 представляет собой атезолизумаб, разработанный Genentech. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-L1 представляет собой дурвалумаб, разработанный AstraZeneca, Celgene и Medimmune. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-L1 представляет собой авелумаб, также известный как MSB0010718C, разработанный Merck Serono и Pfizer. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-L1 представляет собой MDX-1105, разработанный Bristol-Myers Squibb. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-L1 представляет собой AMP-224, разработанный Amplimmune и GSK.

Неограничивающие примеры антител против PD-L1, которые можно использовать в способах лечения, раскрытых в данном документе, раскрыты в следующих патентах и патентных заявках, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме: патент США № 7943743; патент США № 8168179; патент США № 8217149; патент США № 8552154; патент США № 8779108; патент США № 8981063; патент США № 9175082; публикация США № US 2010/0203056 A1; публикация США № US 2003/0232323 A1; публикация США № US 2013/0323249 A1; публикация США № US 2014/0341917 A1; публикация США № US 2014/0044738 A1; публикация США № US 2015/0203580 A1; публикация США № US 2015/0225483 A1; публикация США № US 2015/0346208 A1; публикация США № US 2015/0355184 A1 и публикация PCT № WO 2014/100079 A1; публикация PCT № WO 2014/022758 A1; публикация PCT № WO 2014/055897 A2; публикация PCT № WO 2015/061668 A1; публикация PCT № WO 2015/109124 A1; публикация PCT № WO 2015/195163 A1; публикация PCT № WO 2016/000619 A1 и публикация PCT № WO 2016/030350 A1.

В определенных вариантах осуществления антитело против CTLA-4 используют в способах, раскрытых в данном документе. В определенных вариантах осуществления антитело против CTLA-4 пред-

ставляет собой ипилимумаб, разработанный Bristol-Myers Squibb. В определенных вариантах осуществления антитело против CTLA-4 представляет собой ипилимумаб, разработанный Bristol-Myers Squibb. В определенных вариантах осуществления антитело против CTLA-4 представляет собой тремелимумаб, разработанный Pfizer и Medimmune.

Неограничивающие примеры антител против CTLA-4, которые можно использовать в способах лечения, раскрытых в данном документе, раскрыты в следующих патентах и патентных заявках, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме: патент США № 6984720; патент США № 7411057; патент США № 7034121; патент США № 8697845; публикация США № US 2009/0123477 A1; публикация США № US 2014/0105914 A1; публикация США № US 2013/0267688 A1; публикация США № US 2016/0145355 A1; публикация PCT № WO 2014/207064 A1 и публикация PCT № WO 2016/015675 A1.

В определенных вариантах осуществления антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), раскрытое в данном документе, вводят субъекту в комбинации с соединением, которое нацелено на иммуномодулирующий фермент(ы), такой как IDO (индоламин-(2,3)-диоксигеназа) и/или TDO (триптофан-2,3-диоксигеназа). В определенных вариантах осуществления такое соединение выбрано из группы, состоящей из эпикадостата (Incyte Corp; см., например, WO 2010/005958 которая полностью включена в данное описание посредством ссылки), BMS-986205 (Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb), индоксимод (NewLink Genetics) и NLG919 (NewLink Genetics). В одном варианте осуществления соединение представляет собой эпикадостат. В другом варианте осуществления соединения представляет собой BMS-986205. В другом варианте осуществления соединения представляет собой индоксимод. В другом варианте осуществления соединения представляет собой NLG919. В конкретном варианте осуществления антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), раскрытое в данном документе, вводят субъекту в комбинации с ингибитором IDO для лечения рака. Ингибитор IDO, как описано в данном документе для применения при лечении рака, присутствует в твердой лекарственной форме фармацевтической композиции, такой как таблетка, пилюля или капсула, причем фармацевтическая композиция включает ингибитор IDO и фармацевтически приемлемый эксципиент. Как таковое, антитело, как описано в данном документе, и ингибитор IDO, как описано в данном документе, можно вводить отдельно, последовательно или одновременно в виде отдельных лекарственных форм. В одном варианте осуществления антитело вводят парентерально, а ингибитор IDO вводят перорально. В конкретных вариантах осуществления ингибитор выбран из группы, состоящей из эпикадостата (Incyte Corporation), BMS-986205 (Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb), индоксимода (NewLink Genetics) и NLG919 (NewLink Genetics). Эпикадостат описан в публикации PCT № WO 2010/005958, которая полностью включена в данное описание посредством ссылки. В одном варианте осуществления ингибитор представляет собой эпикадостат. В другом варианте осуществления ингибитор представляет собой BMS-986205. В другом варианте осуществления ингибитор представляет собой индоксимод. В другом варианте осуществления ингибитор представляет собой NLG919.

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека) в комбинации с антителом против PD-1 (например, пембролизумабом или ниволумабом) и ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой пембролизумаб. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой ниволумаб. В определенных вариантах осуществления ингибитор IDO выбирают из группы, состоящей из эпикадостата, BMS-986205, индоксимода и NLG919. В определенных вариантах осуществления ингибитор IDO представляет собой эпикадостат. В определенных вариантах осуществления ингибитор IDO представляет собой BMS-986205. В определенных вариантах осуществления ингибитор IDO представляет собой индоксимод.

В определенных вариантах осуществления антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), раскрытое в данном документе, вводят субъекту в комбинации с другим противораковым агентом. Типичные противораковые агенты включают антитела, такие как трастузумаб (герцептин), антитела к костимулирующим или коингибирующим молекулам, таким как CTLA-4, CD137 и PD-1, и антитела к цитокинам, таким как IL-10 и TGF- β .

В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор JAK, PI3Kdelta, BRD, PI3Kgamma или Axl/Mer. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор JAK, включая JAK1 и/или JAK2. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор PI3Kdelta. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор BRD. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор PI3Kgamma. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор Axl/Mer.

Дополнительные примеры противораковых агентов включают те, которые блокируют миграцию иммунных клеток, такие как антагонисты хемокиновых рецепторов, включая CCR2 и CCR4, и те, которые усиливают иммунную систему, такие как адъюванты или адоптивные переносы T-клеток.

Один или более дополнительных модуляторов иммунной контрольной точки можно использовать в комбинации с антителом против LAG-3 (например, LAG-3 человека), раскрытым в данном документе, для лечения любых заболеваний, расстройств или состояний, описанных в данном документе, например заболеваний, расстройств или патологических состояний, связанных с ТАМ. Типичные модуляторы иммунной контрольной точки включают модуляторы против молекул иммунной контрольной точки, таких как CD27, CD28, CD40, CD122, CD96, CD73, CD47, CD96, CD137, OX40, GITR, CSF1R, JAK, PI3K дельта, PI3K гамма, ТАМ, аргиназа, CD137 (также известный как 4-1BB), ICOS, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT, VISTA, PD-1, PD-L1 и PD-L2. В некоторых вариантах осуществления молекула иммунной контрольной точки представляет собой молекулу костимулирующей контрольной точки, выбранную из CD27, CD28, CD40, ICOS, OX40, GITR и CD137. В некоторых вариантах осуществления молекула иммунной контрольной точки представляет собой коингибирующую молекулу контрольной точки, выбранную из A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR, PD-1, TIM-3 и VISTA. В некоторых вариантах осуществления антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), раскрытое в данном документе, может использоваться в комбинации с одним или более агентами, выбранными из ингибиторов KIR, ингибиторов TIGIT, ингибиторов LAIR1, ингибиторов CD160, ингибиторов 2B4 и ингибиторов TIGIT бета.

В некоторых вариантах осуществления модулятор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой антагонистическое антитело против PD1, антагонистическое антитело против PD-L1 или антагонистическое антитело против CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления модулятор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой агонист GITR, например, агонистическое антитело против GITR. В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело против GITR представляет собой TRX518 или MK-4166.

В некоторых вариантах осуществления модулятор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой агонист OX40, например, агонистическое антитело против OX40 или слитый белок OX40L. В некоторых вариантах осуществления агонистическим антителом против OX40 представляет собой MEDI0562. В некоторых вариантах осуществления слитый белок OX40L представляет собой MEDI6383.

Описанное в данном документе антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека) можно использовать в сочетании с одним или более агентами для лечения таких заболеваний, как рак. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой алкилирующий агент, ингибитор протеасомы, кортикостероид или иммуномодулирующий агент. Примеры алкилирующего агента включают циклофосфамид (CY), мелфалан (MEL) и бендамустин. В некоторых вариантах осуществления ингибитор протеасомы представляет собой карфилзомиб. В некоторых вариантах осуществления кортикостероид представляет собой дексаметазон (DEX). В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий агент представляет собой леналидомид (LEN) или помалидомид (POM).

В определенных вариантах осуществления антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), раскрытое в данном документе, вводят субъекту в комбинации с вакциной. Вакцина может быть, например, пептидной вакциной, ДНК-вакциной или РНК-вакциной. В определенных вариантах осуществления вакцина представляет собой противоопухолевую вакцину на основе белка теплового шока или патогенную вакцину на основе белка теплового шока. В конкретном варианте осуществления антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), раскрытое в данном документе, вводят субъекту в комбинации с противоопухолевой вакциной на основе белка теплового шока. Белки теплового шока (HSP) представляют собой семейство высококонсервативных белков, встречающихся повсеместно среди всех видов. Их экспрессия может быть сильно индуцирована до гораздо более высоких уровней в результате теплового шока или других форм стресса, включая воздействие токсинов, окислительный стресс или депривацию глюкозы. Пять семейств были классифицированы по молекулярной массе: HSP-110, -90, -70, -60 и -28. HSP доставляют иммуногенные пептиды через путь перекрестного представления в антигенпрезентирующих клетках (APC), таких как макрофаги и дендритные клетки (DC), что приводит к активации Т-клеток. HSP функционируют в качестве носителей-шаперонов ассоциированных с опухолью антигенных пептидов, образующих комплексы, способные индуцировать опухолеспецифический иммунитет. После высвобождения из умирающих опухолевых клеток комплексы HSP-антиген поглощаются антигенпрезентирующими клетками (APC), в которых антигены превращаются в пептиды, которые связывают молекулы ГКГС класса I и класса II, что приводит к активации противоопухолевых CD8+ и CD4+ Т-клеток. Иммунитет, вызванный комплексами HSP, полученными из опухолевых препаратов, специфически направлен против уникального антигенного пептидного репертуара, экспрессируемого раком каждого субъекта. Поэтому в одном варианте осуществления данное изобретение относится к (а) антителу и/или фармацевтической композиции по данному изобретению и (b) вакцине для применения в качестве лекарственного средства, например, для применения в способе лечения рака. В одном варианте осуществления данное изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или набору частей, содержащему (а) антителу и/или фармацевтическую композицию по данному изобретению и (b) вакцину. В одном варианте осуществления вакцина представляет собой противоопухолевую вакцину на основе белка теплового шока. В одном варианте осуществления вакцина представляет собой противопатогенную вакцину

на основе белка теплового шока.

Пептидный комплекс белков теплового шока (HSPPC) представляет собой белковый пептидный комплекс, состоящий из белка теплового шока, нековалентно образующего комплекс с антигенными пептидами. HSPPC вызывают как врожденные, так и адаптивные иммунные ответы. В конкретном варианте осуществления антигенный пептид(ы) проявляет антигенность в отношении рака, подлежащего лечению. HSPPC эффективно захватываются APC через мембранные рецепторы (главным образом CD91) или связываются с Toll-подобными рецепторами. Интернализация HSPPC приводит к функциональному созреванию APC с продукцией хемокинов и цитокинов, что приводит к активации естественных клеток-киллеров (NK), моноцитов и Th1 и Th-2-опосредованных иммунных ответов. В определенных вариантах осуществления HSPPC, используемые в способах, раскрытых в данном документе, содержат один или более белков теплового шока из стрессовых белков семейства hsp60, hsp70 или hsp90, образованных в комплексе с антигенными пептидами. В определенных вариантах осуществления HSPPC включают hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, grp96, кальретикулин или комбинации двух или более из них.

В конкретном варианте осуществления пептидный комплекс белка теплового шока (HSPPC) содержит рекомбинантные белки теплового шока (например, hsp70 или hsc70) или его пептидсвязывающий домен, комплексированный с рекомбинантными антигенными пептидами. Рекомбинантные белки теплового шока могут быть получены с помощью технологии рекомбинантной ДНК, например, с использованием последовательности человеческого hsc70, как описано в Dworniczak and Mirault, *Nucleic Acids Res.* 15:5181-5197 (1987) и номер доступа GenBank P11142 и/или Y00371, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме. В определенных вариантах осуществления последовательности Hsp70 являются такими, как описано в Hunt and Morimoto *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (19), 6455-6459 (1985) и номер доступа GenBank P0DMV8 и/или M11717, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме. Антигенные пептиды также могут быть получены методами рекомбинантной ДНК, известными в данной области техники.

В определенных вариантах осуществления антигенные пептиды содержат модифицированную аминокислоту. В определенных вариантах осуществления модифицированная аминокислота содержит посттрансляционную модификацию. В определенных вариантах осуществления модифицированная аминокислота содержит миметик посттрансляционной модификации. В определенных вариантах осуществления модифицированная аминокислота представляет собой Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys или His, которые были фосфорилированы по боковой цепи гидроксила или амина. В определенных вариантах осуществления модифицированная аминокислота представляет собой миметик аминокислоты Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys или His, которые были фосфорилированы по боковой цепи гидроксила или амина.

В конкретном варианте осуществления антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), раскрытое в данном описании, вводят субъекту в комбинации с пептидным комплексом белка теплового шока (HSPPC), например, пептидным комплексом белка теплового шока-96 (HSPPC-96), для лечения рака. HSPPC-96 содержит белок теплового шока (Hsp) 96 кДа, др96, образующий комплекс с антигенными пептидами. HSPPC-96 является иммунотерапией рака, изготовленной из опухоли субъекта, и содержит антигенный "фингерпринт" рака. В некоторых вариантах осуществления этот фингерпринт содержит уникальные антигены, которые присутствуют только в специфических раковых клетках данного конкретного субъекта, и инъекция вакцины предназначена для стимулирования иммунной системы субъекта распознает и атакует любые клетки с определенным раковым фингерпринтом. Следовательно, в одном варианте осуществления данное изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по данному изобретению в сочетании с пептидным комплексом белка теплового шока (HSPPC) для применения в качестве лекарственного средства и/или для применения в способе лечения рака.

В определенных вариантах осуществления HSPPC, например, HSPPC-96, получают из опухолевой ткани субъекта. В конкретном варианте осуществления HSPPC (например, HSPPC-96) получают из опухоли типа рака или его метастазирования, подвергаемого лечению. В другом конкретном варианте осуществления HSPPC (например, HSPPC-96) является аутологичным для субъекта, которого лечат. В определенных вариантах осуществления опухолевая ткань представляет собой некротическую опухолевую ткань. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 1 г (например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 грамм) ткани некротической опухоли используют для получения схемы вакцинации. В определенных вариантах осуществления после хирургической резекции ткань, отличную от некротической опухоли, замораживают перед использованием в препарате вакцины. В некоторых вариантах осуществления HSPPC, например, HSPPC-96, выделяют из опухолевой ткани методами очистки, фильтруют и готовят для инъекционной вакцины. В определенных вариантах осуществления субъекту вводят 6-12 доз HSPPC, например, HSPPC-96. В таких вариантах осуществления дозы HSPPC, например, HSPPC-96, можно вводить еженедельно для первых 4 доз, а затем раз в две недели для 2-8 дополнительных доз.

