



(51) МПК
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/2803 (2021.05); *A61K 39/395* (2021.05); *A61P 35/00* (2021.05); *A61P 37/00* (2021.05); *A61P 37/04* (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2019113790, 13.10.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 13.10.2017

Дата регистрации:
 16.09.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 13.10.2016 US 62/407,678

(43) Дата публикации заявки: 13.11.2020 Бюл. № 32

(45) Опубликовано: 16.09.2021 Бюл. № 26

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: 13.05.2019

(86) Заявка РСТ:
 EP 2017/076188 (13.10.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2018/069500 (19.04.2018)

Адрес для переписки:
 129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
 "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

ГРАНДАЛ, Майкл Монрад (DK),
 БХАТИА, Викрам Келлер (DK),
 ГЕТТИНГ, Торбен (DK),
 ФРЕЛИХ, Камилла (DK),
 ГАЛЛЕР, Гюнтер Роланд (DK),
 КРАГХ, Михаэль (DK),
 ХОРАК, Иван Давид (DK),
 БУКЕН, Томас (DK),
 ПЕДЕРСЕН, Миккель Вандаль (DK)

(73) Патентообладатель(и):

СИМФОГЕН А/С (DK)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: WO2010019570 A2, 18.02.2010.
 US2011070238 A1, 24.03.2011. WO2008132601
 A1, 06.11.2008. WO2014008218 A1, 09.01.2014.
 RU2178306 C2, 20.01.2002.

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

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к анти-LAG-3 антителу или его антигенсвязывающей части, которое специфически связывается с LAG-3, способу его получения, а также содержащей его композиции. Также раскрыта выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая цепи вышеуказанного антитела, а также клетка, содержащая вышеуказанную нуклеиновую

кислоту. Изобретение также относится к способу усиления иммунитета у пациента, предусматривающему использование вышеуказанного антитела или его части. Изобретение позволяет эффективно осуществлять лечение пациента со связанным с LAG-3 нарушением. 10 н. и 15 з.п. ф-лы, 9 ил., 10 табл., 14 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)*A61P 37/00* (2006.01)*A61P 37/04* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 16/2803 (2021.05); *A61K 39/395* (2021.05); *A61P 35/00* (2021.05); *A61P 37/00* (2021.05); *A61P 37/04* (2021.05)

(21)(22) Application: **2019113790**, 13.10.2017

(24) Effective date for property rights:
13.10.2017

Registration date:
16.09.2021

Priority:

(30) Convention priority:
13.10.2016 US 62/407,678

(43) Application published: **13.11.2020 Bull. № 32**(45) Date of publication: **16.09.2021 Bull. № 26**(85) Commencement of national phase: **13.05.2019**

(86) PCT application:
EP 2017/076188 (13.10.2017)

(87) PCT publication:
WO 2018/069500 (19.04.2018)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**GRANDAL, Michael Monrad (DK),
BHATIA, Vikram Kjoller (DK),
GJETTING, Torben (DK),
FROHLICH, Camilla (DK),
GALLER, Gunther Roland (DK),
KRAGH, Michael (DK),
HORAK, Ivan David (DK),
BOUQUIN, Thomas (DK),
PEDERSEN, Mikkell Wandahl (DK)**

(73) Proprietor(s):

SYMPHOGEN A/S (DK)

(54) **ANTI-LAG-3 ANTIBODIES AND THEIR COMPOSITIONS**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biochemistry, in particular to an anti-LAG-3 antibody or its antigen-binding part, which specifically binds to LAG-3, a method for its production, as well as a composition containing it. A selected nucleic acid molecule encoding chains of the above-mentioned antibody, as well as a cell containing the above-

mentioned nucleic acid are also disclosed. The invention also relates to a method for strengthening immunity in a patient providing for the use of the above-mentioned antibody or its part.

EFFECT: invention provides for the effective treatment of a patient with a LAG-3-related disorder.

25 cl, 9 dwg, 10 tbl, 14 ex

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который подан в электронном виде в формате ASCII и включен, таким образом, посредством ссылки в полном объеме. Электронная копия списка последовательностей, созданная 5 октября 2017 года, названа 022675_WO057-SL.txt и имеет размер 64693 Б.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] LAG-3 (ген активации лимфоцитов 3), также известный как CD223, представляет собой белок суперсемейства иммуноглобулинов, который выполняет функцию рецептора контрольной точки иммунитета. Зрелый белок представляет собой трансмембранный белок I типа из 503 аминокислот, состоящий из четырех внеклеточных Ig-подобных доменов. Он экспрессируется клетками различных типов, в том числе активированными Т-клетками, регуляторными Т-клетками (Treg), естественные киллерами, В-клетками и плазмоцитоидными дендритными клетками. Информация о последовательности, организации экзонов/интронов и расположении LAG-3 на хромосоме указывает на его близкое родство с CD4. Как и CD4, LAG-3 связывается с молекулами МНС класса II, но с более высокой аффинностью и на другом сайте по сравнению с CD4.

[0003] LAG-3 представляет собой коингибирующий рецептор, который предположительно регулирует Т-клеточную пролиферацию, активацию и гомеостаз сходным с CTLA-4 и PD-1 образом. При связывании с внеклеточным доменом лиганда, LAG-3 проявляет свой эффект посредством последующей передачи сигнала через цитоплазматический домен. Лучшее всего охарактеризованным лигандом LAG-3 является МНС класса II (МНСII), но описаны другие лиганды LAG-3, в том числе LSECtin.

[0004] LAG-3 не имеет классических мотивов ITIM или ITSM, но имеет консервативный мотив KIEELE (SEQ ID NO:73), который предположительно обязателен для проявления его ингибирующего эффекта на Т-клеточную активность. Точный механизм, по которому LAG-3 воздействует на Т-клеточную активность, слабо изучен. LAG-3 ингибирует деление Т-клеток посредством блокирования вхождения активированных Т-клеток в фазу роста клеточного цикла, что ведет к накоплению клеток в S-фазе. LAG-3 также предположительно играет роль в усилении супрессорной активности регуляторных Т-клеток и в модулировании функции дендритных клеток. Злокачественные клетки обладают способностью активировать экспрессию МНСII, который связывает LAG-3, на эффекторных Т-клетках, таким образом ингибируя их активность и индуцируя ускользание опухоли от иммунного ответа.

[0005] Ввиду решающей роли LAG-3 в качестве иммунного модулятора, существует необходимость в новой и усовершенствованной иммунной терапии, которая нацеливается на LAG-3, для лечения злокачественных опухолей и определенных нарушений иммунной системы.

РАСКРЫТИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Настоящее изобретение относится к новым рекомбинантным антителам, нацеленными на LAG-3, а также к фармацевтическим композициям, содержащим одно или несколько таких антител, и к применению антител и фармацевтических композиций для усиления иммунитета у пациента и для лечения злокачественных опухолей, происходящих из таких тканей, как кожа, легкое, кишечник, толстая кишка, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, гематopoэтическая система, голова и шея, печень, мочевого пузырь, молочная железа, желудок, матка и поджелудочная железа. По сравнению с существующими в настоящее время способами лечения таких злокачественных опухолей, включая терапию антителами, предполагается, что антитела по изобретению могут обеспечивать высокоэффективное лечение как при

самостоятельном применении, так и в комбинации с другим противораковым терапевтическим средством, таким как антитело, нацеленное на другой белок контрольной точки иммунитета.

5 [0007] В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к анти-LAG-3 антителу или его антиген-связывающей части, где анти-LAG-3 антитело представляет собой любое антитело, указанное в настоящем описании как антитело 15646, 15532, 15723, 15595, 15431, 15572 или 15011, или его вариант, где вариант, например, может относиться к другому изотипу или изотипическому подклассу и/или
10 содержать определенные минимальные аминокислотные замены относительно антитела 15646, 15532, 15723, 15595, 15431, 15572 или 15011, не утрачивая при этом антиген-связывающую специфичность родительского антитела.

[0008] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело конкурирует за связывание с LAG-3 человека с антителом, у которого CDR1-3 тяжелой цепи (H) и CDR1-3 легкой цепи (H) такие же как H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 15646, 15532, 15723,
15 15595, 15431, 15572 или 15011, или получены на основе этих антител.

[0009] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело связывается с тем же эпитопом LAG-3 человека, что и антитело, у которого CDR1-3 тяжелой цепи (H) и CDR1-3 легкой цепи (H) такие же как H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 15646, 15532, 15723, 15595, 15431, 15572 или 15011, или получены на основе этих антител.

20 [0010] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело содержит H-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность H-CDR3 антитела 15646, 15532, 15723, 15595, 15431, 15572 или 15011.

[0011] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело содержит H-CDR1-3, содержащие последовательности H-CDR1-3, соответственно, антитела 15646, 15532,
25 15723, 15595, 15431, 15572 или 15011.

[0012] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело содержит L-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность L-CDR3 антитела 15646, 15532, 15723, 15595, 15431, 15572 или 15011.

30 [0013] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело содержит L-CDR1-3, содержащие последовательности L-CDR1-3, соответственно, антитела 15646, 15532, 15723, 15595, 15431, 15572 или 15011.

[0014] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело содержит аминокислотные последовательности H-CDR3 и L-CDR3 антитела 15646, 15532, 15723, 15595, 15431, 15572 или 15011.

35 [0015] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 15646, 15532, 15723, 15595, 15431, 15572 или 15011.

[0016] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело конкурирует за связывание с LAG-3 человека с антителом 15646, 15532, 15723, 15595, 15431, 15572 или
40 15011.

[0017] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело связывается с тем же эпитопом LAG-3 человека, что и антитело 15646, 15532, 15723, 15595, 15431, 15572 или 15011.

45 [0018] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (H-CDR) 3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, 43, 46, 50, 55, 58 или 64.

[0019] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело содержит H-CDR1-3, содержащие аминокислотные последовательности, соответственно, из SEQ ID NO:

35-37; 41-43; 35, 42, и 46; 48-50; 53-55; 56-58; или 62-64.

[0020] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело имеет переменный домен тяжелой цепи (VH), последовательность которого по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности VH с SEQ ID NO:3, 7, 11, 15, 19, 23 или 27.

[0021] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело имеет VH, который содержит SEQ ID NO:3, 7, 11, 15, 19, 23 или 27.

[0022] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело имеет тяжелую цепь (HC), которая содержит VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 19, 23 или 27 и константную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:30.

[0023] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело содержит определяющую комплементарность область легкой цепи (L-CDR) 3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40, 52, 61 или 67.

[0024] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело содержит L-CDR1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:38-40; 44, 45 и 40; 44, 47 и 40; 51, 47 и 52; 59-61; или 65-67, соответственно.

[0025] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело имеет переменный домен легкой цепи (VL), последовательность которого по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности VL с SEQ ID NO:4, 8, 12, 16, 20, 24 или 28.

[0026] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело имеет VL, который содержит SEQ ID NO:4, 8, 12, 16, 20, 24 или 28.

[0027] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело имеет легкую цепь (LC), которая содержит VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, 8, 12, 16, 20, 24 или 28 и константную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:32 или 34.

[0028] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело содержит H-CDR3 и L-CDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:37 и 40; 43 и 40; 46 и 40; 50 и 52; 55 и 40; 58 и 61; или 64 и 67; соответственно.

[0029] В определенных вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть по изобретению содержит H-CDR1-3 и L-CDR1-3 с аминокислотными последовательностями:

- a) SEQ ID NO:35, 36, 37, 38, 39 и 40, соответственно;
- b) SEQ ID NO:41, 42, 43, 44, 45 и 40, соответственно;
- c) SEQ ID NO:35, 42, 46, 44, 47 и 40, соответственно;
- d) SEQ ID NO:48, 49, 50, 51, 47 и 52, соответственно;
- e) SEQ ID NO:53, 54, 55, 44, 45 и 40, соответственно;
- f) SEQ ID NO:56, 57, 58, 59, 60 и 61, соответственно; или
- g) SEQ ID NO:62, 63, 64, 65, 66 и 67, соответственно.

[0030] В определенных вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или его антиген-связывающая часть по изобретению:

- a) имеет VH, последовательность которого по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3, и VL, последовательность которого по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере

последовательности SEQ ID NO:12;

d) имеет VH, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15, и VL, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16;

5 e) имеет VH, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:19, и VL, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:20;

f) имеет VH, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23, и VL, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24; или

g) имеет VH, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:27, и VL, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:28.

[0032] В определенных вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело:

15 a) имеет LC, которая содержит или состоит аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:4 и 34; и HC, которая содержит или состоит аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:3 и 30;

b) имеет LC, которая содержит или состоит аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:8 и 34; и HC, которая содержит или состоит аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:7 и 30;

c) имеет LC, которая содержит или состоит аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:12 и 34; и HC, которая содержит или состоит аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:11 и 30;

d) имеет LC, которая содержит или состоит аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:16 и 34; и HC, которая содержит или состоит аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:15 и 30;

e) имеет LC, которая содержит или состоит аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:20 и 34; и HC, которая содержит или состоит аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:19 и 30;

30 f) имеет LC, которая содержит или состоит аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:24 и 34; и HC, которая содержит или состоит аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:23 и 30; или

g) имеет LC, которая содержит или состоит аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:28 и 32; и HC, которая содержит или состоит аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:27 и 30.

[0033] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть по изобретению имеет по меньшей мере одно из следующих свойств:

a) при концентрации 20 мкг/мл более чем на 85% снижает связывание LAG-3 человека с МНС класса II человека на клетках A375 по сравнению с антителом отрицательного контроля, как определено конкурентным анализом на основе проточной цитометрии;

b) в концентрации 20 мкг/мл снижает связывание LAG-3 человека с МНС класса II человека на клетках A375 до 35-85% по сравнению с антителом отрицательного контроля, как определено конкурентным анализом на основе проточной цитометрии;

c) блокирует связывание LAG-3 человека, экспрессируемым на клетках Jurkat, и МНС класса II человека, экспрессируемым на клетках Raji;

d) связывается с LAG-3 человека при EC_{50} 0,1 нМ или меньше, как измерено проточной цитометрией;

e) связывается с LAG-3 яванского макака при EC_{50} 0,3 нМ или меньше, как измерено

проточной цитометрией;

f) связывается с LAG-3 человека при K_D $3,0 \times 10^{-8}$ или меньше, как измерено поверхностным плазмонным резонансом;

5 г) связывается с LAG-3 яванского макака с K_D $1,5 \times 10^{-7}$ или меньше, как измерено поверхностным плазмонным резонансом;

h) связывается с LAG-3 мыши с K_D $3,5 \times 10^{-8}$ или меньше, как измерено поверхностным плазмонным резонансом;

10 i) стимулирует продукцию IL-2 моноклеарными клетками периферической крови человека (PBMC), обработанными стафилококковым энтеротоксином В (SEB);

j) снижает клеточные уровни LAG-3 в Т-клетках человека;

k) снижает растворимые уровни LAG-3 в культуре Т-клеток человека;

l) индуцирует регрессию опухолевого роста *in vivo*;

15 m) задерживает опухолевый рост *in vivo*; и

n) не связывается с тем же эпитопом LAG-3 человека, что и антитело 25F7-Lag3.5.

[0034] Примеры такого антитела включают, без ограничения, антитело 15646 (по меньшей мере со свойствами b, c, d, e, i и n), антитело 15532 (по меньшей мере со свойствами a, c, d, e, f, g, i, j, k, m и n), антитело 15723 (по меньшей мере со свойствами b, c, d, e, i и n), антитело 15595 (по меньшей мере со свойствами a, c, d, e, i и n), антитело 15431 (по меньшей мере со свойствами a, c, d, e, f, g, i и n), антитело 15572 (по меньшей мере со свойствами b, c, d, e, f, g, i и n) и антитело 15011 (по меньшей мере со свойствами a, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m и n). В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть по изобретению имеет по меньшей мере 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из указанных свойств. В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть по изобретению имеет по меньшей мере свойства b, c, d, e, i и n; по меньшей мере свойства a, c, d, e, f, g, i, j, k, m и n; по меньшей мере свойства a, c, d, e, i и n; по меньшей мере свойства a, c, d, e, f, g, i и n; по меньшей мере свойства b, c, d, e, f, g, i и n; или по меньшей мере свойства a, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m и n.

30 [0035] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть по изобретению конкурирует за связывание с LAG-3 человека с антителом 15011, 15572 и/или 15431.

[0036] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть по изобретению связывается с эпитопом LAG-3 человека, имеющим:

a) аминокислотные остатки H85, P86, A87, P89, S91, W92 и G93 из SEQ ID NO:68;

b) аминокислотные остатки A40, Q41, P43, P46, P49, D52, T62, Q64, H65, Q66, P67, D68, G93, P94, P96, R98, Y99, T100, V101, P106, G107, R119, E124, R129, G130, D131, S133, R137, P138, D143, R148 и R163 из SEQ ID NO:68;

40 c) аминокислотные остатки A40, Q41, P43, P46, P49, D52, T62, Q64, H65, Q66, P67, D68, P96, Y99, T100, V101, P106, G107, R119, E124, R129, G130, D131, S133, R137, P138, D143, R148 и R163 из SEQ ID NO:68; или

d) аминокислотные остатки G107, L109, R110 и S111 из SEQ ID NO:68.

[0037] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть по изобретению связывается с эпитопом, имеющим аминокислотные остатки 98-105 SEQ ID NO:68. Примеры такого антитела включают, без ограничения, антитела 15532, 15431, 15572 и 15011.

[0038] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть по изобретению связывается с эпитопом, имеющим:

а) аминокислотные остатки 78-105 и 123-131 SEQ ID NO:68;

б) аминокислотные остатки 23-30, 40-66, 88-105, 123-137 и 148-152 SEQ ID NO:68; или

с) аминокислотные остатки 23-30, 40-66, 98-105, 118-137 и 148-161 SEQ ID NO:68

[0039] В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению
5 относится к изотипу IgG, например, подклассу IgG1 или IgG2 изотипа IgG. В
определенных вариантах осуществления антитело содержит по меньшей мере одну
мутацию в Fc-области. В конкретных вариантах осуществления антитело содержит
мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях тяжелой цепи 228, 234
и 235, которые пронумерованы согласно схеме нумерации IMGT®. Например, один или
10 оба аминокислотных остатка в положениях 234 и 235 могут быть мутированы из Leu
в Ala и/или аминокислотный остаток в положении 228 может быть мутирован из Ser в
Pro.

[0040] В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическим
композициям, содержащим по меньшей мере одно (например, одно) анти-LAG-3 антитело
15 или его антиген-связывающую часть, как раскрыто в настоящем описании, и
фармацевтически приемлемый эксципиент, необязательно с дополнительным
терапевтическим средством, таким как противораковое терапевтическое антитело.

[0041] Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенным молекулам
нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность, которая
20 кодирует тяжелую цепь или ее антиген-связывающую часть, нуклеотидную
последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антиген-связывающую часть,
или обе цепи, анти-LAG-3 антитела, как раскрыто в настоящем описании. Изобретение
также относится к векторам, содержащим такую выделенную молекулу нуклеиновой
кислоты, где указанный вектор может дополнительно содержать последовательность,
25 контролируемую экспрессию.

[0042] Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, содержащим
нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антиген-
связывающую часть, нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую
цепь или ее антиген-связывающую часть, или обе цепи, анти-LAG-3 антитела, как
30 раскрыто в настоящем описании.

[0043] Настоящее изобретение также относится к способу получения антитела или
его антиген-связывающей части, как раскрыто в настоящем описании, который включает
наличие клетки-хозяина, которая содержит нуклеотидную последовательность, которая
кодирует тяжелую цепь или ее антиген-связывающую часть, и нуклеотидную
35 последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антиген-связывающую часть,
анти-LAG-3 антитела, как раскрыто в настоящем описании, культивирование указанной
клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела или его части, и
выделение полученного антитела или его части.

[0044] Настоящее изобретение также относится к полиспецифической (например,
40 биспецифической) связывающей молекуле, содержащей антиген-связывающую часть
анти-LAG-3 антитела, описанного в настоящем описании, и антиген-связывающую
часть другого отличающегося антитела, такого как другое анти-LAG-3 антитело
(например, как раскрыто в настоящем описании) или антитело, которое нацелено на
другой белок, такой как другой белок контрольной точки иммунитета, раковый антиген
45 или другую молекулу клеточной поверхности, активность которого опосредует
патологическое состояние, такое как злокачественная опухоль.

[0045] Настоящее изобретение также относится к способу лечения пациента со
связанным с LAG-3 нарушением, который включает введение указанному пациенту

анти-LAG-3 антитела или его антиген-связывающей части, фармацевтической композиции или биспецифической связывающей молекулы, как раскрыто в настоящем описании. Если не указано иное, пациентом в настоящем описании является человек.

[0046] Настоящее изобретение также относится к способу усиления иммунитета у пациента, который включает введение указанному пациенту анти-LAG-3 антитела или его антиген-связывающей части, фармацевтической композиции или биспецифической связывающей молекулы, как раскрыто в настоящем описании.

[0047] Настоящее изобретение также относится к способу лечения злокачественной опухоли у пациента, который включает введение указанному пациенту анти-LAG-3 антитела или его антиген-связывающей части, фармацевтической композиции или биспецифической связывающей молекулы, как раскрыто в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль происходит из ткани, выбранной из кожи, легкого, кишечника, толстой кишки, яичника, головного мозга, предстательной железы, почки, мягких тканей, гематopoэтической системы, головы и шеи, печени, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, матки и поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой фибросаркому, немелкоклеточный рак легких, меланому, глиобластому, глиосаркому или рак толстой кишки.

[0048] Любой из вышеуказанных способов дополнительно может включать введение, например, химиотерапевтического средства, анти-неопластического средства, анти-ангиогенного средства, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора пути LAG-3 или лучевой терапии. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ретиноевой кислоты, фенилбутирата, полностью транс-ретиноевой кислоты и/или активной формы витамина D.

[0049] Настоящее изобретение дополнительно относится к применению композиции антител, содержащей анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающую часть, как раскрыто в настоящем описании, для изготовления лекарственного средства для лечения пациента со связанным с LAG-3 нарушением, лечения злокачественной опухоли у пациента и/или усиления иммунитета у больного.

[0050] Настоящее изобретение дополнительно относится к анти-LAG-3 антителу или антиген-связывающей части, как раскрыто в настоящем описании, для лечения пациента со связанным с LAG-3 нарушением, лечения злокачественной опухоли у пациента и/или усиления иммунитета у больного.

[0051] Настоящее изобретение дополнительно относится к изделию, содержащему анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающую часть, как раскрыто в настоящем описании, где указанное изделие подходит для лечения пациента со связанным с LAG-3 нарушением, лечения злокачественной опухоли у пациента и/или усиления иммунитета у больного.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0052] На фиг. 1A-1C представлены репрезентативные точечные диаграммы проточной цитометрии антител, полученных, как описано в примере 2. Фиг. 1A: клон антитела, специфически связывающийся с трансфицированными клетками LAG-3 человека. Фиг. 1B: клон антитела, связывающийся неспецифически с клетками CHO-S. Фиг. 1C: клон антитела, который не связывается ни с одной популяцией клеток, используемых при скрининге.

[0053] На фиг. 2 представлен уровень продукции IL-2 SEB-стимулированными PBMC после обработки моноклональными анти-LAG-3 антителами.

[0054] На фиг. 3 представлен уровень продукции IL-2 SEB-стимулированными PBMC

после обработки моноклональными анти-LAG-3 антителами. Каждая точка представляет уровень секреции IL-2 у одного донора PBMC.

[0055] На фиг. 4 представлен уровень люминесценции в анализе блокирования LAG-3-MHC класса II после лечения моноклональными анти-LAG-3 антителами. Данные представлены в виде среднее $\pm$ SEM.

[0056] На фиг. 5 представлены уровни LAG-3 в лизатах и супернатантах трансфицированной LAG-3 T-клеточной линии после обработки моноклональными анти-LAG-3 антителами. Данные представлены в виде среднее $\pm$ SEM. Звездочки обозначают статистически значимое различие между 15532 и аналогами эталонного антитела (*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

[0057] На фиг. 6 представлен эффект антитела 15011 in vivo в двух моделях сингенных опухолей на мышах.

[0058] На фиг. 7 представлен эффект антитела 15532 in vivo в модели полугуманизированной ксенотрансплантированной опухоли, где иммунную систему мышей NOG восстанавливали с использованием PBMC человека и мышам пересаживали клетки меланомы человека A375.

[0059] На фиг. 8 представлен обзор групп эпитопов (эпитопных групп), идентифицированных в анализе конкурентного связывания на панели из 13 анти-LAG-3 антител. Антитела, соединенные черными линиями, обозначают перекрестную блокирующую активность в обеих ориентациях (лиганд и аналит). Антитела, соединенные штриховыми линиями, обозначают однонаправленное блокирование, где антитело блокирует при тестировании только как аналит. Антитела группируют в соответствии с паттернами конкуренции с другими анти-LAG-3 антителами.

[0060] На фиг. 9 представлен кластерный анализ разнообразия эпитопов антител-лигандов. Антитела с точками ветвления при значениях по оси x выше 0 имеют эпитопы, которые отличаются по конкурентному связыванию с LAG-3 с другими антителами в панели.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0061] Настоящее изобретение относится к новым анти-LAG-3 антителам человека, которые можно использовать для усиления иммунной системы у человека, такого как больной злокачественной опухолью. Если не указано иное, как используют в настоящем описании, «LAG-3» относится к LAG-3 человека. Полипептидная последовательность LAG-3 человека доступна по номеру доступа UniProt P18627 (LAG3_HUMAN) (SEQ ID NO:68).

[0062] Термин «антитело» (Ab) или «иммуноглобулин» (Ig), как используют в настоящем описании, относится к тетрамеру, содержащему две тяжелые (H) цепи (приблизительно 50-70 кДа) и две легкие (L) цепи (приблизительно 25 кДа), соединенные друг с другом дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Каждая легкая цепь состоит из вариабельного домена легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Домены VH и VL можно дополнительно подразделить на гипервариабельные области, называемые «определяющими комплементарность областями» (CDR), которые чередуются с областями, которые более консервативны и называются «каркасными областями» (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR (H-CDR в настоящем описании обозначает CDR тяжелой цепи; и L-CDR в настоящем описании обозначает CDR легкой цепи) и четыре FR, которые расположены от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Присвоение номеров аминокислотам в тяжелой или легкой цепи может происходить согласно определениями IMGT® (Lefranc

et al., Dev Comp Immunol 27(1):55-77 (2003)); или определениями Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 и 1991)); Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); или Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989).

[0063] Термин «рекомбинантное антитело» относится к антителу, которое экспрессирует клетка или клеточная линия, содержащая нуклеотидную последовательность(и), которая кодирует антитело, где указанная нуклеотидная последовательность(и) не связана с клеткой в природе.

[0064] Термин «выделенный белок», «выделенный полипептид» или «выделенное антитело» относится к белку, полипептиду или антителу, которое по своему происхождению или источнику получения (1) не связано с природными компонентами, которые сопровождают его в его нативном состоянии, (2) свободно от других белков того же биологического вида, (3) экспрессируется клеткой другого биологического вида и/или (4) не является природным. Таким образом, полипептид, который синтезируют химически или синтезируют в клеточной системе, отличной от клетки, с которой он естественным образом связан, будет «выделенным» из его природных компонентов. Белок также может быть по существу свободным от природных компонентов посредством выделения, используя приемы очистки белков, хорошо известных в данной области.

[0065] Как используют в настоящем описании, термин «зародышевая линия» относится к нуклеотидным и аминокислотным последовательностям генов антител и сегментам генов, в том виде как они передаются от родителей потомству через половые клетки. Последовательности зародышевой линии отличаются от нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела в зрелых В-клетках, которые изменены посредством событий рекомбинации и гипермутации в ходе созревания В-клеток.

Антитело, которое «использует» конкретную последовательность зародышевой линии, имеет нуклеотидную или аминокислотную последовательность, которую можно выровнять с нуклеотидной последовательностью или аминокислотной последовательностью указанной зародышевой линии более точно, чем с любой нуклеотидной или аминокислотной последовательностью другой зародышевой линии.

[0066] Термин «аффинность» относится к степени сродства антигена и антитела. Присущее сродство антитела к антигену обычно выражают в виде равновесной константы связывания (аффинности) (K_D) для конкретного взаимодействия антитело-антиген. Говорят, что антитело специфически связывается с антигеном, если K_D составляет ≤ 1 мМ, предпочтительно ≤ 100 нМ. Константу (аффинности) связывания K_D можно измерять, например, посредством поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore™) или Bio-Layer Interferometry, например, с использованием системы IBIS MX96 SPR bp IBIS Technologies или системы Octet™ из ForteBio.

[0067] Термин « k_{off} » относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитела и антигена. Константу скорости диссоциации k_{off} можно измерять, например, посредством SPR (поверхностный плазмонный резонанс), например, с использованием системы IBIS MX96.

[0068] Термин «эпитоп», как используют в настоящем описании, относится к части (детерминанте) антигена, которая специфически связывается с антителом или соответствующей молекулой, такой как биспецифическая связывающая молекула. Эпитопные детерминанты в целом состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или углеводные или сахарные боковые цепи, и в целом имеют конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные

характеристики заряда. Эпитоп может быть «линейным» или «конформационным». В линейном эпитопе все точки взаимодействия между белком (например, антигеном) и взаимодействующей молекулой (например, антителом) расположены по линии первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе точки взаимодействия находятся в аминокислотных остатках белка, которые разделены друг от друга в первичной аминокислотной последовательности. Если определен желаемый эпитоп на антигене, то можно создавать антитела к этому эпитопу, используя приемы, хорошо известные в данной области. Например, антитело к линейному эпитопу можно создавать, например, посредством иммунизации животного пептидом, имеющим аминокислотные остатки линейного эпитопа. Антитело к конформационному эпитопу можно создавать, например, посредством иммунизации животного с использованием минидомена, содержащего релевантные аминокислотные остатки конформационного эпитопа. Антитело к конкретному эпитопу также можно создавать, например, посредством иммунизации животного целевой молекулой, представляющей интерес, (например, LAG-3) или ее релевантной частью, с последующим скринингом на связывание с эпитопом.

[0069] Можно определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом или конкурирует за связывание с анти-LAG-3 антителом по изобретению, используя известные в данной области способы, включая, без ограничения, конкурентный анализ, эпитопные группы и сканирование аланином. В одном из вариантов осуществления обеспечивают связывание анти-LAG-3 антитела по изобретению с LAG-3 при насыщающих условиях и затем измеряют способность тестируемого антитела связываться с LAG-3. Если тестируемое антитело способно связываться с LAG-3 одновременно с эталонным антителом против LAG-3, то тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, нежели эталонное анти-LAG-3 антитело. Однако если тестируемое антитело не способно связываться с LAG-3 одновременно, то тестируемое антитело связывается с тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или эпитопом, который находится в непосредственной близости от эпитопа, связываемого антителом против LAG-3 по изобретению. Этот эксперимент можно осуществлять с использованием, например, ELISA, RIA, BIAcore™, SPR, Bio-Layer Interferometry или проточной цитометрии. Для того чтобы тестировать, проявляет ли анти-LAG-3 антитело перекрестную конкуренцию с другим антителом против LAG-3, можно использовать конкурентный способ, описанный выше, в двух направлениях, то есть определять, обеспечивает ли известное антитело блокирование тестируемого антитела, и наоборот. Такие эксперименты перекрестной конкуренции можно осуществлять, например, с использованием прибора IBIS MX96 SPR или системы Octet™.

[0070] Антитело, которое связывается с тем же эпитопом или конкурирует за связывание с антителом по изобретению, предпочтительно обладает блокирующей МНСII активностью, например, как определяют конкурентным анализом на основе проточной цитометрии, описанным в примере 6. Антитело, которое связывается с тем же эпитопом или конкурирует за связывание с антителом по изобретению, может снижать связывание по меньшей мере, например, на 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, или 80% или предпочтительно по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

[0071] Термин «химерное антитело» относится в широком смысле слова к антителу, которое содержит одну или несколько областей из одного антитела и одну или несколько областей из одного или нескольких других антител, обычно к антителу, которое частично происходит от человека и частично происходит от не относящегося к человеку вида,

то есть получено частично от не относящегося к человеку животного, например, мыши, крысы или другого грызуна или птицы, такой как курица. Химерные антитела предпочтительнее не принадлежащих человеку антител для снижения риска ответа на антитело у человека, например, ответа на антитело мыши у человека в случае мышиног

5 антитела. Примером типичного химерного антитела является то, в котором последовательности переменных доменов относятся к мыши, тогда как последовательности константных областей относятся к человеку. В случае химерного антитела, не относящиеся к человеку части можно подвергать дополнительному изменению для того, чтобы гуманизировать антитело. Химерные антитела, описанные

10 в настоящем описании, могут иметь, например, последовательности переменных доменов курицы и последовательности константных областей человека.