Дополнительные примеры HSPPC, которые могут быть использованы в соответствии со способами, описанными в данном документе, раскрыты в следующих патентах и патентных заявках, все из которых включены в данное описание посредством ссылки в полном объеме: патенты США № 6391306, 6383492,

6403095, 6410026, 6436404, 6447780, 6447781 и 6610659, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В определенных вариантах осуществления антитело против LAG-3, раскрытое в данном описании, вводят субъекту в комбинации с адъювантом. Различные адъюванты могут быть использованы в зависимости от контекста лечения.

Неограничивающие примеры подходящих адъювантов включают, но не ограничиваются ими, полный адъювант Фрейнда (CFA), неполный адъювант Фрейнда (IFA), монтанид ISA (неполный адъювант Септика), адъювантную систему Рибис (RAS), Titer Max, мурамельные пептиды, состав Syntex-адъюванта (SAF), квасцы (гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия), адъюванты с солью алюминия, адъюванты Gerbu®, антиген, абсорбированный нитроцеллюлозой, инкапсулированный или захваченный антиген, 3 De-O-ацилированный монофосфориллипид А (3 D-MPL) иммуностимулирующие олигонуклеотиды, лиганды толл-подобного рецептора (TLR), лиганды маннан-связывающего лектина (MBL), агонисты STING, иммуностимулирующие комплексы, такие как сапонины, Quil A, QS-21, QS-7, ISCOMATRIX и другие. Другие адъюванты включают олигонуклеотиды CpG и молекулы двухцепочечной РНК, такие как поли (А) и поли (U). Также могут быть использованы комбинации вышеуказанных адъювантов. См., например, патенты США № 6645495; 7029678 и 7858589, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В одном варианте осуществления адъювант, используемый в данном документе, представляет собой QS-21 STIMULON.

В определенных вариантах осуществления антитело против LAG-3, раскрытое в данном описании, вводят субъекту в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом, включающим TCR. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой растворимый TCR. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой клетку, экспрессирующую TCR. Следовательно, в одном варианте осуществления данное изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по данному изобретению в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом, включающим TCR, для применения в качестве лекарственного средства и/или для применения в способе лечения рака.

В определенных вариантах осуществления антитело против LAG-3, раскрытое в данном документе, вводят субъекту в комбинации с клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR). В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку.

В определенных вариантах осуществления антитело против LAG-3, раскрытое в данном документе, вводят субъекту в комбинации с антителом, имитирующим TCR. В определенных вариантах осуществления антитело, имитирующее TCR, представляет собой антитело, которое специфически связывается с комплексом пептид-ГКГС. Неограничивающие примеры имитирующих TCR антител см., например, в патенте США № 9074000 и в публикациях США № US 2009/0304679 A1 и US 2014/0134191 A1, все из которых включены в данное описание посредством ссылки в полном объеме.

Антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека) и дополнительный терапевтический агент (например, химиотерапевтический, радиотерапевтический, агент, нацеленный на контрольные точки, ингибитор IDO, вакцину, адъювант, растворимый TCR, клетку, экспрессирующую TCR, клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор и/или антитело, имитирующее TCR), может вводиться отдельно, последовательно или одновременно в виде отдельных лекарственных форм. В одном варианте осуществления антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека) вводят парентерально, а ингибитор IDO вводят перорально.

Описанное в данном документе антитело или фармацевтическая композиция могут быть доставлены субъекту различными путями. Они включают, но не ограничиваются ими, парентеральный, интраназальный, внутритрахеальный, пероральный, внутрикожный, местный, внутримышечный, внутрибрюшинный, трансдермальный, внутривенный, внутриопухолевый, конъюнктивальный, внутриартериальный и подкожный пути. Легочное введение также можно применять, например, с использованием ингалятора или распылителя и композиции с аэрозольным агентом для применения в качестве спрея. В определенных вариантах осуществления антитело или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, доставляют подкожно или внутривенно. В определенных вариантах осуществления антитело или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, доставляют внутриопухолево. В определенных вариантах осуществления антитело или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, доставляют внутриартериально. В определенных вариантах осуществления антитело или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, доставляют в лимфатический узел, дренирующий опухоль. В определенных вариантах осуществления антитело или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, доставляют интраназально.

Количество антитела или композиции, которое будет эффективным при лечении и/или профилактике состояния, будет зависеть от природы заболевания и может быть определено стандартными клиническими методами.

Точная доза для применения в композиции также будет зависеть от пути введения и серьезности вызываемой ею инфекции или заболевания, и ее следует выбирать в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами каждого субъекта. Например, эффективные дозы также могут варь-

ровать в зависимости от способа введения, целевого участка, физиологического состояния пациента (включая возраст, массу тела и состояние здоровья), от того, является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарств или от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациентом является человек, но млекопитающие, не являющиеся человеком, включая трансгенных млекопитающих, также могут подвергаться лечению. Дозы лечения оптимально подбираются для оптимизации безопасности и эффективности.

Описанное в данном документе антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека) также можно использовать для анализа уровней белка LAG-3 (например, LAG-3 человека) в биологическом образце с использованием классических иммуногистологических методов, известных специалистам в данной области техники, включая иммуноанализы, такие как иммуноферментный анализ (ELISA), иммунопреципитация или вестерн-блоттинг. Подходящие метки для анализа антител известны в данной области техники и включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (^{125}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), серу (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, такие как люминол и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин. Такие метки могут быть использованы для метки антитела, описанного в данном документе. Альтернативно, второе антитело, которое распознает антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанное в данном документе, может быть помечено и использовано в комбинации с антителом против LAG-3 (например, LAG-3 человека) антителом для обнаружения уровня белка LAG-3 (например, LAG-3 человека). Поэтому в одном варианте осуществления данное изобретение относится к применению антитела по данному изобретению для обнаружения *in vitro* белка LAG-3 (например, белка LAG-3 человека) в биологическом образце. В дополнительном варианте осуществления данное изобретение относится к применению антитела против LAG-3-антитела по изобретению для анализа и/или обнаружения уровней белка LAG-3 (например, LAG-3 человека) в биологическом образце *in vitro*, необязательно, когда антитело против LAG-3 конъюгировано с радионуклидом или детектируемой меткой, и/или несет метку, описанную в данном документе, и/или где используется иммуногистологический метод.

Предполагается, что анализ уровня экспрессии белка LAG-3 (например, LAG-3 человека) включает качественное или количественное измерение или оценку уровня белка LAG-3 (например, LAG-3 человека) в первом биологическом либо непосредственно (например, путем определения или оценки абсолютного уровня белка), либо относительно (например, путем сравнения с уровнем белка, ассоциированным с заболеванием, во втором биологическом образце). Уровень экспрессии полипептида LAG-3 (например, LAG-3 человека) в первом биологическом образце можно измерить или оценить и сравнить со стандартным уровнем белка LAG-3 (например, LAG-3 человека), причем стандарт берется из второго биологического образца, полученного от индивидуума, не имеющего расстройства, или определяемый путем усреднения уровней из популяции лиц, не имеющих расстройства. Как будет понятно в данной области техники, когда известен стандартный уровень полипептида LAG-3 (например, LAG-3 человека), его можно многократно использовать в качестве стандарта для сравнения. Следовательно, в следующем варианте осуществления данное изобретение относится к способу *in vitro* для анализа и/или обнаружения уровней белка LAG-3", например уровней белка LAG-3 человека, в биологическом образце, включающем качественное или количественное измерение или оценку уровня белка LAG-3, например, белка LAG-3 человека, в биологическом образце иммуногистологическим методом.

Используемый в данном документе термин биологический образец относится к любому биологическому образцу, полученному от субъекта, клеточной линии, ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих LAG-3 (например, LAG-3 человека). Способы получения биопсий тканей и биологических жидкостей животных (например, людей) хорошо известны в данной области техники. Биологические образцы включают мононуклеарные клетки периферической крови.

Описанное в данном документе антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека) может быть использовано для прогностических, диагностических, мониторинговых и скрининговых применений, в том числе для применений *in vitro* и *in vivo*, хорошо известных и стандартных для специалиста в данной области техники, и основанных на описании данного изобретения. Прогностические, диагностические, мониторинговые и скрининговые анализы и наборы для оценки *in vitro* и оценки состояния иммунной системы и/или иммунного ответа могут использоваться для прогнозирования, диагностики и мониторинга для оценки образцов пациентов, включая те, о которых известно, что они имеют или имеют подозрение на наличие дисфункции иммунной системы или в отношении ожидаемого или желаемого ответа иммунной системы, ответа на антиген или ответа на вакцину. Оценка и определение состояния иммунной системы и/или иммунного ответа также полезна для определения пригодности пациента для клинического испытания лекарственного средства или для введения конкретного химиотерапевтического агента, радиотерапевтического агента или антитела, включая комбинации его, в отличие от другого агента или антитела. Этот тип прогностического и диагностического мониторинга и оценки уже на практике использует антитело против белка HER2 при раке молочной железы (HerceptestTM, Dako), где анализ также используется для оценки пациентов на терапию антителами с использованием Герцептина®. Применения *in vivo* включают направленную клеточную терапию и модуляцию иммунной системы, а также ра-

диовизуализацию иммунных ответов. Таким образом, в одном варианте осуществления данное изобретение относится к антителу против LAG-3 и/или фармацевтической композиции по данному изобретению для применения в качестве диагностического средства. В другом варианте осуществления данное изобретение относится к антителу против LAG-3 и/или фармацевтической композиции по данному изобретению для применения в способе прогнозирования, диагностики и/или мониторинга субъекта, имеющего или подозреваемого на наличие дисфункции иммунной системы и/или в отношении ожидаемого или желаемого ответа иммунной системы, ответа на антиген или ответа на вакцину. В другом варианте осуществления данное изобретение относится к применению антитела против LAG-3 по изобретению для прогнозирования, диагностики и/или мониторинга субъекта, имеющего или подозреваемого на наличие дисфункции иммунной системы и/или в отношении ожидаемого или желаемого ответа иммунной системы, ответа на антиген или ответа на вакцину путем анализа и/или обнаружения уровней белка LAG-3 в биологическом образце субъекта *in vitro*.

В одном варианте осуществления антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека) можно использовать в иммуногистохимии образцов биопсии. В другом варианте осуществления антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека) может быть использовано для определения уровней LAG-3 (например, LAG-3 человека) или уровней клеток, которые содержат LAG-3 (например, LAG-3 человека) на их мембранной поверхности, уровни которого затем могут быть связаны с определенными симптомами заболевания. Описанные в данном документе антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека) могут иметь детектируемую или функциональную метку. Когда используются флуоресцентные метки, доступная в данное время микроскопия и флуоресцентно-активированный анализ сортировки клеток (FACS) или комбинация обоих методов, известных в данной области техники, могут быть использованы для идентификации и количественного определения специфических связывающих элементов. Описанные в данном документе антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека) могут иметь флуоресцентную метку. Типичные флуоресцентные метки включают, например, реактивные и конъюгированные зонды, например, аминокумарин, флуоресцеин и техасский красный, красители Alexa Fluor, красители Cy и красители DyLight. Антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека) может нести радиоактивную метку, такую как изотопы ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac и ^{186}Re . Когда используются радиоактивные метки, доступные в настоящее время процедуры подсчета, известные в данной области техники, могут использоваться для идентификации и количественного определения специфического связывания антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека) с LAG-3 (например, LAG-3 человека). В случае, когда метка представляет собой фермент, обнаружение может быть выполнено любым из используемых в настоящее время колориметрических, спектрофотометрических, флуороспектрофотометрических, амперометрических или газометрических методов, известных в данной области техники. Это может быть достигнуто путем приведения в контакт образца или контрольного образца с антителом против LAG-3 (например, LAG-3 человека) в условиях, которые допускают образование комплекса между антителом и LAG-3 (например, LAG-3 человека). Любые комплексы, образованные между антителом и LAG-3 (например, LAG-3 человека), обнаруживают и сравнивают в образце и контроле. В свете специфического связывания антител, описанных в данном документе для LAG-3 (например, LAG-3 человека), антитела можно использовать для специфического определения экспрессии LAG-3 (например, LAG-3 человека) на поверхности клеток. Описанные в данном документе антитела также можно использовать для очистки LAG-3 (например, LAG-3 человека) с помощью иммуноаффинной очистки. Также в данный документ включена аналитическая система, которая может быть приготовлена в виде набора для тестирования для количественного анализа степени присутствия, например, LAG-3 (например, LAG-3 человека) или лигандных комплексов LAG-3 (например, LAG-3 человека)/LAG-3 (например, LAG-3 человека). Система или тестовый набор, набор или набор частей могут содержать меченый компонент, например меченое антитело, и один или более дополнительных иммунохимических реагентов.

6.5. Полинуклеотиды, векторы и способы получения антител против LAG-3.

В другом аспекте в данном документе представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, описанное в данном документе, или его фрагмент (например, вариабельную область легкой цепи и/или вариабельную область тяжелой цепи), которая специфически связывается с антигеном и векторами LAG-3 (например, LAG-3 человека), например векторами, содержащими такие полинуклеотиды для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, в клетках *E. coli* и млекопитающих). В данном документе представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую и/или легкую цепь любого из антител, представленных в данном документе, а также векторы, содержащие такие полинуклеотидные последовательности, например, векторы экспрессии для их эффективной экспрессии в клетках-хозяевах, например, в клетках млекопитающих.

Используемый в данном документе термин "выделенный" полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, которые присутствуют в природном источнике (например, у мыши или человека) молекулы нуклеиновой кислоты. Кроме того, "выделенная" молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может

быть по существу свободной от другого клеточного материала или культуральной среды, если она произведена рекомбинантными методами, или, по существу, не содержать химических предшественников или других химических веществ, когда химически синтезирована. Например, выражение "по существу свободный" включает препараты полинуклеотида или молекулы нуклеиновой кислоты, имеющие менее чем около 15, 10, 5, 2, 1, 0,5 или 0,1% (в частности, менее чем около 10%) другого материала, например клеточного материала, культуральной среды, других молекул нуклеиновой кислоты, химических предшественников и/или других химических веществ. В конкретном варианте осуществления молекула(ы) нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело, описанное в данном документе, выделяют или очищают.

В конкретных аспектах в данном документе представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, которые специфически связываются с полипептидом LAG-3 (например, LAG-3 человека) и содержат аминокислотную последовательность, как описано в данном документе, а также антитела, которые конкурируют с такими антителами для связывания с полипептидом LAG-3 (например, LAG-3 человека) (например, в зависимости от дозы) или который связывается с тем же эпитопом, что и у таких антител.

В определенных аспектах в данном документе представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или тяжелую цепь антитела, описанного в данном документе. Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь, содержащую FR VL и CDR антител, описанных в данном документе (см., например, табл. 1, 3, 5, 6 и 7), или нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь, содержащую FR VH и CDR антител, описанных в данном документе (см., например, табл. 1, 2, 4, 6 и 7).

В данном документе также представлены полинуклеотиды, кодирующие антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), которые оптимизируются, например, путем оптимизации кодона/РНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями и удаления элементов нестабильности мРНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека) или его фрагмент (например, легкую цепь, тяжелую цепь, домен VH или домен VL) для рекомбинантной экспрессии путем введения изменений кодонов и/или устранение ингибирующих областей в мРНК может быть осуществлено путем адаптации способов оптимизации, описанных, например, в патентах США № 5965726; 6174666; 6291664; 6414132; и 6794498, соответственно, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Например, потенциальные сайты сплайсинга и элементы нестабильности (например, богатые А/Т или А/У элементы) в РНК могут быть мутированы без изменения аминокислот, кодируемых последовательностями нуклеиновых кислот, для повышения стабильности РНК для рекомбинантной экспрессии. Изменения используют вырожденность генетического кода, например, использование альтернативного кодона для идентичной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления может быть желательно изменить один или более кодонов для кодирования консервативной мутации, например, аналогичной аминокислоты с аналогичной химической структурой и свойствами и/или функцией в качестве исходной аминокислоты. Такие способы могут увеличить экспрессию антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека) или его фрагмента по меньшей мере в 1 раз, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз, в 60 раз, в 70 раз, в 80 раз, в 90 раз или в 100 или более раз относительно экспрессии антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека), кодируемого полинуклеотидами, которые не были оптимизированы.