[0072] Термин «гуманизировать» относится к тому факту, что когда антитело имеет происхождение полностью или частично не от человека (например, антитело мыши или курицы, полученное путем иммунизации мышей или кур, соответственно, с

15 использованием антигена, представляющего интерес, или химерное антитело на основе такого антитела мыши или курицы), возможно осуществлять замену определенных аминокислот, в частности, в каркасных областях и константных областях тяжелых и легких цепей, во избежание или для минимизации иммунного ответа у человека. Несмотря на то, что для конкретного антитела невозможно точно предсказывать иммуногенность

20 и, тем самым, ответ на антитело у человека, не принадлежащие человеку антитела склонны быть более иммуногенными у человека, чем антитела человека. Показано, что химерные антитела, в которых чужеродные константные области (например, грызуна или птицы) заменены на последовательности, происходящие от человека, в менее иммуногенны, чем антитела полностью чужеродного происхождения, и среди

25 терапевтических антител тенденция направлена в сторону гуманизированных антител или полностью антител человека. Химерные антитела или другие антитела не относящегося к человеку происхождения, таким образом, можно гуманизировать для того, чтобы снижать риск ответа на антитело у человека.

[0073] Для химерных антител гуманизация обычно включает модификацию каркасных

30 областей последовательностей переменных доменов. Аминокислотные остатки, которые являются частью определяющих комплементарность областей (CDR), наиболее часто не подвергают изменениям в связи с гуманизацией, хотя в определенных случаях может быть желательно изменять индивидуальные аминокислотные остатки CDR, например, чтобы удалять участок гликозилирования, участок дезамидирования, участок

35 изомеризации аспартата или нежелательный остаток цистеина или метионина. N-связанное гликозилирование происходит посредством прикрепления олигосахаридной цепи к остатку аспарагина в трипептидной последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где X может представлять собой любую аминокислоту, за исключением Pro. Удаления участка N-гликозилирования можно добиваться посредством мутации остатка

40 Asn или Ser/Thr в другой остаток, предпочтительно посредством консервативной замены. Дезамидирование остатков аспарагина и глутамин может происходить в зависимости от таких факторов, как pH и экспозиция на поверхности. Остатки аспарагина особенно восприимчивы к дезамидированию, в первую очередь когда присутствуют в последовательности Asn-Gly и в меньшей степени в других дипептидных

45 последовательностях, таких как Asn-Ala. Когда такой участок дезамидирования, в частности Asn-Gly, присутствует в последовательности CDR, то может быть желательно удалять этот участок, обычно посредством консервативной замены для того, чтобы удалять один из вовлеченных остатков.

[0074] Многие способы гуманизации последовательности антитела известны в данной области; см., например, обзор Almagro & Fransson, *Front Biosci.* 13:1619-1633 (2008). Один широко используемый способ представляет собой пересадку CDR, которая, например, для химерного антитела мышинного происхождения, включает идентификацию аналогов в генах зародышевой линии человека для генов переменных доменов мыши и пересадку последовательностей CDR мыши в этот каркас. Специфичность взаимодействия антитела с целевым антигеном в первую очередь заключена в аминокислотных остатках, расположенных в шести CDR в тяжелой и легкой цепи. Следовательно, аминокислотные последовательности в CDR значительно более переменны между индивидуальными антителами, чем последовательности вне CDR. Поскольку последовательности CDR отвечают за большинство взаимодействий антитело-антиген, возможно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства конкретного встречаемого в природе антитела или, в более общем смысле, любого специфического антитела с данной аминокислотной последовательностью, например, посредством конструирования экспрессирующих векторов, которые экспрессируют последовательности CDR из специфического антитела, пересаженные в каркасные последовательности от другого антитела. Как результат, можно «гуманизировать» не принадлежащее человеку антитело и все еще по существу сохранять специфичность связывания и аффинность исходного антитела. Пересадка CDR может происходить на основе определений CDR по Kabat, хотя в более новой публикации (Magdelaine-Beuzelin et al., *Crit Rev. Oncol Hematol.* 64:210-225 (2007)) сделано предположение о том, что определение IMGT® (международная информационная система ImMunoGeneTics®, www.imgt.org) может усовершенствовать результат гуманизации (см. Lefranc et al., *Dev. Comp Immunol.* 27:55-77 (2003)).

[0075] В некоторых случаях пересадка CDR может снижать специфичность связывания и аффинность и, таким образом, биологическую активность антитела с пересадкой CDR по сравнению с родительским антителом, из которого получают CDR. Обратные мутации (иногда обозначаемые как «репарация каркаса») можно вводить в выбранные положения антитела с пересадкой CDR, обычно в каркасные области, чтобы восстанавливать специфичность связывания и аффинность родительского антитела. Положения для возможных обратных мутаций можно идентифицировать с использованием информации, доступной в литературе и в базах данных об антителах. Аминокислотными остатками, которые являются кандидатами для обратных мутаций, обычно являются те, которые расположены на поверхности молекулы антитела, тогда как погруженные остатки или те, которые имеют малую степень экспозиции на поверхности, обычно не подвергают изменениям. Альтернативным приемом гуманизации для пересадки CDR и обратной мутации является изменение поверхности, при котором сохраняют не экспонированные на поверхности остатки не относящегося к человеку происхождения, тогда как поверхностные остатки изменяют на остатки человека.

[0076] В определенных случаях также может быть желательно изменять один или несколько аминокислотных остатков CDR для того, чтобы усовершенствовать аффинность связывания с целевым эпитопом. Это известно как «созревание аффинности» и необязательно может быть выполнено в связи с гуманизацией, например, в ситуациях, когда гуманизация антитела ведет к снижению специфичности связывания или аффинности и невозможно в достаточной мере усовершенствовать специфичность или аффинность связывания с помощью только обратных мутаций. Различные способы созревания аффинности известны в данной области, например, способ сканирующего насыщающего мутагенеза *in vitro*, описанный в Burks et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:

412-417 (1997), и способ постепенного созревания аффинности *in vitro* из Wu et al., Proc Natl Acad Sci USA 95:6037-6042 (1998).

[0077] Термин «антиген-связывающая часть» антитела (или просто «часть антитела»), как используют в настоящем описании, относится к одной или нескольким частям или
 5 фрагментам антитела, которые сохраняют способность к специфическому связыванию с антигеном (например, LAG-3 человека или его частью). Показано, что определенные фрагменты полноразмерного антитела могут выполнять антиген-связывающую функцию антитела. Примеры связывающих фрагментов, охваченных термином «антиген-связывающая часть», включают (i) фрагмент Fab: одновалентный фрагмент, состоящий
 10 из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂: двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH из одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb, который состоит из домена VH; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR),
 15 способную специфически связываться с антигеном. Кроме того, несмотря на то, что отдельные гены кодируют два домена фрагмента Fv, VL и VH, их можно объединять, используя рекомбинантные способы, посредством синтетического линкера, который позволяет создавать их в виде единой белковой цепи, в которой домены VL и VH образуют пару для того, чтобы формировать одновалентные молекулы (известные как
 20 одноцепочечный Fv (scFv)). Также в изобретение включены антиген-связывающие молекулы, содержащие VH и/или VL. В случае VH, молекулы также могут содержать одну или несколько из области CH1, шарнира, CH2 или CH3. Предусмотрено, что такие одноцепочечные антитела также включены в термин «антиген-связывающая часть» антитела. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также включены.
 25 Диатела представляют собой двухвалентные биспецифические антитела, в которых домены VH и VL экспрессированы в одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который слишком короток, чтобы сделать возможным образование пар между двумя доменами в одной и той же цепи, тем самым принуждая домены образовывать пару с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антиген-связывающих
 30 участка.

[0078] Часта антител, такие как фрагменты Fab и F(ab')₂, можно получать из целых антител, используя общепринятые способы, такие как расщепление целых антител
 35 папаином или пепсином. Кроме того, антитела, части антител и молекулы иммуноадгезии можно получать с использованием стандартных способов рекомбинантной ДНК, например, как раскрыто в настоящем описании.

[0079] Класс (изотип) и подкласс анти-LAG-3 антител можно определять любым известным в данной области способом. В целом, класс и подкласс антитела можно определять с использованием антител, которые обладают специфичностью к
 40 конкретному классу и подклассу антител. Такие антитела доступны коммерчески. Класс и подкласс можно определять с помощью ELISA, вестерн-блоттинга, а также другими приемами. Альтернативно, класс и подкласс можно определять посредством полного или частичного секвенирования константных областей тяжелых и/или легких цепей антител, сравнения их аминокислотных последовательностей с известными
 45 аминокислотными последовательностями различных классов и подклассов иммуноглобулинов и определения класса и подкласса антител.

[0080] Если не указано иное, все номера аминокислотных остатков антител, упоминаемые в этом раскрытии, приведены в соответствии со схемой нумерации IMGT®.
 Анти-LAG-3 антитела

[0081] Настоящее изобретение относится к антителам, нацеленным на LAG-3, и их антиген-связывающим частям. В конкретном варианте осуществления антитела, раскрытые в настоящем описании, представляют собой антитела человека, созданные у трансгенных крыс, которые способны создавать антитела с идиотипами человека. В другом варианте осуществления антитела представляют собой полученные у курицы химерные антитела, содержащие последовательности CDR курицы и каркасные области человека, где каркасные области подвергали гуманизации.

[0082] Одно преимущество новых анти-LAG-3 антител по изобретению состоит в том, что они способны усиливать активность Т-клеток, как измеряют по увеличенному продуцированию IL-2; см., например, пример 7. Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, полагают, что анти-LAG-3 антитела по изобретению способны блокировать взаимодействие LAG-3 с его предполагаемыми лигандами, такими как MHCII и LSECtin. Антитела могут выполнять это непосредственно через блокирование области связывания лиганда, как продемонстрировано, например, в примере 6, или через индуцирование интернализации LAG-3, которая предусмотрена в качестве возможного механизма действия, лежащего в основе результатов, представленных в примере 9. Другое возможное преимущество анти-LAG-3 антител по изобретению состоит в низком уровне вторичных эффекторных функций у антител, имеющих мутации «LALA» (L234A/L235A), которые препятствуют значимому связыванию антитела с FcγR человека (рецепторы Fcγ), и, таким образом, истощении эффекторных Т-клеток.

[0083] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело имеет CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), которая по меньшей мере на 90% идентична по последовательности с любой из SEQ ID NO:37, 43, 46, 50, 55, 58 и 64, например, по меньшей мере на 92% идентична, например, по меньшей мере на 95%, 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из SEQ ID NO:37, 43, 46, 50, 55, 58 и 64.

[0084] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело имеет вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности с любой из SEQ ID NO:3, 7, 11, 15, 19, 23 или 27, например, по меньшей мере на 92% идентичен, например, по меньшей мере на 95%, 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен любой из SEQ ID NO:3, 7, 11, 15, 19, 23 или 27.

[0085] В другом варианте осуществления анти-LAG-3 антитело имеет вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности любой из SEQ ID NO:3, 7, 11, 15, 19, 23 или 27, например, по меньшей мере на 92% идентичен, например, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен любой из SEQ ID NO:3, 7, 11, 15, 19, 23 или 27; и константную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична по последовательности с SEQ ID NO:30, например, по меньшей мере на 92% идентична, например, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с SEQ ID NO:30.

[0086] В другом варианте осуществления анти-LAG-3 антитело имеет тяжелую цепь (HC), которая содержит аминокислотную последовательность VH из любой из SEQ ID NO:3, 7, 11, 15, 19, 23 или 27 и аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи из SEQ ID NO:30.

[0087] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело имеет CDR3 легкой цепи (L-CDR3), которая по меньшей мере на 90% идентична по последовательности

любой из SEQ ID NO:40, 52, 61 и 67, например, по меньшей мере на 92% идентична, например, по меньшей мере на 95%, 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из SEQ ID NO:40, 52, 61 и 67.

[0088] В другом варианте осуществления анти-LAG-3 антитело имеет вариабельный домен легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности с аминокислотной последовательностью VL из любой из SEQ ID NO:4, 8, 12, 16, 20, 24 или 28, например, по меньшей мере на 92% идентичен, например, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен любой из SEQ ID NO:4, 8, 12, 16, 20, 24 или 28.

[0089] В другом варианте осуществления анти-LAG-3 антитело имеет вариабельный домен легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности с аминокислотной последовательностью VL из любой из SEQ ID NO:4, 8, 12, 16, 20 или 24, например, по меньшей мере на 92% идентичен, например, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен любой из SEQ ID NO:4, 8, 12, 16, 20 или 24; и аминокислотную последовательность константной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична по последовательности с SEQ ID NO:34, например, по меньшей мере на 92% идентична, например, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с SEQ ID NO:34.

[0090] В другом варианте осуществления анти-LAG-3 антитело имеет вариабельный домен легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности с аминокислотной последовательностью VL из SEQ ID NO:28, например, по меньшей мере на 92% идентичен, например, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен с SEQ ID NO:28; и аминокислотную последовательность константной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична по последовательности с SEQ ID NO:32, например, по меньшей мере на 92% идентична, например, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с SEQ ID NO:32.

[0091] В другом варианте осуществления анти-LAG-3 антитело имеет легкую цепь, которая содержит любую SEQ ID NO:4, 8, 12, 16, 20 или 24, и SEQ ID NO:34.

[0092] В другом варианте осуществления анти-LAG-3 антитело имеет легкую цепь, которая содержит SEQ ID NO:28 и SEQ ID NO:32.

[0093] В определенных вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело содержит любую из описанных выше тяжелых цепей и любую из описанных выше легких цепей.

[0094] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть по изобретению содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 из:

- a) SEQ ID NO:35, 36, 37, 38, 39 и 40, соответственно;
- b) SEQ ID NO:41, 42, 43, 44, 45 и 40, соответственно;
- c) SEQ ID NO:35, 42, 46, 44, 47 и 40, соответственно;
- d) SEQ ID NO:48, 49, 50, 51, 47 и 52, соответственно;
- e) SEQ ID NO:53, 54, 55, 44, 45 и 40, соответственно;
- f) SEQ ID NO:56, 57, 58, 59, 60 и 61, соответственно; или
- g) SEQ ID NO:62, 63, 64, 65, 66 и 67, соответственно.

[0095] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-

связывающая часть по изобретению содержит H-CDR3 и an L-CDR3, которые на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны аминокислотным последовательностям:

- a) SEQ ID NO:37 и 40, соответственно;
- 5 b) SEQ ID NO:43 и 40, соответственно;
- c) SEQ ID NO:46 и 40, соответственно;
- d) SEQ ID NO:50 и 52, соответственно;
- e) SEQ ID NO:55 и 40, соответственно;
- f) SEQ ID NO:58 и 61, соответственно; или
- 10 g) SEQ ID NO:64 и 67, соответственно.

[0096] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть по изобретению содержит VH и VL, которые на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны аминокислотным последовательностям:

- 15 a) SEQ ID NO:3 и 4, соответственно;
- b) SEQ ID NO:7 и 8, соответственно;
- c) SEQ ID NO:11 и 12, соответственно;
- d) SEQ ID NO:15 и 16, соответственно;
- e) SEQ ID NO:19 и 20, соответственно;
- 20 f) SEQ ID NO:23 и 24, соответственно; или
- g) SEQ ID NO:27 и 28, соответственно.

[0097] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть по изобретению содержит VH и VL, которые имеют аминокислотные последовательности:

- 25 a) SEQ ID NO:3 и 4, соответственно;
- b) SEQ ID NO:7 и 8, соответственно;
- c) SEQ ID NO:11 и 12, соответственно;
- d) SEQ ID NO:15 и 16, соответственно;
- e) SEQ ID NO:19 и 20, соответственно;
- 30 f) SEQ ID NO:23 и 24, соответственно; или
- g) SEQ ID NO:27 и 28, соответственно.

[0098] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело содержит:

- a) HC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:3 и 30 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:4 и 34;
- 35 b) HC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:7 и 30 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:8 и 34;
- c) HC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:11 и 30 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:12 и 34;
- d) HC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:15 и 30 и LC с
- 40 аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:16 и 34;
- e) HC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:19 и 30 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:20 и 34;
- f) HC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:23 и 30 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:24 и 34; или
- 45 g) HC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:27 и 30 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:28 и 32.

[0099] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть по изобретению содержит аминокислотные последовательности

H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 15646, 15532, 15723, 15595, 15431, 15572 или 15011.

[0100] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть по изобретению содержит VH и VL, которые по меньшей мере на 90% идентичны по аминокислотной последовательности VH и VL, соответственно, антитела 15646, 15532, 15723, 15595, 15431, 15572 или 15011.

[0101] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть по изобретению содержит VH и VL, которые представляют собой VH и VL, соответственно, антитела 15646, 15532, 15723, 15595, 15431, 15572 или 15011.

[0102] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело по изобретению представляет собой антитело 15646, 15532, 15723, 15595, 15431, 15572 или 15011 или антитело с теми же аминокислотными последовательностями, что и у указанного антитела.

[0103] Изобретение также относится к анти-LAG-3 антителу или его антиген-связывающей части, которое связывается с эпитопом LAG-3 человека, имеющим:

a) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или все 7 аминокислотных остатков, выбранных из H85, P86, A87, P89, S91, W92 и G93 с SEQ ID NO:68 (например, антитело 15532);

b) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или все 32 аминокислотных остатка, выбранных из A40, Q41, P43, P46, P49, D52, T62, Q64, H65, Q66, P67, D68, G93, P94, P96, R98, Y99, T100, V101, P106, G107, R119, E124, R129, G130, D131, S133, R137, P138, D143, R148 и R163 с SEQ ID NO:68 (например, антитело 15431);

c) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или все 29 аминокислотных остатков, выбранных из A40, Q41, P43, P46, P49, D52, T62, Q64, H65, Q66, P67, D68, P96, Y99, T100, V101, P106, G107, R119, E124, R129, G130, D131, S133, R137, P138, D143, R148 и R163 с SEQ ID NO:68 (например, антитело 15572); или

d) 1, 2, 3 или все 4 аминокислотных остатка, выбранных из G107, L109, R110 и S111 с SEQ ID NO:68 (например, антитело 15011).

[0104] Изобретение также относится к моноклональному антителу или его антиген-связывающей части, которые связываются с эпитопом LAG-3 человека, имеющим остатки 98-105. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающая часть связывается с эпитопом LAG-3 человека, имеющим:

a) 2 или 3 аминокислотных сегмента, выбранных из остатков 78-105 и 123-131 с SEQ ID NO:68 (например, антитело 15532);

b) 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных сегментов, выбранных из остатков 23-30, 40-66, 88-105, 123-137 и 148-152 с SEQ ID NO:68 (например, антитело 15431);

c) 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных сегментов, выбранных из остатков 23-30, 40-66, 98-105, 118-137 и 148-161 с SEQ ID NO:68 (например, антитело 15572); или

d) аминокислотные остатки 98-105 с SEQ ID NO:68 (например, антитело 15011).

[0105] Изобретение также относится к моноклональному антителу или его антиген-связывающей части, которые связываются с эпитопом LAG-3 человека, имеющим остатки 23-30 и 40-66 с SEQ ID NO:68. В некоторых вариантах осуществления эпитоп дополнительно имеет остатки 88-105, 123-137 и/или 148-152 с SEQ ID NO:68. В некоторых вариантах осуществления эпитоп дополнительно имеет остатки 98-105, 118-137 и 148-161 с SEQ ID NO:68.

[0106] Изобретение также относится к анти-LAG-3 антителу или его антиген-связывающей части, которое конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание или связывается с тем же эпитопом, что и антитело, выбранное из группы, состоящей

из 15532, 15646, 15723, 15595, 15431, 15572 и 15011.

[0107] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или его антиген-связывающая часть по изобретению не связываются с тем же эпитопом LAG-3 человека, что и антитело 25F7-Lag3.5.

5 [0108] В некоторых вариантах осуществления в анти-LAG-3 антителе или его антиген-связывающей части по изобретению используют ген тяжелой цепи зародышевой линии человека, выбранный из группы, состоящей изIGHV4-34, IGHV1-24, IGHV6-1, IGHV4-39 и IGHV3-23. В определенных вариантах осуществления ген тяжелой цепи зародышевой линии по меньшей мере на 75%, 80%, 82%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%,
10 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен соответствующей последовательности тяжелой цепи в антителе против LAG3 или антиген-связывающей части. В определенных вариантах осуществления последовательности каркасных областей указанного гена тяжелой цепи зародышевой линии по меньшей мере на 75%, 80%, 82%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%
15 или 100% идентичны соответствующим последовательностям каркасных областей тяжелых цепей в антителе против LAG3 или антиген-связывающей части.

[0109] В некоторых вариантах осуществления в анти-LAG-3 антителе или его антиген-связывающей части по изобретению используют ген легкой цепи зародышевой линии человека, выбранный из группы, состоящей из IGKV3-11, IGKV1-12, IGKV1-5 и IGLV3-19. В определенных вариантах осуществления ген легкой цепи зародышевой линии по
20 меньшей мере на 75%, 80%, 82%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен соответствующей последовательности легкой цепи в антителе против LAG3 или антиген-связывающей части. В определенных вариантах осуществления последовательности каркасных областей указанного гена легкой цепи зародышевой линии по меньшей мере на 75%, 80%, 82%, 85%, 86%, 87%,
25 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны соответствующим последовательностям легких цепей каркасных областей в антителе против LAG3 или антиген-связывающей части.

[0110] В конкретных вариантах осуществления в анти-LAG-3 антителе или его антиген-связывающей части по изобретению используют любую комбинацию вышеуказанных генов тяжелых цепей зародышевой линии человека и генов легких цепей зародышевой
30 линии человека (например, IGHV4-34 и IGKV3-11, IGHV1-24 и IGKV1-12, IGHV6-1 и IGKV3-11, IGHV4-39 и IGKV1-5 или IGHV3-23 и IGLV3-19). В некоторых вариантах осуществления гены тяжелых и легких цепей зародышевой линии по меньшей мере на
35 75%, 80%, 82%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны соответствующим последовательностям тяжелых и легких цепей, соответственно, в антителе против LAG3 или антиген-связывающей части. В определенных вариантах осуществления последовательности каркасных областей указанных генов тяжелых и легких цепей зародышевой линии по меньшей мере на 75%,
40 80%, 82%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны соответствующим последовательностям тяжелых и легких цепей каркасных областей, соответственно, в антителе против LAG3 или антиген-связывающей части.

[0111] В некоторых вариантах осуществления любые анти-LAG-3 антитела или
45 антиген-связывающие части, описанные в настоящем описании, могут связываться с LAG-3 человека с EC₅₀, например, 0,2 нМ или меньше, 0,15 нМ или меньше, 0,1 нМ или меньше, 0,09 нМ или меньше, 0,08 нМ или меньше, 0,07 нМ или меньше, 0,06 нМ или меньше, 0,05 нМ или меньше или 0,04 нМ или меньше. В некоторых вариантах

осуществления любые из анти-LAG-3 антител или антиген-связывающих частей, описанных в настоящем описании, могут связываться с LAG-3 яванского макака, например, с EC_{50} 0,4 нМ или меньше, 0,3 нМ или меньше, 0,2 нМ или меньше, 0,1 нМ или меньше, 0,09 нМ или меньше, 0,08 нМ или меньше, 0,07 нМ или меньше, 0,06 нМ или меньше, 0,05 нМ или меньше, 0,04 нМ или меньше или 0,03 нМ или меньше.

[0112] В некоторых вариантах осуществления любые из анти-LAG-3 антител или антиген-связывающих частей, описанных в настоящем описании, могут связываться с LAG-3 человека с EC_{50} , например, 0,1 нМ или меньше. В некоторых вариантах осуществления любые из анти-LAG-3 антител или антиген-связывающих частей, описанных в настоящем описании, могут связываться с LAG-3 яванского макака, например, с EC_{50} 0,3 нМ или меньше. В конкретных вариантах осуществления любые из анти-LAG-3 антител или антиген-связывающих частей, описанных в настоящем описании, могут связываться с LAG-3 человека, например, с EC_{50} 0,1 нМ или меньше и LAG-3 яванского макака, например, с EC_{50} 0,3 нМ или меньше.

[0113] В некоторых вариантах осуществления любое анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть, описанная в настоящем описании, может ингибировать связывание лигандов, таких как МНС класса II (МНСII) или LSECtin, с LAG-3. Например, при 20 мкг/мл, анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающая часть может снижать связывание LAG-3 с МНСII по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению со связыванием в присутствии антитела отрицательного контроля. В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающий белок может снижать связывание LAG-3 с МНСII больше чем на 85% по сравнению с отрицательным контролем. В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающий белок может снижать связывание LAG-3 с МНСII приблизительно на 35-85% по сравнению с отрицательным контролем.

[0114] В некоторых вариантах осуществления любые из анти-LAG-3 антител или антиген-связывающих частей, описанных в настоящем описании, могут блокировать связывание между LAG-3 и МНС класса II, например, LAG-3 человека, экспрессируемым на клетках Jurkat, и МНС класса II человека, экспрессируемым на клетках Raji (например, в концентрации 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 30 мкг/мл, 40 мкг/мл или 50 мкг/мл).

[0115] В некоторых вариантах осуществления любые из анти-LAG-3 антител или антиген-связывающих частей, описанных в настоящем описании, могут связываться с LAG-3 человека с K_D $5,0 \times 10^{-8}$ или меньше, $4,0 \times 10^{-8}$ или меньше, $3,0 \times 10^{-8}$ или меньше, $2,0 \times 10^{-8}$ или меньше, $1,0 \times 10^{-8}$ или меньше, $9,0 \times 10^{-9}$ или меньше, $8,0 \times 10^{-9}$ или меньше, $7,0 \times 10^{-9}$ или меньше, $6,0 \times 10^{-9}$ или меньше, $5,0 \times 10^{-9}$ или меньше, $4,0 \times 10^{-9}$ или меньше, $3,0 \times 10^{-9}$ или меньше, $2,0 \times 10^{-9}$ или меньше или $1,0 \times 10^{-9}$ или меньше, как измерено поверхностным плазмонным резонансом.

[0116] В некоторых вариантах осуществления любые из анти-LAG-3 антител или антиген-связывающих частей, описанных в настоящем описании, могут связываться с

LAG-3 яванского макака с K_D $1,5 \times 10^{-7}$ или меньше, $1,0 \times 10^{-7}$ или меньше, $9,0 \times 10^{-8}$ или меньше, $8,0 \times 10^{-8}$ или меньше, $7,0 \times 10^{-8}$ или меньше, $6,0 \times 10^{-8}$ или меньше, $5,0 \times 10^{-8}$ или меньше, $4,0 \times 10^{-8}$ или меньше, $3,0 \times 10^{-8}$ или меньше, $2,0 \times 10^{-8}$ или меньше или $1,0 \times 10^{-8}$ или меньше, как измерено поверхностным плазмонным резонансом.

[0117] В некоторых вариантах осуществления любые из анти-LAG-3 антител или антиген-связывающих частей, описанных в настоящем описании, могут связываться с LAG-3 мыши с K_D $5,0 \times 10^{-8}$ или меньше, $4,5 \times 10^{-8}$ или меньше, $4,0 \times 10^{-8}$ или меньше,

$3,5 \times 10^{-8}$ или меньше или $3,0 \times 10^{-8}$ или меньше, как измерено поверхностным плазмонным резонансом.

[0118] В некоторых вариантах осуществления любые из анти-LAG-3 антител или антиген-связывающих частей, описанных в настоящем описании, могут стимулировать продукцию IL-2, например, SEB-стимулированными PBMC.

[0119] В некоторых вариантах осуществления любые из анти-LAG-3 антител или антиген-связывающих частей, описанных в настоящем описании, могут снижать клеточные и/или растворимые уровни LAG-3, например, в линии Т-клеток человека (такой как линия Т-клеток человека со сверхэкспрессией LAG-3).

[0120] В некоторых вариантах осуществления любые из анти-LAG-3 антител или антиген-связывающих частей, описанных в настоящем описании, могут индуцировать регрессию опухолевого роста и/или задерживать опухолевый рост *in vivo*.

[0121] В некоторых вариантах осуществления любые из анти-LAG-3 антител или антиген-связывающих частей, описанных в настоящем описании, могут связываться с другим эпитопом LAG-3 человека, нежели антитело 25F7-Lag3.5.

[0122] В одном из вариантов осуществления введение анти-LAG-3 антитела по изобретению или его антиген-связывающей части может активировать Т-клетки, вызывая усиленную противоопухолевую активность.

[0123] Класс анти-LAG-3 антитела, получаемого с помощью способов, описанных в настоящем описании, можно изменять или переключать на другой класс или подкласс.

В одном аспектов изобретения, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую VL или VH, выделяют с использованием способов, хорошо известных в данной области, так, что она не содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CL или CH, соответственно. Затем молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие VL или VH, функционально связывают с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей CL или CH, соответственно, из молекулы иммуноглобулина другого класса. Этого можно достигать с использованием вектора или молекулы нуклеиновой кислоты, которая содержит цепь CL или CH, как описано выше. Например, класс анти-LAG-3 антитела, которое исходно представляло собой IgM, можно переключать на IgG. Кроме того, переключение класса можно использовать для того, чтобы превращать IgG одного подкласса в другой, например, с IgG1 на IgG2. Константную область легкой цепи к можно менять, например, на константную область легкой цепи λ . Предпочтительный способ получения антитела по изобретению желаемого изотипа Ig включает стадии выделения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь анти-LAG-3 антитела, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь анти-LAG-3 антитела, получения варибельного домена тяжелой цепи, лигирования варибельного домена тяжелой цепи с константной областью тяжелой цепи желаемого изотипа, экспрессии легкой цепи и лигированной тяжелой цепи в клетке и сбора анти-LAG-3 антитела желаемого изотипа.

[0124] Анти-LAG-3 антитело по изобретению может представлять собой молекулу IgG, IgM, IgE, IgA или IgD, но обычно относится к изотипу IgG, например, IgG подкласса IgG1, IgG2a или IgG2b, IgG3 или IgG4. В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой IgG1. В другом варианте осуществления антитело представляет собой IgG2. В определенных вариантах осуществления антитела IgG1 по настоящему изобретению, которые связываются с эпитопом LAG-3, описанным в настоящем описании, дают превосходящую активность при модулировании (например, ингибировании) функций LAG-3, чтобы добиваться лечения злокачественных опухолей или иммуностимулирующих эффектов.

[0125] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело может содержать по меньшей мере одну мутацию в Fc-области. Известно множество различных мутаций Fc, где эти мутации обеспечивают измененную эффекторную функцию. Например, во многих случаях будет желательно снижать или устранять эффекторную функцию, например, когда взаимодействия лиганд/рецептор нежелательны или в случае конъюгатов антитело-лекарственное средство.

[0126] В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело содержит по меньшей мере одну мутацию в Fc-области, которая снижает эффекторную функцию. Положения аминокислот в Fc-области, которые могут быть полезны для мутаций, чтобы снижать эффекторную функцию, включают одно или несколько из положений 228, 233, 234 и 235, где положения аминокислот нумеруют в соответствии со схемой нумерации IMGT®.

[0127] В одном из вариантов осуществления один или оба из аминокислотных остатков в положениях 234 и 235 можно мутировать, например, из Leu в Ala (L234A/L235A). Эти мутации снижают эффекторную функцию Fc-области антител IgG1.

Дополнительно или альтернативно, аминокислотный остаток в положении 228 можно мутировать, например, в Pro. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток в положении 233 можно мутировать, например, в Pro, аминокислотный остаток в положении 234 можно мутировать, например, в Val и/или аминокислотный остаток в положении 235 можно мутировать, например, в Ala. Положения аминокислот нумеруют в соответствии со схемой нумерации IMGT®.

[0128] В некоторых вариантах осуществления, где антитело относится к подклассу IgG4, оно может содержать мутацию S228P, то есть иметь пролин в положении 228, где положение аминокислоты нумеруют в соответствии со схемой нумерации IMGT®. Известно, что эта мутация снижает нежелательный обмен плечами Fab.

[0129] В определенных вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающая часть по изобретению может быть частью более крупной молекулы иммуноадгезии, образованной посредством ковалентной или нековалентной связи антитела или части антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезии включают использование области сердцевины стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al., Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101 (1995)) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и C-концевой полигистидиновой метки для получения двухвалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov et al., Mol. Immunol. 31:1047-1058 (1994)). Другие примеры включают, где одну или несколько CDR из антитела встраивают в молекулу, ковалентно или нековалентно, чтобы делать ее иммуноадгезином, который специфически связывается с антигеном, представляющим интерес. В таких вариантах осуществления CDR можно встраивать в качестве части более крупной полипептидной цепи, можно ковалентно связывать с другой полипептидной цепью или можно встраивать

нековалентно.