В определенных вариантах осуществления оптимизированная полинуклеотидная последовательность, кодирующая антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанное в данном документе, или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH) может гибридизоваться с антисмысловым полинуклеотидом (например, комплементарным) неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанное в данном документе, или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH). В конкретных вариантах осуществления оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанное в данном документе, или фрагмент гибридизуется в условиях высокой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанное в данном документе, или его фрагмент. В конкретном варианте осуществления оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанное в данном документе, или его фрагмент, гибридизуется в условиях гибридизации высокой жесткости, промежуточной или более низкой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанное в данном документе, или его фрагмент. Информация, касающаяся условий гибридизации, была описана, см., например, публикацию заявки на патент США № US 2005/0048549 (например, пункты 72-73), которая включена в данное описание посредством ссылки в полном объеме.

Полинуклеотиды могут быть получены, и нуклеотидная последовательность полинуклеотидов может быть определена любым способом, известным в данной области техники. Нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, описанные в данном документе, например, антитела, описанные в табл. 1, 6 и 7, и модифицированные версии этих антител могут быть определены с использованием мето-

дов, хорошо известных в данной области техники, то есть нуклеотидные кодоны, которые, как известно, кодируют конкретные аминокислоты, собраны в такой способ генерировать нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело.

Такой полинуклеотид, кодирующий антитело, может быть собран из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано в Kutmeier G et al., (1994), *BioTechniques* 17:242-6, которая включена в данное описание посредством ссылки в полном объеме), которая вкратце, включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих участки последовательности, кодирующей антитело, отжиг и лигирование этих олигонуклеотидов, а затем амплификацию лигированных олигонуклеотидов с помощью ПЦР.

Альтернативно, полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в данном документе, может быть получен из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с использованием способов, хорошо известных в данной области техники (например, ПЦР и других методов молекулярного клонирования). Например, амплификация ПЦР с использованием синтетических праймеров, гибридуемых с 3'- и 5'-концами известной последовательности, может быть выполнена с использованием геномной ДНК, полученной из клеток гибридомы, продуцирующих интересующее антитело. Такие способы амплификации ПЦР можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела. Такие способы амплификации ПЦР можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи и/или вариабельную область тяжелой цепи антитела.

Амплифицированные нуклеиновые кислоты могут быть клонированы в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, для получения химерных и гуманизированных антител.

Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело, недоступен, но последовательность молекулы антитела известна, нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуноглобулин, можно химически синтезировать или получить из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антитела или библиотеки кДНК, созданной из нуклеиновой кислоты или, предпочтительно, полиА+РНК, выделенной из любой ткани или клеток, экспрессирующих антитело, таких как клетки гибридомы, отобранные для экспрессии антитела, описанного в данном документе), путем ПЦР-амплификации с использованием синтетических праймеров, гибридуемых с 3'- и 5'-концов последовательности или путем клонирования с использованием олигонуклеотидного зонда, специфичного для конкретной последовательности гена, для идентификации, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, которая кодирует антитело. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные с помощью ПЦР, могут быть затем клонированы в реплицируемые клонирующие векторы с использованием любого метода, хорошо известного в данной области техники.

ДНК, кодирующая антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанные в данном документе, может быть легко выделена и секвенирована с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека). Клетки гибридомы могут служить источником такой ДНК. После выделения ДНК может быть помещена в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируются в клетки-хозяева, такие как клетки *E.coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, клетки CHO из системы CHO GSTM (Lonza))) или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют белок иммуноглобулина, для получения синтеза антител против LAG-3 (например, LAG-3 человека) в рекомбинантных клетках-хозяевах.

Для создания целых антител можно использовать праймеры ПЦР, включающие нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции, для амплификации последовательностей VH или VL в клонах scFv. Используя методы клонирования, известные специалистам в данной области техники, амплифицированные с помощью ПЦР домены VH могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие константную область тяжелой цепи, например константную область гамма-4 человека, а амплифицированные с помощью ПЦР домены VL могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие константную область легкой цепи, например константные области каппа или лямбда человека. В определенных вариантах осуществления векторы для экспрессии доменов VH или VL содержат промотор EF-1 α , сигнал секреции, сайт клонирования для вариабельной области, константные домены и маркер селекции, такой как неомицин. Домены VH и VL также могут быть клонированы в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Затем векторы превращения тяжелой цепи и векторы превращения легкой цепи совместно трансфицируют в клеточные линии, чтобы генерировать стабильные или временные клеточные линии, которые экспрессируют антитела полной длины, например, IgG, с использованием методов, известных специалистам в данной области техники.

ДНК также может быть модифицирована, например, путем замены кодирующей последовательности для константных доменов тяжелой и легкой цепи человека вместо мышиных последовательностей или путем ковалентного присоединения к кодирующей последовательности иммуноглобулина всей или

части кодирующей последовательности для не кодирующей последовательности полипептид иммуноглобулина.

Также предоставлены полинуклеотиды, которые гибридизуются в условиях гибридизации высокой строгости, средней или низкой жесткости с полинуклеотидами, которые кодируют антитело, описанное в данном документе. В конкретных вариантах осуществления полинуклеотиды, описанные в данном документе, гибридизуются в условиях гибридизации высокой жесткости, промежуточной или более низкой жесткости с полинуклеотидами, кодирующими домен VH и/или домен VL, предоставленные в данном документе.

Условия гибридизации были описаны в данной области техники и известны специалисту в данной области техники. Например, гибридизация в жестких условиях может включать гибридизацию с ДНК, связанной с фильтром, в 6х хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) при температуре около 45°C с последующей одной или более промывками в 0,2хSSC/0,1% SDS при температуре около 50-65°C; гибридизация в очень жестких условиях может включать гибридизацию с нуклеиновой кислотой, связанной с фильтром, в 6хSSC при около 45°C с последующей одной или более промывками в 0,1хSSC/0,2% SDS при около 68°C. Гибридизация в других жестких условиях гибридизации известна тем, кто и были описаны, см., например, Ausubel FM et al., eds., (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., Нью-Йорк на страницах 6.3.1-6.3.6 и 2.10.3, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

В определенных аспектах в данном документе представлены клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантные) антитела, описанные в данном документе, которые специфически связываются с LAG-3 (например, LAG-3 человека) и родственными полинуклеотидами и векторами экспрессии. В данном документе представлены векторы (например, векторы экспрессии), содержащие полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека), или фрагмент для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках млекопитающих. В данном документе также представлены клетки-хозяева, содержащие такие векторы для рекомбинантной экспрессии антител против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанных в данном документе (например, человеческого или гуманизированного антитела). В конкретном аспекте в данном документе предлагаются способы получения антитела, описанного в данном документе, включающие экспрессию такого антитела из клетки-хозяина.

Рекомбинантная экспрессия антитела, описанного в данном документе (например, полноразмерного антитела, тяжелой и/или легкой цепи антитела или антитела с одной цепью, описанного в данном документе), которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), включает конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело. Как только полинуклеотид, кодирующий молекулу антитела, тяжелую и/или легкую цепь антитела или его фрагмент (например, переменные области тяжелой и/или легкой цепи), описанный в данном документе, получен, вектор для получения молекулы антитела может быть получен с помощью технологии рекомбинантных ДНК с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, в данном документе описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь), кодирующий нуклеотидную последовательность. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь), и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции. Эти способы включают, например, методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Также предоставлены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, описанную в данном документе, тяжелую или легкую цепь антитела, переменную область тяжелой или легкой цепи антитела или его фрагмента или CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанные с промотором. Такие векторы могут, например, включать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, международные публикации № WO 86/05807 и WO 89/01036; и патент США № 5122464, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме) и переменные области антитела могут быть клонированы в такой вектор для экспрессии всей тяжелой цепи, всей легкой цепи или как всей тяжелой, так и легкой цепи.

Вектор экспрессии может быть перенесен в клетку (например, клетку-хозяина) обычными методами, и полученные в результате клетки могут быть затем культивированы обычными методами для получения антитела, описанного в данном документе, или его фрагмента. Таким образом, в данном документе представлены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в данном документе, или его фрагменты, или его тяжелую или легкую цепь, или его фрагмент, или одноцепочечное антитело, описанное в данном документе, функционально связанные с промотором для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В определенных вариантах осуществления для экспрессии антител с двойной цепью векторы, кодирующие как тяжелую, так и легкую цепи, по отдельности, могут совместно экспрессироваться в клетке-хозяине для экспрессии всей молекулы иммуноглобулина, как подробно описано ниже. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит вектор, со-

державший полинуклеотид, кодирующий как тяжелую цепь, так и легкую цепь антитела, описанного в данном документе, или его фрагмент. В конкретных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит два разных вектора, первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела, описанного в данном документе, или его фрагмента, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела, описанного в данном документе, или его фрагмента. В других вариантах осуществления первая клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела, описанного в данном документе, или его фрагмента, а вторая клетка-хозяин содержит второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела, описанного в данном документе. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь/переменная область тяжелой цепи экспрессируется первой клеткой, ассоциированной с легкой цепью/переменной областью легкой цепи второй клетки, с образованием антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанного в данном документе. В определенных вариантах осуществления в данном документе представлена популяция клеток-хозяев, включающая такую первую клетку-хозяина и такую вторую клетку-хозяина.

В конкретном варианте осуществления в данном документе представлена популяция векторов, включающая первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/переменную область легкой цепи антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанного в данном документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/переменную область тяжелой цепи антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанного в данном документе.

Для экспрессии молекул антител, описанных в данном документе, можно использовать множество векторных систем-хозяев экспрессии (см., например, патент США № 5807715, который полностью включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме). Такие системы-хозяева экспрессии представляют собой носители, с помощью которых интересующие кодирующие последовательности могут быть получены и впоследствии очищены, но также представляют собой клетки, которые могут при трансформации или трансфекции соответствующими нуклеотидными кодирующими последовательностями экспрессировать молекулу антитела, описанную в данном документе *in situ*. Они включают, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или векторами экспрессии космидной ДНК, содержащими кодирующие последовательности антител; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессирующими векторами, содержащими кодирующие последовательности антител; системы клеток насекомых, инфицированные векторами экспрессии рекомбинантных вирусов (например, бакуловирус), содержащие кодирующие последовательности антител; системы растительных клеток (например, зеленые водоросли, такие как *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированные векторами экспрессии рекомбинантного вируса (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом мозаики табака, TMV) или трансформированные векторами экспрессии рекомбинантной плазмиды (например, плазмиды Ti), содержащие кодирующие антитела последовательности; или клеточные системы млекопитающих (например, COS (например, COS1 или COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NSO, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210 клетки R1.1, BW, LM, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), несущие рекомбинантные экспрессирующие конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлопротеиназы) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса) промотор вируса коровьей оспы 7.5K). В конкретном варианте осуществления клетки для экспрессии антител, описанные в данном документе, представляют собой клетки CHO, например клетки CHO из системы CHO GSTM (Lonza). В определенных вариантах осуществления тяжелая цепь и/или легкая цепь антитела, продуцируемого клеткой CHO, может иметь N-концевой остаток глутамина или глутамата, замененный пироглутаматом. В конкретном варианте осуществления клетки для экспрессии антител, описанные в данном документе, представляют собой клетки человека, например, линии клеток человека. В конкретном варианте осуществления вектор экспрессии млекопитающего представляет собой pOptiVECTM или pcDNA3.3. В конкретном варианте осуществления бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), особенно для экспрессии молекулы цельного рекомбинантного антитела, используют для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как основной промежуточный ранний промоторный элемент гена из цитомегаловируса человека, является эффективной системой экспрессии для антител (Foecking MK & Hofstetter H (1986) *Gene* 45: 101-5 и Cockett MI et al., (1990) *Biotechnology* 8(7): 662-7, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме). В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, продуцируются клетками CHO или клетками NS0. В конкретном варианте осуществления экспрессия описанных в данном документе нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела, которые специфически связывают LAG-3 (например, LAG-3 человека), регулируется конститутивным промотором, индуцибельным промотором или тканеспецифичным

промотором.

В бактериальных системах ряд векторов экспрессии можно преимущественно выбирать в зависимости от применения, предназначенного для экспрессируемой молекулы антитела. Например, когда необходимо получить большое количество такого антитела, для создания фармацевтических композиций молекулы антитела, могут быть желательны векторы, которые направляют экспрессию высоких уровней продуктов слитого белка, которые легко очищаются. Такие векторы включают, но не ограничиваются ими, вектор экспрессии *E.coli* pUR278 (Ruether U & Mueller-Hill B (1983) EMBO J 2: 1791-1794), в которой кодирующая последовательность антитела может быть лигирована индивидуально в вектор в рамке с кодирующей областью *lac Z*, так что образуется слитый белок; векторы pIN (Inouye S & Inouye M (1985) Nuc Acids Res 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) J Biol Chem 24: 5503-5509) и тому подобное, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Например, векторы pGEX также можно использовать для экспрессии чужеродных полипептидов в виде белков слияния с глутатион-5-трансферазой (GST). Как правило, такие слитые белки растворимы и могут быть легко очищены от лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матричными гранулами глутатион-агарозы с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX конструируют так, чтобы они включали сайты расщепления протеазой тромбина или фактора Ха, чтобы клонированный продукт гена-мишени мог высвобождаться из фрагмента GST.

В системе насекомых, например, вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV) может использоваться в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующая последовательность антитела может быть индивидуально клонирована в несущественные области (например, ген полиэдрина) вируса и помещены под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина).

В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать ряд вирусных систем экспрессии. В случаях, когда аденовирус используют в качестве вектора экспрессии, представляющую интерес кодирующую последовательность антитела можно лигировать с комплексом контроля транскрипции/трансляции аденовируса, например поздним промотором и трехсторонней лидерной последовательностью. Этот химерный ген затем может быть вставлен в геном аденовируса путем рекомбинации *in vitro* или *in vivo*.

Вставка в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приведет к получению рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способен экспрессировать молекулу антитела в инфицированных хозяевах (например, см. Logan J & Shenk T (1984). PNAS 81 (12): 3655-9, который включен в данное описание посредством ссылки в полном объеме). Специфические сигналы инициации также могут потребоваться для эффективной трансляции кодирующих последовательностей встроенных антител. Эти сигналы включают иницирующий кодон ATG и смежные последовательности. Кроме того, иницирующий кодон должен находиться в фазе с рамкой считывания желаемой кодирующей последовательности, чтобы обеспечить трансляцию всей вставки. Эти экзогенные трансляционные контрольные сигналы и иницирующие кодоны могут иметь различное происхождение, как природное, так и синтетическое. Эффективность экспрессии может быть повышена путем включения соответствующих элементов энхансера транскрипции, терминаторов транскрипции и т.д. (См., например, Bitter G et al., (1987) Methods Enzymol. 153: 516-544, который включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме).

Кроме того, может быть выбран штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей или модифицирует и обрабатывает продукт гена определенным желаемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важными для функции белка. Различные клетки-хозяева имеют характерные и специфические механизмы для посттрансляционного процесса и модификации белков и генных продуктов. Подходящие клеточные линии или системы-хозяева могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессированного чужеродного белка. С этой целью могут быть использованы эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным механизмом для правильной обработки первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (клеточная линия мышины миеломы, которая эндогенно не продуцирует никаких цепей иммуноглобулина), клетки CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst. В определенных вариантах осуществления антитела против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанные в данном документе, продуцируются в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO.