[0130] В другом варианте осуществления можно создавать слитое антитело или иммуноадгезин, которые содержат полностью или часть анти-LAG-3 антитела по изобретению, которое связано с другим полипептидом. В определенных вариантах осуществления только вариабельные домены анти-LAG-3 антитела связывают с полипептидом. В определенных вариантах осуществления домен VH анти-LAG-3 антитела связывают с первым полипептидом, тогда как домен VL анти-LAG-3 антитела связывают со вторым полипептидом, который ассоциируется с первым полипептидом таким образом, что домены VH и VL могут взаимодействовать друг с другом для того, чтобы формировать антиген-связывающий участок. В другом предпочтительном варианте осуществления домен VH отделяют от домена VL посредством линкера так, что домены VH и VL могут взаимодействовать друг с другом (например, одноцепочечные антитела). Затем антитело VH-линкер-VL связывают с полипептидом, представляющим интерес. Кроме того, можно создавать слитые антитела, в которых два (или больше) одноцепочечных антитела связывают друг с другом. Это можно использовать при желании создавать двухвалентное или поливалентное антитело на одной полипептидной цепи или при желании создавать биспецифическое антитело.

[0131] Для того чтобы создавать одноцепочечное антитело (scFv), VH- и VL- кодирующие фрагменты ДНК функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly4 Ser)3 (SEQ ID NO:74), так, что последовательности VH и VL можно экспрессировать в виде непрерывного одноцепочечного белка, с доменами VL и VH, соединенными гибким линкером. См., например, Bird et al., Science 242:423 426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879 5883 (1988); и McCafferty et al., Nature 348:552 554 (1990). Одноцепочечное антитело может быть одновалентным, если только используют одну VH и VL; двухвалентным, если используют две VH и VL; или поливалентным, если используют больше чем две VH и VL. Например, можно создавать биспецифические или поливалентные антитела, которые специфически связываются с LAG-3 человека и другой молекулой.

[0132] В других вариантах осуществления можно получать другие модифицированные антитела с использованием молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих анти-LAG-3 антитело. Например, «каппа-тела» (Ill et al., Protein Eng. 10:949-57 (1997)), «миниантитела» (Martin et al., EMBO J. 13:5303-9 (1994)), «диатела» (Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)) или «янусины» (Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991) и Traunecker et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52 (1992)) можно получать с использованием стандартных молекулярно-биологических приемов, придерживаясь указаний из описания.

[0133] В анти-LAG-3 антитело или антиген-связывающую часть по изобретению можно ввести функциональные группы или связать с другой молекулой (например, другим пептидом или белком). В целом, в антитела или их части вводят такие функциональные группы, которые при получении производных или введении метки на связывание с LAG-3 не оказывают нежелательного влияния. Соответственно, предполагается, что антитела и части антител по изобретению включают как интактные, так и модифицированные формы анти-LAG-3 антител человека, описанных в настоящем описании. Например, антитело или часть антитела по изобретению можно функционально связывать (путем химического конъюгирования, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или несколькими другими молекулярными объектами, такими как другое антитело (например, биспецифическое

антитело или диатело), средство детекции, фармацевтическое средство и/или белок или пептид, который может опосредовать связывание антитела или части антитела с другой молекулой (такой как область сердцевины стрептавидина или полигистидиновая метка).

[0134] Один тип производных антитела получают посредством перекрестного связывания двух или нескольких антител (одного и того же типа или различных типов, например, для создания биспецифических антител). Подходящие агенты перекрестного связывания включают гетеробифункциональные агенты и агенты, имеющие две отдельные реакционноспособные группы, разделенные подходящим спейсером (например, сложный эфир м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид) или гомобифункциональным (например, дисукцинимидилсуберат). Такие линкеры доступны, например, в Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

[0135] В анти-LAG-3 антитело также можно ввести функциональную химическую группу, такую как полиэтиленгликоль (PEG), метильная или этильная группа или углеводная группа. Эти группы можно использовать для улучшения биологических характеристик антитела, например, для повышения времени полужизни в сыворотке.

[0136] В антитело по настоящему изобретению также можно вводить метку. Как используют в настоящем описании, термины «введение метки» или «меченное» относятся ко встраиванию другой молекулы в антитело. В одном из вариантов осуществления метка представляет собой поддающийся обнаружению маркер, например, встраивание радиоактивно-меченой аминокислоты или присоединение к полипептиду биотинильных фрагментов, которые можно обнаруживать с помощью помеченного авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которые можно обнаруживать оптическими или колориметрическими способами). В другом варианте осуществления метка или маркер могут быть терапевтическими, например, конъюгат лекарственного средства или токсин. В настоящей области известны различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов, которые можно использовать. Примеры меток для полипептидов включают, но не ограничиваясь ими, следующее: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантаноидные люминофоры), ферментативные метки (например, пероксидазу хрена, β -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные маркеры, биотинильные группы, предварительно определяемые полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, пара последовательностей лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, металлсвязывающие домены, эпитопные метки), магнитные средства, такие как хелаты гадолиния, токсины, такие как токсин коклюша, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрацидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи. В некоторых вариантах осуществления метки прикрепляют с помощью спейсерных плеч различной длины для того, чтобы снижать потенциальные стерические затруднения.

[0137] В определенных вариантах осуществления антитела по изобретению могут присутствовать в нейтральной форме (включая цвиттер-ионные формы) или в виде положительно или отрицательно заряженных частиц. В некоторых вариантах осуществления антитела могут образовывать комплексы с противоионом для того, чтобы формировать фармацевтически приемлемую соль.

[0138] Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к комплексу,

содержащему одно или несколько антител и один или несколько противоионов, где противоионы происходят из фармацевтически приемлемых неорганических и органических кислот и оснований.

Биспецифические связывающие молекулы

5 [0139] В дополнительном аспекте, изобретение относится к биспецифической связывающей молекуле, обладающей специфичностью связывания (например, которая содержит антиген-связывающие части) анти-LAG-3 антитела, описанного в настоящем описании, и специфичностью связывания другого анти-LAG-3 антитела (например, другого анти-LAG-3 антитела, описанного в настоящем описании) или антитела, которое
10 направлено на другой белок, такой как другой белок контрольной точки иммунитета, антиген злокачественной опухоли или другая молекула клеточной поверхности, активность которой опосредует патологическое состояние, такое как злокачественная опухоль. Такие биспецифические связывающие молекулы известны в данной области, и примеры биспецифических связывающих молекул других типов приведены в другом
15 месте в настоящем описании.

Молекулы нуклеиновой кислоты и векторы

[0140] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты и последовательностям, кодирующим анти-LAG-3 антитела или их антиген-связывающие части, описанные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления
20 различные молекулы нуклеиновой кислоты кодируют аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи анти-LAG-3 антитела или его антиген-связывающей части. В других вариантах осуществления одна и та же молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи анти-LAG-3 антитела или его антиген-связывающей части.

25 [0141] Указание нуклеотидной последовательности включает ее комплементарный вариант, если не указано иное. Таким образом, следует понимать, что указание на нуклеиновую кислоту с конкретной последовательностью, включает ее комплементарную цепь с комплементарной последовательностью. Термин «полинуклеотид», как обозначают в настоящем описании, обозначает полимерную
30 форму нуклеотидов по меньшей мере в 10 оснований в длину, рибонуклеотидов или дезоксинуклеотидов, или модифицированную форму нуклеотида любого типа. Термин включает одно- и двухцепочечные формы.

[0142] Изобретение также относится к нуклеотидным последовательностям, которые по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичны одной
35 или нескольким нуклеотидным последовательностям, перечисленным в настоящем описании, например, к нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18, 21, 22, 25 и 26, или к нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 24, 27 и 28. Термин
40 «процент идентичности последовательностей» в контексте последовательностей нуклеиновой кислоты относится к остаткам в двух последовательностях, которые представляют собой одно и то же при выравнивании для максимального соответствия. Отрезок сравнения идентичности последовательностей может охватывать фрагмент по меньшей мере приблизительно в 9 нуклеотидов, обычно по меньшей мере
45 приблизительно 18 нуклеотидов, более обычно по меньшей мере приблизительно 24 нуклеотида, обычно по меньшей мере приблизительно 28 нуклеотидов, более обычно по меньшей мере приблизительно 32 нуклеотида и предпочтительно по меньшей мере приблизительно 36, 48 или больше нуклеотидов. Существует множество различных

алгоритмов, известных в данной области, которые можно использовать для того, чтобы измерять идентичность нуклеотидных последовательностей. Например, полинуклеотидные последовательности можно сравнивать с использованием FASTA, Gap или Bestfit, которые представляют собой программы в Wisconsin Package версии 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, которая включает, например, программы FASTA2 и FASTA3, предоставляет выравнивания и процент идентичности последовательностей для областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой и поисковой последовательностями (см., например, Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol. 266:227-258 (1996); и Pearson, J. Mol. Biol. 276:71-84 (1998) включены в настоящее описание посредством ссылки). Если не указано иное, используют параметры по умолчанию для конкретной программы или алгоритма. Например, процент идентичности последовательностей между последовательностями нуклеиновой кислоты можно определять с использованием FASTA с ее параметрами по умолчанию (размер слова 6 и коэффициент NOPAM для весовой матрицы) или с использованием Gap с ее параметрами по умолчанию, как предоставлено в GCG версии 6.1, включенном в настоящее описание посредством ссылки.

[0143] В одном из аспектов, изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18, 21, 22, 25 и 26. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидные последовательности из SEQ ID NO:1 и 2, SEQ ID NO:5 и 6, SEQ ID NO:9 и 10, SEQ ID NO:13 и 14, SEQ ID NO:17 и 18, SEQ ID NO:21 и 22 или SEQ ID NO:25 и 26.

[0144] В любом из приведенных выше вариантов осуществления, молекулы нуклеиновой кислоты могут быть выделенными.

[0145] В дополнительном аспекте, настоящее изобретение относится к вектору, подходящий для экспрессии одной из цепей антитела или его антиген-связывающей части, как раскрыто в настоящем описании. Термин «вектор», как используют в настоящем описании, обозначает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой плазмиду, то есть круглый двухцепочечный фрагмент ДНК, в который можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК можно лигировать в вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный участок начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). В других вариантах осуществления векторы (например, не эписомные векторы млекопитающих) можно встраивать в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и тем самым реплицировать наряду с геномом хозяина. Кроме того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы обозначают в настоящем описании как «рекомбинантные экспрессирующие векторы» (или просто «экспрессирующие векторы»).

[0146] Изобретение относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют тяжелую цепь анти-LAG-3 антитела по изобретению или его антиген-связывающей части, легкую цепь анти-LAG-3 антитела по изобретению или его антиген-связывающей части или как тяжелую, так и легкую цепи анти-LAG-3 антитела по изобретению или его антиген-связывающей части. Изобретение

дополнительно предусматривает векторы, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие слитые белки, модифицированные антитела, фрагменты антител и их зонды.

[0147] Молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую и/или легкую цепь анти-LAG-3 антитела или его антиген-связывающей части по изобретению, можно выделять из любого источника, который продуцирует такое антитело или часть. В различных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты выделяют из В-клеток, экспрессирующих анти-LAG-3 антитело, которые выделены у животного, иммунизированного с использованием антигена LAG-3 человека, или из иммортилизованной клетки, полученной из такой В-клетки. Способы выделения нуклеиновых кислот, кодирующих антитело, хорошо известны в данной области. мРНК можно выделять и использовать для получения кДНК для использования в полимеразной цепной реакции (ПЦР) или клонирования кДНК генов антитела. В определенных вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению можно синтезировать, а не выделять.

[0148] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты по изобретению может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую домен VH анти-LAG-3 антитела или антиген-связывающей части по изобретению, соединенный с сохранением рамки считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константную область тяжелой цепи, из любого источника. Аналогичным образом, молекула нуклеиновой кислоты по изобретению может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую домен VL анти-LAG-3 антитела или антиген-связывающей части по изобретению, соединенную с сохранением рамки считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константную область легкой цепи, из любого источника.

[0149] В дополнительном аспекте изобретения, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие переменный домен тяжелых (VH) и/или легких (VL) цепей, можно «превращать» в полноразмерные гены антител. В одном из вариантов осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие домены VH или VL, превращают в полноразмерные гены антител посредством инсерции в экспрессирующий вектор, уже кодирующий константную область тяжелой цепи (CH) или константную область легкой цепи (CL), соответственно, так, что сегмент VH функционально связывают с сегментом (ами) CH в векторе и/или сегмент VL функционально связывают с сегментом CL в векторе. В другом варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие домены VH и/или VL, превращают в полноразмерные гены антител посредством связывания, например, лигирования, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей домены VH и/или VL, с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей область CH и/или CL, используя стандартные приемы молекулярной биологии. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полноразмерные тяжелые и/или легкие цепи, затем можно экспрессировать в клетке, в которую их ввели, и выделять анти-LAG-3 антитело.

[0150] Молекулы нуклеиновой кислоты можно использовать для рекомбинантной экспрессии больших количеств анти-LAG-3 антител. Молекулы нуклеиновой кислоты также можно использовать для получения химерных антител, биспецифических антител, одноцепочечных антител, иммуноадгезинов, диател, мутантных антител и производных антител, как раскрыто в настоящем описании.

[0151] В другом варианте осуществления молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению используют в качестве зонда или ПЦР праймера для специфической последовательности антитела. Например, нуклеиновую кислоту можно использовать

в качестве зонда в диагностических способах или в качестве ПЦР праймера для амплификации областей ДНК, что можно использовать, *inter alia*, для выделения дополнительных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих переменные домены анти-LAG-3 антител. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты представляют собой олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды происходят из высоко переменных доменов тяжелых и легких цепей антитела, представляющего интерес. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды кодируют полностью или частично одну или несколько CDR анти-LAG-3 антител или их антиген-связывающих частей по изобретению, как раскрыто в

настоящем описании.

[0152] В другом варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты и векторы можно использовать для получения мутантных анти-LAG-3 антител. В переменные домены тяжелых и/или легких цепей антитела можно вводить мутации, например, чтобы изменять связывающее свойство антитела. Например, мутацию можно создавать в одной или нескольких из CDR для того, чтобы увеличивать или уменьшать K_D анти-LAG-3 антитела, увеличивать или уменьшать k_{off} или изменять специфичность связывания антитела. В другом варианте осуществления одну или несколько мутаций создают в аминокислотном остатке, который доподлинно подлежит изменению по сравнению с зародышевой линией в моноклональном антителе по изобретению. Мутации можно создавать в CDR или каркасной области переменного домена или в константной области. В предпочтительном варианте осуществления мутации выполняют в переменном домене. В некоторых вариантах осуществления одну или несколько мутаций выполняют в аминокислотном остатке, который доподлинно подлежит изменению по сравнению с зародышевой линией в CDR или каркасной области переменного домена антитела или его антиген-связывающей части по изобретению.

[0153] В другом варианте осуществления в каркасную область(и) вводят мутацию с тем, чтобы получаемая каркасная область(и) имела аминокислотную последовательность соответствующего гена зародышевой линии. Мутацию можно создавать в каркасной области или константной области для увеличения времени полужизни анти-LAG-3 антитела. См., например, публикацию PCT WO 00/09560. Мутацию в каркасной области или константной области также можно выполнять для того, чтобы изменять иммуногенность антитела и/или предоставлять участок для ковалентного или нековалентного связывания с другой молекулой. В соответствии с изобретением, одно антитело может иметь мутации в любой одной или нескольких CDR или каркасных областях переменного домена или в константной области.

[0154] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитела по изобретению или их антиген-связывающие части экспрессируют посредством встраивания ДНК, кодирующей частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, полученные как описано выше, в экспрессирующие векторы так, что гены функционально связывают с необходимыми управляющими экспрессией последовательностями, такими как транскрипционные и трансляционные управляющие последовательности. Экспрессирующие векторы включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирус табачной мозаики, космиды, YAC, эписомы, полученные из EBV, и т. п. Кодировующую последовательность антитела можно лигировать в вектор так, что транскрипционные и трансляционные управляющие последовательности в векторе выполняют свою предполагаемую функцию регуляции транскрипции и трансляции кодирующей последовательности антитела. Экспрессирующий вектор и

управляющие экспрессией последовательности можно выбирать так, чтобы они были совместимыми с выбранной экспрессионной клеткой-хозяином. Кодирующую последовательность легкой цепи антитела и кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела можно вставлять в отдельные векторы и можно функционально связывают в одними и теми же или различными управляющими экспрессией последовательностями (например, промоторами). В одном из вариантов осуществления обе кодирующие последовательности вставляют в один и тот же экспрессирующий вектор и можно функционально связывать с одними и теми же управляющими экспрессией последовательностями (например, обыкновенный промотор), с отдельными идентичными управляющими экспрессией последовательностями (например, промоторами) или с различными управляющими экспрессией последовательностями (например, промоторами). Кодирующие последовательности антитела можно вставлять в экспрессирующий вектор стандартными способами (например, лигированием комплементарных участков рестрикции на фрагменте гена антитела и векторе или лигированием тупых концов, если участки рестрикции отсутствуют).

[0155] Удобным вектором является тот, который кодирует функционально полную последовательность СН или CL иммуноглобулина человека с подходящими участками рестрикции, разработанными с тем, чтобы любую последовательность VH или VL можно было легко вставлять и экспрессировать, как описано выше. HC- и LC- кодирующие гены в таких векторах могут содержать последовательности интронов, которые будут вести к увеличенному общему выходу белков антител посредством стабилизации соответствующей мРНК. Последовательности интронов фланкируют посредством участками доноров сплайсинга и акцепторов сплайсинга, которые определяют, где будет происходить сплайсинг РНК. Местоположение последовательностей интронов может находиться в переменных или константных областях цепей антител или как в переменных, так и в константных областях, когда используют несколько интронов. Полиаденилирование и терминация транскрипции могут происходить в нативных хромосомных участках ниже по направлению считывания от кодирующих областей. Рекомбинантный экспрессирующий вектор также может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию цепи антитела клеткой-хозяином. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор так, что сигнальный пептид связывают с сохранением рамки считывания с аминоконцом цепи иммуноглобулина. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (то есть сигнальный пептид из неиммуноглобулинового белка).

[0156] В дополнение к генам цепей антител, рекомбинантные экспрессирующие векторы по изобретению могут нести регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией генов цепей антител в клетке-хозяине. Специалисты в данной области примут во внимание, что разработка экспрессирующего вектора, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, желаемый уровень экспрессии белка и т. д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего включают вирусные элементы, которые задают высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, полученные из ретровирусных LTR, цитомегаловируса (CMV) (такие как промотор/энхансер CMV), вируса обезьян 40 (SV40) (такие как промотор/энхансер SV40), аденовируса (например, главный поздний промотор аденовируса (AdMLP)), полиомы и сильные промоторы млекопитающих, такие как нативные промоторы

иммуноглобулинов и актина. Дополнительное описание вирусных регуляторных элементов и их последовательностей см. например, в патентах США 5168062, 4510245 и 4968615. Способы экспрессии антител у растений, включая описание промоторов и векторов, а также трансформации растений известны в данной области. См., например, патент США 6517529. Способы экспрессии полипептидов в бактериальных клетках или грибковых клетках, например, дрожжевых клетках, также хорошо известны в данной области.

[0157] В дополнение к генам цепей антител и регуляторным последовательностям, рекомбинантные экспрессирующие векторы по изобретению могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, участки начала репликации), и гены селективных маркеров. Ген селективного маркера облегчает отбор клеток-хозяев, в которые введен вектор (см., например, патенты США 4399216, 4634665 и 5179017). Например, обычно ген селективного маркера придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую введен вектор. Например, гены селективных маркеров включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для использования в dhfr- клетках-хозяевах с отбором/амплификацией на метотрексате), ген нео (для отбора на G418) и ген глутаматсинтетазы.

[0158] Термин «управляющая экспрессией последовательность», как используют в настоящем описании, обозначает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для того, чтобы вызывать экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, с которыми их лигируют. Управляющие экспрессией последовательности включают подходящие последовательности инициации транскрипции, терминации, промоторные и энхансерные последовательности; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые увеличивают эффективность трансляции (то есть консенсусную последовательность Козак); последовательности, которые увеличивают стабильность белка; и, по желанию, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Свойства таких управляющих последовательностей различаются в зависимости от организма-хозяина; у прокариот такие управляющие последовательности в целом включают промотор, участок связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции; у эукариот в целом такие управляющие последовательности включают промоторы и последовательность терминации транскрипции. Термин «управляющие последовательности» предназначен включать, как минимум, все компоненты, присутствие которых необходимо для экспрессии и процессинга, и также может включать дополнительные компоненты, присутствие которых благоприятно, например, лидерные последовательности и последовательности партнеров слияния.

Клетки-хозяева и способы получения антител и композиций антител

[0159] Дополнительный аспект изобретения относится к способам получения композиций антител и антител и их антиген-связывающих частей по изобретению. Один из вариантов осуществления этого аспекта изобретения относится к способу получения антитела, как определено в настоящем описании, который включает предоставление рекомбинантной клетки-хозяина, способной экспрессировать антитело, культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и выделение получаемого антитела. Антитела, получаемые посредством такой экспрессии в таких рекомбинантных клетках-хозяевах, обозначают в настоящем описании как «рекомбинантные антитела». Изобретение также относится к клеткам потомства таких

клеток-хозяев и антителам, продуцируемым ими.

[0160] Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин»), как используют в настоящем описании, обозначает клетку, в которую введен рекомбинантный экспрессирующий вектор. Изобретение относится к клеткам-хозяевам, которые могут содержать, например, вектор в соответствии с изобретением, описанный выше. Изобретение также относится к клеткам-хозяевам, которые содержат, например, нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антиген-связывающую часть, нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антиген-связывающую часть, или обе, анти-LAG-3 антитела или его антиген-связывающей части по изобретению. Следует понимать, что «рекомбинантная клетка-хозяин» и «клетка-хозяин» обозначают не только конкретную рассматриваемую клетку, но также потомство такой клетки. Поскольку определенные модификации могут происходить в последующих поколениях из-за мутационных или средовых влияний, такое потомство фактически может не быть идентичным родительской клетке, но все еще быть включенным в объем термина «клетка-хозяин» как используют в настоящем описании.

[0161] Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие анти-LAG-3 антитела, и векторы, содержащие эти молекулы нуклеиновой кислоты, можно использовать для трансфекции подходящей клетки-хозяина млекопитающего, растения, бактерии или дрожжей.

Трансформацию можно осуществлять любым известным способом введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают опосредованную декстраном трансфекцию, преципитацию с фосфатом кальция, опосредованную полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсулирование полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты можно вводить в клетки млекопитающих посредством вирусных векторов. Способы трансформации клеток хорошо известны в данной области. См., например, патенты США 4399216, 4912040, 4740461 и 4959455. Способы трансформации клеток растения хорошо известны в данной области и включают, например, опосредованную *Agrobacterium* трансформацию, биолистическую трансформацию, прямую инъекцию, электропорацию и вирусную трансформацию. Способы трансформации бактериальных и дрожжевых клеток также хорошо известны в данной области.

[0162] Клеточные линии млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области и включают многие линии immortalized клеток, доступные в American Type Culture Collection (ATCC). Они включают, *inter alia*, клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки NS0, клетки SP2, клетки HEK-293T, клетки 293 Freestyle (Invitrogen), клетки NIH-3T3, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки почки африканской зеленой мартышки (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человек (например, Hep G2), клетки A549 и множество других клеточных линий. Клеточные линии, которым отдают конкретное предпочтение, выбирают посредством определения того, какие клеточные линии имеют высокие уровни экспрессии. Другие клеточные линии, которые можно использовать, представляют собой линии клеток насекомых, такие как клетки Sf9 или Sf21. Когда рекомбинантные экспрессирующие векторы, кодирующие гены антител, вводят в клетки-хозяева млекопитающих, антитела получают посредством культивирования клеток-хозяев в течение определенного периода времени, достаточного для того, чтобы сделать возможной экспрессию антитела в клетках-хозяевах или, более предпочтительно,

секрецию антитела в среду для культивирования, в которой растут клетки-хозяева. Антитела можно извлекать из среды для культивирования с использованием стандартных способов очистки белка. Клетки-хозяева растений включают, например, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, яваску, кукурузу, пшеницу, картофель и т. д. Бактериальные клетки-хозяева включают *E. coli* и виды *Streptomyces*. Клетки-хозяева дрожжей включают *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

[0163] Кроме того, экспрессию антител по изобретению или их антиген-связывающих частей продуцирующими клеточными линиями можно усиливать с использованием множества известных приемов. Например, система экспрессии гена глутаминсинтетазы (система GS) представляет собой обычный подход для усиления экспрессии при определенных условиях. Система GS рассмотрена в целом или частично в связи с патентами EP 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 и 0 338 841.

[0164] Вероятно антитела, экспрессируемые различными клеточными линиями или трансгенными животными, будут иметь паттерны гликозилирования, отличные друг от друга. Однако, все антитела, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, предусмотренными в настоящем описании, или содержащие аминокислотные последовательности, предусмотренные в настоящем описании, представляют собой часть настоящего изобретения, независимо от состояния гликозилирования антител и, в более общем смысле, независимо от присутствия или отсутствия посттрансляционной модификации(й).

Фармацевтические композиции

[0165] Другой аспект изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей в качестве активного ингредиента (или в качестве единственного активного ингредиента) анти-LAG-3 антитело или его антиген-связывающую часть, биспецифическую связывающую молекулу или композицию антител по изобретению. Фармацевтическая композиция может содержать любое анти-LAG-3 антитело или его антиген-связывающую часть, биспецифическую связывающую молекулу или композицию антител как раскрыто в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции предназначены для улучшения, предотвращения и/или лечения связанного с LAG-3 нарушения и/или злокачественной опухоли. Как используют в настоящем описании, LAG-3-связанное или -опосредованное нарушение относится к нарушению, заболеванию или состоянию, которое улучшают или у которого замедляют прогрессирование посредством модуляции активности LAG-3. В некоторых вариантах осуществления композиции предназначены для активации иммунной системы. В определенных вариантах осуществления композиции предназначены для улучшения, предотвращения и/или лечения злокачественной опухоли, происходящей из таких тканей, как кожа, легкое, кишечник, ободочная кишка, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, гематопоезическая система, голова и шея, печень, мочевой пузырь, молочная железа, желудок, матка и поджелудочная железа. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой фибросаркому, карциному легких или меланому. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой глиобластому, глиосаркому или рак толстой кишки. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции по изобретению предназначены для лечения псориаза.

[0166] В целом, антитела, антиген-связывающие части и биспецифические связывающие молекулы по изобретению подходят для введения в виде состава в связи с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, например, как описано ниже.

[0167] Фармацевтические композиции по изобретению должны содержать одно или несколько анти-LAG-3 антител, связывающих частей или биспецифических связывающих молекул по изобретению, например, одно или два анти-LAG-3 антитела, связывающих части или биспецифических связывающих молекулы. В одном из вариантов осуществления композиция содержит одно анти-LAG-3 антитело по изобретению или его связывающую часть.

[0168] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция может содержать по меньшей мере одно анти-LAG-3 антитело или его антиген-связывающую часть, например, одно анти-LAG-3 антитело или часть, и одно или несколько дополнительных антител, которые направлены на один или несколько релевантных рецепторов клеточной поверхности, например, один или несколько релевантных рецепторов злокачественных опухолей.

[0169] Термин «эксципиент» используют в настоящем описании для того, чтобы описывать любой ингредиент, отличный от соединения(й) по изобретению. Выбор эксципиента(ов) в значительной степени зависит от таких факторов, как конкретный способ введения, эффект, оказываемый эксципиентом на растворимость и стабильность, и свойства дозированной формы. Как используют в настоящем описании, «фармацевтически приемлемый эксципиент» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и задерживающие абсорбцию средства и т. п., которые физиологически совместимы. Некоторые примеры фармацевтически приемлемых эксципиентов представляют собой воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, декстрозу, глицерин, этанол и т. п., а также их сочетания. Во многих случаях в композицию предпочтительно включать изотонические средства, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Дополнительные примеры фармацевтически приемлемых веществ представляют собой смачивающие средства или незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность антитела.

[0170] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению и способы их получения будут без труда видны специалистам в данной области. Такие композиции и способы их получения можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 19-е изд. (Mack Publishing Company, 1995). Фармацевтические композиции предпочтительно изготавливают по условиям GMP (Good Manufacturing Practice).

[0171] Фармацевтическую композицию по изобретению можно получать, упаковывать или продавать партиями, в виде единичной стандартной дозы или в виде множества единичных стандартных доз. Как используют в настоящем описании, «стандартная доза» представляет собой дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей предварительно определяемое количество активного ингредиента.

Количество активного ингредиента в целом равно дозе активного ингредиента, которую следует вводить субъекту, или удобной доле от такой дозы, например, такой как половина или треть такой дозы.

[0172] Любой способ введения пептидов, белков или антител, принятый в данной области, можно подходящим образом использовать для антител и антиген-связывающих частей по изобретению.

[0173] Фармацевтические композиции по изобретению обычно подходят для парентерального введения. Как используют в настоящем описании, «парентеральное введение» фармацевтической композиции включает любой путь введения, отличающийся

физическим нарушением целостности ткани субъекта и введением фармацевтической композиции через брешь в ткани, что таким образом в целом ведет к непосредственному введению в кровоток, в мышцу или во внутренний орган. Парентеральное введение, таким образом, включает, но не ограничиваясь этим, введение фармацевтической композиции посредством инъекции композиции, посредством внесения композиции через хирургический разрез, посредством внесения композиции через проникающее не хирургическое ранение ткани и т. п. В частности, предусмотрено, что парентеральное введение включает, но не ограничиваясь этим, подкожную, внутрибрюшинную, внутримышечную, интрастернальную, внутривенную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, внутриуретральную, внутричерепную, внутриопухолевую и интрасиновиальную инъекцию или инфузию; и приемы инфузии при почечном диализе. Также предусмотрены регионарные перфузии. Конкретные варианты осуществления включают внутривенные и подкожные пути.

[0174] Составы фармацевтической композиции, подходящие для парентерального введения, обычно содержат активный ингредиент в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический солевой раствор. Такие составы можно получать, упаковывать или продавать в форме, подходящей для болюсного введения или для непрерывного введения. Инъецируемые составы можно получать, упаковывать или продавать в стандартной дозированной форме, например, в ампулах или в контейнерах нескольких доз, содержащих консервант. Составы для парентерального введения включают, но не ограничиваясь этим, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных носителях, пасты и т. п. Такие составы дополнительно могут содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, включая в качестве неограничивающих примеров суспендирующее, стабилизирующее или диспергирующее средство. В одном из вариантов осуществления состава для парентерального введения активный ингредиент предоставляют в сухой (то есть порошковой или гранулированной) форме для восстановления с использованием подходящего носителя (например, стерильной апиrogenной воды) перед парентеральным введением восстановленной композиции. Парентеральные составы также включают водные растворы, которые могут содержать эксципиенты, такие как соли, углеводы и буферные средства (предпочтительно при pH от 3 до 9), но для некоторых применений их можно более подходящим образом формулировать в виде стерильного неводного раствора или в виде высушенной формы, подлежащей использованию в сочетании с подходящим носителем, таким как стерильная апиrogenная вода. Образцовые формы для парентерального введения включают растворы или суспензии в стерильных водных растворах, например, водных растворах пропиленгликоля или декстрозы. При желании, такие дозированные формы можно подходящим образом забуферить. Другие парентерально вводимые составы, которые можно использовать, включают те, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме или в липосомном препарате. Составы для парентерального введения можно формулировать для незамедлительного и/или модифицированного высвобождения. Составы с модифицированным высвобождением включают отсроченное, замедленное, импульсное, контролируемое, направленное и программируемое высвобождение.

[0175] Например, в одном из аспектов стерильные инъецируемые растворы можно получать посредством встраивания анти-LAG-3 антитела, его антиген-связывающей части, биспецифической связывающей молекулы или композиции антител в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, после чего следует стерилизация

фильтрованием. В целом, дисперсии получают посредством встраивания активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъектируемых растворов, предпочтительные способы получения представляют собой вакуумную сушку и лиофилизацию, которая дает порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его раствора, предварительно стерилизованного фильтрованием. Надлежащую текучесть раствора можно поддерживать, например, с помощью покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии, и с помощью поверхностно-активных средств. Пролонгированную абсорбцию инъектируемых композиций можно обеспечивать посредством включения в композицию средства, которое задерживает абсорбцию, например, солей моностеаратов и желатина, и/или посредством использования покрытий с модифицированным высвобождением (например, покрытий с медленным высвобождением).

[0176] Антитела по изобретению также можно вводить интраназально или посредством ингаляции, обычно в форме сухого порошка (отдельно, в виде смеси или в виде смешанных частиц компонентов, например, смешанных с подходящим фармацевтически приемлемым эксципиентом) из ингалятора сухого порошка, в виде аэрозольного спрея из контейнера под давлением, насоса, спрея, атоизатора (предпочтительно атоизатора, использующего электрогидродинамику для получения мелкодисперсного тумана) или небулайзера, с использованием или без использования подходящего пропеллента, или в виде назальных капель.

[0177] Контейнер под давлением, насос, спрей, атоизатор или небулайзер в целом содержит раствор или суспензию антитела по изобретению, которые содержат, например, подходящее средство для диспергирования, солюбилизации или продления высвобождения активного средства, пропеллент(ы) в качестве растворителя.

[0178] Перед использованием в сухом порошковом или суспензионном составе, лекарственный продукт в целом микронизируют до размера, подходящего для доставки посредством ингаляции (обычно меньше 5 мкм). Этого можно достигать любым подходящим способом измельчения, таким как размол на спиральной струйной мельнице, размол на струйной мельнице с кипящим слоем, обработка сверхкритического текучего вещества для формирования наночастиц, гомогенизация высокого давления или распылительная сушка.

[0179] Для использования в ингаляторе или инсуффляторе можно формулировать капсулы, блистеры и картриджи, содержащие порошковую смесь соединения по изобретению, подходящей порошковой основы и модификатора эксплуатационных характеристик.

[0180] Подходящий состав раствора для использования в атоизаторе с использованием электрогидродинамики для получения мелкодисперсного тумана может содержать подходящую дозу антитела по изобретению на приведение в действие и объем приведения в действие, например, может варьировать от 1 мкл до 100 мкл.

[0181] Можно формулировать составы для ингаляционного/интраназального введения с незамедлительным и/или модифицированным высвобождением. Составы с модифицированным высвобождением включают отсроченное, замедленное, импульсное, контролируемое, направленное и программируемое высвобождение.

[0182] В случае ингаляторов сухого порошка и аэрозолей, единицу дозирования определяют с помощью клапана, который доставляет отмеренное количество. Единицы в соответствии с изобретением обычно устраивают так, чтобы вводить отмеренную

дозу или «пшик» антитела по изобретению. Общую суточную дозу обычно вводят в однократной дозе или, более обычно, в виде разделенных доз на всем протяжении суток.

[0183] Антитела и части антител по изобретению также можно формулировать для введения через оральный путь. Оральное введение может включать проглатывание с тем, чтобы соединение попадало в желудочно-кишечный тракт, и/или буккальное, лингвальное или сублингвальное введение, посредством которого соединение попадает в кровоток непосредственно изо рта.

[0184] Составы, подходящие для орального введения, включают твердые, полутвердые и жидкие системы, такие как таблетки; мягкие или твердые капсулы, содержащие мульти- или наночастицы, жидкости или порошки; пастилки (в том числе заполненные жидкостью); жвачки; гели; быстро диспергируемые дозированные формы; пленки; суппозитории; спреи; и буккальные/мукоадгезивные пластыри.

[0185] Жидкие составы включают суспензии, растворы, сиропы и крепкие настои. Такие составы можно использовать в качестве наполнителей в мягких или твердых капсулах (выполненных, например, из желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), и обычно они содержат носитель, например, воду, этанол, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, метилцеллюлозу или подходящее масло, и одно или несколько эмульгирующих средств и/или суспендирующих средств. Жидкие составы также можно получать посредством восстановления твердого вещества, например, из саше.

Терапевтическое применение антител и композиций по изобретению

[0186] В одном из аспектов, анти-LAG-3 антитела и их антиген-связывающие части, композиции против LAG-3 и биспецифические связывающие молекулы по изобретению используют для усиления или активации иммунной системы у человека, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет иммунную супрессию. Например, врач может повышать активность собственной иммунной системы пациента против злокачественной опухоли посредством введения анти-LAG-3 антитела по настоящему изобретению, отдельно или в комбинации с другими терапевтическими средствами (последовательно или параллельно). Антитело к LAG-3 модулирует активность LAG-3 в клетках иммунной системы, что ведет к усилению иммунитета против злокачественной опухоли.

[0187] В определенных вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающая часть, композиция или биспецифическая связывающая молекула предназначены для использования в лечении злокачественной опухоли, например, злокачественных опухолей, которые происходят из тканей, таких как кожа, легкое, кишечник, ободочная кишка, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, гематопоезическая система, голова и шея, печень, мочевой пузырь, молочная железа, желудок, матка и поджелудочная железа и любые злокачественные опухоли или другие состояния, которые зависят от активности LAG-3 и/или при которых пациент экспрессирует или сверхэкспрессирует лиганд LAG-3 (например, MHCII, LSECtin или оба).

[0188] В некоторых вариантах осуществления злокачественные опухоли, которые лечат антителами против LAG-3, антиген-связывающими частями, биспецифическими связывающими молекулами и/или композициями антител по изобретению, могут включать, например, меланому (например, распространенную или метастатическую меланому), немелкоклеточный рак легких, плоскоклеточную злокачественную опухоль головы и шеи, почечноклеточную карциному, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, глиобластому, глиому, плоскоклеточную злокачественную опухоль легких,

мелкоклеточную злокачественную опухоль легких, гепатоцеллюлярную карциному, злокачественную опухоль мочевого пузыря, злокачественную опухоль верхних мочевых путей, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль гастроезофагеального перехода, злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль печени, рак толстой кишки, карциному толстой кишки, множественную миелому, саркомы, острый миелолейкоз, хронический миелолейкоз, миелодиспластический синдром, назофарингеальную злокачественную опухоль, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, злокачественную опухоль яичников, злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта, первичную перитонеальную злокачественную опухоль, злокачественную опухоль фаллопиевой трубы, уротелиальную злокачественную опухоль, HTLV-ассоциированный Т-клеточный лейкоз/лимфому, злокачественную опухоль предстательной железы, урогенитальную злокачественную опухоль, менингиому, аденокортикальную злокачественную опухоль, глиосаркому, фибросаркому, злокачественную опухоль почки, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль поджелудочной железы, злокачественную опухоль эндометрия, базальноклеточную злокачественную опухоль кожи, злокачественную опухоль аппендикса, злокачественную опухоль желчных путей, злокачественную опухоль слюнных желез, распространенную злокачественную опухоль из клеток Меркеля, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, мезотелиому или солидные опухоли. Злокачественная опухоль может быть, например, на ранней, промежуточной, поздней или метастатической стадии.

[0189] В некоторых вариантах осуществления злокачественные опухоли, которые лечат антителами против LAG-3, антиген-связывающими частями, композициями и/или биспецифическими связывающими молекулами по изобретению, могут включать, например, гематологические злокачественные новообразования, глиобластому (например, рецидивирующую глиобластому), глиосаркому, немелкоклеточный рак легких (например, распространенную немелкоклеточный рак легких), рак толстой кишки и солидные опухоли.

[0190] В одном из аспектов анти-LAG-3 антитела и их антиген-связывающие части, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы по изобретению можно использовать для лечения иммунно-опосредованного нарушения, такого как псориаз, системная красная волчанка, MLS (склероз), болезнь Крона, сахарный диабет и/или язвенный колит.

[0191] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитела и их антиген-связывающие части, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы по изобретению можно использовать для лечения вирусных и/или паразитарных инфекций, например, при которых патогены подавляют иммунный ответ хозяина. Например, патогеном может быть HIV, гепатит (А, В или С), вирус папилломы человека (HPV), вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), аденовирус, флавивирус, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, коронавирусы, респираторный синцитиальный вирус, вирус паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус осповакцины, человек Т-лимфотропный вирус человека (HTLV), вирус денге, вирус моллюска, полиовирус, вирус бешенства, вирус Джона Каннингема (JC), вирус арбовирусного энцефалита, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), грипп, герпес, лямблия, малярия, лейшмания, *Staphylococcus aureus* или *Pseudomonas aeruginosa*.

[0192] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитела и их антиген-связывающие части, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы

по изобретению можно использовать для лечения пациента с ослабленным иммунитетом или у которого имеется риск ослабленного иммунитета (например, из-за химиотерапии или лучевой терапии).

[0193] В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитела и их антиген-связывающие части, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы по изобретению можно использовать для активации и деления антиген-специфических Т-клеток *ex vivo*.

[0194] «Лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к способу облегчения или устранения биологического нарушения и/или по меньшей мере одного из сопутствующих ему симптомов. Как используют в настоящем описании, «облегчать» заболевание, нарушение или состояние обозначает снижать тяжесть и/или частоту возникновения симптомов заболевания, нарушения или состояния. Кроме того, в настоящем описании отсылки к «лечению» включают отсылки к излечивающему, паллиативному и профилактическому лечению.

[0195] «Терапевтически эффективное количество» относится ко вводимому количеству терапевтического средства, которое будет облегчать в определенной степени один или несколько симптомов нарушения, подлежащего лечению. Терапевтически эффективное количество терапевтического средства против злокачественной опухоли, например, ведет к уменьшению размеров опухоли, увеличенной выживаемости, элиминации клеток злокачественной опухоли, снижению прогрессированию заболевания, обращению метастазов или другим клиническим конечным точкам, которые желательны для работников здравоохранения.

[0196] Анти-LAG-3 антитела или их антиген-связывающие части, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы по изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими лекарственными средствами или антителами (или в виде любого их сочетания). Фармацевтические композиции, способы и использования по изобретению, таким образом, также охватывают варианты осуществления комбинаций (совместное введение) с другими активными средствами, как подробно изложено далее.

[0197] Как используют в настоящем описании, термины «совместное введение», «совместно вводимый» и «в комбинации с», в отношении анти-LAG-3 антител и их антиген-связывающих частей, композиций антител и биспецифических связывающих молекул по изобретению с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, предназначен для того, чтобы обозначать и ссылаться на и включать следующее:

а) одновременное введение такой комбинации антитела/антиген-связывающей части/композиции антител/биспецифической связывающей молекулы по изобретению и терапевтического средства(в) больному, когда такие компоненты формулируют вместе в одной дозированной форме, которая высвобождает указанные компоненты указанному пациенту по существу одновременно,

б) по существу одновременное введение такой комбинации антитела/антиген-связывающей части/композиции антител/биспецифической связывающей молекулы по изобретению и терапевтического средства(в) больному, когда такие компоненты формулируют отдельно друг от друга в отдельных дозированных формах, которые указанный пациент принимает по существу одновременно, после чего происходит по существу одновременное высвобождение указанных компонентов указанному пациенту,

с) последовательное введение такой комбинации антитела/антиген-связывающей части/композиции антител/биспецифической связывающей молекулы по изобретению

и терапевтического средства(в) больному, когда такие компоненты вводят в состав отдельно друг от друга в дозированные лекарственные формы, которые указанный пациент принимает последовательно во времени со значительным временным интервалом между каждым введением, в связи с чем происходит поступление указанных

5 компонентов указанному пациенту по существу в разные моменты времени; и

d) последовательное введение такой комбинации антитела/антиген-связывающей части/композиции антител/биспецифической связывающей молекулы по изобретению и терапевтического средства(в) больному, когда такие компоненты вводят вместе в состав общей дозированной лекарственной формы, которая высвобождает указанные

10 компоненты контролируемым образом, после чего происходит их параллельное, последовательное и/или перекрывающееся поступление указанному пациенту в один и те же и/или различные моменты времени, где каждую часть можно вводить одним и тем же или отличающимся путем.

[0198] Анти-LAG-3 антитела и их антиген-связывающие части, композиции антител

15 или биспецифические связывающие молекулы по изобретению можно вводить без дополнительного терапевтического лечения, то есть в виде самостоятельно применяемой терапии (монотерапии). Альтернативно, лечение антителами против LAG-3 и их антиген-связывающими частями, композициями антител или биспецифическими связывающими молекулами по изобретению может включать по меньшей мере одно дополнительное

20 терапевтическое лечение (комбинированная терапия), например, другое иммуностимулирующее средство, средство против злокачественной опухоли, противовирусное средство или вакцину (например, противоопухолевую вакцину).

[0199] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающую часть, композицию антител или биспецифическую связывающую молекулу можно

25 совместно вводить или формулировать с другим лекарством/лекарственным средством для лечения злокачественной опухоли. Дополнительное терапевтическое лечение может включать, например, химиотерапевтическое, антинеопластическое или антиангиогенное средство, другое антитело против злокачественной опухоли и/или лучевую терапию.

[0200] Посредством объединения антител или их антиген-связывающих частей,

30 композиций антител или биспецифических связывающих молекул по изобретению со средствами, которые доподлинно индуцируют терминальную дифференцировку клеток злокачественной опухоли, эффект можно усовершенствовать дополнительно. Такие соединения, например, можно выбирать из группы, состоящей из ретиноевой кислоты, транс-ретиноевых кислот, цис-ретиноевых кислот, фенилбутирата, фактора роста

35 нервов, диметилсульфоксида, активной формы витамина D₃, активированного пролифератором пероксисом рецептора γ , 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата, гексаметилен-бис-ацетамид, трансформирующего фактора роста β , масляной кислоты, циклического АМР и веснаринона. В некоторых вариантах осуществления соединения выбирают из группы, состоящей из ретиноевой кислоты, фенилбутирата, полностью

40 транс-ретиноевой кислоты и активной формы витамина D.

[0201] Фармацевтические изделия, содержащие анти-LAG-3 антитело или его антиген-связывающую часть, композицию антител или биспецифическую связывающую молекулу по изобретению и по меньшей мере одно другое средство (например,

45 химиотерапевтическое, антинеопластическое или антиангиогенное средство) можно использовать в качестве комбинированного лечения для одновременного, раздельного или последовательного введения при терапии злокачественной опухоли. Другое средство может представлять собой любое средство, подходящее для лечения конкретной рассматриваемой злокачественной опухоли, например, средство, выбранное из группы,

состоящей из алкилирующих средств, например, производных платины, таких как цисплатин, карбоплатин и/или оксалиплатин; растительных алкалоидов, например, паклитаксела, доцетаксела и/или иринотекана; противоопухолевых антибиотиков, например, доксорубицина (адриамицина), даунорубицина, эпирубицина, идарубицина, митоксантрона, дактиномицина, блеомицина, актиномицина, лутеомицина и/или митомицина; ингибиторов топоизомеразы, таких как топотекан; и/или антиметаболитов, например, фторурацила и/или других фторпиримидинов. В некоторых вариантах осуществления другим средством является дакарбазин или гемцитабин.

[0202] Анти-LAG-3 антитело или его антиген-связывающую часть, композицию антител или биспецифическую связывающую молекулу по изобретению также можно использовать в комбинации с другой терапией против злокачественной опухоли, такой как вакцины, цитокины, ингибиторы ферментов, иммуностимулирующие соединения и Т-клеточная терапия. В случае вакцины, например, она может представлять собой белковую, пептидную или ДНК вакцину, содержащую один или несколько антигенов, которые релевантны для злокачественной опухоли, подлежащей лечению, или вакцину, содержащую дендритные клетки наряду с антигеном. Подходящие цитокины включают, например, IL-2, IFN- γ и GM-CSF. Примером типа ингибитора фермента, который обладает активностью против злокачественной опухоли, является ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), например, 1-метил-D-триптофан (1-D-MT). Адоптивная Т-клеточная терапия относится к различным иммунотерапевтическим приемам, которые включают размножение или изменение собственных Т-клеток пациентов для того, чтобы они распознавали и атаковали свои опухоли.

[0203] Также предусмотрено, что анти-LAG-3 антитело или его антиген-связывающую часть, композицию антител или биспецифическую связывающую молекулу по изобретению можно использовать в смежной терапии в связи с ингибиторами тирозинкиназы. Они представляют собой синтетические молекулы низкой молекулярной массы, преимущественно производные хиназолина, которые взаимодействуют с внутриклеточным доменом тирозинкиназы рецепторов и ингибируют индуцированное лигандом фосфорилирование рецептора посредством конкуренции за внутриклеточный сайт связывания Mg-ATP.

[0204] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающую часть, композицию антител или биспецифическую связывающую молекулу можно использовать в комбинации с другим лекарством/лекарственным средством, которое опосредует активацию иммунной системы, включая в качестве неограничивающих примеров, средство, которое модулирует экспрессию или активность A2AR, BTLA, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, CD27, CD28, CD40, CD47, CD55, CD73, CD122, CD137, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, CTLA-3, CEACAM (например, CEACAM-1 и/или CEACAM-5), GAL9, GITR, HVEM, LY108, LAIR1, ICOS, IDO, KIR, LAIR1, PD-1/PD-L1/PD-L2, OX40, TIGIT, TIM-3, TGFR- β , VISTA, LILRB2, CMTM6 и/или 2B4. В определенных вариантах осуществления средством является антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который связывается с одной из вышеуказанных молекул. Также предусмотрено, что анти-LAG-3 антитело или его антиген-связывающую часть, композицию антител или биспецифическую связывающую молекулу по изобретению можно использовать в комбинации с цитокином (например, IL-1, IL-2, IL-12, IL-15 или IL-21), ингибитором EGFR, ингибитором VEGF и т. д.

[0205] В определенных аспектах антитела и антиген-связывающие части, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы по изобретению можно вводить в комбинации с другим ингибитором пути LAG-3, который может быть направлен на

LAG-3 или один или несколько его лигандов. Примеры таких ингибиторов включают другие анти-LAG-3 антитела, антитела против МНСII, антитела против галектина-3 и антитела против LSECtin. В некоторых вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело или его антиген-связывающую часть, биспецифическое антитело или композицию антител по изобретению можно вводить в комбинации с BMS-986016, GSK2831781, REGN3767, BAP050 или BAP050-chi или LAG525.

[0206] Понятно, что антитела и их антиген-связывающие части, композиции антител и биспецифические связывающие молекулы по изобретению можно использовать в способе лечения, как раскрыто в настоящем описании, могут быть для использования в лечении, как раскрыто в настоящем описании, и/или могут быть для использования в изготовлении лекарственного средства для лечения, как раскрыто в настоящем описании. Изобретение также относится к наборам и промышленным изделиям, содержащим антитела и их антиген-связывающие части, композиции антител и биспецифические связывающие молекулы, описанные в настоящем описании.

Доза и путь введения

[0207] Антитела или их антиген-связывающие части, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы по изобретению следует вводить в эффективном количестве для лечения рассматриваемого состояния, то есть в дозах и в течение периодов времени, которые необходимы для достижения желаемого результата. Терапевтически эффективное количество может варьировать в соответствии с такими факторами, как конкретное состояние, подлежащее лечению, возраст, пол и масса пациента, и вводят ли антитела в качестве обособленного лечения или в комбинации с одним или несколькими дополнительными лечениями против злокачественных опухолей.

[0208] Схемы дозирования можно корректировать для того, чтобы обеспечивать оптимальный желаемый ответ. Например, можно вводить один болюс, можно вводить несколько разделенных доз с течением времени или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать, как то указывают потребности терапевтической ситуации. В частности, благоприятно формулировать парентеральные композиции в форме единицы дозирования для облегчения введения и однородности дозы. Форма единицы дозирования, как используют в настоящем описании, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве одинарных доз для пациентов/субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит предварительно определяемое количество активного соединения, которое вычисляют для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Описание для форм единиц дозирования по изобретению в целом продиктовано и непосредственно зависит от (а) уникальных характеристик химиотерапевтического средства и конкретного терапевтического или профилактического эффекта, которого нужно достигнуть, и (б) ограничений, свойственных области компаундирования такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов.

[0209] Таким образом, специалист в данной области примет во внимание, на основе раскрытия, предоставленного в настоящем описании, что дозу и схему дозирования корректируют в соответствии со способами, общеизвестными области терапии. То есть, можно легко устанавливать максимальную переносимую дозу, а также можно определять эффективное количество, обеспечивающее поддающийся обнаружению терапевтический эффект у пациента, как позволяют временные требования для введения каждого средства, чтобы обеспечивать поддающийся обнаружению терапевтический эффект у пациента. Соответственно, хотя определенная доза и схемы введения приведены

в качестве примера в настоящем описании, эти примеры ни коим образом не ограничивают дозу и схему введения, которые можно предоставлять пациенту при практическом осуществлении настоящего изобретения.

[0210] Следует отметить, что значения доз могут варьировать вместе с типом и 5 тяжестью состояния, подлежащего облегчению, и могут включать однократные и многократные дозы. Кроме того, следует понимать, что у любого конкретного субъекта конкретные схемы дозирования следует корректировать с течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным суждением человека, осуществляющего введение или наблюдение за введением композиций, и что 10 диапазоны доз, приведенные в настоящем описании, являются лишь образцовыми и не предназначены для того, чтобы ограничивать объем или практику осуществленной композиции. Кроме того, схема дозирования композиций по данному изобретению может быть основана на различных факторах, включая тип заболевания, возраст, массу, пол, медицинское состояние пациента, тяжесть состояния, путь введения и 15 конкретное используемое антитело. Таким образом, схема дозирования может варьировать широко, но ее можно определять обычным образом, используя стандартные способы. Например, дозы можно корректировать на основе фармакокинетических или фармакодинамических параметров, которые могут включать клинические эффекты, такие как токсические эффекты, и/или лабораторные значения. Таким образом, 20 настоящее изобретение относится к индивидуальному увеличению дозы, как определяет специалист в данной области. Определение подходящих доз и схем общеизвестно в релевантной области, и специалисту в данной области будет понятно, что оно включено в предоставленные положения, раскрытые в настоящем описании.

[0211] Предусмотрено, что подходящая доза антитела, антиген-связывающей части, 25 композиции антител или биспецифической связывающей молекулы по изобретению находится в диапазоне 0,1-100 мг/кг, таком как приблизительно 0,5-50 мг/кг, например, приблизительно 1-20 мг/кг. Антитело, антиген-связывающую часть, композицию антител или биспецифическую связывающую молекулу, например, можно вводить в дозе по меньшей мере 0,25 мг/кг, например, по меньшей мере 0,5 мг/кг, например, по меньшей 30 мере 1 мг/кг, например, по меньшей мере 1,5 мг/кг, например, по меньшей мере 2 мг/кг, например, по меньшей мере 3 мг/кг, например, по меньшей мере 4 мг/кг, например, по меньшей мере 5 мг/кг; и, например, вплоть до самое большее 50 мг/кг, например, вплоть до самое большее 30 мг/кг, например, вплоть до самое большее 20 мг/кг, например, вплоть до самое большее 15 мг/кг. Введение обычно повторяют с 35 подходящими интервалами, например, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели, и до тех пор, пока это сочтет подходящим ответственный врач, который может необязательно увеличивать или уменьшать дозу по мере необходимости.

[0212] Эффективное количество терапии опухоли можно измерять по ее способности 40 стабилизировать прогрессирование заболевания и/или улучшать симптомы у пациента и предпочтительно обращать прогрессирование заболевания, например, посредством уменьшения размера опухоли. Способность антитела, антиген-связывающей части, композиции антител или биспецифической связывающей молекулы по изобретению ингибировать злокачественную опухоль можно оценивать посредством анализов *in* 45 *vitro*, например, как описано в примерах, а также в подходящих моделях на животных, которые позволяют предсказывать эффект, оказываемый на опухоли человека. Подходящие схемы дозирования следует выбирать для того, чтобы обеспечивать оптимальный терапевтический ответ в каждой конкретной ситуации, например, введение

в виде одного болюса или в виде непрерывной инфузии и с возможной корректировкой дозы, как то указывают потребности каждого случая.

Диагностическое применение и композиции

[0213] Антитела по настоящему изобретению также можно использовать в
 5 диагностических процессах (например, *in vitro*, *ex vivo*). Например, антитела можно использовать для того, чтобы обнаруживать и/или измерять уровень LAG-3 в образце от пациента (например, образце ткани или образце текучего вещества организма, такого как воспалительный экссудат, кровь, сыворотка, текучее вещество кишечника, слюна или моча). Подходящие способы обнаружения и измерения включают такие
 10 иммунологические способы, как проточная цитометрия, твердофазный иммуносорбентный анализ (ELISA), хемилюминесцентный анализ, радиоиммунологический анализ и иммуногистология. Изобретение дополнительно включает наборы (например, диагностические наборы), содержащие антитела, описанные в настоящем описании.

[0214] Если не определено иное в настоящем описании, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, должны иметь значения, в которых их обычно понимают средние специалисты в данной области. Образцовые
 15 способы и материалы описаны далее, хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем описании, также можно использовать при практической реализации или тестировании настоящего изобретения. В случае
 20 противоречия, данное описание, включая определение, имеет решающее значение.

[0215] В целом, используемая номенклатура и приемы из культур клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, а также
 25 химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации, которые описаны в настоящем описании, являются общеизвестными и широко используемыми в данной области. Ферментативные реакции и приемы очистки осуществляют в соответствии с описаниями производителей, как обычно выполняют в данной области или как раскрыто в настоящем описании.

[0216] Кроме того, пока иного не требует контекст, формы единственного числа включают множественное число и формы множественного числа включают
 30 единственное число. На всем протяжении это описания и вариантов осуществления, слова «иметь» и «содержать» или вариации, такие как «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий», следует понимать как подразумевающие включение указанного
 35 целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

[0217] Все публикации и другие источники, упомянутые в настоящем описании, включены в данное описание посредством ссылки в полном объеме. Несмотря на то, что в настоящем описании процитировано множество документов, это цитирование не
 40 составляет допущение того, что любой из этих документов образует часть общих обычных познаний в данной области.

[0218] Для лучшего понимания этого изобретения приведены следующие примеры. Эти примеры служат лишь иллюстративной цели, и их не следует толковать в качестве ограничения объема изобретения каким-либо образом.

ПРИМЕРЫ

45 Пример 1: создание и скрининг репертуаров анти-LAG-3 антител

[0219] Два репертуара анти-LAG-3 антител создавали посредством иммунизации внеклеточным доменом LAG-3 (ECD) или слитым белком LAG-3 ECD Fc. Одну библиотеку антител получали из одноклеточных сортированных В-клеток от

иммунизированных крыс OmniRat® с использованием технологии обнаружения антител Symplex™ (Osborn et al., J Immunol. 190(4): 1481-90 (2013); Meijer et al., J Mol Biol. 358(3): 764-72 (2006)). Экспрессионные конструкции из этого репертуара антител кодировали полностью иммуноглобулины человека в формате IgG1, несущие две мутации (L234A/L235A), которые заведомо снижают эффекторную функцию Fc-области антител IgG1 (Hezareh et al., J Virol. 75(24):12161-8 (2001)). Второй репертуар антител конструировали с использованием одноклеточных сортированных В-клеток, происходящих из лимфоидных органов иммунизированных кур дикого типа (*Gallus gallus*).

[0220] Клонированные антитела из обоих репертуаров против LAG-3 индивидуально трансфицировали и экспрессировали в клетках HEK293 с использованием трансфекционного реактива 293fectin™ (Invitrogen, № по каталогу 12347-019) в 384-луночном формате и собирали антителосодержащие супернатанты в сутки 6 после трансфекции.

[0221] Для клеточного скрининга антител клетки CHO-S трансфицировали в 384-луночном формате для того, чтобы экспрессировать GPI-заякоренный LAG-3 человека с использованием реактива FreeStyle™ MAX (Invitrogen, № по каталогу 16447-100), а клетки, трансфицированные нерелевантным GPI-заякоренным контрольным белком, использовали в качестве отрицательного контроля. Для того чтобы сделать возможным проведение мультиплексного скрининга, контрольные клетки метили с использованием сложного эфира карбоксифлуоресцеинсукцинимидила (CFSE) и смешивали с немеченными LAG-3-трансфицированными клетками в соотношении 1 к 1 при плотности 1×10⁶ клеток на мл. В 384-луночных планшетах 40 мкл этой смеси клеток смешивали с 10 мкл антителосодержащего супернатанта, и антитело, связанное с клетками, обнаруживали посредством добавления вторичного антитела AF647 козы против IgG человека (H+L) (Molecular Probes, № по каталогу A21445). Параллельно осуществляли скрининг антител на связывание с LAG-3 яванского макака в схожей постановке. Образцы получали с использованием высокопропускной проточной цитометрии (iQue® Screener, Intellicyt) и анализировали данные с использованием программного обеспечения ForeCyt® посредством построения графика CFSE в зависимости от связывания IgG человека (AF647). LAG-3-специфические первичные попадания идентифицировали как клоны антител, связывающиеся клетками, трансфицированными LAG-3 как человека, так и яванского макака (CFSE-отрицательные), но не с контрольными клетками (CFSE-положительные), и собирали номера планшетов и координаты планшетов для извлечения попаданий и последующего анализа последовательностей.

[0222] Последовательности ДНК переменных областей тяжелых и легких цепей и белков шести функциональных полученных от OmniRat® анти-LAG-3 антител (15646, 15532, 15723, 15595, 15431 и 15572) и одного функционального полученного от курицы анти-LAG-3 антитела (15011; см. пример 2) предоставлены далее в разделе со списком последовательностей. Обзор SEQ ID NO:последовательностей ДНК переменных и константных областей и белков приведен в таблицах 8 и 9. SEQ ID NO:для CDR находятся в таблице 9. Последовательности CDR в настоящем описании определяли в соответствии с определениями IMGT® для CDR1 и CDR2. Для CDR3 тяжелых и легких цепей определения в настоящем описании включают один дополнительный аминокислотный остаток выше по направлению считывания от IMGT-CDR3 (Cys) и один дополнительный аминокислотный остаток ниже по направлению считывания (Trp для H-CDR3, Phe для L-CDR3). Использование генов зародышевой линии в шести полученных от OmniRat® антителах показано в таблице 10.

Пример 2: гуманизация полученных у курицы анти-LAG-3 антител

[0223] Гуманизацию каркасных областей полученных у курицы анти-LAG-3 антител осуществляли для того, чтобы получать молекулы антител, которые обладают минимальной иммуногенностью при введении человеку, при этом по существу сохраняя специфичность и аффинность родительских антител курицы.

5 [0224] Гуманизацию полученного у курицы антитела осуществляли с использованием подхода «пересадки CDR», способ исходно описан в посреде Jones et al., Nature 321 (6069):522-5 (1986). Сначала вариабельные области тяжелых (VH) и легких (VL) цепей антител сравнивали программой BLAST с базами данных о IgG человека для того, чтобы находить ближайшие гены зародышевой линии человека. Так идентифицировали
10 гены IGHV3-23*01 (M99660) и IGLV3-19*01 (X56178) человека в качестве ближайших к генам VH и VL курицы, соответственно. Аналогичным образом, выбранные аминокислотные последовательности человека для гуманизации области J-гена извлекали из IGHJ1*01 (J00256) и IGLJ6*01 (M18338) для VH и VL, соответственно. Затем гены VH и VL антител выравнивали с генами зародышевой линии иммуноглобулинов курицы
15 для того, чтобы идентифицировать соматические мутации в каркасных областях, которые могут играть роль в функции и/или структуре антител. Наконец, определенные аминокислотные положения, так называемые «остатки Vernier» (Nishibori et al., Mol Immunol. 43(6):634-42 (2006)), которые доподлинно играют важную роль в структуре, стабильности и функции антител, учитывали при генерации альтернативных вариантов
20 гуманизированных антител, содержащих остатки человека или курицы из соответствующих зародышевых линий.

[0225] Сборку CDR курицы и каркасных областей человека осуществляли *in silico*, а синтетические гены, кодирующие гуманизированные VH и VL, заказывали в Genscript Inc. Гены VH и VL клонировали в экспрессирующие векторы (плазмиды), несущие
25 константные области легкой цепи и тяжелой цепи антитела человека. В частности, VL соединяли с константной λ IGLC1*01 человека (J00252). Для того чтобы повышать правильное отщепление сигнального пептида выше от цепи λ , вторую аминокислоту (Ser) в гене λ IGLV3.19 заменяли на другую аминокислоту (Tyr), которая присутствует в других зародышевых линиях человека, например, IGLV3.25.

30 [0226] Репрезентативные точечные диаграммы проточной цитометрии для клонов антител, созданных как описано в этом примере, представлены на фиг. 1A-C: (A) клон антитела, специфически связывающийся с трансфицированными LAG-3 человека клетками, (B) клон антитела, связывающийся неспецифически с клетками CHO-S, и (C) клон антитела, который не связывается с какими-либо из популяций клеток,
35 используемых в скрининге.

Пример 3: клонирование аналогов эталонного анти-LAG-3 антитела

[0227] Аминокислотные последовательности, кодирующие вариабельные домены тяжелых и легких цепей аналогов антител 25F7-Lag3.5 и BAP050, получали из публикации патентной заявки США 2014/0093511 A1 (SEQ ID NO:12 и 14) и публикации патентной
40 заявки PCT WO 2015/138920 A1 (SEQ ID NO:6 и 16), соответственно. Последовательности белков подвергали обратной транскрипции в последовательности ДНК с использованием кодонов человека. Соответствующие последовательности ДНК после этого синтезировали и клонировали в экспрессирующие векторы, содержащие кодирующую последовательность для константного домена тяжелой цепи или легкой к цепи IgG4
45 человека, что вело к экспрессии полноразмерных антител. Для того чтобы предотвращать обмен плечами Fab, остаток серина в положении 228 заменяли на пролин (Angal et al., Mol. Immunol. 30:105-108 (1993)). Клетки CHO трансфицировали получаемыми экспрессирующими плазмидами с использованием стандартной экспрессирующей белок

системы. Соответствующие антительные супернатанты очищали с использованием стандартной хроматографической очистки на колонке с белком А.