В конкретном варианте осуществления антитела, описанные в данном документе, имеют пониженное содержание фукозы или отсутствие содержания фукозы. Такие антитела могут быть получены с использованием методик, известных специалисту в данной области техники. Например, антитела могут быть экспрессированы в клетках, дефицитных или не обладающих способностью фукозилировать. В конкретном примере клеточные линии с нокаутом обоих аллелей $\alpha 1,6$ -фукозилтрансферазы можно ис-

пользовать для получения антител с пониженным содержанием фукозы. Система Potelligent® (Lonza) является примером такой системы, которую можно использовать для получения антител с пониженным содержанием фукозы.

Для длительного получения рекомбинантных белков с высоким выходом могут быть получены стабильные экспрессирующие клетки. Например, могут быть сконструированы линии клеток, которые стабильно экспрессируют антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанное в данном документе. В конкретных вариантах осуществления клетка, представленная в данном документе, стабильно экспрессирует легкую цепь/вариабельную область легкой цепи и тяжелую цепь/вариабельную область тяжелой цепи, которые связываются с образованием антитела, описанного в данном документе.

В определенных аспектах вместо использования векторов экспрессии, которые содержат вирусные источники репликации, клетки-хозяева можно трансформировать ДНК, контролируемой соответствующими элементами контроля экспрессии (например, промотором, энхансером, последовательностями, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.д.) и селективным маркером. После введения чужеродной ДНК/полинуклеотида сконструированные клетки могут расти в течение 1-2 суток в обогащенной среде, с последующей пересадкой на селективную среду. Селектируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к селекции и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в их хромосомы и расти, образуя очаги, которые, в свою очередь, могут быть клонированы и размножены в клеточные линии. Этот способ может преимущественно использоваться для конструирования клеточных линий, которые экспрессируют антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанное в данном документе, или его фрагмент. Такие сконструированные клеточные линии могут быть особенно полезны при скрининге и оценке композиций, которые прямо или косвенно взаимодействуют с молекулой антитела.

Можно использовать ряд систем отбора, включая, но не ограничиваясь этим, тимидинкиназу вируса простого герпеса (Wigler M et al., (1977) Cell 11 (1): 223-32), гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазу (Szybalska EH & Szybalski W (1962) PNAS 48 (12): 2026-2034) и гены аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy I et al., (1980) Cell 22 (3): 817-23) в tk-, hprt- или aprt-клетках, соответственно, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Кроме того, устойчивость к анти-метаболитам может быть использована в качестве основы для отбора следующих генов: dhfr, который придает устойчивость к метотрексату, (Wigler M et al., (1980) PNAS 77(6): 3567-70; O'Hare K et al., (1981) PNAS 78: 1527-31); gpt, который придает устойчивость к микофенольной кислоте (Mulligan RC & Berg P (1981) PNAS 78(4): 2072-6); neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Wu GY & Wu CH (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32: 573-596; Mulligan RC (1993) Science 260: 926-932 и Morgan RA & Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62: 191-217; Nabel GJ & Feigner PL (1993) Trends Biotechnol 11(5): 211-5); и hyg, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre RF et al., (1984) Gene 30(1-3): 147-56), все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Методы, общеизвестные в области технологии рекомбинантных ДНК, могут обычно применяться для выбора желаемого рекомбинантного клона, и такие методы описаны, например, в Ausubel FM et al., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990) и в главах 12 и 13, Dracopoli NC et al., (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbère-Garapin F et al., (1981) J Mol Biol 150: 1-14, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Уровни экспрессии молекулы антитела могут быть увеличены с помощью векторной амплификации (для обзора см. Bebbington CR & Hentschel CCG, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987), которая включена в данное описание посредством ссылки в полном объеме). Когда маркер в векторной системе, экспрессирующей антитело, является амплифицируемым, увеличение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, приведет к увеличению количества копий маркерного гена. Поскольку амплифицированная область связана с геном антитела, продукция антитела также будет увеличиваться (Crouse GF et al., (1983) Mol Cell Biol 3: 257-66, которая полностью включена в данное описание посредством ссылки).

Клетка-хозяин может быть совместно трансфицирована двумя или более векторами экспрессии, описанными в данном документе, первый вектор, кодирующий полипептид, полученный из тяжелой цепи, и второй вектор, кодирующий полипептид, полученный из легкой цепи. Два вектора могут содержать идентичные селектируемые маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию полипептидов тяжелой и легкой цепи. Клетки-хозяева можно совместно трансфицировать различными количествами двух или более векторов экспрессии. Например, клетки-хозяева могут быть трансфицированы любым из следующих соотношений первого вектора экспрессии и второго вектора экспрессии: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 или 1:50.

Альтернативно, можно использовать один вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды как тяжелой, так и легкой цепи. В таких ситуациях легкую цепь следует поместить перед тяжелой цепью, чтобы избежать избытка свободной от токсинов тяжелой цепи (Proudfoot NJ (1986) Na-

ture 322: 562-565 и Köhler G (1980) PNAS 77: 2197-2199, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Кодированные последовательности для тяжелой и легкой цепей могут включать кДНК или геномную ДНК. Вектор экспрессии может быть моноцистронным или мультицистронным. Мультицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может кодировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более, или в диапазоне 2-5, 5-10 или 10-20 генов/нуклеотидных последовательностей. Например, бицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может содержать в следующем порядке промотор, первый ген (например, тяжелую цепь антитела, описанного в данном документе) и второй ген и (например, легкую цепь антитела, описанного в данном документе). В таком экспрессионном векторе транскрипция обоих генов может управляться промотором, тогда как трансляция мРНК из первого гена может осуществляться с помощью кэп-зависимого механизма сканирования, а трансляция мРНК из второго гена может с помощью кэп-независимого механизма сканирования, например, IRES.

Как только молекула антитела, описанная в данном документе, получена рекомбинантной экспрессией, она может быть очищена любым способом, известным в данной области техники, для очистки молекулы иммуноглобулина, например, хроматографией (например, ионообменной, аффинной, в частности, с аффинностью к конкретному антигену после белка А и калибровочной хроматографией), центрифугированием, дифференциальной растворимостью или любым другим стандартным методом очистки белков. Кроме того, антитела, описанные в данном документе, могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в данном документе, или другими способами, известными в данной области техники, для облегчения очистки.

В конкретных вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, является выделенным или очищенным. Обычно выделенное антитело представляет собой антитело, которое по существу не содержит других антител с антигенной специфичностью, отличных от выделенного антитела. Например, в конкретном варианте осуществления препарат антитела, описанный в данном документе, по существу не содержит клеточного материала и/или химических предшественников. Выражение "по существу не содержит клеточного материала" включает препараты антитела, в которых антитело отделено от клеточных компонентов клеток, из которых оно выделено или получено рекомбинантным способом. Таким образом, антитело, которое по существу не содержит клеточного материала, включает препараты антитела, имеющие менее чем около 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 или 0,1% (по сухой массе) гетерологического белка (также называемый в данном документе "загрязняющим белком") и/или варианты антитела, например, различные посттрансляционные модифицированные формы антитела или другие разные варианты антитела (например, фрагменты антитела). Когда антитело получают рекомбинантным способом, оно также, как правило, по существу не содержит культуральной среды, то есть культуральная среда составляет менее чем около 20, 10, 2, 1, 0,5 или 0,1% от объема белкового препарата. Когда антитело получают химическим синтезом, оно, как правило, по существу не содержит химических предшественников или других химических веществ, то есть оно отделено от химических предшественников или других химических веществ, которые участвуют в синтезе белка. Соответственно, такие препараты антитела содержат менее чем около 30, 20, 10 или 5% (по сухой массе) химических предшественников или соединений, отличных от представляющего интерес антитела. В конкретном варианте осуществления антитела, описанные в данном документе, являются выделенными или очищенными.

Антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с LAG-3 (например, LAG-3 человека), можно получить любым известным в данной области способом синтеза антител, например химическим синтезом или методами рекомбинантной экспрессии. Методы, описанные в данном документе, используют, если не указано иное, общепринятые методы в молекулярной биологии, микробиологии, генетическом анализе, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтезе и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и смежных областях в пределах данной области техники. Эти методики описаны, например, в ссылках, цитируемых в данном документе, и полностью объяснены в литературе. См., например, Maniatis T et al., (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные обновления); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные обновления) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B et al., (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В конкретном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, представляет собой антитело (например, рекомбинантное антитело), полученное, экспрессированное, созданное или выделенное любым способом, который включает создание, например, посредством синтеза, геномной инженерии последовательностей ДНК. В определенных вариантах осуществления такое антитело содержит последовательности (например, последовательности ДНК или аминокислотные последовательности), которые в природе не существуют в репертуаре зародышевой линии антитела животного или млекопитающего (например, человека) *in vivo*.

В одном аспекте в данном документе представлен способ получения антитела, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), включающий культивирование клетки или клетки-хозяина, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления способ выполняют *in vitro*. В определенном аспекте в данном документе предложен способ получения антитела, которое специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека), включающий экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) антитела с использованием клетки или клетки-хозяина, описанных в данном документе (например, клетка или клетка-хозяин, содержащих полинуклеотиды, кодирующие антитело, описанное в данном документе). В конкретном варианте осуществления клетка представляет собой выделенную клетку. В конкретном варианте осуществления экзогенные полинуклеотиды были введены в клетку. В конкретном варианте осуществления способ дополнительно включает стадию очистки антитела, полученного из клетки или клетки-хозяина.

Способы получения поликлональных антител известны в данной области техники (см., например, главу 11 в: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., eds., John Wiley and Sons, New York, который включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме).

Моноклональные антитела могут быть получены с использованием широкого спектра методик, известных в данной области техники, включая использование технологий гибридомной, рекомбинантной и фаговой индикации или их комбинации. Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридомных методов, включая те, которые известны в данной области техники и описаны, например, в Harlow E & Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ et al., в: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981), каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме. Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Например, моноклональные антитела могут быть получены рекомбинантно из клеток-хозяев, экзогенно экспрессирующих антитело, описанное в данном документе, или его фрагмент, например, легкую цепь и/или тяжелую цепь такого антитела.

В конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело, как используется в данном документе, представляет собой антитело, продуцируемое одной клеткой (например, гибридомой или клеткой-хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело), причем антитело специфически связывается с LAG-3 (например, LAG-3 человека) как определено, например, с помощью ELISA или другого анализа антигенсвязывающего или конкурентного связывания, известного в данной области или в приведенных в данном документе примерах. В конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело может представлять собой химерное антитело или гуманизированное антитело. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой моновалентное антитело или мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело. Моноклональные антитела, описанные в данном документе, могут быть получены, например, гибридомным способом, как описано в Köhler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495, который включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме, или могут быть, например, выделены из фаговых библиотек, например, с использованием описанных в данном документе методик. Другие способы получения клональных клеточных линий и экспрессируемых ими моноклональных антител хорошо известны в данной области техники (см., например, главу 11 в: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., выше).

Способы получения и скрининга специфических антител с использованием гибридомной технологии являются стандартными и хорошо известны в данной области техники. Например, при гибридомном способе мышь или другое подходящее животное-хозяин, такое как овца, коза, кролик, крыса, хомяк или макака, иммунизируют для выявления лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые специфически связываются с белком (например, LAG-3 (например, LAG-3 человека)), используемым для иммунизации. Альтернативно, лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы с использованием подходящего агента слияния, такого как полиэтиленгликоль, для образования клетки гибридомы (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986), который включен в данный документ в качестве ссылки в полном объеме). Кроме того, для иммунизации животного может быть использована методика RIMMS (повторная иммунизация нескольких сайтов) (Kilpatrick KE et al., (1997) *Hybridoma* 16:381-9, которая включена в данное описание в качестве ссылки в полном объеме).

В некоторых вариантах осуществления мыши (или другие животные, такие как крысы, обезьяны, ослы, свиньи, овцы, хомяки или собаки) могут быть иммунизированы антигеном (например, LAG-3 (например, LAG-3 человека)) и однократно обнаруживают иммунный ответ, например, антитела, специфичные для антигена, обнаруживают в сыворотке мыши, собирают селезенку мыши и выделяют спленоциты. Сплелоциты затем сливают хорошо известными способами с любыми подходящими клетками миеломы, например клетками из линии клеток SP20, доступными из Американской коллекции типовых культур (ATCC®) (Манассас, штат Виргиния), для образования гибридом. Гибридомы отбирают и клонируют путем ограниченного разведения. В определенных вариантах осуществления лимфатические узлы имму-

низированных мышей собирают и сливают с клетками миеломы NS0.

Полученные таким образом клетки гибридомы высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживание не слитых клеток родительской миеломы. Например, если в клетках родительской миеломы отсутствует фермент гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом обычно включает гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), которые препятствуют росту HGPRT-дефицитных клеток.

В конкретных вариантах осуществления используются клетки миеломы, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильную продукцию антител на высоком уровне выбранными антителопродуцирующими клетками и чувствительны к среде, такой как среда HAT. Среди этих линий клеток миеломы имеются линии миеломы мыши, такие как линия клеток NS0 или линии, полученные из опухолей мышей MOPC-21 и MPC-11, которые можно приобрести в Центре распределения клеток Salk Institute, Сан-Диего, штат Калифорния, США, и клетки SP-2 или X63-Ag8.653, доступные из Американской коллекции типовых культур, Роквилль, штат Мэриленд, США. Линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека также были описаны для получения моноклональных антител человека. (Kozbor D (1984) *J Immunol* 133: 3001-5; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987), каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме).

Культуральную среду, в которой растут клетки гибридомы, анализируют на продуцирование моноклональных антител, направленных против LAG-3 (например, LAG-3 человека).

Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют способами, известными в данной области техники, например, иммунопреципитацией или анализом связывания *in vitro*, таким как радиоиммуноанализ (RIA) или ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA).

После того, как будут идентифицированы клетки гибридомы, которые продуцируют антитела желаемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны могут быть субклонированы путем ограничения процедур разведения и выращены стандартными методами (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, выше). Подходящие культуральные среды для этой цели включают, например, среду D-MEM или RPMI 1640. Кроме того, клетки гибридомы могут быть выращены *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, соответствующим образом отделяют от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулина, таких как, например, хроматография на белок А-сефарозе, гидроксилапатит, геле-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Антитела, описанные в данном документе, включают фрагменты антител, которые распознают специфический LAG-3 (например, LAG-3 человека) и могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области техники. Например, фрагменты Fab и F(ab')₂, описанные в данном документе могут быть получены путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина с использованием ферментов, таких как папаин (для получения фрагментов Fab) или пепсин (для получения фрагментов F(ab')₂). Фрагмент Fab соответствует одному из двух идентичных плеч молекулы антитела и содержит полную легкую цепь в паре с доменами VH и CH1 тяжелой цепи. Фрагмент F(ab')₂ содержит две антигенсвязывающие ветви молекулы антитела, связанные дисульфидными связями в шарнирной области.