Пример 4: скрининг панели LAG-3-специфических mAb в SEB+PBMC анализе

[0228] Способность большой панели LAG-3-специфических mAb стимулировать секрецию IL-2 обработанными стафилококковым энтеротоксином В (SEB) мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) оценивали с использованием PBMC одного донора. SEB представляет собой суперантиген, который связывается с молекулами МНС класса II и специфическими областями V β Т-клеточных рецепторов (TCR) и обеспечивает неспецифическую стимуляцию Т-клеток. Это ведет к активации/пролиферации поликлональных Т-клеток и высвобождению цитокинов, включая IL-2. PBMC человека, выделенные из лейкоцитомоноцитарных слоев от здоровых доноров, высевали в 384-луночные планшеты и оставляли без обработки или обрабатывали с использованием 10 нг/мл SEB и 10 мкг/мл антител. После 48 часов в увлажненном инкубаторе при 37°C, супернатанты удаляли и анализировали в них уровни IL-2 с использованием набора IL-2 ELISA (Life Technologies).

[0229] Увеличение секреции IL-2 после обработки репертуарами mAb против LAG-3 или аналогом 25F7-Lag3.5 представлено на фиг. 2. Очевидно, что уровни IL-2 после обработки различными mAb против LAG-3 значительно варьировали, что показывает, что некоторые антитела в репертуаре не имели функциональности в этом анализе, тогда как другие антитела индуцировали секрецию IL-2 до уровней, схожих с аналогом 25F7-Lag3.5.

Пример 5: связывание антител с LAG-3 человека или яванского макака, экспрессируемым клетками

[0230] Для того чтобы определять значения EC₅₀ для связывания антител посредством проточной цитометрии, клетки CHO-временно трансфицировали для того, чтобы экспрессировать LAG-3 человека или яванского макака с использованием реактива FreeStyle™ MAX (Invitrogen, № по каталогу 16447-100). Антитела титровали в 3-кратных разведениях от 10 до 0,05 мкг/мл в окрашивающем буфере (PBS; 2% FBS; NaN₃) и смешивали и инкубировали с клетками, трансфицированными LAG-3 человека или яванского макака. После двух промываний в окрашивающем буфере, связанной с клеткой антитело обнаруживали посредством добавления вторичного антитела козы AF647 против IgG человека (H+L) (Molecular Probes, № по каталогу A21445). Образцы получали с использованием высокопропускной проточной цитометрии (iQue® Screener, Intellicyt) и анализировали данные с использованием программного обеспечения ForeCyt® посредством построения графика концентрации антитела в зависимости от средней интенсивности флуоресценции (MFI) для AF647. Значения EC₅ вычисляли с использованием функции «dose response graph» в ForeCyt®.

[0231] Сводка по связывающим свойствам антител, которые измеряли посредством титрования, находится далее в таблице 1, где huLAG-3 и cyLAG-3 представляют собой клетки, трансфицированные LAG-3 человека и яванского макака, соответственно. Как показано в таблице 1, антитела 15646, 15532, 15723, 15595, 15431 и 15572 связываются с LAG-3 как человека, так и яванского макака.

Таблица 1. Обзор свойств антител

Антитело	Источник	EC ₅₀ по FACS - huLAG-3 (нМ)	EC ₅₀ по FACS - cyLAG-3 (нМ)
15646	OmniRat®	0,10	0,11
15532	OmniRat®	0,07	0,05
15723	OmniRat®	0,09	0,26

15595	OmniRat®	0,05	0,03
15431	OmniRat®	0,04	0,04
15572	OmniRat®	0,07	0,06
15011	Курица	NA	NA

Пример 6: Проточный цитометрический анализ анти-LAG-3 антител на блокирующую МНСII активность

[0232] Этот пример иллюстрирует, как анти-LAG-3 антитела тестировали на блокирующую главный комплекс гистосовместимости II (МНСII) активность посредством выполнения конкурентным анализом на основе проточной цитометрии с использованием клеток A375 с положительной по МНСII поверхностью и меченного флуорохромом растворимого LAG-3.

[0233] Блокирующую МНСII активность изучали в клеточном анализе с использованием клеточной линии A375 меланомы человека (ATCC® CRL-1619™). R-PE-меченный химерный белок из LAG-3 человека и Fc может специфически связываться с МНСII, экспрессируемым на поверхности A375, что делает возможным количественное определение этого взаимодействия посредством проточной цитометрии. Коммерчески доступный рекомбинантный химерный белок из LAG-3 человека и Fc (R&D Systems, USA) конъюгировали с R-PE, используя Lightning-Link® R-Phycoerythrin Conjugation Kit (Innova Biosciences, UK). Клетки A375 собирали с использованием Cell Dissociation Buffer, не содержащего ферменты (Gibco™), промывали и ресуспендировали в холодном окрашивающем буфере (PBS, 2% FBS, NaN₃). Анти-LAG-3 антитела, подлежащие тестированию, наносили на планшеты в 96-луночном формате и корректировали до 20 мкг/мл в 50 мкл окрашивающего буфера. На лунку добавляли 1 мкл LAG-3-Fc-PE (соответствует приблизительно 0,17 мкг LAG-3-Fc), смешивали и инкубировали планшеты при 4°C в течение 30 мин для того, чтобы сделать возможным образование комплекса LAG-3-антитело. В ходе инкубации 1×10⁵ клеток A375 (в 100 мкл окрашивающего буфера) высевали в 96-луночном формате, осаждали посредством центрифугирования и ресуспендировали клеточные осадки в предварительно инкубированных смесях LAG-3/антитело. Клетки инкубировали в течение дополнительных 20 мин при 4°C, промывали 1× в 200 мкл холодного окрашивающего буфера и ресуспендировали в 100 мкл окрашивающего буфера для регистрации.

[0234] Из семи протестированных анти-LAG-3 антител (при 20 мкг/мл), четыре, 15532, 15595, 15431 и 15011, индуцировали снижение связывания LAG-3 с МНСII (MFI) приблизительно на 90% по сравнению со связыванием в присутствии антитела отрицательного контроля, и, таким образом, считались эффективными блокаторами взаимодействия. Остальные три антитела, 15646, 15723 и 15572, оказывали только ограниченный эффект на связывание LAG-3-МНСII и могли считаться слабыми блокаторами. Аналог эталонного антитела 25F7-Lag3.5 демонстрировал промежуточную блокирующую активность. Результаты сведены в таблице 2.

Таблица 2. Блокирование связывания LAG-3 с МНСII на клетках A375 в присутствии анти-LAG-3 антител.

Антитело	Блокирование LAG-3/МНСII (%)*
15646	49
15532	89
15723	55
15595	94
15431	92
15572	37
15011	92

*Медиана, нормализованная по связыванию LAG-3 в присутствии антитела отрицательного контроля.

Пример 7: Эффект моноклональных анти-LAG-3 антител в SEB+PBMC анализе

[0235] Оценивали способность семи mAb против LAG-3 стимулировать секрецию IL-2 обработанными стафилококковым энтеротоксином В (SEB) мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC). В этом примере описан эффект семи mAb против LAG-3, оказываемый на PBMC нескольких доноров. Кроме того, описан эффект четырех mAb против LAG-3 из других кластеров последовательностей. Номера кластеров последовательностей приведены в скобках после номеров антител и дополнительно описаны в примере 13. Анти-LAG-3 антитела тестировали в концентрациях 10 или 12,5 мкг/мл в SEB+PBMC анализе, как описано в примере 4.

[0236] Увеличение секреции IL-2 после обработки с использованием mAb против LAG-3 15431, 15532, 15572, 15595, 15646, 15723 и 15011 или аналога 25F7-Lag3.5 показано на фиг. 3. Каждая точка представляет уровень секреции IL-2 в PBMC одного донора. Очевидно, что уровни IL-2 после обработки с использованием mAb против LAG-3 варьировали среди различных доноров PBMC, но все семь mAb против LAG-3 стимулировали продукцию IL-2 на схожих уровнях. Это отличается от mAb против LAG-3 15445, 15429 и 15491, которые не увеличивают продукцию IL-2.

Пример 8: эффект моноклональных анти-LAG-3 антител в клеточном анализе блокирования LAG-3-МНС класса II

[0237] Чтобы дополнительно охарактеризовать семь mAb против LAG-3, в клеточном анализе тестировали способность блокировать взаимодействие между LAG-3 и МНС класса II.

[0238] Клетки Jurkat, несущие ген люциферазы под управлением NFAT-RE и экспрессирующие модифицированный TCR и LAG-3 (Promega), инкубировали с клеточной линией Raji, экспрессирующей МНС класса II, 50 нг/мл стафилококкового энтеротоксина D (SED) и различными концентрациями моноклональных антител, как указано на фиг. 4. После 6 часов в увлажненном инкубаторе при 37°C, добавляли субстрат люциферазы (Promega) и измеряли люминесценцию. Люминесценция представляет собой меру экспрессии люциферазы, которую контролируют посредством передачи сигнала TCR и ингибируют посредством передачи сигнала LAG-3. Таким образом, меньшая передача сигнала LAG-3, например, посредством блокирования взаимодействия LAG-3 с МНСII, будет вести к повышенной люминесценции.

[0239] Увеличение люминесценции после обработки с использованием mAb против LAG-3 15431, 15532, 15572, 15595, 15646, 15723 и 15011 или аналога 25F7-Lag3.5 представлено на фиг. 4. Обнаруживали, что все тестируемые анти-LAG-3 антитела увеличивают люминесценцию до схожих уровней.

Пример 9: эффект моноклональных анти-LAG-3 антител, оказываемый на клеточные уровни LAG-3

[0240] Чтобы дополнительно охарактеризовать выбранные mAb против LAG-3, способность к понижающей регуляции уровней LAG-3 тестировали в линии Т-клеток со сверхэкспрессией LAG-3.

[0241] Клетки Jurkat, экспрессирующие модифицированный TCR и LAG-3 (Promega), инкубировали с 25 мкг/мл моноклональных антител, как указано на фиг. 5. После 24 часов в увлажненном инкубаторе при 37°C, собирали супернатанты и осуществляли лизис клеток. Уровни LAG-3 в клетках оценивали с использованием идентифицирующего анти-LAG-3 антитела (Novus Biologicals) и приема Simple Western (Sally Sue, Proteinsimple).

Уровни LAG-3 в супернатанте оценивали с использованием ELISA против LAG-3 (R&D Systems). Исследования конкурентного связывания подтверждали, что тестируемые анти-LAG-3 антитела не конкурируют с идентифицирующим антителом ELISA за связывание с растворимым LAG-3. Статистический анализ осуществляли с использованием однофакторного дисперсионного анализа с коррекцией для множественных сравнений, после чего следовал апостериорный критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони.

[0242] Уровни клеточного и растворимого LAG-3 после обработки с использованием mAb против LAG-3 15431, 15532, 15011, аналога 25F7-Lag3.5 или аналога BAP050 представлены на фиг. 5. 15532, 15011, аналог 25F7-Lag3.5 и аналог BAP050 снижали клеточные и растворимые уровни LAG-3. 15532 снижало клеточные уровни LAG-3 до более низкого уровня, чем аналог 25F7-Lag3.5, со статистической значимостью и снижало растворимые уровни LAG-3 до более низкого уровня, чем аналог 25F7-Lag3.5 и аналог BAP050, со статистической значимостью. 15431 не снижало ни клеточные ни растворимые уровни LAG-3.

Пример 10: эффект антитела 15011 *in vivo*, оказываемый в двух моделях сингенных опухолей на мышах

[0243] Этот пример демонстрирует эффект антитела 15011 *in vivo*, оказываемый в двух моделях сингенных опухолей на мышах.

Способы

[0244] 2×10^5 клеток Sa1N (фибросаркома) и 5×10^6 клеток ASB-XIV (карцинома легких) инокулировали подкожно в бок самок мышей A/J (Sa1N) или BALB/cAnNRj (ASB-XIV) в возрасте 6-8 недель. Опухоли измеряли три раза в неделю штангенциркулем по двум измерениям и объем опухоли в мм^3 вычисляли в соответствии с формулой: $(\text{ширина})^2 \times \text{длина} \times 0,5$. В сутки 5-7 после инокуляции, при усредненном размере опухоли 30-50 мм^3 , мышей рандомизировали в две группы по 10 животных и начинали лечение. Мышей лечили три раза в неделю с использованием всего шести лечений посредством интраперитонеальной инъекции буфера-носителя или моноклонального антитела 15011, после чего следовал период наблюдения. Лечение антителами дозировали по 10 мг/кг. Двухфакторный дисперсионный анализ с использованием критерия множественного сравнения Бонферрони применяли для того, чтобы сравнивать объемы опухолей в каждый момент времени между группами лечения. Статистический анализ осуществляли с использованием GraphPad Prism версии 5.0 (GraphPad Software, Inc.).

Результаты

[0245] Результаты показывали выраженный эффект ингибирования опухоли антителом 15011 в тестируемых моделях сингенных опухолей (* $P < 0,001$) (фиг. 6). 15011 индуцировало регрессию опухолевого роста у 50% мышей с пересаженными опухолями Sa1N и вело к задержке опухолевого роста в модели сингенной опухоли ASB-XIV.

Пример 11: эффект антитела 15532 *in vivo* у мышей NOG, которых восстанавливали с использованием PBMC человека и которым пересаживали клетки меланомы человека A375

[0246] В этом примере продемонстрирован эффект антитела 15532 *in vivo* в модели полугуманизированной ксенотрансплантированной опухоли, где иммунную систему мышей NOG восстанавливали с использованием PBMC человека, и мышам пересаживали клетки меланомы человека A375.

Способы

[0247] В сутки исследования 0 мышам NOG подкожно инъецировали $2-4,5 \times 10^6$ клеток

меланомы A375 и интраперитонеально вводили 9 или 12×10^6 РВМС в сутки исследования 2. В каждом эксперименте использовали РВМС от одного донора. Лечение инициировали в сутки инокуляции РВМС, и мышей лечили три раза в неделю с использованием всего шести или девяти лечений посредством интраперитонеальной инъекции буфера-носителя или моноклонального антитела 15532 (10 мг/кг), после чего следовал период наблюдения. Опухоли измеряли три раза в неделю штангенциркулем по двум измерениям и вычисляли объем опухоли мм^3 в соответствии с формулой: $(\text{ширина})^2 \times \text{длина} \times 0,5$. Двухфакторный дисперсионный анализ с использованием критерия множественного сравнения Бонферрони применяли для того, чтобы сравнивать объемы опухолей в каждый момент времени между группами лечения. Статистический анализ осуществляли с использованием GraphPad Prism версии 5.0 (GraphPad Software, Inc.).

Результаты

[0248] На фиг. 7 представлены результаты из двух экспериментов с использованием РВМС двух различных доноров-людей, которые отвечали на лечение против LAG-3. Лечение с использованием 15532 вело к значительной задержке опухолевого роста по сравнению с группой лечения носителем [$P < 0,05$ (донор 1) и $P < 0,001$ (донор 2)].

Пример 12: измерение аффинностей моноклональных анти-LAG-3 антител в отношении LAG-3 человека, яванского макака и мыши

[0249] В этом примере продемонстрировано связывание анти-LAG-3 антител с внеклеточными доменами LAG-3 человека, яванского макака и мыши, как измерено поверхностным плазмонным резонансом (SPR). Последовательность белка LAG-3 человека доступна по № доступа UniProt P18627 (SEQ ID NO:68). Последовательность белка LAG-3 яванского макака доступна по № доступа NCBI XP_005570011.1 (SEQ ID NO:69). Последовательность белка LAG-3 мыши доступна по № доступа UniProt Q61790 (SEQ ID NO:72).

Материалы и способы

[0250] Кинетический анализ связывания осуществляли посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR), используя Continuous Flow Microspotter (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, US) в сочетании с прибором IBIS MX96 SPR (IBIS Technologies, The Netherlands).

[0251] Fab анти-LAG-3 антитела создавали посредством расщепления антител IgG1 с использованием фермента GingisKHAN, используя набор, предоставляемый в Genovis (Sweden).

[0252] Синтезировали кДНК LAG-3, кодирующую внеклеточные домены LAG-3 человека и яванского макака, и каждую клонировали в вектор, содержащий промотор CMV и последовательность Fc IgG1 человека (AA P101-K330), что вело к слиянию Fc IgG1 C-концом с клонированным ECD LAG-3. Слитые конструкции LAG-3 Fc создавали посредством стандартной ПЦР и приемов конструирования, и белок временно экспрессировали в 2 мл культуре с использованием экспрессирующей системы ExpiCHO™. После 9 суток собирали слитые конструкции LAG-3 человека Fc и супернатанты тестировали на аффинность связывания с Fab антителами к LAG-3 посредством SPR. Антигены очищали с использованием стандартных процедур и захватывали на G-a-hu-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, The Netherlands) в течение 15 минут с использованием Continuous Flow Microspotter (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, US). После точечного нанесения, SensEye® помещали в биосенсор IBIS MX96 и оставшиеся захватывающие участки блокировали. Кинетический анализ осуществляли посредством применения так называемого ряда кинетического титрования (Karlsson R. 2006), где мономерные Fab фрагменты антител по изобретению впрыскивали в

увеличивающихся концентрациях от 1 нМ до 1000 нМ без применения стадий регенерации поверхности после каждого впрыска Fab. Связывание Fab осуществляли в течение 15 минут и диссоциацию антигена осуществляли в течение 15 минут.

Зарегистрированные сигналы связывания аппроксимировали к простой модели связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения Scrubber 2 для вычисления констант скорости ассоциации (k_{on} или k_a), скорости диссоциации (k_{off} или k_d) и аффинности (K_D).

Результаты

[0253] Результаты измерения аффинности показывают, что оцениваемые антитела 15532, 15431, 15572, 15011 и аналог эталонного антитела 25F7-Lag3.5 связывают LAG-3 человека и яванского макака с различными аффинностями. 15011 представляет собой единственное антитело с перекрестной реактивностью к LAG-3 мыши. Подробности о кинетике связывания приведены далее в таблице 3.

Таблица 3. Кинетика связывания Fab фрагментов против LAG-3 с LAG-3 человека, яванского макака и мыши ECD, как измеряют посредством SPR.

Антитело	ECD LAG-3	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)
15532	Человек	1,1E+05	6,5E-04	5,8E-09
15532	Яванский макак	7,1E+04	4,8E-03	6,8E-08
15532	Мышь	C.O.	C.O.	C.O.
15431	Человек	6,6E+04	2,0E-03	3,0E-08
15431	Яванский макак	5,9E+04	6,8E-03	1,2E-07
15431	Мышь	C.O.	C.O.	C.O.
15572	Человек	1,1E+05	3,0E-03	2,7E-08
15572	Яванский макак	4,0E+04	4,0E-03	1,0E-07
15572	Мышь	C.O.	C.O.	C.O.
15011	Человек	1,1E+05	4,8E-04	4,3E-09
15011	Яванский макак	7,0E+04	2,5E-03	3,5E-08
15011	Мышь	7,2E+04	2,3E-03	3,3E-08
25F7-Lag3.5	Человек	1,4E+05	1,2E-03	8,5E-09
25F7-Lag3.5	Яванский макак	4,2E+03	3,8E-03	9,1E-07
25F7-Lag3.5	Мышь	C.O.	C.O.	C.O.

*NB: связывание отсутствует

Пример 13: группировка эпитопов анти-LAG-3 антител

[0254] Этот пример иллюстрирует, как анти-LAG-3 антитела группировали по группам эпитопов на основе паттернов парной конкуренции в сэндвич-анализе. Антитела, относящиеся к различным группам эпитопов, распознают различные эпитопы на ECD LAG-3.

Материалы и способы

[0255] Исследование парной конкуренции антител осуществляли посредством анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием Continuous Flow Microspotter (CFM) (Wasatch Microfluidics, US) в сочетании с прибором IBIS MX96 SPR (IBIS Technologies, The Netherlands). Анализ визуализации поверхностного плазмонного резонанса осуществляли на SPR датчике Goat-Anti-Human-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, The Netherlands). Всего 13 анти-LAG-3 антител, включая эталонное антитело 25F7-Lag3.5, разводили до 7,5 мкг/мл в буфере PBS, содержащем 0,05% Tween 20 (PBS-T), pH 7,0. Антитела захватывали на поверхности датчика против Fc посредством точечного нанесения в течение 15 минут с использованием Continuous Flow Microspotter. После точечного нанесения, SensEye® помещали в биосенсор IBIS MX96 и оставшиеся участки против Fc блокировали посредством впрыска 30 мкг/мл неспецифического IgG1 человека.

Захваченные антитела конъюгировали с поверхностью с использованием набора FixIt (Ssens BV, The Netherlands). После подготовки датчика иммобилизованные антитела (лиганды) использовали для захвата одновалентного антигена LAG-3 (50 нМ, Acro Biosystems, China) в растворе, когда впрыскивали на датчик. Затем панель антител к LAG-3, разведенных до 15 мкг/мл в буфере PBS-T, впрыскивали в качестве анализируемых веществ одно за одним на датчик и тестировали на связывание с захваченным LAG-3 в сэндвич-анализе, чтобы устанавливать паттерны конкуренции антител. После впрыска каждого антитела, поверхность датчика регенерировали с использованием 100 мМ H_3PO_4 буфера, pH 3,0.

Результаты

[0256] Паттерн конкуренции 13 анти-LAG-3 антител представлен на фиг. 8. Антитела названы в соответствии с их идентификационным номером, а кластерные группы перечислены в скобках. Ожидают, что mAb из идентичных кластерных групп связывают идентичные группы эпитопов, поскольку белковые последовательности элементов кластеров являются близкородственными и различаются только несколькими положениями.

[0257] Все антитела успешно проходили группировку по эпитопам; однако антитела 15595 (52), 15613 (33) и 15431 (38) не работают при использовании в качестве лигандов и могут тестироваться только в качестве анализируемых веществ. Антитела 15646 (15) и 15011 (94) тестировали только в качестве лигандов.

[0258] Анализ конкуренции показывал, что панель антител к LAG-3 охватывает 6 основных групп эпитопов (фиг. 8). Антитело 15011 (94) связывалось с уникальным эпитопом, который не подвергался перекрестному блокированию любыми другими антителами из панели, и, следовательно, это антитело присваивали группе эпитопов 1. Группа эпитопов 2 содержит 7 антител, которые перекрестно конкурировали с некоторыми другими mAb из группы, и эти антитела дополнительно делили на подгруппы. mAb 15584 (54) отличалось перекрестным блокированием 15532 (17) и 15595 (52) при тестировании в качестве лиганда или анализируемого вещества, но его не блокировало эталонное mAb 25F7-Lag3.5 при тестировании в качестве анализируемого вещества. mAb 15613 (33) тестировали только в качестве анализируемого вещества и показывали, что его блокируют 15723 (39), 15532 (17) и 15646 (15), но не 25F7-Lag3.5. Следовательно, несмотря на то, что 15532 (17) связывало эпитоп, перекрывающийся с 25F7-Lag3.5, эпитоп 15532 (17) отличается от такового для 25F7-Lag3.5 из-за различий в конкуренции с 15584 (84) и 15613 (33), и, следовательно, эти антитела присваивали различным подгруппам. Аналогичным образом, другие mAb в группе эпитопов 2 присваивали подгруппам на основе паттернов конкуренции с другими антителами в группе 2 (фиг. 8).

[0259] У mAb 15572 (91) обнаруживали только перекрестную конкуренцию с mAb 15584 (54), и его относили к отдельной группе 3. Аналогичным образом, mAb 15431 (83) относили к отдельной группе 4, поскольку это антитело перекрестно конкурирует только с mAb 15723 (39). Наконец, идентифицировали две отдельные группы эпитопов, содержащие антитела с нефункциональной активностью. Группа эпитопов 5 содержала перекрестно блокирующие антитела 15445 (70) и 15491 (84) и группа эпитопов 6 содержала mAb 15429 (72), которое не демонстрирует перекрестного блокирования любого из антител из панели. Антитела группы 5 также блокировали антитела 25F7-Lag3.5, 15532 (17) и 15723 (39) из группы 2, когда их тестировали в качестве анализируемых веществ (фиг. 8). Сводка по паттернам конкуренции для антител-лигандов приведена на фиг. 9, где родство эпитопов для mAb показано на основе

кластеризации с использованием эвклидова расстояния. В кластерной диаграмме можно наблюдать, что антитела с точками ветвления при значениях по оси x выше нуля имеют другие эпитопы по сравнению с другими антителами в тестируемой панели LAG-3. В кластерный анализ не включали mAb 15595 (52), 15613 (33) и 15431 (38), поскольку они

не работают в качестве лигандов.

Пример 14: картирование эпитопов антител к LAG-3 посредством мутагенеза LAG-3

[0260] Эпитопы антител в целом можно охарактеризовать как линейные эпитопы (также называемые непрерывными эпитопами) или конформационные эпитопы (также называемые прерывистыми эпитопами). Линейные эпитопы определяют на основе одной непрерывной аминокислотной последовательности, тогда как конформационные эпитопы могут состоять из нескольких более мелких не непрерывных линейных последовательностей или отдельных контактных остатков. Совокупность контактных остатков, которые образуют кластер в межмолекулярном белковом интерфейсе между антителом и антигеном, также называют горячей точкой (Moreira et al., *Proteins* 68(4): 803-12 (2007)). Сейчас общепризнанным является то, что большинство эпитопов В-клеток являются не непрерывными по природе (Sivalingam and Shepherd, *Mol Immunol.* 51(3-4):304-92012 (2012), Kringelum et al., *Mol Immunol.* 53(1-2):24-34 (2013)), причем усредненный эпитоп охватывает 15-22 аминокислотных остатков, из которых 2-5 аминокислот вносят основной вклад в связывание (Sivalingam and Shepherd, выше).

[0261] Посредством ранжирования аффинности связывания с 108 различными мутантами LAG-3, этот пример иллюстрирует, как связывающие эпитопы анти-LAG-3 антител 15532, 15431, 15572 и 15011 можно делить на линейные эпитопы и горячие точки, которые отличаются от эпитопа, распознаваемого аналогом эталонного антитела 25F7-Lag3.5.

Способы

[0262] Рецептор LAG-3 человека (CD223) представляет собой трансмембранный белок из 525 аминокислот (AA), который содержит внеклеточный домен (ECD) из 427 аминокислот (остатки 23-450), после которого следует трансмембранный домен (остатки 451-471) и цитоплазматический домен (остатки 472-525). ECD LAG-3 содержит 4 иммуноглобулиновых домена (D1-D4), где первый домен, домен типа IgV, участвует в связывании лиганда (связывании МНСII), а остальные три домена представляют собой домены типа IgC2. Отдельно первых двух N-концевых доменов (D1-D2) достаточно для связывания лиганда и показано, что D2 необходим для корректного представления рецептора (Huard et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5744-5749 (1997), Andrews et al., *Immunol Rev.* 276(1):80-96 (2017)). Домен 1 содержит дополнительный уникальный фрагмент из 30 аминокислот (дополнительная петля), который не находят в других IgV-доменах и который, как показано, важен для связывания лиганда. Аминокислоты (AA) 99, 110, 125, 131 и 137 также идентифицированы в качестве важных для связывания лиганда (Y77, R88, R103, D109, R115 в зрелом белке) (Huard et al, выше; Andrews et al., выше).

Структура LAG-3 не опубликована. Однако установлены последовательность и эволюционная гомология между LAG-3 и CD4, что, таким образом, делает возможным доступ к структурной информации о LAG-3 на основе моделирования по гомологии с CD4 (Huard et al., выше; Andrews et al., выше).

[0263] Белковые последовательности LAG-3 человека и ортологи загружали из UniProt или NCBI: человек (P18627; SEQ ID NO:68), яванский макак (*Macaca fascicularis*, XP_005570011.1; SEQ ID NO:69), крыса (*Rattus norvegicus*, Q5BK54; SEQ ID NO:70) и собака (*Canis Lupus Familiaris*, F1P7Z3; SEQ ID NO:71). Идентичности последовательностей для различных аминокислотных последовательностей

внеклеточных доменов LAG-3 представлены далее в таблице 4.

Таблица 4. Список аминокислотных различий и идентичность последовательностей с LAG-3 человека во внеклеточном домене LAG-3 от трех различных биологических видов.

	Аминокислотные различия	% идентичности последовательностей
ECD LAG-3 яванского макака	34	92,1
ECD LAG-3 крысы	140	67,3
ECD LAG-3 собаки	197	54,1

[0264] Для картирования линейных эпитопов в контексте нативной структуры LAG-3 человека разрабатывали 35 химерных белков, где 10 аминокислоты в последовательности ECD LAG-3 человека последовательно заменяли на последовательность крысы в сегментах, которые перекрывались на 5 аминокислот, и с добавлением версий собаки и яванского макака в областях особого интереса (например, критичные AA вставочные последовательности и фрагменты петель). Замены последовательностей осуществляли в домене 1 LAG-3 человека, охватывающем аминокислоты 23-170. По сконструированной гомологичной модели на основе кристаллических структур CD4 (1WIO, 1WIQ) и выравнивания аминокислотных последовательностей идентифицировали аминокислоты, экспонированные на поверхности, и разрабатывали 80 индивидуальных замен в домене 1 LAG-3 человека. Введенные точечные мутации в первую очередь представляли собой аланиновые замены. Когда экспонированный на поверхности остаток представлял аланин, это положение меняли на серин.

[0265] кДНК LAG-3, кодирующую домены 1 и 2 внеклеточного домена LAG-3 человека (AA 1-266), синтезировали и клонировали в вектор, содержащий промотор CMV и последовательность Fc IgG1 человека (AA P101-K330), что вело к экспрессии слитого белка из доменов 1-2 LAG и Fc. Слитые конструкции мутантного LAG-3 человека и Fc создавали посредством стандартной ПЦР и приемов конструирования, и белок временно экспрессировали в 2 мл культуре с использованием экспрессирующей системы ExpiCHO™. Слитые конструкции из LAG-3 человека и Fc собирали, очищали и тестировали на аффинность связывания с mAb против LAG-3 посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Слитые белки LAG-3 иммобилизовали на G-a-hu-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, The Netherlands) в течение 15 минут с использованием Continuous Flow Microspotter (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, US). После точечного нанесения, SensEye® помещали в биосенсор IBIS MX96 и оценивали аффинность связывания захваченных белков. Кинетический анализ осуществляли посредством применения так называемого ряда кинетического титрования (Karlsson R. 2006), где мономерные Fab фрагменты антител по изобретению впрыскивали в увеличивающихся концентрациях от 0,4 нМ до 300 нМ без применения стадий регенерации поверхности после каждого впрыска Fab. Связывание Fab осуществляли в течение 15 минут и диссоциацию антигена осуществляли в течение 15 минут. Зарегистрированные сигналы связывания аппроксимировали к простой модели связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения Scrubber 2 для вычисления констант скорости ассоциации (k_{on} или k_a), скорости диссоциации (k_{off} или k_d) и аффинности (K_D).

Результаты

[0266] Аффинности связывания Fab фрагментов анти-LAG-3 антител 15532, 15431, 15572, 15011 и аналога эталонного антитела 25F7-Lag3.5 оценивали в отношении

измененного связывания с конструкциями мутантного LAG-3. Аффинности связывания Fab фрагментов, связывающихся с конструкциями мутантного LAG-3, экспрессировали в виде соотношения K_D мутанта/ K_D дикого типа (нормализованная аффинность связывания). Далее в таблицах 5 и 6 представлены нормализованные аффинности связывания со всеми тестированными химерными белками и для экспериментов сканирования аланином, соответственно. Порог по меньшей мере 5-кратного снижения аффинности использовали в качестве критерия для обнаружения значительно сниженной аффинности связывания с конструкциями мутантного LAG-3. В некоторых случаях нельзя обнаруживать связывание со специфическими антителами. Эти конструкции перечислены как «связывание отсутствует» (С.О.).

[0267] Анализ показывал, что связывающие эпитопы анти-LAG-3 антител 15532, 15431, 15572, 15011 отличаются от таковых для аналога эталонного антитела 25F7-Lag3.5. Связывающий эпитоп для 15532 был очевиден из химерных белков с АА, вставленными в положениях 78-87, 84-92, 88-97 - совокупный аминокислотный фрагмент в LAG-3, который находится в пределах дополнительной петли домена 1. Однако, в отличие от 25F7-Lag3.5, линейные эпитопы для 15532 выходят за пределы этого фрагмента, включая АА 95-100, АА 98-105 и АА123-131. Интересно, что ключевые аминокислоты для лигандных взаимодействий идентифицированы в сегменте 99-131 (Y99, R125 и D131; Huard et al, выше). Аналог 25F7-Lag3.5 не демонстрирует какую-либо чувствительность к мутациям в области, критичной для связывания лиганда. Контактные остатки 15532, как измеряют посредством аланиновых замен, идентифицировали как H85, P86, A87, P89, S91, W92 и G93, тогда как аналог 25F7-Lag3.5 не демонстрирует чувствительность к P86 и S91, что иллюстрирует дифференцированные контактные остатки в области АА 85-93. 15532 способен связывать химерную конструкцию №28 с обратными мутациями АА яванского макака (P84H; H85R; S90Y), тогда как аналог 25F7-Lag3.5 не способен, что снова отражает дифференцированный тонкий эпитоп в области АА 84-90.

[0268] Было обнаружено, что два антитела 15431 и 15572 связывают линейные эпитопы в сегментах АА 23-30 и 40-66. Кроме того, аланиновое сканирование иллюстрировало, что оба антитела имели идентичные контактные остатки в положениях А40, Q41, P43, P46, P49, D52, T62, Q64, H65, Q66, P67 и D68. Кроме того, 15431 чувствителен к химерным конструкциям 88-97, 95-100 и 98-105 (сегмент АА 88-105). Доказано, что АА область 98-105 является уникальным общим эпитопом для 15532, 15431, 15572 и 15011. Аналог 25F7-Lag3.5 не связывает этот эпитоп. Аланиновое сканирование показывало, что 15431 и 15572 делили контактные остатки P96, Y99, T100, V101, P106 и G107, тогда как 15431 имело уникальные контакты в положениях G93, P94 и R98. Антитело 15431 также имело линейный эпитоп в сегментах АА 123-131, 128-137 и 148-154. Интересно, что предварительно показано, что положения 125, 131 и 137 важны для связывания лиганда (Huard et al, выше). Эти сегменты (АА 123-131, 128-137 и 148-154) также важны для 15572, которое распознавало линейные эпитопы в сегментах АА 118-137 и 148-161. Кроме того, аланиновое сканирование показывало, что 15431 и 15572 делили контактные остатки в положениях R119, E124, R129, G130, D131, S133, R137, P138, D143, R148 и R163, тогда как аналог 25F7-Lag3.5 не демонстрирует чувствительность к любым из этих областей эпитопов или аминокислотных положений.

[0269] Антитело 15011 содержало линейный эпитоп, определяемый химерной конструкцией с мутациями в диапазоне АА 98-105, и аланиновое сканирование дополнительно расширяло уникальный эпитоп на контактные остатки в положениях G107, L109, R110 и S111. Интересно, что показано, что R110 важен для связывания

лиганда (Huard et al, выше). Аминокислотная последовательность высоко консервативна в этой области (AA 98-113) между ортологами человека, яванского макака, мыши и крысы, что объясняет перекрестную реактивность этого антитела к LAG-3 мыши и яванского макака (пример 12). Сводка собранных находок при картировании эпитопов

представлена далее в таблице 7.

[0270] Вкратце, авторы изобретения показали на разрешении в одну аминокислоту, посредством анализа связывания с панелью из 108 мутантов LAG-3, что четыре антитела 15532, 15431, 15572 и 15011 распознают уникальные, но частично перекрывающиеся эпитопы в домене 1 LAG-3. Эта находка соответствует анализу группировки эпитопов в примере 13, который показывает, что 15532 перекрестно конкурирует с аналогом 25F7-Lag3.5, но имеет дифференцированный паттерн конкуренции с другими антителами к LAG-3 и, таким образом, другой эпитоп (таблица 7). 15431, 15572 и 15011 не конкурируют за связывание с 15532 или 25F7-Lag3.5 и имеют уникальные паттерны конкуренции с отдельными антителами группы эпитопов 2. Присвоенные группы эпитопов (пример 13) хорошо совпадают с картированием эпитопом, которое обнаруживало, что каждое антитело демонстрировало уникальные дифференцированные эпитопы (таблица 7). Данные об эпитопах, включая химерную конструкцию №28, также хорошо подтверждаются анализом аффинности связывания (пример 12), в котором 15532 демонстрировало значимое связывание с LAG-3 яванского макака, а 25F7-Lag3.5 - нет, что отражает различные свойства антител из-за дифференцированных контактных остатков.

Таблица 5. Сводка по анализу аффинности связывания для Fab фрагментов анти-LAG-3 антител, связывающих конструкции мутантного ECD LAG-3 со вставленными сегментами последовательностей крысы, собаки или яванского макака. Нормализованное связывание приведено в виде K_D мутанта/ K_D дикого типа.

Номер химерной конструкции	Сканированная область hu LAG-3	Мутантная область hu LAG-3	Введенные мутации от других видов	15532	15431	15572	15011	Аналог 25F7-Lag3.5
1	AA 23-32	AA 23-30	L23S; Q24G; A27K; V29L; P30S	3,2	C.O.	C.O.	0,5	1,3
2	AA 28-37	AA 29-30	V29L; P30S	3,1	C.O.	C.O.	0,5	1,2
3	AA 33-42	AA 40-41	A40V; Q41H	2,2	C.O.	C.O.	0,5	1,3
4	AA 38-47	AA 40-47	A40V; Q41H; P46L; T47E	3,9	C.O.	C.O.	0,5	1,3
5	AA 43-52	AA 46-51	P46L; T47E; I48F; L50H; Q51L	2,7	C.O.	C.O.	0,5	1,3
6	AA 48-57	AA 48-55	I48F; L50H; Q51L; L53P; S54N; L55F	3,4	C.O.	C.O.	0,5	1,4
C7	AA 53-62	AA 53-60	L53P; S54N; L55F; A59G; G60W	3,4	C.O.	C.O.	0,5	1,4
8	AA 58-67	AA 59-66	A59G; G60W; Q66R	2,7	C.O.	C.O.	0,5	1,3
9	AA 63-72	AA 66-71	Q66R; G70D; P71Q	3,9	0,4	1,1	0,7	1,3
10	AA 68-77	AA 70-77	G70D; Q71Q; A74S; A75I; G77A	1,1	1,1	0,7	1,8	1,0
11	AA 73-82	AA 74-82	A74S; A75I; G77A; H78L; P79D; A81L; P82Q	1,5	0,4	0,5	0,6	1,1
12	AA 78-87	AA 78-87	H78L; P79D; A81L; P82Q; delP84-A87	C.O.	0,8	0,8	0,9	C.O.
13	AA 83-92	AA 84-92	delP84-A87; A88M; S91T; W92R	C.O.	0,6	1,1	1,3	C.O.
14	AA 88-97	AA 88-97	A88M; S91T; W92R; G93R; P94H; R95P; R97H	C.O.	C.O.	0,7	0,6	C.O.

15	AA 93-102	AA 95-100	R95G; R98S; T100V	6,5	C.O.	3,1	1,9	1,5
16	AA 98-107	AA 98-105	R98S; T100V; S103M; V104R; G105A	6,3	C.O.	C.O.	7,2	1,7
17	AA 108-117	AA 114-117	L114Q; Q117L	1,4	0,5	0,5	2,6	1,3
18	AA 113-122	AA 114-119	L114Q; Q117L; P118S; R119H	1,1	0,6	0,6	2,1	0,8
19	AA 118-127	AA 118-127	P118S; R119H; D123E; E124K; R127P	0,5	0,5	C.O.	0,6	0,8
20	AA 123-132	AA 123-131	D123N; E124S; R125P; R127P; Q128T; delG130- D131	5,4	C.O.	C.O.	0,3	1,3
21	AA 128-137	AA 128-137	Q128T; delG130- D131; W135A; R137Q	4,7	C.O.	C.O.	0,4	1,4
22	AA 133-142	AA 140-142	R140T; A142K	1,3	0,6	0,8	0,5	1,2
23	AA 143-152	AA 148-152	R148H; A150F; H152R	2,5	3,5	C.O.	2,0	0,8
24	AA 148-156	AA 148-154	R148H; A150F; H152R; R154P	2,6	10,6	C.O.	1,9	0,7
25	AA 153-160	AA 154-158	R154P; A157D; L158F	1,1	0,8	C.O.	1,9	0,7
26	AA 157-165	AA 157-161	A157D; L158F; R161S	1,1	0,6	C.O.	0,7	0,9
27	AA 161-170	AA 161-166	R161S; L166V	0,8	1,3	1,7	2,3	0,8
28	AA 83-92	AA 84-90	P84H; H85R; S90Y	4,8	1,1	0,5	0,6	C.O.
20	< 5-кратное изменение K _D , химерные мутанты							
	> 5-кратное изменение K _D , химерные мутанты							
	C.O.		Связывание химерных мутантов отсутствует					

Таблица 6. Сводка по анализу аффинности связывания для Fab фрагментов анти-LAG-3 антител, связывающих сканированных точечными мутациями LAG-3 человека. Нормализованное связывание представляли в виде K_D мутанта/ K_D дикого типа.

5	Точечная мутация №	Мутантные AA в hu LAG-3	15532	15431	15572	15011	Аналог 25F7-Lag3.5
	1	A40S	4,4	C.O.	C.O.	0,6	1,1
	2	Q41A	3,4	C.O.	C.O.	0,7	1,0
10	3	P43A	3,8	C.O.	C.O.	0,6	1,2
	4	S45A	1,7	0,4	0,6	0,7	1,0
	5	P46A	4,0	C.O.	C.O.	0,7	1,1
	6	T47A	1,5	0,9	0,6	0,9	0,8
15	7	P49A	1,7	C.O.	C.O.	0,8	1,1
	8	Q51A	0,9	0,7	0,6	0,8	0,8
	9	D52A	1,7	C.O.	C.O.	0,7	0,8
	10	S54A	0,7	0,5	0,7	0,8	0,8
20	11	L56A	1,2	0,3	0,7	0,7	0,9
	12	R57A	1,1	0,6	0,8	0,7	0,7
	13	R58A	0,8	1,2	0,8	1,7	0,8
	14	T62A	4,2	C.O.	C.O.	0,6	1,3
25	15	Q64A	2,9	C.O.	C.O.	0,6	1,3
	16	H65A	3,8	C.O.	C.O.	0,5	1,2
	17	Q66A	2,7	C.O.	C.O.	0,7	0,9
	18	P67A	3,8	C.O.	C.O.	0,6	1,1
30	19	D68A	3,4	C.O.	C.O.	0,6	0,9
	20	A73S	0,7	0,6	0,6	0,7	0,8
	21	A74S	1,0	0,8	0,7	0,8	0,9
	22	A75S	0,9	0,8	0,7	0,8	0,9
35	23	P76A	1,0	0,7	0,6	0,8	0,9
	24	G77A	1,0	0,7	0,7	0,8	1,0
	25	H78A	0,9	0,4	0,5	0,7	0,8
	26	P79A	0,9	0,4	0,4	0,6	0,8
40	27	L80A	0,6	0,5	0,6	0,8	0,7
	28	A81S	0,6	0,6	0,6	0,8	0,7
	29	P82A	1,0	1,0	0,8	0,9	0,9
	30	G83A	1,1	0,5	0,5	0,7	1,0
45	31	P84A	0,5	1,1	0,9	1,0	0,6
	32	H85A	7,2	0,8	0,7	0,9	14,1

5

10

15

20

25

30

35

40

45

33	P86A	6,1	0,6	0,7	0,7	2,7
34	A87S	C.O.	1,0	0,9	1,0	C.O.
35	A88S	3,7	0,6	0,6	0,9	3,5
36	P89A	14,2	0,8	0,8	0,9	C.O.
37	S90A	0,6	0,9	0,8	0,9	1,0
38	S91A	5,3	0,7	0,7	0,8	2,2
39	W92A	C.O.	3,6	1,0	1,1	C.O.
40	G93A	7,1	11,6	0,8	1,0	6,2
41	P94A	0,8	C.O.	0,6	0,7	0,8
42	R95A	3,7	1,9	0,6	0,7	1,9
43	P96A	1,4	C.O.	C.O.	0,6	0,7
44	R97A	0,9	1,3	0,6	0,7	0,9
45	R98A	1,6	C.O.	0,9	1,2	0,9
46	Y99A	4,1	C.O.	C.O.	0,5	1,0
47	T100A	3,9	C.O.	C.O.	0,6	1,2
48	V101A	3,5	C.O.	C.O.	0,5	1,0
49	G105A	1,1	0,4	0,4	1,6	1,0
50	P106A	2,7	C.O.	C.O.	4,6	1,0
51	G107A	2,1	C.O.	C.O.	5,7	0,8
52	G108A	1,0	0,3	0,4	0,5	0,9
53	L109A	1,1	1,0	1,0	84,2	0,9
54	R110A	0,9	0,9	0,6	C.O.	0,9
55	S111A	1,0	0,8	0,7	53,4	0,9
56	G112A	1,0	0,5	0,5	3,1	0,9
57	R113A	0,6	0,9	0,7	3,3	0,8
58	P115A	1,0	1,1	1,4	1,3	1,0
59	Q117A	0,8	0,4	0,5	0,7	0,8
60	P118A	0,7	1,0	0,9	1,2	0,8
61	R119A	3,2	C.O.	C.O.	0,6	1,1
62	Q121A	0,9	1,0	0,6	0,9	0,9
63	D123A	1,0	0,9	0,5	0,8	1,0
64	E124A	1,8	C.O.	C.O.	0,8	1,1
65	R125A	0,9	1,1	1,1	1,1	0,9
66	G126A	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
67	R127A	0,6	0,9	0,5	0,9	0,7
68	Q128A	0,7	0,8	0,9	1,0	0,7

69	R129A	3,0	C.O.	C.O.	0,7	1,2
70	G130A	4,4	C.O.	C.O.	0,6	1,3
71	D131A	4,2	C.O.	C.O.	0,6	1,2
72	S133A	2,2	C.O.	C.O.	0,6	1,1
73	R137A	3,6	C.O.	C.O.	0,6	1,0
74	P138A	2,7	C.O.	C.O.	0,7	1,0
75	R141A	0,7	1,0	0,9	1,1	0,8
76	D143A	3,8	C.O.	C.O.	0,5	1,0
77	R148A	2,9	C.O.	C.O.	0,7	1,2
78	R154A	0,8	1,0	0,8	1,2	0,8
79	S159A	0,7	0,9	0,3	0,7	0,8
80	R163A	2,5	C.O.	C.O.	0,6	1,0
< 5-кратное изменение K _D , точечные мутанты						
> 5-кратное изменение K _D , точечные мутанты						
C.O. Связывание точечных мутантов отсутствует						

Таблица 7. Сводка по связывающим эпитопам, которые идентифицировали для тестируемых анти-LAG-3 антител

Антитело	Группировка эпитопов	Линейные эпитопы	Контактные остатки
15532	2D	78-105, 123-131	H85, P86, A87, P89, S91, W92, G93
15431	4	23-30, 40-66, 88-105, 123-137, 148-152	A40, Q41, P43, P46, P49, D52, T62, Q64, H65, Q66, P67, D68, G93, P94, P96, R98, Y99, T100, V101, P106, G107, R119, E124, R129, G130, D131, S133, R137, P138, D143, R148, R163
15572	3	23-30, 40-66, 98-105, 118-137, 148-161	A40, Q41, P43, P46, P49, D52, T62, Q64, H65, Q66, P67, D68, P96, Y99, T100, V101, P106, G107, R119, E124, R129, G130, D131, S133, R137, P138, D143, R148, R163
15011	1	98-105	G107, L109, R110, S111
25F7-Lag3.5, аналог	2E	78-97	H85, A87, P89, W92, G93

Таблица 8. SEQ ID NO последовательностей ДНК и белков VH, VL, HC и LC

SEQ ID №	Последовательность
1	15646 последовательность ДНК варибельного домена тяжелой цепи (VH)
2	15646 последовательность ДНК варибельного домена легкой цепи (VL)
3	15646 последовательность белка VH
4	15646 последовательность белка VL
5	15532 последовательность ДНК VH
6	15532 последовательность ДНК VL
7	15532 последовательность белка VH
8	15532 последовательность белка VL
9	15723 последовательность ДНК VH
10	15723 последовательность ДНК VL
11	15723 последовательность белка VH
12	15723 последовательность белка VL
13	15595 последовательность ДНК VH
14	15595 последовательность ДНК VL
15	15595 последовательность белка VH
16	15595 последовательность белка VL
17	15431 последовательность ДНК VH
18	15431 последовательность ДНК VL

19	15431 последовательность белка VH
20	15431 последовательность белка VL
21	15572 последовательность ДНК VH
22	15572 последовательность ДНК VL
23	15572 последовательность белка VH
24	15572 последовательность белка VL
25	15011 последовательность ДНК VH
26	15011 последовательность ДНК VL
27	15011 последовательность белка VH
28	15011 последовательность белка VL
29	последовательность ДНК константной области тяжелой цепи (HC) IgG1-LALA
30	последовательность белка константной области тяжелой цепи (HC) IgG1-LALA
31	последовательность ДНК константной области легкой цепи λ (LC) Ig
32	последовательность белка константной области легкой цепи λ (LC) Ig
33	последовательность ДНК константной области легкой цепи κ (KC) Ig
34	последовательность белка константной области легкой цепи κ (KC) Ig

Таблица 9. SEQ ID NO последовательностей ДНК и белка VH и VL и аминокислотных последовательностей H-CDR1-3 и L-CDR1-3 анти-LAG-3 антител

Анти-тело	VH (ДНК)	VL (ДНК)	VH (белок)	VL (белок)	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
15646	1	2	3	4	35	36	37	38	39	40
15532	5	6	7	8	41	42	43	44	45	40
15723	9	10	11	12	35	42	46	44	47	40
15595	13	14	15	16	48	49	50	51	47	52
15431	17	18	19	20	53	54	55	44	45	40
15572	21	22	23	24	56	57	58	59	60	61
15011	25	26	27	28	62	63	64	65	66	67

Таблица 10. Определяющие комплементарность области (CDR) анти-LAG-3 антител и происхождение генов зародышевой линии для антител, полученных у ОМТ крыс.

№ антитела	Ген IGHV	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	SEQ ID NO
15646	IGHV4-34	GGSFSGYY	INHRGST	CTRGEWESLFFDYW	35-37
15532	IGHV4-34	GESFSGYY	INHSGST	CARGWDLDDWNDYWNEYW	41-43
15723	IGHV4-34	GGSFSGYY	INHSGST	CARGEDWGESFFDYW	35, 42, 46
15595	IGHV1-24	GYSLTEIS	FDPEDGET	CATGGWGPWFDPW	48-50
15431	IGHV6-1	GDSVSSNSA	TYYSKWK	CARDDDWDFDYW	53-55
15572	IGHV4-39	GDSISSSSYY	IFYSGNT	CAREDDFLTDYYGAFDIW	56-58
15011	IGHV3-23*	GDFRSYA	INGEVGGSNT	CVKGAGACGICNDDIDAW	62-64
№ антитела	IGKV ген	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3	SEQ ID NO
15646	IGKV3-11	QSISSY	GAS	CQQRSNWPLTF	38-40
15532	IGKV3-11	QSVSSY	DAS	CQQRSNWPLTF	44, 45, 40
15723	IGKV3-11	QSVSSY	AAS	CQQRSNWPLTF	44, 47, 40
15595	IGKV1-12	QGISSW	AAS	CQQANSFPFTF	51, 47, 52
15431	IGKV3-11	QSVSSY	DAS	CQQRSNWPLTF	44, 45, 40
15572	IGKV1-5	QSISSW	KAS	CQQYNSYLTF	59-61
15011	IGLV3-19*	GSYAGSY	DND	CGSTNDNDGGLF	65-67

*Гены, используемые для гуманизации, см. пример 2.

Список последовательностей

Последовательности ДНК и белка VH и VL

SEQ ID NO:1 (15646 последовательность ДНК VH)

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGTGCCGGTCTGCTGAAGCCTTCTGAAACTCTGT
CTCTGACTTGTGCCGTCTATGGTGGATCATTCAGCGGCTACTATTGGTCCTGGATCA
GGCAGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCGAGATCAACCACCGGGGCTCT

ACCAACTACAATCCCTCTCTGAAGAGCAGGGTGACCATCTCCGTGGACACATCTAA
GAATCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCCGCTGATACAGCCGTGTACT
ATTGCACAAGGGGGGAGGAATGGGAGTCACTGTTCTTTGATTACTGGGGGCAGGGG
ACACTGGTCACAGTCTCGAGT

5 SEQ ID NO:2 (15646 последовательность ДНК VL)

GAAATCGTCCTGACCCAGTCCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGCCCCGGAGAAAGA
GCCACCCTGTCTGCCCAGCAAGCCAGTCCATCAGCTCCTATCTCGCCTGGTATCAG
CAGAAACCAGGCCAGGCTCCCCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCAACAGAGCTAC
AGGAATCCCAGCCCGCTTCAGCGGCTCCGGCTCTGGCACAGACTTTACCCTGACAAT
10 CTCTAGCCTGGAGCCTGAGGATTTCCCGTGTACTATTGCCAGCAGAGATCTAATTG
GCCACTGACATTCGGCGGCGGCACACGGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO:3 (15646 последовательность белка VH)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHRGS
TNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCTRGEWESLFFDYWGQGTIV
15 TVSS

SEQ ID NO:4 (15646 последовательность белка VL)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIP
ARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTRVEIK

SEQ ID NO:5 (15532 последовательность ДНК VH)

20 CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCCGGCCTGCTGAGACCAAGCGAGACCCTG
TCCCTGACATGCGCCGTGTATGGCGAGAGCTTCTCCGGCTATTACTGGAAGTGGATC
CGGCAGCCTCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCGAGATCAATCACTCCGGCTC
CACCAATTACAACCCATCCCTGAAGTCTCGGGTGACAATCAGCGTGGATACAAGCA
AGACCCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACAGCTGCCGATACCGCCGTGTAT
25 TACTGCGCCAGAGGCTGGGACCTGCTGGATTGGAATGACTACTGGAATGAGTACTG
GGGCCAGGGGACCCTGGTGACCGTCTCGAGT

SEQ ID NO:6 (15532 последовательность ДНК VL)

GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCTCTGTCCCCTGGCGAGCGGG
CCACCCTGTCTGTAGAGCTTCTCAGTCCGTGTCTTCTACCTGGCTTGGTACCAGCA
30 GAAGCCAGGACAGGCCCCAAGACTGCTGATCTATGACGCTTCCAATCGGGCTACCG
GCATCCCAGCTCGCTTTAGCGGCTCCGGCTCCGGCACCAGCTTCACCCTGACAATCA
GCTCCCTGGAGCCAGAGGATTTTGCCGTGTATTACTGTCAGCAGAGGTCCAATTGGC
CACTGACATTTGGCGGCGGCACAAAGGTTGAGATCAAG

SEQ ID NO:7 (15532 последовательность белка VH)

35 QVQLQQWGAGLLRPSETLSLTCAVYGESFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGST
NYNPSLKSRTISVDTSKTQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGWDLLDWN DYWNEYWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO:8 (15532 последовательность белка VL)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI
40 PARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:9 (15723 последовательность ДНК VH)

CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCTGGCCTGCTGAAGCCCTCTGAGACCCTGT
CTCTGACCTGTGCCGTGTATGGCGGCAGCTTCTCCGGCTATTACTGGAAGTGGATCC
GCCAGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCGAGATCAACCACTCCGGCTCT
45 ACCAACTACAATCCTTCTCTGAAGTCCAGGGTGACAATCAGCGTGGACACCAGCAA
GAACCAAGTTTAGCCTGAAGCTGTCCAGCGTGACAGCTGCCGATACAGCCGTGTATT
ACTGCGCCAGAGGCGAGGATTGGGGCGAGAGCTTCTTTGATTACTGGGGCCAGGGG
ACCCTGGTGACCGTCTCGAGT

SEQ ID NO:10 (15723 последовательность ДНК VL)

GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCTCTGTCCCCCTGGCGAGCGGG
CCACCCTGAGCTGTCTGGGCCTCCCAGTCCGTGAGCTCCTACCTGGCTTGGTATCAGC
AGAAGCCAGGACAGGCCCCAAGACTGCTGATCTACGCCGCTTCCAATCGGGCCACC
5 GGCATCCCCGCCAGATTTTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGATTTACCCCTGACAATC
AGCTCCCTGGAGCCAGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGGTCTAATTG
GCCACTGACATTTGGCGGCGGCACCAAGGTTGAGATCAAG

SEQ ID NO:11 (15723 последовательность белка VH)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGS
10 TNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGEDWGESFFDYWGQGL
VTVSS

SEQ ID NO:12 (15723 последовательность белка VL)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYAASNRATGI
PARFSGSGSGTDFTLTISLPEDEFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKEIK

15 SEQ ID NO:13 (15595 последовательность ДНК VH)

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGAGCTTCTGTG
AAGGTTTCCTGTAAGGTTTCCGGCTATAGCCTGACCGAGATCTCTATGCACTGGGTA
CGGCAAGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGGCTTTGACCCAGAGGATGG
CGAGACCATCTACGCTCAGAGGTTTCAGGGGCGCGTGATCATGACCGAGGATACCA
20 GCACCGATACCGCCTACATGGAGCTGTCCAGCCTGAGATCCGAGGATACCGCCGTG
TATTACTGCGCTACTGGTGGCTGGGGCCCCAATTGGTTCGATCCTTGGGGCCAGGGG
ACCCTGGTGACCGTCTCGAGT

SEQ ID NO:14 (15595 последовательность ДНК VL)

GACATCCAGATGACACAGTCTCCTTCCTCTGTGAGCGCCTCTGTGGGCGACCGCG
25 TGACCATCACATGCCGCGCTTCCCAGGGGATCTCTTCCTGGCTGGCTTGGTACCAGC
AGAAGCCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTATGCTGCCAGCAGCCTGCAGTCC
GGCGTGCCCTTCCAGGTTTAGCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTTACACTGACAATC
AGCTCCCTGCAGCCCGAGGATTTTGCCACCTATTACTGTCAGCAGGCGAATTCCTTC
CCTTTTACATTTCGGCCCTGGCACCAAGGTTGATATCAAG

30 SEQ ID NO:15 (15595 последовательность белка VH)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYSLTEISMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPED
GETIYAQRFGQGRVIMTEDTSTDATYMESSLRSEDTAVYYCATGGWGPNWFDWPWGQ
TLVTVSS

SEQ ID NO:16 (15595 последовательность белка VL)

35 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPFTFGPGTKVDIK

SEQ ID NO:17 (15431 последовательность ДНК VH)

CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCCCGCCTGGTGAAGCCAAGCCAGACCCTG
TCTCTGACATGCGCCATCTCCGGCGACAGCGTGTCTCTAACTCCGCCGCTTGGAAT
40 TGGATCCGGCAGTCTCCATCCAGAGGCCTGGAGTGGCTGGGCAGAACCTATTACCG
GTCCAAGTGGTACAACGATTATGCCGTGTCCGTGAAGAGCAGAATCACCATCAACC
CTGATACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGCAGCTGAATTCGTGACCCAGAGGAT
ACAGCCGTGTATTACTGTGCTAGGGACGATGATTGGAATGACTTCGATTACTGGGGC
CAGGGGACCCTGGTGACAGTCTCGAGT

45 SEQ ID NO:18 (15431 последовательность ДНК VL)

GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCAGCTACACTGTCCCTGTCTCCCGGCGAGCGGG
CCACCCTGAGCTGTAGAGCTTCCCAGTCCGTGTCTTCCTATCTGGCTTGGTATCAGC
AGAAGCCAGGACAGGCCCCAAGGCTGCTGATCTACGACGCCTCCAATAGAGCCACC

GGCATCCCAGCTAGATTTTCTGGCTCCGGCTCCGGCACCGATTTACACTGACCATC
TCTAGCCTGGAGCCAGAGGATTTTGCTGTATATTACTGCCAGCAGCGCAGCAACTGG
CCCCTGACATTTGGCGGCGGCACCAAGGTTGAGATCAAG

SEQ ID NO:19 (15431 последовательность белка VH)

5 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRS
KWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDDDWDFDYWGQG
TLVTVSS

SEQ ID NO:20 (15431 последовательность белка VL)

10 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI
PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGKVEIK

SEQ ID NO:21 (15572 последовательность ДНК VH)

15 CAGCTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCGGCCTGGTGAAGCCCTCTGAGACCCTG
TCCCTGACATGCACCGTGAGCGGCGATTCCATCAGCTCTTCCAGCTATTACTGGGGC
TGGATCCGGCAGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAGCATCTTCTACTC
CGGCAATACATATTATAATCCTTCTCTGAAGAGCAGGGTGACAATCAGCGTGGATA
CCTCCAAGAATCAGTTTAGCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACAGCTGCCGATACAGCC
GTGTATTACTGCGCTAGGGAGGACGATTTTCTGACCGATTATTACGGCGCTTTCGAC
ATCTGGGGCCAGGGGACAATGGTGACAGTCTCGAGT

SEQ ID NO:22 (15572 последовательность ДНК VL)

20 GATATCCAGATGACCCAGTCTCCAAGCACCTGAGCGCCTCTGTGGGCGATCGGG
TGACCATCACATGTCGGGCTTCTCAGTCCATCAGCAGCTGGCTGGCTTGGTATCAGC
AGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGCCTCTTCCAGCGAGAGC
GGCGTGCCATCCAGTTTAGCGGCTCCGGCTCCGGCACCGAGTTTACCCTGACCATC
TCTTCCCTGCAGCCCGATGACTTTGCCACCTACTACTGTCAGCAGTACAATTCCTATC
25 TGACATTCGGCGGGCGGCACCAAGGTTGAGATCAAG

SEQ ID NO:23 (15572 последовательность белка VH)

30 QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIFYSGNT
YYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDDFLTDYYGAFDIWGQG
TMVTVSS

SEQ ID NO:24 (15572 последовательность белка VL)

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSSESGV
PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFAVYYCQQYNSYLTFGGGKVEIK

SEQ ID NO:25 (15011 последовательность ДНК VH)

35 GAGGTGCAGCTGCTGGAATCCGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTGGATCCCTG
CGACTGAGCTGCGCCGCTTCTGGCTTCGACTTTAGAAGCTACGCAATGATGTGGGTG
CGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTGGGAGGGATCAACGGTGAAGTCG
GTGGCTCTAATACATACTATGCACCTGCCGTCAAGGGAAGGGCTACTATTAGTCGG
GACAACTCAAAAAATACCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGCCGAGGATAC
CGCCGTGTACTATTGCGTGAAAGGTGCTGGCGCATGCGGCATCTGTAATGACGATA
40 TTGATGCATGGGGACAGGGGACCCTGGTGACAGTCTCGAGT

SEQ ID NO:26 (15011 последовательность ДНК VL)

45 AGTTATGAGCTGACTCAGGACCCAGCAGTGTGAGTCCGCCCTGGGCCAGACAGTG
AGAATCACTTGCAAGTGGGGCTGGTTCATATGCAGGCTCCTACTATTACGGATGGCAC
CAGCAGAAGCCCGGACAGGCACCTGTGACAGTCATCTACGACAACGATAAAAGGCC
AAGCAATATTCCCGACCGGTTCTCTGGGTCCAGCTCTGGTAACACCGCCTCCCTGAC
CATTAAGTGGGGCCAGGCTGAGGACGAAGCTGATTATTACTGTGGCTCTACAAACG
ATAATGACGATGGCGGACTGTTTGGCTCCGGAACCTAAGGTCACCGTCCTA

SEQ ID NO:27 (15011 последовательность белка VH)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFRSYAMMWVRQAPGKGLEWVGGINGEV
 GGSNTYYAPAVKGRATISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKGAGACGICNDDID
 AWGQGTILVTVSS

SEQ ID NO:28 (15011 последовательность белка VL)

5 SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGAGSYAGSYYYGWHQQKPGQAPVTVIYDNDKRP
 SNIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCGSTNDNDGGLFGSGTKVTVL

Последовательности ДНК и белка константной области

SEQ ID NO:29 (последовательность ДНК константной области IgHC)

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
 10 CTGGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
 ACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGT
 CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG
 CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
 TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCCACCGTGC
 15 CCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAA
 GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
 GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
 GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
 20 GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG
 GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA
 AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCG
 TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA
 25 GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
 CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA

SEQ ID NO:30 (последовательность белка константной области IgHC)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
 30 AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
 LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:31 (последовательность ДНК константной области IgLC)

GGCCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGC
 35 TCCAAGCCAACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGAAGTCTACCCGGGAGCT
 GTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCA
 CCAAACCCTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTG
 ACGCCCGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGG
 40 GAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:32 (последовательность белка константной области IgLC)

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTK
 PSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:33 (последовательность ДНК константной области IgKC)

45 CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA
 AATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA
 AAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCCAGGAGAGTGTG
 ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA

GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO:34 (последовательность белка константной области IgKC)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT

5 EQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:35 (15646/15723 H-CDR1)

GGSFSGYY

SEQ ID NO:36 (15646 H-CDR2)

INHRGST

10 SEQ ID NO:37 (15646 H-CDR3)

CTRGEEWESLFFDYW

SEQ ID NO:38 (15646 L-CDR1)

QSISSY

SEQ ID NO:39 (15646 L-CDR2)

15 GAS

SEQ ID NO:40 (15646/15532/15723/15431 L-CDR3)

CQQRSNWPLTF

SEQ ID NO:41 (15532 H-CDR1)

GESFSGYY

20 SEQ ID NO:42 (15532/15723 H-CDR2)

INHSGST

SEQ ID NO:43 (15532 H-CDR3)

CARGWDLWDNDYWNEYW

SEQ ID NO:44 (15532/15723/15431 L-CDR1)