Кроме того, антитела, описанные в данном документе, также могут быть получены с использованием различных способов фагового дисплея, известных в данной области техники. В способах фагового дисплея функциональные домены антител отображаются на поверхности фаговых частиц, которые несут кодирующие их полинуклеотидные последовательности. В частности, последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL, амплифицируют из библиотек кДНК животных (например, библиотек кДНК пораженных тканей человека или мыши). ДНК, кодирующая домены VH и VL, рекомбинируется вместе с линкером scFv с помощью ПЦР и клонируется в фагмидный вектор. Вектор электропорирован в *E. coli*, а *E. coli* инфицируется фагом-помощником. Фаг, используемый в этих способах, обычно представляет собой нитевидный фаг, включая fd и M13, и домены VH и VL обычно рекомбинантно сливаются с геном фага III или геном VIII. Фаг, экспрессирующий антигенсвязывающий домен, который связывается с конкретным антигеном, может быть выбран или идентифицирован с антигеном, например, с использованием меченого антигена или антигена, связанного или захваченного на твердой поверхности или шарике. Примеры способов фагового дисплея, которые можно использовать для получения антител, описанных в данном документе, включают способы, раскрытые в Brinkman U et al., (1995) *J Immunol Methods* 182: 41-50; Ames RS et al., (1995) *J Immunol Methods* 184: 177-186; Kettleborough CA et al., (1994) *Eur J Immunol* 24: 952-958; Persic L et al., (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) *Advan Immunol* 57: 191-280; публикация PCT № PCT/GB91/001134; международная публикация № WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 и WO 97/13844; и патент США № 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225,

5658727, 5733743 и 5969108, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Как описано в приведенных выше ссылках, после отбора фага кодирующие области антитела из фага могут быть выделены и использованы для создания целых антител, включая антитела человека или любой другой желательный антигенсвязывающий фрагмент, и экспрессированы в любом желаемом хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжи и бактерии, например, как описано ниже. Методики рекомбинантного получения фрагментов антител, таких как фрагменты Fab, Fab' и F(ab')₂ также могут быть использованы с использованием методов, известных в данной области техники, таких как раскрытые в публикации PCT № WO 92/22324; Mullinax RL et al., (1992) *BioTechniques* 12(6): 864-9; Sawai H et al., (1995) *Am J Reprod Immunol* 34: 26-34 и Better M et al., (1988) *Science* 240: 1041-1043, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В определенных вариантах осуществления для создания целых антител можно использовать праймеры ПЦР, включающие нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции, для амплификации последовательностей VH или VL из матрицы, например клонов scFv. Используя методики клонирования, известные специалистам в данной области техники, амплифицированные с помощью ПЦР домены VH могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие константную область VH, и амплифицированные с помощью ПЦР домены VL могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие константную область VL, например, константные области каппа и лямбда человека. Домены VH и VL также могут быть клонированы в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Затем векторы превращения тяжелой цепи и векторы превращения легкой цепи совместно трансфицируют в клеточные линии, чтобы генерировать стабильные или временные клеточные линии, которые экспрессируют антитела полной длины, например, IgG, с использованием методов, известных специалистам в данной области техники.

Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части антитела получены из разных молекул иммуноглобулина. Например, химерное антитело может содержать переменную область моноклонального антитела мыши или крысы, слитую с константной областью антитела человека. Способы получения химерных антител известны в данной области техники. См., например, Morrison SL (1985) *Science* 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986) *BioTechniques* 4: 214-221; Gillies SD et al., (1989) *J Immunol Methods* 125: 191-202; и патенты США № 5807715, 4816567, 4816397 и 6331415, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Гуманизированное антитело способно связываться с заранее определенным антигеном и содержит каркасную область, имеющую, по существу, аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека, и CDR, имеющие, по существу, аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина (например, иммуноглобулина мыши). В конкретных вариантах осуществления гуманизированное антитело также содержит, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно часть иммуноглобулина человека. Антитело также может включать область CH1, шарнирную область, области CH2, CH3 и CH4 тяжелой цепи. Гуманизированное антитело может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Гуманизированные антитела могут быть получены с использованием различных методов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, трансплантацию CDR (европейский патент № EP 239400; международная публикация № WO 91/09967 и патенты США № 5225539, 5530101 и 5585089), венирование или изменение поверхности (европейские патенты № EP 592106 и EP 519596; Padlan EA (1991) *Mol Immunol* 28(4/5): 489-498; Studnicka GM et al., (1994) *Prot Engineering* 7(6): 805-814 и Roguska MA et al., (1994) *PNAS* 91: 969-973), шаффлинг цепей (патент США № 5565332), и методики, раскрытые в, например, патенте США № 6407213, патенте США № 5766886, международной публикации № WO 93/17105; Tan P et al., (2002) *J Immunol* 169: 1119-25; Caldas C et al., (2000) *Protein Eng.* 13(5): 353-60; Morea V et al., (2000) *Methods* 20(3): 267-79; Baca M et al., (1997) *J Biol Chem* 272(16): 10678-84; Roguska MA et al., (1996) *Protein Eng* 9(10): 895-904; Couto JR et al., (1995) *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto JR et al., (1995) *Cancer Res* 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994) *Gene* 150(2): 409-10 и Pedersen JT et al., (1994) *J Mol Biol* 235(3): 959-73, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. См. также публикацию заявки США № US 2005/0042664 A1 (Feb. 24, 2005), которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Способы получения полиспецифических (например, биспецифических антител) были описаны, см., например, патенты США № 7951917; 7183076; 8227577; 5837242; 5989830; 5869620; 6132992 и 8586713, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Однодоменные антитела, например, антитела, лишённые легких цепей, могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники. См. Riechmann L & Muyldermans S (1999) *J Immunol* 231: 25-38; Nuttall SD et al., (2000) *Curr Pharm Biotechnol* 1(3): 253-263; Muyldermans S, (2001) *J Biotechnol* 74(4): 277-302, патенте США № 6005079, и международных публикациях № WO 94/25591 и WO 01/44301, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Кроме того, антитела, которые специфически связываются с антигеном LAG-3 (например, LAG-3

человека), могут, в свою очередь, использоваться для создания антиидиотипических антител, которые имитируют антиген, используя методы, хорошо известные специалистам в данной области техники. См., например, Greenspan NS & Bona CA (1989) FASEB J 7(5): 437-444 и Nissinoff A (1991) J Immunol 147(8): 2429-2438, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме.

В конкретных вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, которое связывается с тем же эпитопом LAG-3 (например, LAG-3 человека), что и антитело против LAG-3 (например, LAG-3 человека), описанное в настоящем документе, представляет собой антитело человека. В конкретных вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, которое конкурентно блокирует (например, зависимым от дозы образом) любое одно из антител, описанных в данном документе, от связывания с LAG-3 (например, LAG-3 человека), представляет собой антитело человека. Антитела человека могут быть получены с использованием любого метода, известного в данной области техники. Например, можно использовать трансгенных мышей, которые не способны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены иммуноглобулина человека. В частности, генные комплексы иммуноглобулинов тяжелой и легкой цепей человека могут быть введены случайным образом или путем гомологичной рекомбинации в эмбриональные стволовые клетки мыши. Альтернативно, варибельная область человека, константная область и вариантная область могут быть введены в эмбриональные стволовые клетки мыши в дополнение к генам тяжелой и легкой цепи человека. Гены иммуноглобулинов тяжелой и легкой цепей мышей могут стать нефункциональными по отдельности или одновременно с введением локусов иммуноглобулина человека путем гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция области J_H предотвращает выработку эндогенных антител. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножаются и микроинъектируются в бластоцисты для получения химерных мышей. Затем химерных мышей разводят для получения гомозиготного потомства, которое экспрессирует антитела человека. Трансгенных мышей иммунизируют обычным образом выбранным антигеном, например, всем или частью антигена (например, LAG-3 (например, LAG-3 человека)). Моноклональные антитела, направленные против антигена, могут быть получены от иммунизированных трансгенных мышей с использованием обычной технологии гибридомы. Трансгены иммуноглобулина человека, которые несут трансгенные мыши, перестраиваются во время дифференцировки В-клеток и впоследствии подвергаются переключению классов и соматическим мутациям. Таким образом, используя такую методику, можно получить терапевтически полезные антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Для обзора этой технологии для производства антител человека см. Lonberg N & Huszar D (1995) Int Rev Immunol 13:65-93, включенные в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Подробное обсуждение этой технологии получения антител человека и моноклональных антител человека и протоколов получения таких антител см., например, в международных публикациях № WO 98/24893, WO 96/34096 и WO 96/33735 и патентах США № 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806, 5814318 и 5939598, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Примеры мышей, способных продуцировать антитела человека, включают Xenomouse™ (Abgenix, Inc.; патент США № 6075181 и 6150184), HuAb-Mouse™ (Mederex, Inc./Gen Pharm; патент США № 5545806 и 5569825), Trans Chromo Mouse™ (Kirin) и KM Mouse™ (Medarex/Kirin), все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Антитела человека, которые специфически связываются с LAG-3 (например, LAG-3 человека), могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, включая способы фагового дисплея, описанные выше, с использованием библиотек антител, полученных из последовательностей иммуноглобулина человека. См. также патенты США № 4444887, 4716111 и 5885793; и международные публикации № WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления антитела человека могут быть получены с использованием гибридом мышь-человек. Например, лимфоциты периферической крови человека, трансформированные вирусом Эпштейна-Барра (EBV), могут быть слиты с клетками миеломы мыши для получения гибридом мышь-человек, секретирующих моноклональные антитела человека, и эти гибридомы мышь-человек могут быть подвергнуты скринингу для определения тех, которые секретируют моноклональные антитела человека, которые специфически связываются с антигеном-мишенью (например, LAG-3 (например, LAG-3 человека)). Такие способы известны и описаны в данной области техники, см., например, Shimoto H et al., (2004) Cytotechnology 46: 19-23; Naganawa Y et al., (2005) Human Antibodies 14: 27-31, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки в полном объеме.

6.6. Наборы.

Также предоставлены наборы, содержащие одно или более антител, описанных в данном документе, или фармацевтическую композицию или их конъюгаты. В конкретном варианте осуществления в данном документе предоставлена фармацевтический набор, содержащий один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в данном документе, такими как одно или более антител, представленных в данном документе. В некоторых вариан-

тах осуществления наборы содержат фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, и любой профилактический или терапевтический агент, такой как описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления наборы могут содержать митоген Т-клеток, такой как, например, фитогемагглютинин (РНА) и/или форбол миристатацетат (РМА), или антитело, стимулирующее комплекс ТСR, такое как антитело против CD3 и антитело против CD28. При желании с таким контейнером(ами) может быть связано уведомление в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, причем это уведомление отражает одобрение агентства по производству, использованию или продаже для введения человеком.

Также предоставляются наборы, которые можно использовать в описанных выше способах. В одном варианте осуществления набор содержит антитело, описанное в данном документе, предпочтительно очищенное антитело, в одном или более контейнерах. В конкретном варианте осуществления описанные в данном документе наборы содержат по существу выделенный антиген LAG-3 (например, LAG-3 человека) в качестве контроля. В другом конкретном варианте осуществления описанные в данном документе наборы дополнительно содержат контрольное антитело, которое не реагирует с антигеном LAG-3 (например, LAG-3 человека). В другом конкретном варианте осуществления описанные в данном документе наборы содержат один или более элементов для обнаружения связывания антитела с антигеном LAG-3 (например, LAG-3 человека) (например, антитело может быть конъюгировано с детектируемым субстратом, таким как флуоресцентное соединение, ферментативный субстрат, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение или второе антитело, которое распознает первое антитело, может быть конъюгировано с детектируемым субстратом). В конкретных вариантах осуществления предлагаемый в данном документе набор может содержать рекомбинантно полученный или химически синтезированный антиген LAG-3 (например, LAG-3 человека). Антиген LAG-3 (например, LAG-3 человека), представленный в наборе, также может быть прикреплен к твердой подложке. В более конкретном варианте осуществления средство обнаружения описанного выше набора включает твердую подложку, к которой прикреплен антиген LAG-3 (например, LAG-3 человека). Такой набор также может включать неприкрепленное меченое репортером античеловеческое антитело или анти-мышинное/крысиное антитело. В данном варианте осуществления связывание антитела с антигеном LAG-3 (например, LAG-3 человека) можно обнаружить путем связывания указанного меченого репортером антитела. В одном варианте осуществления данное изобретение относится к применению набора по данному изобретению для анализа и/или обнаружения *in vitro* антигена LAG-3 (например, LAG-3 человека) в биологическом образце.

7. Примеры

Примеры в этом разделе (то есть, раздел 6) предлагаются в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

7.1. Пример 1. Создание и характеристика новых антител против LAG-3 человека.

Этот пример описывает создание и характеристику антител, которые связываются с геном активации лимфоцитов 3 человека (LAG-3), также известным как CD223. В частности, этот пример описывает создание антител мыши, которые специфически связываются с LAG-3 человека и ингибируют функцию LAG-3 человека.

7.1.1. Создание антител против LAG-3.

Антитела против LAG-3 идентифицировали путем создания и отбора иммунизированной библиотеки Fab-фагового дисплея. Сначала суммарную РНК очищали из суспензии отдельных клеток спленоцитов от трех отдельных мышей, предварительно иммунизированных рекомбинантным белком LAG-3-Fc человека (R & D Systems, Cat № 2319-L3-050) и рекомбинантным белком LAG-3-Fc яванского макака (Evitria, Индивидуальный заказ). Для мыши была создана библиотека Fab с помощью случайно-праймированной кДНК с использованием суммарной РНК в качестве матрицы для амплификации переменных областей из генов антител мыши. Ампликоны тяжелой и каппа-цепи объединяли и клонировали в фагмидные векторы. Три раунда селекции выполняли против рекомбинантных белков LAG-3 (LAG-3-Fc человека, LAG-3-6His человека и/или 30-аминокислотный пептид LAG-3 человека) и/или клеток, экспрессирующих LAG-3 яванского макака для идентификации LAG-3-специфичных клонов фага Fab. Пептид LAG-3 человека из 30 аминокислот представляет собой биотинилированный пептид, содержащий аминокислотную последовательность GPPAAAPGHPLAPGHPAAPSWSGPRPRRY (SEQ ID NO: 199). Периплазматические экстракты отобранных Fab-клонов затем подвергали скринингу с помощью ELISA или проточной цитометрии. Затем проводили секвенирование антител и анализ скорости диссоциации на Fab против LAG-3.

Набор мышинных антител, которые связываются с LAG-3 человека, был идентифицирован и обозначен как P01A12, P01C09, P05E01, P05E03, P13A04, P13A06, P13B01, P13B02, P13B03, P13B11, P13C06, P13C08, P13C10, P13D04, P13D05, P13E02, P13F01, P13F02, P13F06, P13F09, P13G01, P13G04, P13G05, P13H05, P14A04, P14B07, P14C04, P14F01, P14F06, P14G01, P14G03, P15B06, P15C02, P15E06, P15F06, P15G05, P16D04 и P16H05. Информация о последовательности переменных областей этих антител приведена в табл. 6.

7.1.2. Связывание Fab против LAG-3 с LAG-3-экспрессирующими клетками.

Fab против LAG-3 из периплазматических экстрактов тестировали на связывание с клетками, экспрессирующими LAG-3, с использованием проточной цитометрии. Вкратце, клетки Jurkat, экспрессирующие LAG-3 дикого типа и человека, высевали в количестве 2×10^5 клеток/лунка в буфер для образцов (PBS (Gibco, кат. № 10010-015) + 0,5% ФБС (Gibco, кат. № 10270-106)) в 96-луночных U-образных планшетах (Sarstedt). 22 мкл периплазматического экстракта Fab против LAG-3 и 83 мкл разведенного антитела против с-мус (Gentaur, клон № 9E10, кат. № 04-смус-9E10) инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. 100 мкл смеси периплазматический экстракт/антитело против с-мус добавляли к клеткам и затем инкубировали в течение одного часа на льду. Клетки трижды промывали и затем инкубировали с козым антимышиным APC (BD Biosciences, кат. № 550826) в течение 30 мин на льду. Клетки промывали три раза и затем анализировали на аппарате FACS (BD Accuri6).

Как показано на фиг. 1A-1C, все протестированные Fab против LAG-3 проявляли связывание с клетками Jurkat, экспрессирующими LAG-3 человека. Очевидный низкий уровень связывания P05E01, возможно, был обусловлен низкой концентрацией Fab в периплазматических экстрактах. Связывание P05E01 было подтверждено в более поздних экспериментах (данные не показаны).

7.1.3. Активность блокирование лиганда у Fab или антител против LAG-3.

Fab против LAG-3 тестировали на их способность блокировать связывание рекомбинантного LAG-3 человека с клетками, экспрессирующими ГКГС класса II. LAG-3-6His (Acro Biosystems, кат. № LA3-H5222) предварительно инкубировали в концентрации 10 мкг/мл с анти-His биотином (Genscript, клон № A00186, кат. № A00613) при 6 мкг/мл в течение 10 мин, при 4°C. Эту смесь затем инкубировали с 10000 нг/мл (фиг. 2A) или серийным разведением (21170, 7056,6, 2352,2, 784,0, 261,3, 87,1, 29,0 или 9,7 нг/мл) (фиг. 2B) Fab против LAG-3 или в отрицательном контроле с Fab, неспецифичным для LAG-3 в течение 60 мин при 4°C, а затем инкубировали с 50000 клеток Raji в течение еще 60 мин при 4°C. Культуры дважды промывали буфером для образцов (PBS+2% ФБС+0,09% азида натрия) и затем инкубировали со стрептавидином-PE (Biolegend, кат. № 405204) в буфере для образцов в течение 30 мин при 4°C. Клетки дважды промывали и затем анализировали с помощью цитометра FACS Fortessa (Becton Dickinson).

Как показано на фиг. 2A и 2B, все протестированные Fab против LAG-3 блокировали связывание сшитого рекомбинантного LAG-3-6His с клетками Raji положительными относительно ГКГС класса II.

Вариабельные области выбранных Fab были клонированы в константные области тяжелой цепи (Ch1, Ch2 и Ch3) человека и легкой цепи (CL) и экспрессированы в виде полноразмерных химерных антител IgG1 и протестированы в аналогичном анализе блокирования лиганда, как описано выше, при различных концентрации (96360, 48180, 24090, 12045, 6022, 3011, 1505, 753, 376, 188 или 94 нг/мл).

Все протестированные полноразмерные химерные антитела против LAG-3 блокировали взаимодействие между рекомбинантным LAG-3 и клетками Raji, экспрессирующими ГКГС класса II (фиг. 3).

7.1.4. Влияние антитела против LAG-3-на PBMC человека при стимуляции энтеротоксином А стафилококка (SEA).

Функциональную активность химерного антитела против LAG-3 P13B02 тестировали с использованием первичных мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК), стимулированных энтеротоксином А стафилококка (SEA). Вкратце, криоконсервированные МКПК человека (Research Blood Components) высевали в количестве 10^5 клеток/лунка в RPMI1640 с добавлением Normocin™ (Invivogen, кат. № ant-ng-1) и 10% инактивированной нагреванием ФБС (Thermo Fisher Scientific, кат. № 26140079) в 96-луночные планшеты с дельта-поверхностью NUNCCLON (NUNC™). Клетки культивировали с 100 нг/мл SEA (Toxin Technologies, кат. № at101red) и 10 мкг/мл P13B02 или антителом, контрольного изотипа, в течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и 97% влажности. Осветленный супернатант собирали и хранили при -80°C до анализа. Уровни IL-2 определяли с использованием AlphaLISA (Perkin Elmer, кат. № AL221C).

Как показано на фиг. 4, антитело против LAG-3 P13B02 увеличивало продукцию IL-2 в PBMC человека, стимулированных суперантигеном SEA.

7.2. Пример 2. Создание и характеристика гуманизированных антител против LAG-3 человека.

Этот пример описывает гуманизацию мышиного антитела P13B02 и характеристику гуманизированных антител.

7.2.1. Гуманизация мышиного антитела P13B02.

Гомологическое сопоставление использовали для выбора акцепторных каркасных областей человека для трансплантации CDR мышиного антитела P13B02. Базы данных, например, база данных вариабельных генов зародышевой линии из локусов иммуноглобулина человека и мыши (база данных IMGT (международная информационная система ImMunoGeneTics)®; Lefranc MP et al., (1999) *Nucleic Acids Res* 27(1): 209-12; Ruiz M et al., (2000) *Nucleic Acids Res* 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) *Nucleic Acids Res* 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) *Nucleic Acids Res* 31(1): 307-10; Lefranc MP et al., (2005) *Dev Comp Immunol* 29(3): 185-203; Kaas Q et al., (2007) *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* 6(4): 253-64) или VBASE2 (Retter I et al., (2005) *Nucleic Acids Res* 33, Database issue D671-D674) или база данных Kabat (Johnson G et al., (2000) *Nucleic Acids Res* 28: 214-218) или публикации (например, Kabat EA et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services,

NIH Publication No. 91-3242), все из которых включены посредством ссылки в полном объеме, могут использоваться для идентификации подсемейств человека, к которым относятся вариабельные области тяжелой и легкой цепи мыши, и определения наиболее подходящей структуры зародышевой линии человека для использования в качестве молекулы-акцептора. Выбор последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей внутри этих подсемейств для использования в качестве акцептора может быть основан на гомологии последовательностей и/или совпадении структуры областей CDR1 и CDR2, чтобы помочь сохранить соответствующее относительное представление шести CDR после трансплантации.

Поиск в базе данных IMGT, загруженной с IMGT.org, с помощью редактора выравнивания последовательностей BioEdit (Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98, включенный в данный документ посредством ссылки в полном объеме) указывает на хорошую гомологию между каркасной областью вариабельной области тяжелой цепи P13B02 и членами подгруппы вариабельной области тяжелой цепи человекаIGHV1. Самые высокие гомологии и идентичности как CDR, так и каркасных последовательностей наблюдались для последовательностей зародышевой линии: IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 153) (62% идентичности; 61 аминокислотных остатка из 98); IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 154) (63% идентичности; 62/98); IGHV1-3*01 (SEQ ID NO: 155) (64% идентичности; 63/98); IGHV1-24*01 (SEQ ID NO: 156) (61% идентичности; 60/98); IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 157) (60% идентичности; 59/98); IGHV1-45*01 (SEQ ID NO: 158) (59% идентичности; 58/98) и IGHV1-18*01 (SEQ ID NO: 159) (60% идентичности; 59/98).

Используя тот же подход, последовательность вариабельной области легкой цепи P13B02 показала хорошую гомологию с членами каппа-подгруппы вариабельной области легкой цепи человека IGKV3 и IGKV1. Самые высокие гомологии и идентичности как CDR, так и каркасных последовательностей наблюдались для последовательностей зародышевой линии: IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 160) (59% идентичности; 57 аминокислотных остатков из 96); IGKV3D-15*01 и IGKV3-15*01 (SEQ ID NO: 161) (58% идентичности; 56/96); IGKV3D-20*01 (SEQ ID NO: 162) (59% идентичности; 57/96); IGKV3D-7*01 (SEQ ID NO: 163) (58% идентичности; 56/96); IGKV1-9*01 (SEQ ID NO: 164) (63% идентичности; 61/96) и IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 165) (60% идентичности; 58/96).

В качестве отправной точки процесса гуманизации была создана версия VH мыши с трансплантированными CDR P13B02 с использованием каркасных областей 1, 2 и 3 человеческого IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 153) и каркасной области 4 человеческого IGHJ1*01 (SEQ ID NO: 200) в качестве человеческого акцепторного каркаса. Был осуществлен ряд обратных мутаций в положениях, которые могут влиять на конформацию CDR или упаковку между вариабельными областями и, следовательно, могут иметь структурное значение для поддержания полной активности антитела (H0-H4; SEQ ID NO: 56-60 и 220 соответственно) (фиг. 5A). Подобным образом, CDR-привитую версию VL мыши P13B02 создавали с использованием каркасных областей 1, 2 и 3 IGKV3-20*01 человека (SEQ ID NO: 160) и каркаса 4 человеческого IGKJ1*01 (SEQ ID NO: 201) в качестве человеческого акцептора каркаса (L0; SEQ ID NO: 73) (фиг. 5B). Обратные мутации были созданы в различных положениях (L1-L4; SEQ ID NO: 74-77, соответственно) (фиг. 5B). Последовательности гуманизированных VH H0-H4 и гуманизированных VL L0-L4 представлены в табл. 1. В табл. 10 показаны положения, которые различаются между каркасными областями антител мыши и человека и подвергаются обратной мутации по меньшей мере в одной из гуманизированных VH или VL, описанных выше. В табл. 11 показаны положения, которые различаются в каркасных областях антител мыши и человека и подвергаются обратной мутации в H1_R98K_L4M.

Таблица 10

Обзор каркасных обратных мутаций по меньшей мере в одной из гуманизированных VH или VL

Вариабельная область тяжелой цепи		
Положение	по VH P13B02	IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 153)
Kabat		
H4	M	L
H5	K	V
H12	V	K
H23	T	K
H27	F	Y
H28	N	T
H29	I	F
H30	K	T
H48	I	M
H69	I	M
H71	A	R
H75	S	T
H76	N	S
H80	L	M
H81	Q	E
H94	T	R
Вариабельная область легкой цепи		
Положение	по VL P13B02	IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 160)
Kabat		
L3	L	V
L22	T	S
L36	F	Y
L43	S	A
L47	W	L
L58	V	I
L70	S	D
L71	Y	F

Таблица 11

Обзор каркасных обратных мутаций в H1_R98K_L4M

Положение	по VH P13B02	IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 153)
Kabat		
H4	M	L
H27	F	Y
H28	N	T
H29	I	F
H30	K	T
H69	I	M
H71	A	R
H94	T	R

Кроме того, HCDR3 из P13B02 содержит мотив "RYD", который, как было продемонстрировано ранее, имитирует мотив связывания интегрин "RGD". Чтобы проверить, может ли мотив "RYD" быть удален без влияния на связывание с LAG-3, в тяжелую цепь была введена аминокислотная замена R98K или D100E, пронумерованная в соответствии с определением Kabat.

Панель из 37 гуманизированных антител, обозначенных от P13B02-01 до P13B02-37, были сконструированы на основе приведенного выше описания и созданы в виде полноразмерных антител IgG₁.

P13B02-30 были получены в трех вариантах: полноразмерное антитело, содержащее аллотип IgG₁ G1m17, обозначаемое как P13B02-30 (IgG₁); полноразмерное антитело, содержащее аллотип IgG₁ G1m17 с мутацией N297A, обозначаемое как P13B02-30 (IgG₁ G1m17 N297A); и полноразмерное антитело, содержащее аллотип IgG₁ G1m3 с мутацией N297A, обозначаемое как P13B02-30 (IgG₁ G1m3 N297A). Информация о последовательности вариабельных областей от P13B02-01 до P13B02-37 приведена в табл. 7. Две партии P13B02-30 (IgG₁ G1m3 N297A) были исследованы на посттрансляционный процессинг в клетках-продуцентах. Все эти 37 гуманизированных антитела сохраняли связывание с рекомбинантным человеческим LAG-3 в анализе поверхностного плазмонного резонанса (данные не показаны).

7.2.2. Связывание гуманизированных антител против LAG-3 с человеческим LAG-3.

Антитела против LAG-3 тестировали на связывание с первичными Т-клетками человека с использованием проточной цитометрии. Кримоконсервированные человеческие МКПК (Research Blood Components) высевали в количестве 10^6 клеток/мл в RPMI1640 с добавлением Normocin™ (Invivogen, кат. № ant-nr-1) и 10% инактивированной нагреванием ФБС (Thermo Fisher Scientific, кат. № 26140079) в колбу T-75 (Corning) в присутствии 100 нг/мл SEA (Toxin Technologies, кат. № at101red) в течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и 97% влажности. Культивируемые МКПК затем высевали по 10^5 клеток/лунка в 96-луночные планшеты с U-образным дном (Nunc). Клетки инкубировали с 10 мкг/мл антитела против LAG-3 в течение 30 мин на льду. Клетки трижды промывали и затем инкубировали с антителом против CD4-PE/Cy7 (Biolegend, клон № OKT4, кат. № 317414), с антителом против CD8-FITC (Biolegend, клон № RPA-T8, кат. № 301060), с антителом против CD3 -APC (BD Biosciences, клон № SP34-2, кат. № 557597), LIVE/DEAD®, фиксирующим красителем для мертвых клеток в ближнем ИК-диапазоне (Life Technologies, кат. № L10119), блокиратором Fc (BD Biosciences, кат. № 422302) и козым анти-человеческим IgG-PE (ThermoFisher, кат. № PA1-74408). Клетки инкубировали в течение 30 мин на льду, промывали и анализировали на аппарате FACS (BD Canto). Как показано на фиг. 6А, химерное антитело P13B02 и все протестированные гуманизированные антитела демонстрировали связывание с первичными CD4⁺ человеческими Т-клетками, стимулированными суперантигеном SEA.

Затем человеческие МКПК активировали с использованием суперантигена SEA аналогично тому, как описано выше, и инкубировали с серийно разведенными (50000, 15000, 4500, 1350, 407, 122, 37 или 11 нг/мл) P13B02-16 или антителом изотипического контроля. Связывание анализировали с помощью цитометра FACS Fortessa (Becton Dickinson). Гуманизированное антитело P13B02-16 связывалось с активированными первичными человеческими CD4⁺ Т-клетками зависимым от дозы образом (фиг. 6В).

7.2.3. Блокирующая лиганд активность гуманизированных антител против LAG-3.

Затем способность гуманизированных антител против LAG-3 блокировать взаимодействие между поперечно-сшитыми рекомбинантными LAG-3-6His и ГКГС класса II, экспрессирующими клетки Raji, была исследована, как описано выше.

Гуманизированные антитела P13B02-06, P13B02-07, P13B02-16, P13B02-26 и P13B02-27, все из которых включают константную область человеческого IgG₁, тестировали при 57820, 28910, 14455, 7228, 3613, 1807, 903, 452, 226, 113 и 56 нг/мл (фиг. 7А). Гуманизированное антитело P13B02-30 (IgG₁ G1m17 N297A) тестировали при 96360, 48180, 24090, 12045, 6022, 3011, 1505, 753, 376, 188 и 94 нг/мл (фиг. 7В).

Как показано на фиг. 7А и 7В, все протестированные гуманизированные антитела эффективно блокировали связывание LAG-3 с позитивными относительно ГКГС класса II клетками Raji.

7.2.4. Влияние антитела против LAG-3 на PBMC человека при стимуляции энтеротоксином А стафилококка (SEA).

Функциональную активность гуманизированного антитела P13B02-30 (IgG₁) оценивали с использованием первичных PBMC человека, стимулированных энтеротоксином А стафилококка (SEA). Кримоконсервированные МКПК человека (Research Blood Components) высевали в количестве 10^5 клеток/лунка в RPMI1640 с добавлением Normocin™ (Invivogen, кат. № ant-nr-1) и 10% инактивированной нагреванием ФБС (Thermo Fisher Scientific, кат. № 26140079) в 96-луночные планшеты с дельта-поверхностью NUNC-CLON (NUNC™). Клетки культивировали с 100 нг/мл SEA (Toxin Technologies, кат. № at101red) и 10 мкг/мл P13B02-30 (IgG₁) или антителом, контрольного изотипа, в течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и 97% влажности. Осветленный супернатант собирали и хранили при -80°C до анализа. Уровни IL-2 определяли с использованием AlphaLISA (Perkin Elmer, кат. № AL221C).

Как показано на фиг. 8А, антитело против LAG-3 P13B02-30 (IgG₁) усиливало выработку IL-2 в PBMC человека, стимулированных суперантигеном SEA.