25 QSVSSY

SEQ ID NO:45 (15532/15431 L-CDR2)

DAS

SEQ ID NO:46 (15723 H-CDR3)

CARGEDWGESFFDYW

30 SEQ ID NO:47 (15723/15595 L-CDR2)

AAS

SEQ ID NO:48 (15595 H-CDR1)

GYSLTEIS

SEQ ID NO:49 (15595 H-CDR2)

35 FDPEDGET

SEQ ID NO:50 (15595 H-CDR3)

CATGGWGPNWFDPW

SEQ ID NO:51 (15595 L-CDR1)

QGISSW

40 SEQ ID NO:52 (15595 L-CDR3)

CQQANSFPFTF

SEQ ID NO:53 (15431 H-CDR1)

GDSVSSNSA

SEQ ID NO:54 (15431 H-CDR2)

45 TYYRSKW

SEQ ID NO:55 (15431 H-CDR3)

CARDDDWNDFFDYW

SEQ ID NO:56 (15572 H-CDR1)

GDSISSSSY

SEQ ID NO:57 (15572 H-CDR2)

IFYSGNT

SEQ ID NO:58 (15572 H-CDR3)

5 CAREDDFLTDYYGAFDIW

SEQ ID NO:59 (15572 L-CDR1)

QSISSW

SEQ ID NO:60 (15572 L-CDR2)

KAS

10 SEQ ID NO:61 (15572 L-CDR3)

CQQYNSYLT

SEQ ID NO:62 (15011 H-CDR1)

GFDFRSYA

SEQ ID NO:63 (15011 H-CDR2)

15 INGEVGGST

SEQ ID NO:64 (15011 H-CDR3)

CVKGAGACGICNDDIDAW

SEQ ID NO:65 (15011 L-CDR1)

GSYAGSY

20 SEQ ID NO:66 (15011 L-CDR2)

DND

SEQ ID NO:67 (15011 L-CDR3)

CGSTNDNDGGLF

SEQ ID NO:68 (LAG-3 человека)

25 MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEVPVWVAQEGAPQLPCSTIPLQDLSLL
RRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGLRSGRL
PLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASM
TASPPGSLRASDWILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPIHHLAESFLFLPQ
VSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVG
30 TRSFLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVSAQAGTYTCHIHLEQQLNATVT
LAITVTPKSFGSPGSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRFSFGPWLEAQEAQLLSQ
PWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLFLILGVLSLLLVGTG
AFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL

SEQ ID NO:69 (LAG-3 яванского макака)

35 MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPPQPGAEISVVWVAQEGAPQLPCSTIPLQDLSLLR
RAGVTWQHQPDSGPPAXAPGHPPVPGHRPAAPYSWGPRPRRYTVLSVGPGLRSGRLP
LQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRATVHLRDRALSCRLRLRVGQASMT
ASPPGSLRTSDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRSRGQGRVPVQGSPIHHLAESFLFLPHV
GPMDSGLWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPATPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVGT
40 QSFLTAKWAPPGGGPDLLVAGDNGDFTLRLEDVSAQAGTYICHIRLQGGQLNATVTL
AIITVTPKSFGSPGSLGKLLCEVTPASGQEHFVWSPLNTPSQRFSFGPWLEAQEAQLLSQP
WQCQLHQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALRAGHLPLFLILGVLFLLLVGTGA
FGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPELEPEPELERELGPEPEPGPEPE
PEQL

45 SEQ ID NO:70 (LAG-3 крысы)

MRQDLFLDLLLQLLWEAPVSSGPGKELSVVWVAQEGAPVHLPCSLFPHLDPNFLR
RGWVTWQHHRPDSQPASIPALDLLQGMPTRRHPPHRYTVLSVAPGGLRSGRQPLLSH
VQLEKRGPRGRGDFSLWLRPATRKDAGEYHAFVRLPDRDFCSLRLRVGQASMIASPPG

TLKPSDWVILNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQSRVPVHNSPRHYLAESFLLLPQVSPLDSGT
WGCVLTYRDGFNVSTYTNLKVQGLEPVAPLTVYAAEGSRVELPCHLPPVVGTPSLLIAK
WTPPGGGPELPTVGKSGNFTLQLENVGRAQAGTYTCSIHLQGRQLSAAVTLAVITVTPK
SFGLPGSPQKLLCEVVPASGEGRFVWRPLSDLSRSSLGPVLELQEAKLLAEQWQCQLYE
5 GQKLLGATVYTAESSSGAWSAKRISGDLKGGHLFSLILGALALFLVLTGAFGFHLWRR
QLLRRRFSALEHGIRPPPVQSKIEELEREPETEMEPETEPDPEPQPEPELEPESRQL

SEQ ID NO:71 (LAG-3 собаки)

MWEVQFLVLLLLQLLWVAPVAAPGSGTEVQVVWAQEGAPVQLPCSPTIPLQDVSL
RNAGVTWYHLPESGPAAPALSLRPAAPSARGPGPRSYVVLMPAPGGLRSGLVPTVNAL
10 ALNSPGPTRFSLALQTVISLPHSWLFPGPSSLPQGPLASCWPSPHVGVGCVCHEPPFIH
LLPARQSPLLFLLPSLQPQCSASLYLSLSASTLASSFPGLEPSGPLTVYTGAGSRVGLPCR
LPPGVGTQSFLTAKWTPPGGGPDLLVAGDDGNFTLQLEVVNQAQAGTYTCHHLQGGQ
LSTTVTLAVITVTPKSSGLPGNLRKLLCEVTPASGQERFVWSPLDKQSWRGSPGPCLEM
QETRLLSQPWQCHVYQAERLLGTAVYLIDPAGPGAQRSGRAQGVLTGHLSLLLILGIL
15 FLLLLMTGAFGFQLWRRQWRPRRFSALELGTHPPQAQSKIGELEQEPELEPEPEPEPE
PEPE

SEQ ID NO:72 (мышь LAG-3)

MREDLLLGFLLLGLLWEAPVVSSGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCSLKSPNLDPNFLR
RGGVIWQHQPDSGQPTIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGGLRSGRQPLHPHV
20 QLEERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCSLRLRVGQASMIASPSGVL
KLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVPVYNSPRHFLAETFLLLPQVSPLDSGTW
GCVLTYRDGFNVSTYTNLKVGLPEPVAPLTVYAAEGSRVELPCHLPPGVGTGPSLLIAKW
TPPGGGPELPVAGKSGNFTLHLEAVGLAQAGTYTCSIHLQGGQLNATVTLAVITVTPKS
FGLPGSRGKLLCEVTPASGKERFVWRPLNNLSRSCPGPVLEIQEARLLAERWQCQLYEG
25 QRLLGATVYAAESSSGAHSARRISGDLKGGHLVILVILGALSFLVLAGAFGFHWWRK
QLLRRRFSALEHGIQPFPAQRKIEELERELETEMGQEPEPEPEPEPQLEPEPRQL

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> СИМФОГЕН А/С

<120> АНТИ-LAG-3 АНТИТЕЛА И ИХ КОМПОЗИЦИИ

30 <130> 022675.WO057

<140>

<141>

<150> 62/407,678

<151> 2016-10-13

35 <160> 74

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1

<211> 357

<212> ДНК

40 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
полинуклеотид»

45 <400> 1

cagggtgcagc tgcagcagtg ggggtgccgt ctgctgaagc cttctgaaac tctgtctctg 60

acttgtgccg tctatgggtg atcattcagc ggctactatt ggtcctggat caggcagccc 120

cctggcaagg gcctggagtg gatcggcgag atcaaccacc ggggctctac caactacaat 180

ccctctctga agagcagggt gaccatctcc gtggacacat ctaagaatca gttcagcctg 240
aagctgagct ccgtagaccgc cgctgataca gccgtgtact attgcacaag gggggaggaa 300
tgggagtcac tggtctttga ttactggggg cagggggacac tggtcacagt ctcgagt 357
<210> 2
5 <211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
10 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
полинуклеотид»
<400> 2
gaaatcggtc tgacccagtc ccccgccacc ctgagcctga gccccggaga aagagccacc 60
ctgtcctgcc gagcaagcca gtccatcagc tcctatctcg cctggatatca gcagaaacca 120
15 gggcagggtc cccggctgct gatctacggc gcctccaaca gagctacagg aatcccagcc 180
cgcttcagcg gctccggctc tggcacagac ttaccctga caatctctag cctggagcct 240
gaggatttcg ccggtgtacta ttgccagcag agatctaatt ggccactgac attcggcggc 300
ggcacacggg tggagatcaa g 321
<210> 3
20 <211> 119
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
25 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
полипептид»
<400> 3
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
30 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
35 50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95
40 Arg Gly Glu Glu Trp Glu Ser Leu Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 4
45 <211> 107
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полипептид»

<400> 4

5 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 10 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 15 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 5

20 <211> 366

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

25 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид»

<400> 5

caggttcagc tgcagcagtg gggcgccggc ctgctgagac caagcgagac cctgtccctg 60
 acatgcgccg tgtatggcga gagcttctcc ggctattact ggaactggat ccggcagcct 120
 30 cccggcaagg gcctggagtg gatcggcgag atcaatcact ccggctccac caattacaac 180
 ccatccctga agtctcgggt gacaatcagc gtggatacaa gcaagacca gttcagcctg 240
 aagctgagct ccgtgacagc tgccgatacc gccgtgtatt actgcgccag aggtggggac 300
 ctgctggatt ggaatgacta ctggaatgag tactggggcc aggggaccct ggtgaccgtc 360
 tcgagt 366

35 <210> 6

<211> 321

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

40 <221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид»

<400> 6

gagatcgtagc tgacccagtc ccttgccacc ctgtctctgt cccctggcga gcggggccacc 60
 45 ctgtcctgta gagcttctca gtccgtgtct tcctacctgg cttggtagca gcagaagcca 120
 ggacaggccc caagactgct gatctatgac gcttccaatc gggctaccgg catcccagct 180
 cgcttttagcg gctccggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagctc cctggagcca 240
 gaggattttg ccgtgtatta ctgtcagcag aggtccaatt ggccactgac atttggcggc 300

ggcacaaaagg ttgagatcaa g

<210> 7

<211> 122

<212> Белок

5 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полипептид»

10 <400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Arg Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Glu Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

15 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Thr Gln Phe Ser Leu

20 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Trp Asp Leu Leu Asp Trp Asn Asp Tyr Trp Asn Glu Tyr Trp

100 105 110

25 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 107

<212> Белок

30 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полипептид»

35 <400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

40 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

45 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 9

<211> 357

<212> ДНК

5 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид»

10 <400> 9

caggttcagc tgcagcagtg gggcgctggc ctgctgaagc cctctgagac cctgtctctg 60

acctgtgccg tgtatggcgg cagcttctcc ggctattact ggaactggat ccgccagccc 120

cccggcaagg gcctggagtg gatcggcgag atcaaccact ccggctctac caactacaat 180

ccttctctga agtccagggt gacaatcagc gtggacacca gcaagaacca gtttagcctg 240

15 aagctgtcca gcgtgacagc tgccgataca gccgtgtatt actgcgccag aggcgaggat 300

tggggcgaga gcttctttga ttactggggc caggggaccc tggtgaccgt ctcgagt 357

<210> 10

<211> 321

<212> ДНК

20 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид»

25 <400> 10

gagatcgtgc tgacccagtc ccctgccacc ctgtctctgt cccctggcga gcggggccacc 60

ctgagctgtc gggcctccca gtccgtgagc tcctacctgg cttggtatca gcagaagcca 120

ggacaggccc caagactgct gatctacgcc gcttccaatc gggccaccgg catccccgcc 180

agattttccg gctctggctc cggcaccgat ttcaccctga caatcagctc cctggagcca 240

30 gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag aggtctaatt ggccactgac atttggcggc 300

ggcaccsaagg ttgagatcaa g 321

<210> 11

<211> 119

<212> Белок

35 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полипептид»

40 <400> 11

Gln Val Gln Leu Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

45 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
5 Arg Gly Glu Asp Trp Gly Glu Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 12
10 <211> 107
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
15 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
полипептид»
<400> 12
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
20 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
25 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95
30 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 13
<211> 357
<212> ДНК
35 <213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
полинуклеотид»
40 <400> 13
cagggttcagc tgggtgcagtc cggcgctgag gtgaagaagc ctggagcttc tgtgaagggt 60
tcctgtaagg tttccggcta tagcctgacc gagatctcta tgcaactgggt acggcaagcc 120
cccggcaagg gcctggagtg gatgggcggc tttgaccagc aggatggcga gaccatctac 180
gctcagagggt ttcaggggcg cgtgatcatg accgaggata ccagcaccga taccgcctac 240
45 atggagctgt ccagcctgag atccgaggat accgccgtgt attactgcgc tactgggtggc 300
tgggggcccca attggttcga tccttggggc caggggaccc tggtgaccgt ctcgagt 357
<210> 14
<211> 321

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

5 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид»

<400> 14

gacatccaga tgacacagtc tccttcctct gtgagcgcct ctgtgggcga ccgcgtgacc 60
atcacatgcc gcgcttccca ggggatctct tcctggctgg cttggtacca gcagaagccc 120
10 ggcaaggccc ccaagctgct gatctatgct gccagcagcc tgcagtcagg cgtgccttcc 180
aggttttagcg gctccggctc cggcaccgac tttaactga caatcagctc cctgcagccc 240
gaggattttg ccacctatta ctgtcagcag gcgaattcct tcccttttac attcggccct 300
ggcaccaagg ttgatataa g 321

<210> 15

15 <211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

20 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полипептид»

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
25 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Leu Thr Glu Ile
20 25 30
Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Arg Phe
30 50 55 60
Gln Gly Arg Val Ile Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
35 Ala Thr Gly Gly Trp Gly Pro Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16

40 <211> 107

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

45 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полипептид»

<400> 16

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

	1	5	10	15												
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp
		20		25		30										
	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
5		35		40		45										
	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50		55		60										
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65			70		75									80	
10	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ala	Asn	Ser	Phe	Pro	Phe
				85		90								95		
	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys					
		100		105												
	<210> 17															
15	<211> 363															
	<212> ДНК															
	<213> Искусственная последовательность															
	<220>															
	<221> источник															
20	<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид»															
	<400> 17															
	caggttcagc	tgcagcagtc	cggccccggc	ctggtgaagc	caagccagac	cctgtctctg		60								
	acatgcgcca	tctccggcga	cagcgtgtcc	tctaaactccg	ccgcttgga	ttggatccgg		120								
25	cagtctccat	ccagaggcct	ggagtggctg	ggcagaacct	attaccggtc	caagtggtag		180								
	aacgattatg	ccgtgtccgt	gaagagcaga	atcaccatca	accctgatac	cagcaagaac		240								
	cagttcagcc	tgcagctgaa	ttccgtgacc	ccagaggata	cagccgtgta	ttactgtgct		300								
	agggacgatg	attggaatga	cttcgattac	tggggccagg	ggaccctggg	gacagtctcg		360								
	agt							363								
30	<210> 18															
	<211> 321															
	<212> ДНК															
	<213> Искусственная последовательность															
	<220>															
35	<221> источник															
	<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид»															
	<400> 18															
	gagatcgtgc	tgacccagtc	cccagctaca	ctgtccctgt	ctcccggcga	gcggggccacc		60								
40	ctgagctgta	gagcttccca	gtccgtgtct	tcctatctgg	cttggtatca	gcagaagcca		120								
	ggacaggccc	caaggctgct	gatctacgac	gcctccaata	gagccaccgg	catcccagct		180								
	agatthttctg	gctccggctc	cggcaccgat	ttcacactga	ccatctctag	cctggagcca		240								
	gaggatthttg	ctgtatatatta	ctgccagcag	cgcagcaact	ggcccctgac	atttggcggc		300								
	ggcaccaagg	ttgagatcaa	g					321								
45	<210> 19															
	<211> 121															
	<212> Белок															
	<213> Искусственная последовательность															

<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полипептид»

5 <400> 19

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

10 Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala

50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn

15 65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val

85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asp Asp Trp Asn Asp Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

20 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 20

<211> 107

<212> Белок

25 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полипептид»

30 <400> 20

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

35 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

40 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

45 <210> 21

<211> 372

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид»

5 <400> 21

cagctgcagc	tgcaggaaaag	cggtcccgcc	ctggtgaagc	cctctgagac	cctgtccctg	60
acatgcaccg	tgagcggcga	ttccatcagc	tcttcagct	attactgggg	ctggatccgg	120
cagccccccg	gcaagggcct	ggagtggatc	ggcagcatct	tctactccgg	caatacatat	180
tataatcctt	ctctgaagag	caggggtgaca	atcagcgtgg	atacctccaa	gaatcagttt	240
agcctgaagc	tgagctccgt	gacagctgcc	gatacagccg	tgtattactg	cgctagggag	300
gacgattttc	tgaccgatta	ttacggcgct	ttcgacatct	ggggccaggg	gacaatgggtg	360
acagtctcga	gt					372

<210> 22

<211> 318

15 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид»

20 <400> 22

gatatccaga	tgaccagtc	tccaagcacc	ctgagcgct	ctgtgggcga	tcgggtgacc	60
atcacatgtc	gggttctca	gtccatcagc	agctggctgg	cttggtatca	gcagaagccc	120
ggcaaggccc	caaagctgct	gatctacaag	gcctcttcca	gcgagagcgg	cgtgccatcc	180
aggttttagcg	gctccggctc	cggcaccgag	tttaccctga	ccatctcttc	cctgcagccc	240
gatgactttg	ccacctacta	ctgtcagcag	tacaattcct	atctgacatt	cggcggcggc	300
accaaggttg	agatcaag					318

<210> 23

<211> 124

30 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полипептид»

35 <400> 23

Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5				10					15		
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
				20				25					30		
Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
				35				40					45		
Trp	Ile	Gly	Ser	Ile	Phe	Tyr	Ser	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
				50				55					60		
Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
65				70				75					80		
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85				90					95		

Cys Ala Arg Glu Asp Asp Phe Leu Thr Asp Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp
 100 105 110
 Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 24

<211> 106

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

10 <221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полипептид»

<400> 24

15 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

20 Tyr Lys Ala Ser Ser Ser Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

25 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 25

<211> 375

30 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид»

35 <400> 25

gaggtgcagc tgctggaatc cggaggagga ctggtccagc caggtggatc cctgcgactg 60
 agctgcgccg cttctggctt cgactttaga agctacgcaa tgatgtgggt ccgccaggca 120
 ccaggaaagg gactggagtg ggtgggaggg atcaacgggtg aagtcgggtg ctctaataca 180
 40 tactatgcac ctgccgtcaa gggaagggtc actattagtc gggacaactc aaaaaatacc 240
 ctgtatctgc aaatgaacag tctgagggcc gaggataccg ccgtgtacta ttgcgtgaaa 300
 ggtgctggcg catgcggcat ctgtaatgac gatattgatg catggggaca ggggaccctg 360
 gtgacagtct cgagt 375

<210> 26

45 <211> 330

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид»

<400> 26

5 agttatgagc tgactcagga cccagcagtg tcagtcgccc tgggccagac agtgagaatc 60
acttgcaagt gggctgggtc atatgcaggc tcctactatt acggatggca ccagcagaag 120
cccgacagc cacctgtgac agtcattctac gacaacgata aaaggccaag caatattccc 180
gaccggttct ctgggtccag ctctggtaac accgcctccc tgaccattac tggggcccag 240
gctgaggacg aagctgatta ttactgtggc tctacaaacg ataatgacga tggcgagctg 300
10 tttggctccg gaactaaggt caccgtccta 330

<210> 27

<211> 125

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

15 <220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полипептид»

<400> 27

20 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Arg Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
25 35 40 45
Gly Gly Ile Asn Gly Glu Val Gly Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60
Ala Val Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
30 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Lys Gly Ala Gly Ala Cys Gly Ile Cys Asn Asp Asp Ile
100 105 110
Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
35 115 120 125

<210> 28

<211> 110

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

40 <220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полипептид»

<400> 28

45 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr
20 25 30

Tyr Tyr Gly Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Thr Val
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Asn Asp Lys Arg Pro Ser Asn Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 5 Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln
 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Thr Asn Asp Asn Asp
 85 90 95
 Asp Gly Gly Leu Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 10 100 105 110
 <210> 29
 <211> 990
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 полинуклеотид»
 <400> 29
 20 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300
 25 aaatcttggtg acaaaaactca cacatgcca ccgtgcccag cacctgaagc cgccggggga 360
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 420
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaaagc gcggggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactgggt gaatggcaag 600
 30 gagtacaagt gcaaggctct caacaaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 720
 atgaccaaga accagggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 35 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa 990
 <210> 30
 <211> 330
 <212> Белок
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 полипептид»
 45 <400> 30
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

RU 2 755 503 C2

		20		25		30											
		Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35							40				45				
		Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
5		50					55						60				
		Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
		65					70					75				80	
		Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
					85						90				95		
10		Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
				100						105				110			
		Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
				115					120					125			
		Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
15		130					135						140				
		Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
		145					150					155				160	
		Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
					165						170				175		
20		Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
					180					185				190			
		His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
				195					200					205			
		Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
25		210					215						220				
		Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
		225					230					235				240	
		Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
					245						250				255		
30		Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
				260						265				270			
		Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				275					280					285			
		Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
35		290					295						300				
		Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
		305					310					315				320	
		Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
					325						330						
40		<210>	31														
		<211>	318														
		<212>	ДНК														
		<213>	Искусственная последовательность														
		<220>															
45		<221>	источник														
		<223>	/примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид»														
		<400>	31														

ggccagccca aggccaaccc cactgtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagctccaa 60
 gccacaagg ccacactagt gtgtctgata agtgacttct acccgggagc tgtgacagtg 120
 gcctggaagg cagatggcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccaa accctccaaa 180
 cagagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcccga gcagtggag 240
 5 tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
 gccctacag aatgttca 318
 <210> 32
 <211> 106
 <212> Белок
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 полипептид»
 15 <400> 32
 Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 20 25 30
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
 35 40 45
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 25 65 70 75 80
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105
 30 <210> 33
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 полинуклеотид»
 <400> 33
 cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 40 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaagggtg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321
 45 <210> 34
 <211> 107
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический полипептид»

5 <400> 34

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

10 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

15 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

20 <210> 35

<211> 8

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

25 <221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический пептид»

<400> 35

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr

30 1 5

<210> 36

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

35 <220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический пептид»

<400> 36

40 Ile Asn His Arg Gly Ser Thr

1 5

<210> 37

<211> 15

<212> Белок

45 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический

пептид»
 <400> 37
 Cys Thr Arg Gly Glu Glu Trp Glu Ser Leu Phe Phe Asp Tyr Trp
 1 5 10 15
 5 <210> 38
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид»
 <400> 38
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 15 1 5
 <210> 39
 <211> 3
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид»
 <400> 39
 25 Gly Ala Ser
 1
 <210> 40
 <211> 11
 <212> Белок
 30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид»
 35 <400> 40
 Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr Phe
 1 5 10
 <210> 41
 <211> 8
 40 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 45 пептид»
 <400> 41
 Gly Glu Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
 1 5

<210> 42
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический пептид»
 <400> 42
 10 Ile Asn His Ser Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 43
 <211> 18
 <212> Белок
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический пептид»
 20 <400> 43
 Cys Ala Arg Gly Trp Asp Leu Leu Asp Trp Asn Asp Tyr Trp Asn Glu
 1 5 10 15
 Tyr Trp
 <210> 44
 25 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 30 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический пептид»
 <400> 44
 Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5
 35 <210> 45
 <211> 3
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический пептид»
 <400> 45
 Asp Ala Ser
 45 1
 <210> 46
 <211> 15
 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 5 пептид»
 <400> 46
 Cys Ala Arg Gly Glu Asp Trp Gly Glu Ser Phe Phe Asp Tyr Trp
 1 5 10 15
 <210> 47
 10 <211> 3
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 15 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид»
 <400> 47
 Ala Ala Ser
 1
 20 <210> 48
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид»
 <400> 48
 Gly Tyr Ser Leu Thr Glu Ile Ser
 30 1 5
 <210> 49
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид»
 <400> 49
 40 Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr
 1 5
 <210> 50
 <211> 14
 <212> Белок
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический

пептид»
 <400> 50
 Cys Ala Thr Gly Gly Trp Gly Pro Asn Trp Phe Asp Pro Trp
 1 5 10
 5 <210> 51
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид»
 <400> 51
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 15 1 5
 <210> 52
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид»
 <400> 52
 25 Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr Phe
 1 5 10
 <210> 53
 <211> 9
 <212> Белок
 30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид»
 35 <400> 53
 Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala
 1 5
 <210> 54
 <211> 7
 40 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 45 пептид»
 <400> 54
 Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp
 1 5

<210> 55
 <211> 13
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический пептид»
 <400> 55
 10 Cys Ala Arg Asp Asp Asp Trp Asn Asp Phe Asp Tyr Trp
 1 5 10
 <210> 56
 <211> 10
 <212> Белок
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический пептид»
 20 <400> 56
 Gly Asp Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr
 1 5 10
 <210> 57
 <211> 7
 25 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический пептид»
 30 <400> 57
 Ile Phe Tyr Ser Gly Asn Thr
 1 5
 <210> 58
 35 <211> 18
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 40 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический пептид»
 <400> 58
 Cys Ala Arg Glu Asp Asp Phe Leu Thr Asp Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp
 1 5 10 15
 45 Ile Trp
 <210> 59
 <211> 6
 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 5 пептид»
 <400> 59
 Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 1 5
 <210> 60
 10 <211> 3
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 15 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид»
 <400> 60
 Lys Ala Ser
 1
 20 <210> 61
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид»
 <400> 61
 Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Leu Thr Phe
 30 1 5 10
 <210> 62
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид»
 <400> 62
 40 Gly Phe Asp Phe Arg Ser Tyr Ala
 1 5
 <210> 63
 <211> 10
 <212> Белок
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический

пептид»
 <400> 63
 Ile Asn Gly Glu Val Gly Gly Ser Asn Thr
 1 5 10
 5 <210> 64
 <211> 18
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид»
 <400> 64
 Cys Val Lys Gly Ala Gly Ala Cys Gly Ile Cys Asn Asp Asp Ile Asp
 15 1 5 10 15
 Ala Trp
 <210> 65
 <211> 7
 <212> Белок
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид»
 25 <400> 65
 Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr
 1 5
 <210> 66
 <211> 3
 30 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 35 пептид»
 <400> 66
 Asp Asn Asp
 1
 <210> 67
 40 <211> 13
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 45 <223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид»
 <400> 67
 Cys Gly Ser Thr Asn Asp Asn Asp Asp Gly Gly Leu Phe

1 5 10
 <210> 68
 <211> 525
 <212> Белок
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 68
 Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
 1 5 10 15
 Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
 10 20 25 30
 Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
 35 40 45
 Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
 50 55 60
 15 His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
 65 70 75 80
 Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
 85 90 95
 Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
 20 100 105 110
 Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
 115 120 125
 Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
 130 135 140
 25 Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
 145 150 155 160
 Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
 165 170 175
 Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
 30 180 185 190
 Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
 195 200 205
 Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
 210 215 220
 35 Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
 225 230 235 240
 Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
 245 250 255
 Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
 40 260 265 270
 Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val
 275 280 285
 Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 45 Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
 305 310 315 320
 Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His
 325 330 335

RU 2 755 503 C2

	Leu	Gln	Glu	Gln	Gln	Leu	Asn	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Ala	Ile	Ile	Thr
				340					345					350		
	Val	Thr	Pro	Lys	Ser	Phe	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Leu	Gly	Lys	Leu	Leu
				355				360					365			
5	Cys	Glu	Val	Thr	Pro	Val	Ser	Gly	Gln	Glu	Arg	Phe	Val	Trp	Ser	Ser
				370				375				380				
	Leu	Asp	Thr	Pro	Ser	Gln	Arg	Ser	Phe	Ser	Gly	Pro	Trp	Leu	Glu	Ala
	385					390					395					400
	Gln	Glu	Ala	Gln	Leu	Leu	Ser	Gln	Pro	Trp	Gln	Cys	Gln	Leu	Tyr	Gln
10					405					410					415	
	Gly	Glu	Arg	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Val	Tyr	Phe	Thr	Glu	Leu	Ser	Ser
				420					425					430		
	Pro	Gly	Ala	Gln	Arg	Ser	Gly	Arg	Ala	Pro	Gly	Ala	Leu	Pro	Ala	Gly
				435				440					445			
15	His	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Ile	Leu	Gly	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu
				450				455				460				
	Val	Thr	Gly	Ala	Phe	Gly	Phe	His	Leu	Trp	Arg	Arg	Gln	Trp	Arg	Pro
	465					470					475					480
	Arg	Arg	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Gln	Gly	Ile	His	Pro	Pro	Gln	Ala	Gln
20					485					490					495	
	Ser	Lys	Ile	Glu	Glu	Leu	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro
				500					505					510		
	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Gln	Leu			
				515				520					525			
25	<210>	69														
	<211>	533														
	<212>	Белок														
	<213>	Macaca fascicularis														
	<220>															
30	<221>	модифицированный остаток														
	<222>	(74) .. (74)														
	<223>	Любая аминокислота														
	<400>	69														
35	Met	Trp	Glu	Ala	Gln	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Leu	Gln	Pro	Leu	Trp
	1				5				10						15	
	Val	Ala	Pro	Val	Lys	Pro	Pro	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Ile	Ser	Val	Val
				20					25					30		
	Trp	Ala	Gln	Glu	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Pro	Cys	Ser	Pro	Thr	Ile
				35				40					45			
40	Pro	Leu	Gln	Asp	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Arg	Ala	Gly	Val	Thr	Trp	Gln
				50			55					60				
	His	Gln	Pro	Asp	Ser	Gly	Pro	Pro	Ala	Xaa	Ala	Pro	Gly	His	Pro	Pro
	65					70					75					80
	Val	Pro	Gly	His	Arg	Pro	Ala	Ala								

RU 2755 503 C2

	115		120		125												
	Arg	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu	Trp	Leu	Arg	Pro	Ala	Arg	Arg	Ala	Asp	Ala	
	130							135				140					
	Gly	Glu	Tyr	Arg	Ala	Thr	Val	His	Leu	Arg	Asp	Arg	Ala	Leu	Ser	Cys	
5	145					150					155					160	
	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Val	Gly	Gln	Ala	Ser	Met	Thr	Ala	Ser	Pro	Pro	
					165					170					175		
	Gly	Ser	Leu	Arg	Thr	Ser	Asp	Trp	Val	Ile	Leu	Asn	Cys	Ser	Phe	Ser	
				180					185					190			
10	Arg	Pro	Asp	Arg	Pro	Ala	Ser	Val	His	Trp	Phe	Arg	Ser	Arg	Gly	Gln	
	195							200					205				
	Gly	Arg	Val	Pro	Val	Gln	Gly	Ser	Pro	His	His	His	Leu	Ala	Glu	Ser	
	210					215						220					
	Phe	Leu	Phe	Leu	Pro	His	Val	Gly	Pro	Met	Asp	Ser	Gly	Leu	Trp	Gly	
15	225					230					235					240	
	Cys	Ile	Leu	Thr	Tyr	Arg	Asp	Gly	Phe	Asn	Val	Ser	Ile	Met	Tyr	Asn	
					245					250					255		
	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Ala	Thr	Pro	Leu	Thr	Val	Tyr	Ala	
				260					265					270			
20	Gly	Ala	Gly	Ser	Arg	Val	Glu	Leu	Pro	Cys	Arg	Leu	Pro	Pro	Ala	Val	
	275							280					285				
	Gly	Thr	Gln	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Lys	Trp	Ala	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	
	290					295						300					
	Pro	Asp	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	Asp	Asn	Gly	Asp	Phe	Thr	Leu	Arg	Leu	
25	305					310					315					320	
	Glu	Asp	Val	Ser	Gln	Ala	Gln	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ile	Cys	His	Ile	Arg	
					325					330					335		
	Leu	Gln	Gly	Gln	Gln	Leu	Asn	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Ala	Ile	Ile	Thr	
				340					345					350			
30	Val	Thr	Pro	Lys	Ser	Phe	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Leu	Gly	Lys	Leu	Leu	
	355							360					365				
	Cys	Glu	Val	Thr	Pro	Ala	Ser	Gly	Gln	Glu	His	Phe	Val	Trp	Ser	Pro	
	370						375					380					
	Leu	Asn	Thr	Pro	Ser	Gln	Arg	Ser	Phe	Ser	Gly	Pro	Trp	Leu	Glu	Ala	
35	385					390					395					400	
	Gln	Glu	Ala	Gln	Leu	Leu	Ser	Gln	Pro	Trp	Gln	Cys	Gln	Leu	His	Gln	
				405						410					415		
	Gly	Glu	Arg	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Val	Tyr	Phe	Thr	Glu	Leu	Ser	Ser	
				420					425					430			
40	Pro	Gly	Ala	Gln	Arg	Ser	Gly	Arg	Ala	Pro	Gly	Ala	Leu	Arg	Ala	Gly	
	435							440					445				
	His	Leu	Pro	Leu	Phe	Leu	Ile	Leu	Gly	Val	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	
	450						455					460					
	Val	Thr	Gly	Ala	Phe	Gly	Phe	His	Leu	Trp	Arg	Arg	Gln	Trp	Arg	Pro	
45	465					470					475					480	
	Arg	Arg	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Gln	Gly	Ile	His	Pro	Pro	Gln	Ala	Gln	
					485					490					495		
	Ser	Lys	Ile	Glu	Glu	Leu	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Leu	Glu	Pro	Glu	Pro	