В аналогичном эксперименте кримоконсервированные человеческие PBMC культивировали с 100 нг/мл SEA (Toxin Technologies, кат. № at101red) и 10 мкг/мл P13B02-16 (IgG₁) или антителом изотипического контроля в присутствии или в отсутствие 5 мкг/мл антитела против PD-1 пембролизумаб (Pembro) (Myoderm), антитела против PD-1 ниволумаб (Nivo) (Myoderm), трех различных антител против PD-L1 или антитела против CTLA-4 ипилимумаб (Ipi) (Myoderm) в течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и 97% влажности. Осветленный супернатант собирали и хранили при -80°C до анализа. Уровни IL-2 определяли с использованием AlphaLISA (Perkin Elmer, кат. № AL221C). Антитело против PD-L1 № 1 было получено на основе последовательностей вариабельной области антитела A09-246-2, представленных в публика-

ции заявки на патент США № US2014/0341917 (полностью включенной в данный документ посредством ссылки). Антитело против PD-L1 № 2 было получено на основе последовательностей вариабельной области антитела 2.14H9OPT, предоставленных в патенте США № 8779108 (полностью включенного в данный документ посредством ссылки). Антитело против PD-L1 № 3 было получено на основе последовательностей, представленных в патенте США № 8217149 (полностью включенном в данный документ посредством ссылки). Последовательности этих трех антител против PD-L1 приведены в табл. 12.

Таблица 12
Последовательности антител против PD-L1

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
202	тяжелая цепь антитела против PD-L1 № 1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGK GLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARIKLGTVTITVDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
203	легкая цепь антитела против PD-L1 № 1	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPG KAPKLMYDVSNRPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDA DYICSSYTSSSTRVFGTGKVTVLQPKANPTVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
204	тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGK GLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL

	антитела против PD- L1 № 2	RAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
205	легкая цепь антитела против PD- L1 № 2	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSGLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
206	тяжелая цепь антитела против PD- L1 № 3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGK GLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTF EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
207	легкая цепь антитела против PD- L1 № 3	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Как показано на фиг. 8В, P13B02-16 (IgG₁), отдельно или в комбинации с антителом против PD-1 пембролизумабом или ниволумабом, антителом против PD-L1 № 1, № 2 или № 3 или антителом против CTLA-4 ипилимумаб, повышало продуцирование IL-2 в PBMC человека в присутствии суперантигена SEA.

7.2.5. Влияние гуманизированного антитела против LAG-3 на выработку цитокинов опухолевыми инфильтрирующими лимфоцитами.

Антитело против LAG-3 P13B02-30 (IgG₁ G1m3 N297A) далее оценивали на его способность стимулировать выработку цитокинов активированными первичными опухолевыми инфильтрирующими лимфоцитами (TIL), отдельно или в комбинации с антителом против PD-1. Суспензии отдельных клеток из опухолей свежей почечно-клеточной карциномы (RCC) (стадия I) или колоректального рака (CRC) (стадия II) (UMass Medical School, Вустер, штат Массачусетс) выделяли с помощью механической микродиссекции. В некоторых случаях, в зависимости от уровня фиброза, было необходимо ферментативное расщепление (Liberase и DNaseI, Roche). Клетки оставляли в покое в концентрации 5×10^4 клеток/лунка в RPMI1640 с добавлением Normocin™ (Invivogen, кат. № ant-nr-1), рекомбинантного человеческого IL-2 (20 ед/мл, R&D Systems, кат. № 202-IL-010), и 10% инактивированной нагреванием ФБС (Thermo Fisher Scientific, кат. № 26140079) в 96-луночных планшетах с дельта-поверхностью NUNCCLON (NUNC™, кат. № 143761) в течение 1 суток. На следующие сутки образцы центрифугировали и получали свежую культуральную среду, содержащую представляющие интерес антитела, P13B02-30 (IgG₁ G1m3 N297A) в концентрации 20 мкг/мл и антитело против PD-1 пембролизумаб (Pembro) (Myoderm) при 5 мкг/мл и микрошариками против CD3/CD28 (соотношение гранулы 1:1 клетки) добавляли в конечном объеме 100 мкл и оставляли на 3 суток для инкубации при 37°C и 5% CO₂. Бесклеточный супернатант собирали и хранили при -80°C до анализа. Уровни TNFα определяли с использованием AlphaLISA (Perkin Elmer, кат. № AL208C).

Как показано на фиг. 9А и 9В, антитело против LAG-3 P13B02-30 (IgG₁ G1m3 N297A) усиливает

продукцию TNF α активированными первичными TIL из опухолей RCC или CRC.

7.2.6. Антитело против LAG-3 усиливает активацию Т-клеток в анализе подавления LAG-3-опосредованных клеток.

В этом примере использовали репортерную линию NFAT-люциферазы для оценки ингибирующего эффекта антитела против LAG-3 P13B02-30 (IgG1 G1m3 N297A) против LAG-3 в анализе подавления клеток. Два эксперимента были выполнены, как описано ниже.

В каждом из двух экспериментов клетки Jurkat-NFAT-LAG-3 суспендировали до $2,5 \times 10^6$ рабочей концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде для анализа (RPMI+10% инактивированной нагреванием ФБС+1% Pen/Strep). Клетки Raji суспендировали до $3,33 \times 10^6$ рабочей концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде для анализа. Энтеротоксин Е стафилококка (Toxin Technology) готовили при $10 \times$ рабочей концентрации, равной 0,04 нг/мл в среде для анализа. Серийное разведение антитела против LAG-3 или антитела изотипа готовили в среде для анализа. В первом эксперименте концентрации антител находились в диапазоне 0,2-50 мкг/мл. Во втором эксперименте концентрации антител находились в диапазоне 0,1-100 мкг/мл. После приготовления серийных разведений антител 40 мкл клеток Jurkat-NFAT-LAG-3 и 20 мкл раствора антител предварительно инкубировали в течение 30 мин при 37°C и 5% CO₂ в 96-луночных планшетах с U-образным дном. 30 мкл клеток Raji и 10 мкл энтеротоксина Е стафилококка добавляли в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение 5-6 ч. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл люциферазы Bio-Glo (Promega) и люминесценцию регистрировали с использованием ридера планшетов EnVision (Perkin Elmer) через 10-15 мин.

Как показано на фиг. 10A и 10B, антитело против LAG-3 значительно увеличивало сигнал репортерной NFAT-люциферазы относительно антитела изотипического контроля зависимым от дозы образом.

7.3. Пример 3. Картирование эпитопов антитела против LAG-3.

В этом примере эпитоп антитела против LAG-3 P13B02-30 был охарактеризован, как описано ниже.

7.3.1. Картирование эпитопов антитела против LAG-3 с использованием масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX).

F(ab')₂ против LAG-3 был получен из P13B02-30 (IgG₄ S228P) с использованием набора FragIT (Genovis, кат. № A2-FR2-100). Взаимодействие F(ab')₂ против LAG-3 с человеческим LAG-3 изучали с помощью масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX).

Для расщепления пепсином/протеазой XIII было денатурировано 7,9 мкг рекомбинантного человеческого-меченного LAG-3 (Sino Biological, кат. № 16498-H08H) в 125 мкл контрольного буфера (50 mM фосфат, 100 mM хлорид натрия, pH 7,4), добавляя 125 мкл 4 M гидрохлорида гуанидина, 0,85 M буфера TCEP (конечный pH 2,5) и инкубируя смесь в течение 5 мин при 20°C. Затем смесь подвергали расщеплению на колонке пепсин/протеаза XIII с использованием самостоятельно набитой колонки пепсин/протеаза XIII (масса/масса, 1:1) и полученные пептиды анализировали с использованием системы СВЭЖХ-МС, состоящей из Waters UPLC Acquity соединенной с гибридным квадрупольным орбитраповым масс-спектрометром Q-Exactive™ (Thermo). Пептиды разделяли на колонке C8 размером 50×1 мм с 19-минутным градиентом от 2-30% растворителя В (0,2% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Идентификацию пептидов проводили путем поиска данных МС/МС по последовательности LAG-3 человека с Mascot. Допуск по массе для прокурсора и продукта составлял 10 частей на миллион и 0,05 Да соответственно.

20 мкл LAG-3 человека (7,9 мк) или 20 мкл смеси LAG-3/F(ab')₂ человека (7,9 мкг: 15,8 мкг) инкубировали с 105 мкл буфера для маркировки оксида дейтерия (50 mM фосфата натрия, 100 mM хлорида натрия, pH 7,4) в течение 0, 6, 300, 1800, 7200 и 14400 с при 20°C. Обмен водород/дейтерий гасили добавлением 125 мкл 4 M гидрохлорида гуанидина, 0,85 M буфера TCEP (конечный pH 2,5). Затем погашенные образцы подвергали расщеплению на колонке пепсин/протеаза XIII и анализу ЖХ-МС, как описано выше. Масс-спектры регистрировали только в режиме МС. Необработанные данные МС обрабатывались с использованием HDX WorkBench, программного обеспечения для анализа H/D-обмена данных МС (J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2012, 23 (9), 1512-1521, включенный в данный документа посредством ссылки в полном объеме). Уровни дейтерия рассчитывали, используя среднюю разницу масс между дейтерированным пептидом и его нативной формой (t₀).

Охват последовательностей, достигнутый для LAG-3 человека, составил 96,6%. В то время как большинство человеческих пептидов LAG-3 показали идентичные или сходные уровни дейтерия с и без F(ab')₂ против LAG-3, было обнаружено, что несколько пептидных сегментов значительно снижают включение дейтерия при связывании F(ab')₂. Сильное снижение поглощения дейтерия наблюдалось в области, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 215 (SPTIPLQDLSL). Остатки пронумерованы в соответствии с SEQ ID NO: 166.

Изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к описанным станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих фигур. Предполагается, что такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

Все ссылки (например, публикации или патенты или патентные заявки), цитированные в данном документе, включены в данное описание посредством ссылки в их полном объеме и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная ссылка (например, публикация или патент или заявка на патент) была конкретно и индивидуально указана, как включенная посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

Другие варианты осуществления находятся в пределах следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с LAG-3 человека, содержащее вариabельную область тяжелой цепи, содержащую области, определяющие комплементарность CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариabельную область легкой цепи, содержащую области, определяющие комплементарность CDRL1, CDRL2 и CDRL3, в котором CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 78, 83, 94, 100, 104 и 105; 78, 85, 95, 100, 104 и 105; 78, 86, 96, 100, 104 и 105; 78, 86, 96, 100, 104 и 109; 78, 86, 96, 100, 104 и 110; 78, 86, 96, 101, 104 и 108; 78, 86, 96, 103, 104 и 111; 78, 86, 97, 102, 104 и 112; 78, 91, 94, 100, 104 и 107; 78, 92, 96, 100, 104 и 105; 78, 92, 96, 100, 104 и 109; 79, 84, 95, 100, 104 и 105; 79, 84, 95, 100, 104 и 106; 79, 84, 95, 102, 104 и 105; 79, 88, 95, 100, 104 и 105; 79, 89, 95, 100, 104 и 105; 79, 90, 95, 100, 104 и 105; 79, 90, 98, 100, 104 и 105; 79, 90, 99, 100, 104 и 105; 80, 85, 96, 100, 104 и 105; 81, 87, 96, 100, 104 и 105; 81, 87, 96, 100, 104 и 107; или 82, 93, 95, 100, 104 и 105 соответственно.

2. Выделенное антитело по п.1, где:

(a) указанная вариabельная область тяжелой цепи содержит каркасные области последовательности вариabельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 151, 222, 218 или 223;

(b) указанная вариabельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, 222, 218 или 223;

(c) указанная вариabельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-72 и 220;

(d) указанная вариabельная область тяжелой цепи содержит каркасные области, полученные от человека;

(e) указанная вариabельная каркасная область тяжелой цепи является или происходит от аминокислотной последовательности, кодируемой геном человека, причем указанная аминокислотная последовательность выбрана из группы, состоящей из IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 153), IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 154), IGHV1-3*01 (SEQ ID NO: 155), IGHV1-24*01 (SEQ ID NO: 156), IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 157), IGHV1-45*01 (SEQ ID NO: 158) и IGHV1-18*01 (SEQ ID NO: 159), необязательно где вариabельная каркасная область тяжелой цепи происходит из аминокислотной последовательности IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 153), причем по меньшей мере одна аминокислота в аминокислотной последовательности IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 153) замещена аминокислотой в аналогичном положении в соответствующей вариabельной каркасной области тяжелой цепи, полученной не от человека, необязательно где:

(i) аминокислотная замена находится в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из 4, 5, 12, 23, 27, 28, 29, 30, 48, 69, 71, 75, 76, 80, 81 и 94, причем аминокислотное положение указано в соответствии с системой нумерации Kabat;

(ii) аминокислотная замена выбрана из группы, состоящей из 4M, 5K, 12V, 23T, 27F, 28N, 29I, 30K, 48I, 69I, 71A, 75S, 76N, 80L, 81Q и 94T, причем положение аминокислотной замены указано в соответствии с системой нумерации Kabat; и/или

(iii) аминокислотная замена находится в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из 4, 27, 28, 29, 30, 69, 71 и 94, причем аминокислотное положение указано в соответствии с системой нумерации Kabat;

(f) N-концевой аминокислотный остаток указанной вариabельной области тяжелой цепи представляет собой пироглутамат;

(g) указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 168-186 и 225-227; и/или

(h) указанное антитело содержит тяжелую цепь, которая является агликозилированной.

3. Выделенное антитело по п.1 или 2, где:

(a) указанная вариabельная область легкой цепи содержит каркасные области последовательности вариabельной области легкой цепи SEQ ID NO: 152 или 224;

(b) указанная вариabельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152 или 224;

(c) указанная вариabельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73-77 и 221;

(d) указанная вариabельная область легкой цепи содержит каркасные области, полученные от чело-

века;

(е) указанная переменная каркасная область легкой цепи, которая является или происходит от аминокислотной последовательности, кодируемой геном человека, причем указанная аминокислотная последовательность выбрана из группы, состоящей из IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 160), IGKV3D-15*01 (SEQ ID NO: 161), IGKV3-15*01 (SEQ ID NO: 161), IGKV3D-20*01 (SEQ ID NO: 162), IGKV3D-7*01 (SEQ ID NO: 163), IGKV1-9*01 (SEQ ID NO: 164) и IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 165), необязательно где переменная каркасная область легкой цепи получена из аминокислотной последовательности IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 160), где по меньшей мере одна аминокислота в аминокислотной последовательности IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 160) замещена аминокислотой в аналогичном положении в соответствующей переменной каркасной области легкой цепи, полученной не от человека, необязательно где:

(i) аминокислотная замена находится в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 22, 36, 43, 47, 58, 70 и 71, причем аминокислотное положение указано в соответствии с системой нумерации Kabat, и необязательно где

(ii) аминокислотная замена выбрана из группы, состоящей из 3L, 22T, 36F, 43S, 47W, 58V, 70S и 71Y, причем положение аминокислотной замены указано в соответствии с системой нумерации Kabat;

(f) N-концевой аминокислотный остаток указанной переменной области легкой цепи представляет собой пироглутамат; и/или

(g) указанное антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 187-191 и 228.

4. Выделенное антитело, которое специфически связывается с LAG-3 человека, причем указанное антитело содержит:

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-72 и 220, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73-77 и 221;

(b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 168-186 и 225-227, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 187-191 и 228;

(c) переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи, соответственно, содержат аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 56 и 73; 56 и 74; 56 и 75; 56 и 76; 56 и 77; 57 и 73; 57 и 74; 57 и 75; 57 и 76; 57 и 77; 58 и 73; 58 и 74; 58 и 75; 58 и 76; 58 и 77; 59 и 73; 59 и 74; 59 и 75; 59 и 76; 59 и 77; 60 и 73; 60 и 74; 60 и 75; 60 и 76; 60 и 77; 61 и 77; 62 и 77; 63 и 73; 64 и 73; 65 и 73; 220 и 73; 65 и 221; 220 и 221; 66 и 73; 67 и 73; 68 и 73; 69 и 73; 70 и 73; 71 и 73 или 72 и 73; или

(d) тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная тяжелая цепь и указанная легкая цепь, соответственно, содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 169 и 187.

5. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что содержит

(a) константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂ человека, необязательно где указанная константная область тяжелой цепи представляет собой:

(i) IgG₁, содержащую мутацию N297A, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EU, необязательно содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194;

(ii) IgG₁, содержащую мутацию N297Q, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EU;

(iii) нефукозилированный IgG₁; и/или

(iv) IgG₄, содержащую мутацию S228P, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EU, необязательно содержащую константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196; и/или

(b) константную область легкой цепи к или λ человека, необязательно где указанная константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198 или 219.

6. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело:

(a) связывается с эпитопом, расположенным в области LAG-3 человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 216;

(b) связывается с эпитопом, расположенным в области LAG-3 человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 215;

(c) связывается с эпитопом, расположенным в области LAG-3 человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 214;

(d) связывается с эпитопом, расположенным в области LAG-3 человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 213;

(e) связывается с эпитопом, расположенным в области LAG-3 человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 212; и/или

(f) связывается с эпитопом, расположенным в области LAG-3 человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 211.

7. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело:

- (a) представляет собой гуманизированное антитело, мышинное антитело или химерное антитело;
- (b) является антагонистическим по отношению к LAG-3 человека;
- (c) деактивирует, снижает или ингибирует активность LAG-3 человека;
- (d) ингибирует связывание LAG-3 человека с ГКГС класса II;
- (e) индуцирует выработку ИЛ-2 мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК), стимулированными энтеротоксином А стафилококка (SEA); и/или
- (f) индуцирует выработку $\text{TNF}\alpha$ лимфоцитами, инфильтрирующими опухоль (TIL), стимулированными антителами против CD3 и против CD28.

8. Конъюгат, содержащий выделенное антитело по любому из пп.1-7 и цитотоксический агент, цитостатический агент, токсин или радионуклид.

9. Конъюгат, содержащий выделенное антитело по любому из пп.1-7 и детектируемую метку.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-7 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

11. Выделенный полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела по любому из пп.1-7.

12. Выделенный полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи или легкую цепь антитела по любому из пп.1-7.

13. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.11 или 12.

14. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая:

- (a) полинуклеотид по п.11 или 12;
- (b) вектор по п.13;
- (c) полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, или тяжелую цепь и легкую цепь, антитела по любому из пп.1-7;
- (d) первый полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела по любому из пп.1-7, и второй полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи или легкую цепь антитела по любому из пп.1-7;
- (e) вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, или тяжелую цепь и легкую цепь, антитела по любому из пп.1-7; или
- (f) первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела по любому из пп.1-7, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи или легкую цепь антитела по любому из пп.1-7.

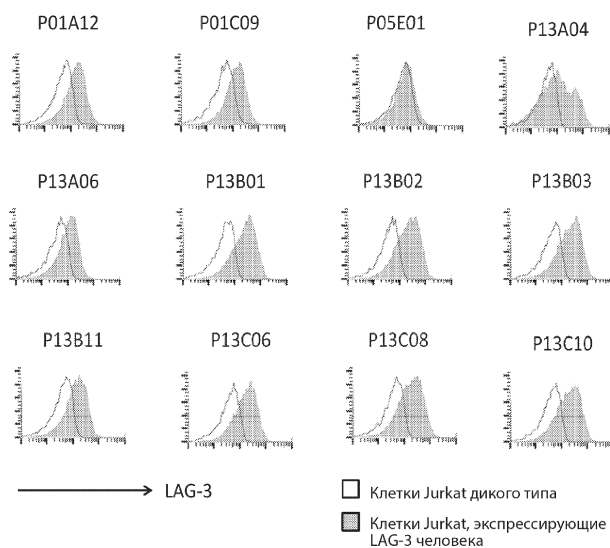
15. Способ получения антитела, которое связывается с LAG-3 человека, включающий культивирование рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей:

- (a) полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, или тяжелую цепь и легкую цепь, антитела по любому из пп.1-7;
- (b) первый полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела по любому из пп.1-7, и второй полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи или легкую цепь антитела по любому из пп.1-7;
- (c) вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, или тяжелую цепь и легкую цепь, антитела по любому из пп.1-7; или
- (d) первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела по любому из пп.1-7, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи или легкую цепь антитела по любому из пп.1-7,

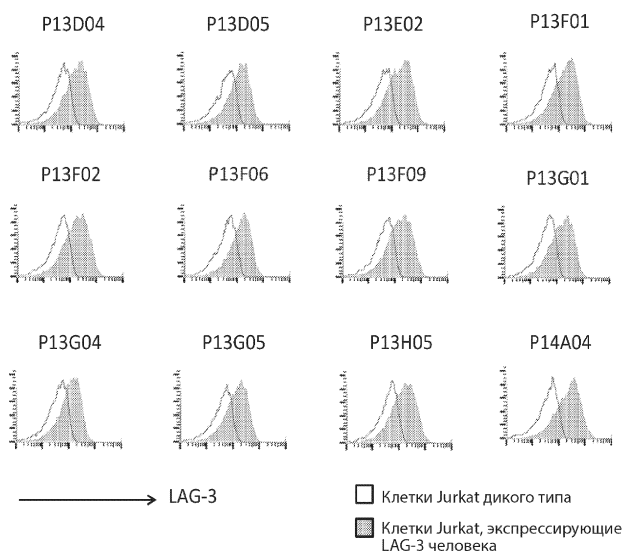
так, что продуцируется антитело.

16. Способ повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела по любому из пп.1-7 или фармацевтической композиции по п.10.

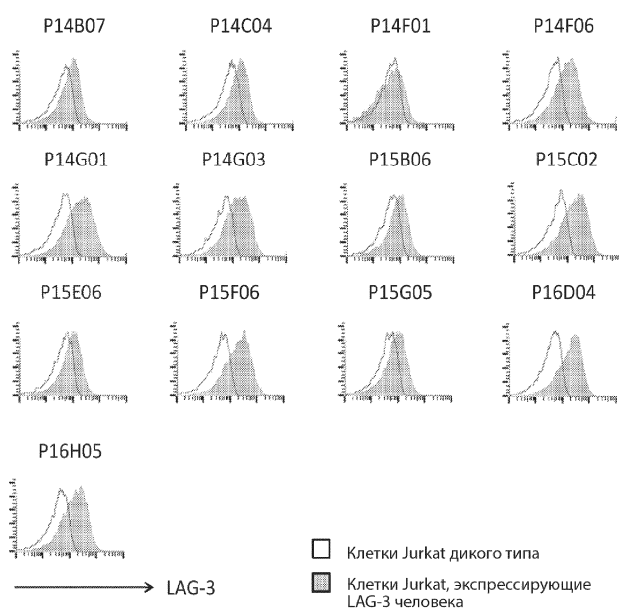
17. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела по любому из пп.1-7 или фармацевтической композиции по п.10.



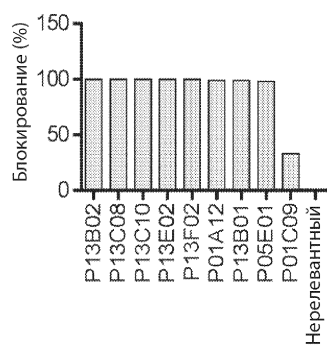
Фиг. 1А



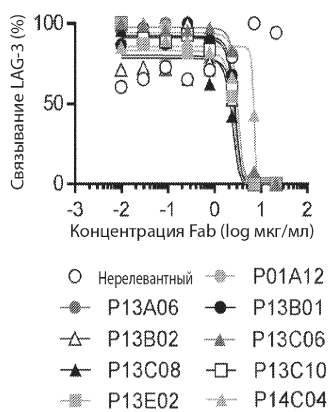
Фиг. 1В



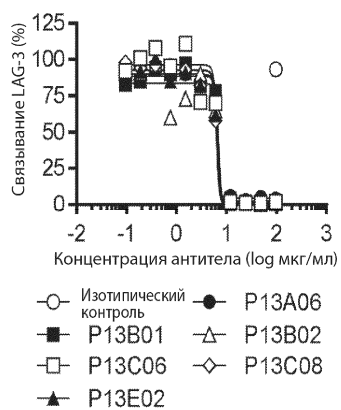
Фиг. 1С



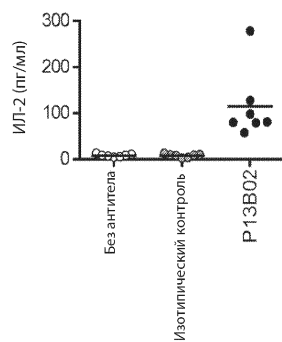
Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 3



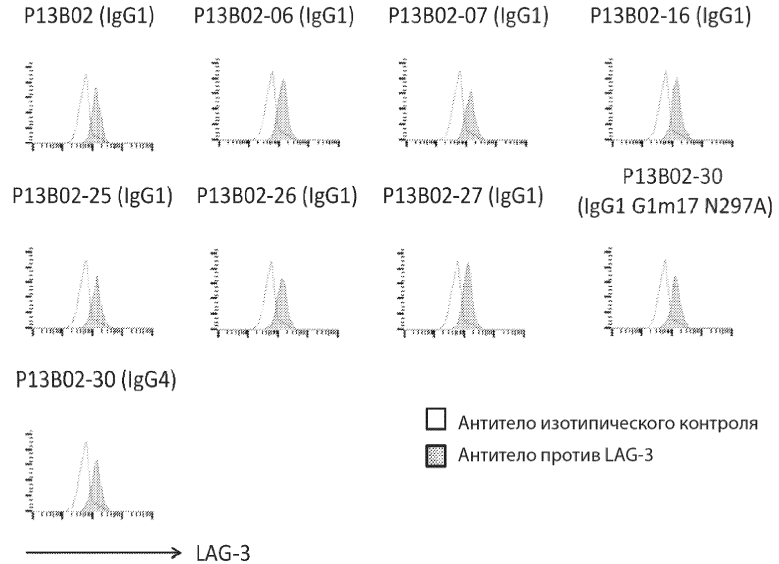
Фиг. 4



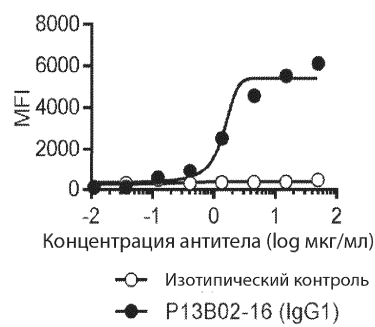
Фиг. 5А



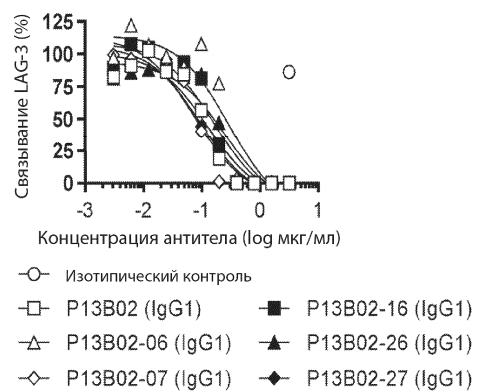
Фиг. 5В



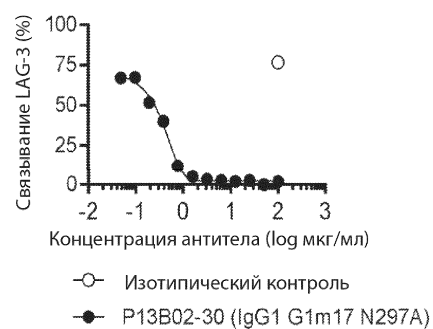
Фиг. 6А



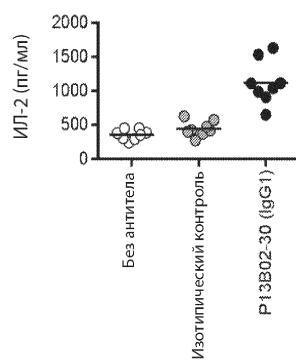
Фиг. 6B



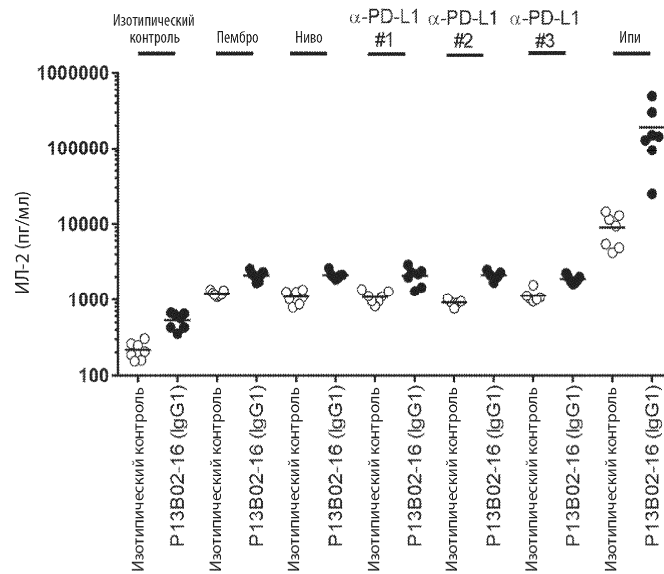
Фиг. 7A



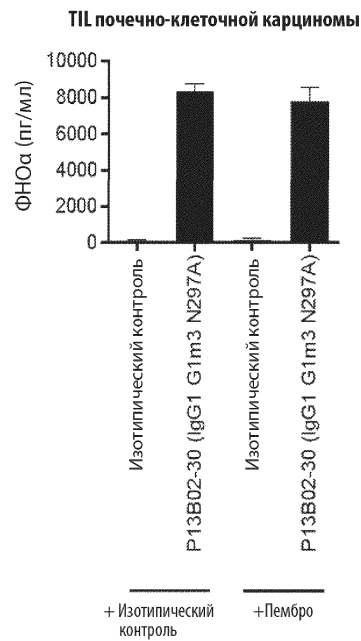
Фиг. 7B



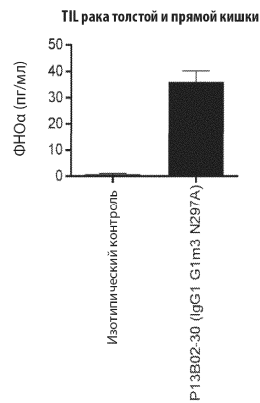
Фиг. 8A



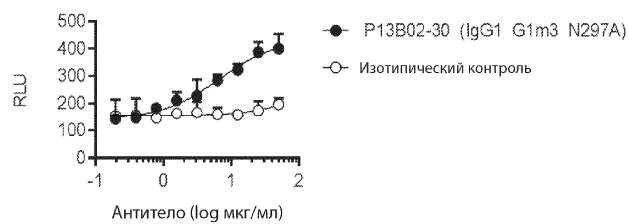
ФИГ. 8



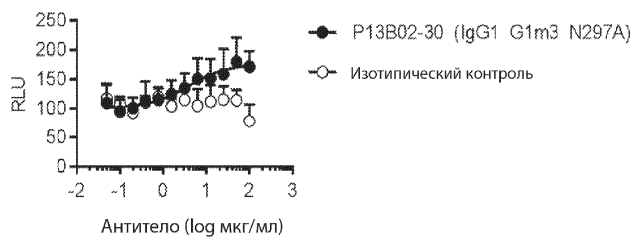
ФИГ. 9А



ФИГ. 9В



Фиг. 10А



Фиг. 10В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2