RU 2755 503 C2

	500		505		510
	Glu Leu Glu Arg Glu Leu Gly Pro Glu Pro Glu Pro Gly Pro Glu Pro				
	515		520		525
	Glu Pro Glu Gln Leu				
5	530				
	<210> 70				
	<211> 525				
	<212> Белок				
	<213> Rattus norvegicus				
10	<400> 70				
	Met Arg Gln Asp Leu Phe Leu Asp Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Trp				
	1 5 10 15				
	Glu Ala Pro Val Val Ser Ser Gly Pro Gly Lys Glu Leu Ser Val Val				
	20 25 30				
15	Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Val His Leu Pro Cys Ser Leu Glu Phe				
	35 40 45				
	Pro His Leu Asp Pro Asn Phe Leu Arg Arg Gly Trp Val Thr Trp Gln				
	50 55 60				
	His Arg Pro Asp Ser Asp Gln Pro Ala Ser Ile Pro Ala Leu Asp Leu				
20	65 70 75 80				
	Leu Gln Gly Met Pro Ser Thr Arg Arg His Pro Pro His Arg Tyr Thr				
	85 90 95				
	Val Leu Ser Val Ala Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Gln Pro Leu				
	100 105 110				
25	Leu Ser His Val Gln Leu Glu Lys Arg Gly Pro Gln Arg Gly Asp Phe				
	115 120 125				
	Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Thr Arg Lys Asp Ala Gly Glu Tyr His				
	130 135 140				
	Ala Phe Val Arg Leu Pro Asp Arg Asp Phe Ser Cys Ser Leu Arg Leu				
30	145 150 155 160				
	Arg Val Gly Gln Ala Ser Met Ile Ala Ser Pro Pro Gly Thr Leu Lys				
	165 170 175				
	Pro Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg				
	180 185 190				
35	Pro Val Ser Val His Trp Phe Gln Gly Gln Ser Arg Val Pro Val His				
	195 200 205				
	Asn Ser Pro Arg His Tyr Leu Ala Glu Ser Phe Leu Leu Leu Pro Gln				
	210 215 220				
	Val Ser Pro Leu Asp Ser Gly Thr Trp Gly Cys Val Leu Thr Tyr Arg				
40	225 230 235 240				
	Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Thr Tyr Asn Leu Lys Val Gln Gly Leu				
	245 250 255				
	Glu Pro Val Ala Pro Leu Thr Val Tyr Ala Ala Glu Gly Ser Arg Val				
	260 265 270				
45	Glu Leu Pro Cys His Leu Pro Pro Val Val Gly Thr Pro Ser Leu Leu				
	275 280 285				
	Ile Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly Pro Glu Leu Pro Val Thr				
	290 295 300				

RU 2755 503 C2

Gly Lys Ser Gly Asn Phe Thr Leu Gln Leu Glu Asn Val Gly Arg Ala
305 310 315 320
Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys Ser Ile His Leu Gln Gly Arg Gln Leu
325 330 335
5 Ser Ala Ala Val Thr Leu Ala Val Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe
340 345 350
Gly Leu Pro Gly Ser Pro Gln Lys Leu Leu Cys Glu Val Val Pro Ala
355 360 365
10 Ser Gly Glu Gly Arg Phe Val Trp Arg Pro Leu Ser Asp Leu Ser Arg
370 375 380
Ser Ser Leu Gly Pro Val Leu Glu Leu Gln Glu Ala Lys Leu Leu Ala
385 390 395 400
Glu Gln Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Glu Gly Gln Lys Leu Leu Gly Ala
405 410 415
15 Thr Val Tyr Thr Ala Glu Ser Ser Ser Gly Ala Trp Ser Ala Lys Arg
420 425 430
Ile Ser Gly Asp Leu Lys Gly Gly His Leu Phe Leu Ser Leu Ile Leu
435 440 445
Gly Ala Leu Ala Leu Phe Leu Leu Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His
20 450 455 460
Leu Trp Arg Arg Gln Leu Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu His
465 470 475 480
Gly Ile Arg Pro Pro Pro Val Gln Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Arg
485 490 495
25 Glu Pro Glu Thr Glu Met Glu Pro Glu Thr Glu Pro Asp Pro Glu Pro
500 505 510
Gln Pro Glu Pro Glu Leu Glu Pro Glu Ser Arg Gln Leu
515 520 525
<210> 71
30 <211> 476
<212> Белок
<213> Canis familiaris
<400> 71
Met Trp Glu Val Gln Phe Leu Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Trp
35 1 5 10 15
Val Ala Pro Val Ala Ala Pro Gly Ser Gly Thr Glu Val Gln Val Val
20 25 30
Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Val Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
35 40 45
40 Pro Leu Gln Asp Val Ser Leu Leu Arg Asn Ala Gly Val Thr Trp Tyr
50 55 60
His Leu Pro Glu Ser Gly Pro Ala Ala Pro Ala Leu Ser Leu Arg Pro
65 70 75 80
Ala Ala Pro Ser Ala Arg Gly Pro Gly Pro Arg Ser Tyr Val Val Leu
45 85 90 95
Met Arg Ala Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Leu Val Pro Thr Val Asn
100 105 110
Ala Leu Ala Leu Asn Ser Pro Gly Pro Thr Arg Phe Ser Leu Ala Leu

RU 2 755 503 C2

	115		120		125												
	Gln	Thr	Val	Ile	Ser	Leu	Pro	His	Ser	Trp	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	
	130						135					140					
	Ser	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Leu	Ala	Ser	Cys	Trp	Pro	Ser	Pro	His	Val	
5	145					150					155					160	
	Gly	Val	Gly	Cys	Val	Cys	Glu	His	Pro	Pro	Phe	Ile	His	Leu	Thr	Leu	
					165					170					175		
	Leu	Pro	Ala	Arg	Gln	Ser	Pro	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Pro	Ser	Leu	Gln	
				180					185					190			
10	Pro	Gln	Cys	Ser	Ala	Ser	Leu	Tyr	Leu	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Thr	Leu	
	195						200					205					
	Ala	Ser	Ser	Phe	Pro	Gly	Leu	Glu	Pro	Ser	Gly	Pro	Leu	Thr	Val	Tyr	
	210					215					220						
	Thr	Gly	Ala	Gly	Ser	Arg	Val	Gly	Leu	Pro	Cys	Arg	Leu	Pro	Pro	Gly	
15	225					230					235					240	
	Val	Gly	Thr	Gln	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Lys	Trp	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	
				245					250					255			
	Gly	Pro	Asp	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	Asp	Asp	Gly	Asn	Phe	Thr	Leu	Gln	
			260				265				270						
20	Leu	Glu	Val	Val	Asn	Gln	Ala	Gln	Ala	Gly	Thr	Tyr	Thr	Cys	His	Ile	
	275					280					285						
	His	Leu	Gln	Gly	Gln	Gln	Leu	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Leu	Ala	Val	Ile	
	290					295					300						
	Thr	Val	Thr	Pro	Lys	Ser	Ser	Gly	Leu	Pro	Gly	Asn	Leu	Arg	Lys	Leu	
25	305					310					315					320	
	Leu	Cys	Glu	Val	Thr	Pro	Ala	Ser	Gly	Gln	Glu	Arg	Phe	Val	Trp	Ser	
				325					330					335			
	Pro	Leu	Asp	Lys	Gln	Ser	Trp	Arg	Gly	Ser	Pro	Gly	Pro	Cys	Leu	Glu	
			340				345				350						
30	Met	Gln	Glu	Thr	Arg	Leu	Leu	Ser	Gln	Pro	Trp	Gln	Cys	His	Val	Tyr	
	355					360					365						
	Gln	Ala	Glu	Arg	Leu	Leu	Gly	Thr	Ala	Val	Tyr	Leu	Ile	Asp	Pro	Ala	
	370					375					380						
	Gly	Pro	Gly	Ala	Gln	Arg	Ser	Gly	Arg	Ala	Gln	Gly	Val	Leu	Lys	Thr	
35	385					390					395					400	
	Gly	His	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Gly	Ile	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	
				405					410				415				
	Leu	Met	Thr	Gly	Ala	Phe	Gly	Phe	Gln	Leu	Trp	Arg	Arg	Gln	Trp	Arg	
			420				425				430						
40	Pro	Arg	Arg	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Leu	Gly	Thr	His	Pro	Pro	Gln	Ala	
	435					440					445						
	Gln	Ser	Lys	Ile	Gly	Glu	Leu	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Leu	Glu	Leu	Glu	
	450					455					460						
	Pro	Glu	Pro	Glu	Leu	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu					
45	465					470					475						
	<210>	72															
	<211>	521															
	<212>	Белок															

<213> Mus musculus

<400> 72

```

Met Arg Glu Asp Leu Leu Leu Gly Phe Leu Leu Leu Gly Leu Leu Trp
1           5           10           15
5  Glu Ala Pro Val Val Ser Ser Gly Pro Gly Lys Glu Leu Pro Val Val
    20           25           30
    Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Val His Leu Pro Cys Ser Leu Lys Ser
    35           40           45
    Pro Asn Leu Asp Pro Asn Phe Leu Arg Arg Gly Gly Val Ile Trp Gln
10      50           55           60
    His Gln Pro Asp Ser Gly Gln Pro Thr Pro Ile Pro Ala Leu Asp Leu
    65           70           75           80
    His Gln Gly Met Pro Ser Pro Arg Gln Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Thr
    85           90           95
15  Val Leu Ser Val Ala Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Gln Pro Leu
    100          105          110
    His Pro His Val Gln Leu Glu Glu Arg Gly Leu Gln Arg Gly Asp Phe
    115          120          125
    Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Leu Arg Thr Asp Ala Gly Glu Tyr His
20      130          135          140
    Ala Thr Val Arg Leu Pro Asn Arg Ala Leu Ser Cys Ser Leu Arg Leu
    145          150          155          160
    Arg Val Gly Gln Ala Ser Met Ile Ala Ser Pro Ser Gly Val Leu Lys
    165          170          175
25  Leu Ser Asp Trp Val Leu Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg
    180          185          190
    Pro Val Ser Val His Trp Phe Gln Gly Gln Asn Arg Val Pro Val Tyr
    195          200          205
    Asn Ser Pro Arg His Phe Leu Ala Glu Thr Phe Leu Leu Leu Pro Gln
30      210          215          220
    Val Ser Pro Leu Asp Ser Gly Thr Trp Gly Cys Val Leu Thr Tyr Arg
    225          230          235          240
    Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Thr Tyr Asn Leu Lys Val Leu Gly Leu
    245          250          255
35  Glu Pro Val Ala Pro Leu Thr Val Tyr Ala Ala Glu Gly Ser Arg Val
    260          265          270
    Glu Leu Pro Cys His Leu Pro Pro Gly Val Gly Thr Pro Ser Leu Leu
    275          280          285
    Ile Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly Pro Glu Leu Pro Val Ala
40      290          295          300
    Gly Lys Ser Gly Asn Phe Thr Leu His Leu Glu Ala Val Gly Leu Ala
    305          310          315          320
    Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys Ser Ile His Leu Gln Gly Gln Gln Leu
    325          330          335
45  Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Val Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe
    340          345          350
    Gly Leu Pro Gly Ser Arg Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Ala
    355          360          365

```

Ser Gly Lys Glu Arg Phe Val Trp Arg Pro Leu Asn Asn Leu Ser Arg
370 375 380
Ser Cys Pro Gly Pro Val Leu Glu Ile Gln Glu Ala Arg Leu Leu Ala
385 390 395 400
5 Glu Arg Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Glu Gly Gln Arg Leu Leu Gly Ala
405 410 415
Thr Val Tyr Ala Ala Glu Ser Ser Ser Gly Ala His Ser Ala Arg Arg
420 425 430
Ile Ser Gly Asp Leu Lys Gly Gly His Leu Val Leu Val Leu Ile Leu
10 435 440 445
Gly Ala Leu Ser Leu Phe Leu Leu Val Ala Gly Ala Phe Gly Phe His
450 455 460
Trp Trp Arg Lys Gln Leu Leu Leu Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu His
465 470 475 480
15 Gly Ile Gln Pro Phe Pro Ala Gln Arg Lys Ile Glu Glu Leu Glu Arg
485 490 495
Glu Leu Glu Thr Glu Met Gly Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
500 505 510
Gln Leu Glu Pro Glu Pro Arg Gln Leu
20 515 520
<210> 73
<211> 6
<212> Белок
<213> Неизвестно
25 <220>
<221> источник
<223> /примечание=«описание неизвестного: мотив LAG-3»
<400> 73
Lys Ile Glu Glu Leu Glu
30 1 5
<210> 74
<211> 15
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
35 <220>
<221> источник
<223> /примечание=«описание искусственной последовательности: синтетический
пептид»
<400> 74
40 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

(57) Формула изобретения

1. Анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающая часть, которое специфически
45 связывается с LAG-3,

где указанное антитело содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3
и L-CDR1-3:

а) SEQ ID NO:41, 42, 43, 44, 45 и 40 соответственно;

- b) SEQ ID NO:35, 36, 37, 38, 39 и 40 соответственно;
- c) SEQ ID NO:35, 42, 46, 44, 47 и 40 соответственно;
- d) SEQ ID NO:48, 49, 50, 51, 47 и 52 соответственно;
- e) SEQ ID NO:53, 54, 55, 44, 45 и 40 соответственно;
- 5 f) SEQ ID NO:56, 57, 58, 59, 60 и 61 соответственно; или
- g) SEQ ID NO:62, 63, 64, 65, 66 и 67 соответственно.

2. Анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи с аминокислотными последовательностями:

- 10 a) SEQ ID NO:7 и 8 соответственно;
- b) SEQ ID NO:3 и 4 соответственно;
- c) SEQ ID NO:11 и 12 соответственно;
- d) SEQ ID NO:15 и 16 соответственно;
- e) SEQ ID NO:19 и 20 соответственно;
- 15 f) SEQ ID NO:23 и 24 соответственно; или
- g) SEQ ID NO:27 и 28 соответственно.

3. Анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1 или 2, где антитело или его антигенсвязывающая часть имеет по меньшей мере одно свойство, выбранное из:

20 a) снижает связывание с LAG-3 человека с МНС класса II человека на клетках A375 более чем на 85%, как определено конкурентным анализом на основе проточной цитометрии;

b) снижает связывание LAG-3 человека с МНС класса II человека на клетках A375 до 35-85%, как определено конкурентным анализом на основе проточной цитометрии;

25 c) блокирует связывание между LAG-3 человека, экспрессируемым на клетках Jurkat, и МНС класса II человека, экспрессируемым на клетках Raji;

d) связывается с LAG-3 человека с EC_{50} , равной 0,1 нМ или меньше, как измерено проточной цитометрией;

30 e) связывается с LAG-3 яванского макака с EC_{50} , равной 0,3 нМ или меньше, как измерено проточной цитометрией;

f) связывается с LAG-3 человека с K_D , равной $3,0 \times 10^{-8}$ М или меньше, как измерено поверхностным плазмонным резонансом;

35 g) связывается с LAG-3 яванского макака с K_D , равной $1,5 \times 10^{-7}$ М или меньше, как измерено поверхностным плазмонным резонансом;

h) связывается с LAG-3 мыши с K_D , равной $3,5 \times 10^{-8}$ М или меньше, как измерено поверхностным плазмонным резонансом;

40 i) стимулирует продукцию IL-2 в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC), обработанных стафилококковым энтеротоксином В (SEB);

j) снижает клеточные уровни LAG-3 в Т-клетках человека;

k) снижает растворимые уровни LAG-3 в культуре Т-клеток человека;

l) индуцирует регрессию опухолевого роста in vivo;

m) задерживает опухолевый рост in vivo; и

45 n) не связывается с тем же эпитопом LAG-3 человека, что и антитело 25F7-Lag3.5.

4. Анти-LAG-3 антитело или антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-3, которое связывается с эпитопом LAG-3 человека, имеющим:

- a) аминокислотные остатки H85, P86, A87, P89, S91, W92 и G93 SEQ ID NO:68;

б) аминокислотные остатки A40, Q41, P43, P46, P49, D52, T62, Q64, H65, Q66, P67, D68, G93, P94, P96, R98, Y99, T100, V101, P106, G107, R119, E124, R129, G130, D131, S133, R137, P138, D143, R148 и R163 SEQ ID NO: 68;

5 с) аминокислотные остатки A40, Q41, P43, P46, P49, D52, T62, Q64, H65, Q66, P67, D68, P96, Y99, T100, V101, P106, G107, R119, E124, R129, G130, D131, S133, R137, P138, D143, R148 и R163 SEQ ID NO: 68;

д) аминокислотные остатки G107, L109, R110 и S111 SEQ ID NO:68;

е) аминокислотные остатки 98-105 SEQ ID NO:68;

ф) аминокислотные остатки 78-105 и 123-131 SEQ ID NO:68;

10 г) аминокислотные остатки 23-30, 40-66, 88-105, 123-137 и 148-152 SEQ ID NO:68; или

х) аминокислотные остатки 23-30, 40-66, 98-105, 118-137 и 148-161 SEQ ID NO:68.

5. Анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-4, где:

а) антитело относится к подклассу IgG₁ изотипа IgG и содержит мутацию в одном или обоих аминокислотных положениях тяжелой цепи 234 и 235, где один или оба аминокислотных остатка в положениях 234 и 235 мутированы из Leu в Ala, или

б) антитело относится к подклассу IgG₄ изотипа IgG, где аминокислотный остаток в положении 228 мутирован из Ser в Pro;

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT[®].

6. Антитело, которое специфически связывается с LAG-3, где указанное антитело содержит:

а) HC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:7 и 30 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:8 и 34;

б) HC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:3 и 30 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:4 и 34;

с) HC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:11 и 30 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:12 и 34;

д) HC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:15 и 30 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:16 и 34;

е) HC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:19 и 30 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:20 и 34;

ф) HC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:23 и 30 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:24 и 34; или

г) HC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:27 и 30 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:28 и 32.

7. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественной опухоли, содержащая эффективное количество анти-LAG-3 антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

8. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты для использования в получении анти-LAG-3 антитела или его антигенсвязывающей части, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или обе цепи, анти-LAG-3 антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-6.

9. Вектор экспрессии, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.8, где указанный вектор дополнительно содержит последовательность,

контролирующую экспрессию.

10. Клетка-хозяин для получения анти-LAG-3 антитела или его антигенсвязывающей части, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, и нуклеотидную последовательность, которая
5 кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, анти-LAG-3 антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-6.

11. Способ получения анти-LAG-3 антитела или его антигенсвязывающей части, предусматривающий наличие клетки-хозяина по п.10, культивирование указанной
10 клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела или части, и выделение полученного антитела или части.

12. Способ лечения пациента со связанным с LAG-3 нарушением, включающий введение указанному больному анти-LAG-3 антитела или антигенсвязывающей части по любому из пп.1-6 или фармацевтической композиции по п.7.

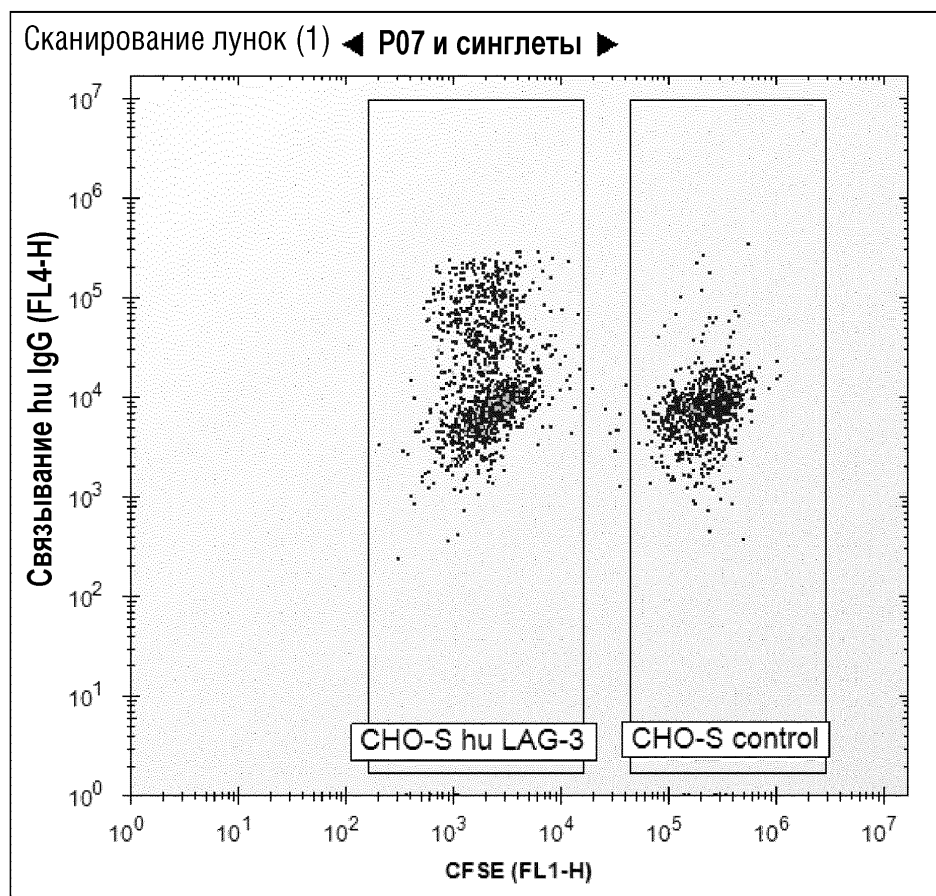
13. Способ лечения злокачественной опухоли у пациента, включающий введение
15 указанному больному анти-LAG-3 антитела или антигенсвязывающей части по любому из пп.1-6 или фармацевтической композиции по п.7.

14. Способ по п.13, где злокачественная опухоль представляет собой фибросаркому, немелкоклеточный рак легких, меланому, глиобластому, глиосаркому или рак толстой
кишки.

15. Способ усиления иммунитета у пациента, включающий введение указанному
20 пациенту анти-LAG-3 антитела или антигенсвязывающей части по любому из пп.1-6 или фармацевтической композиции по п.7.

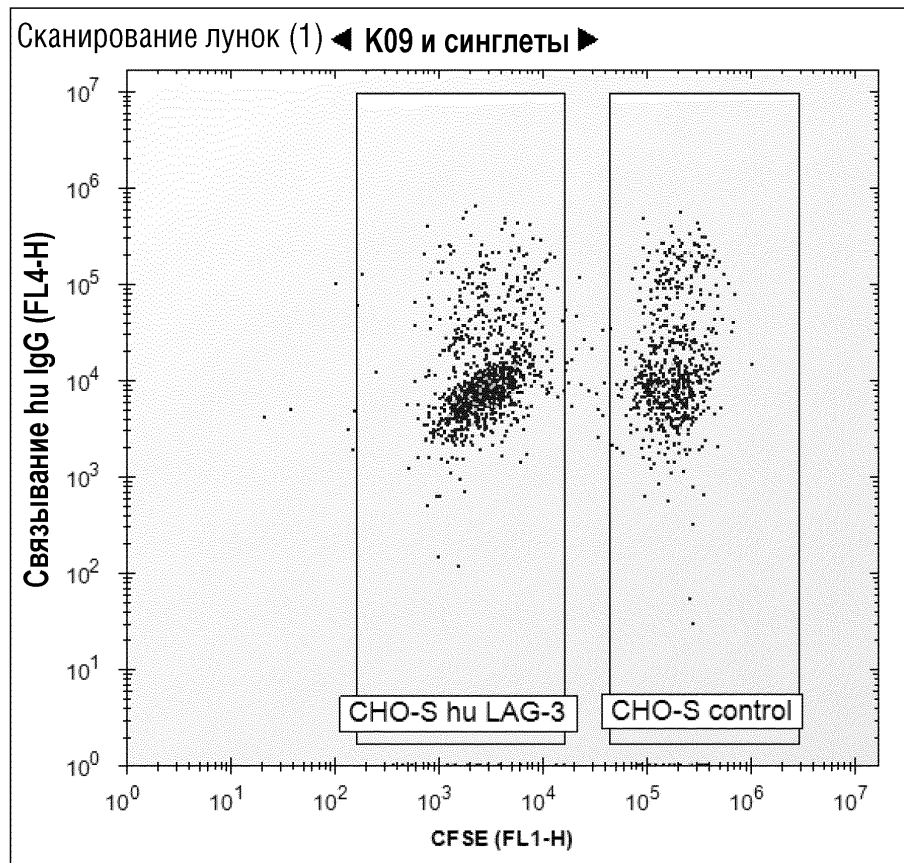
1/11

ФИГ.1А



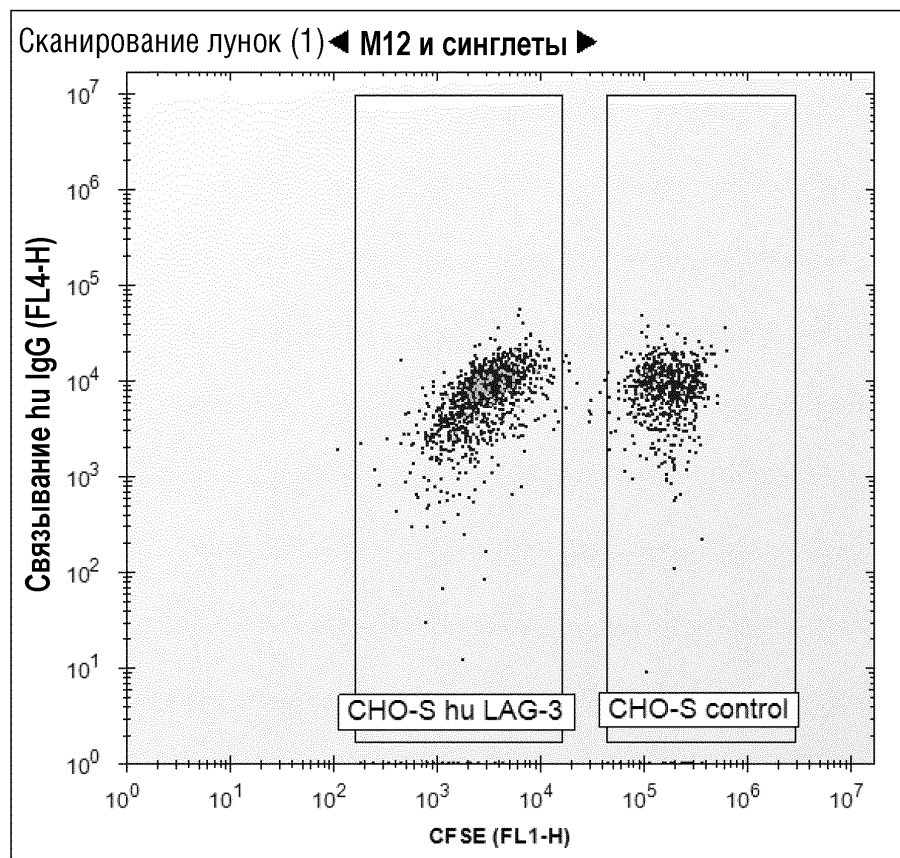
2/11

ФИГ.1В

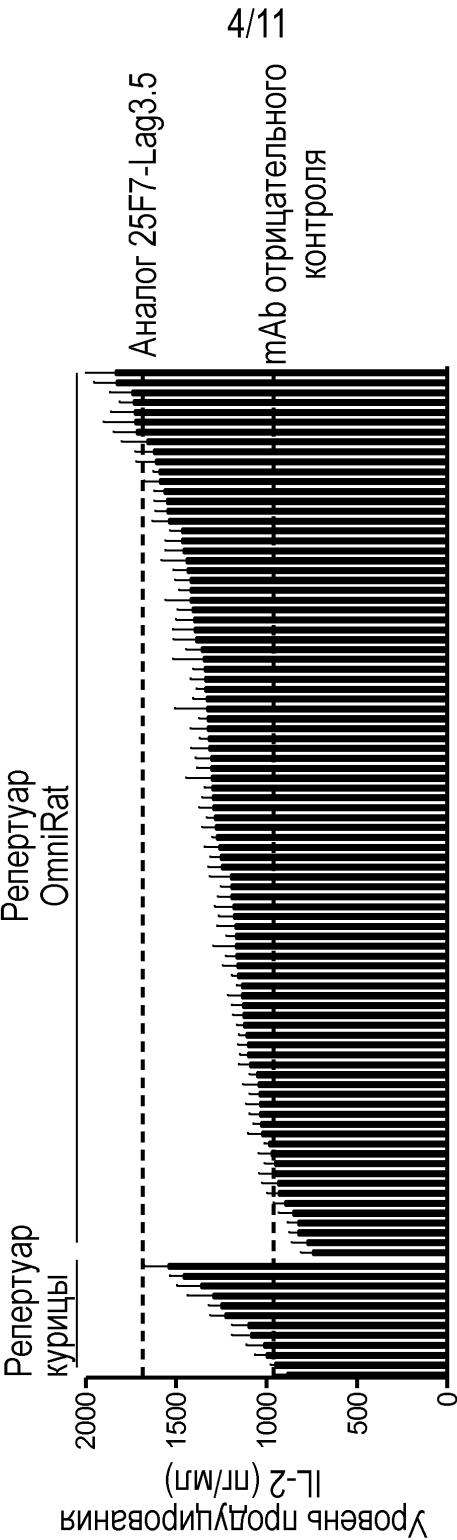


3/11

ФИГ.1С

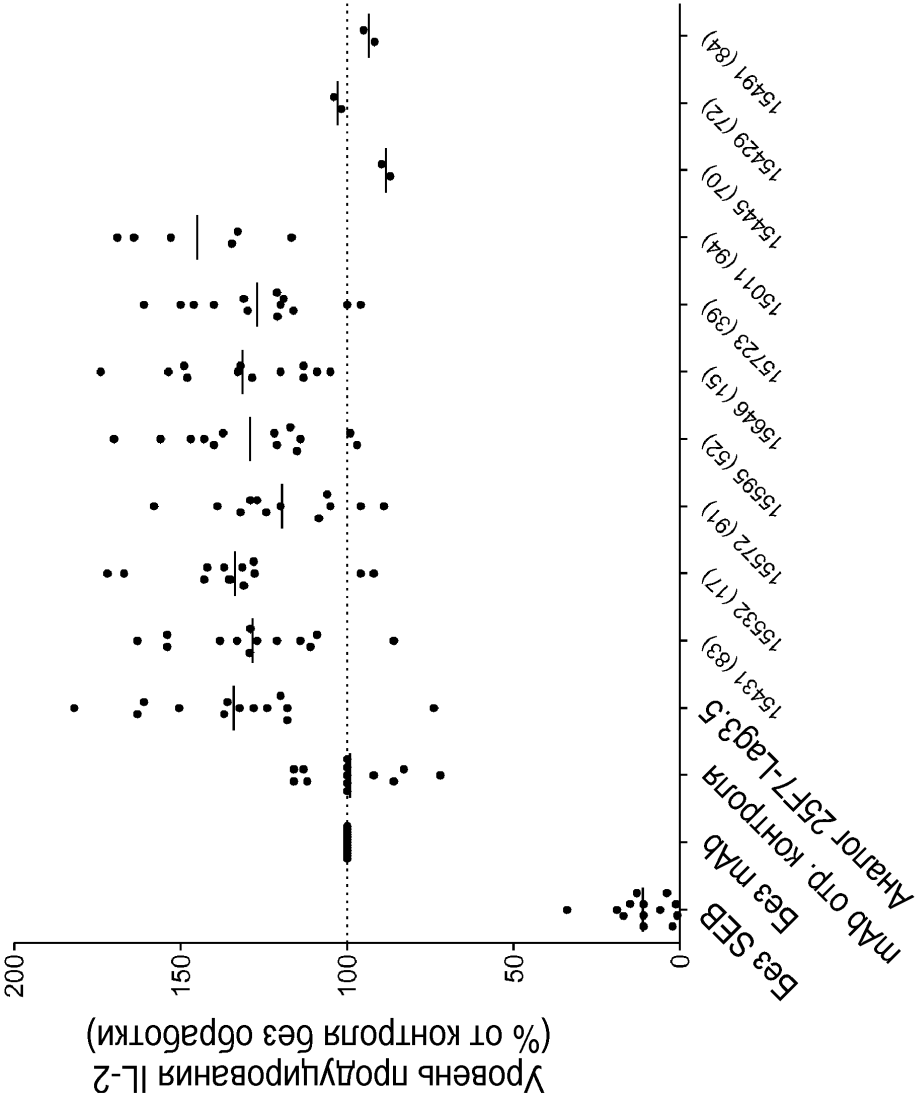


ФИГ.2



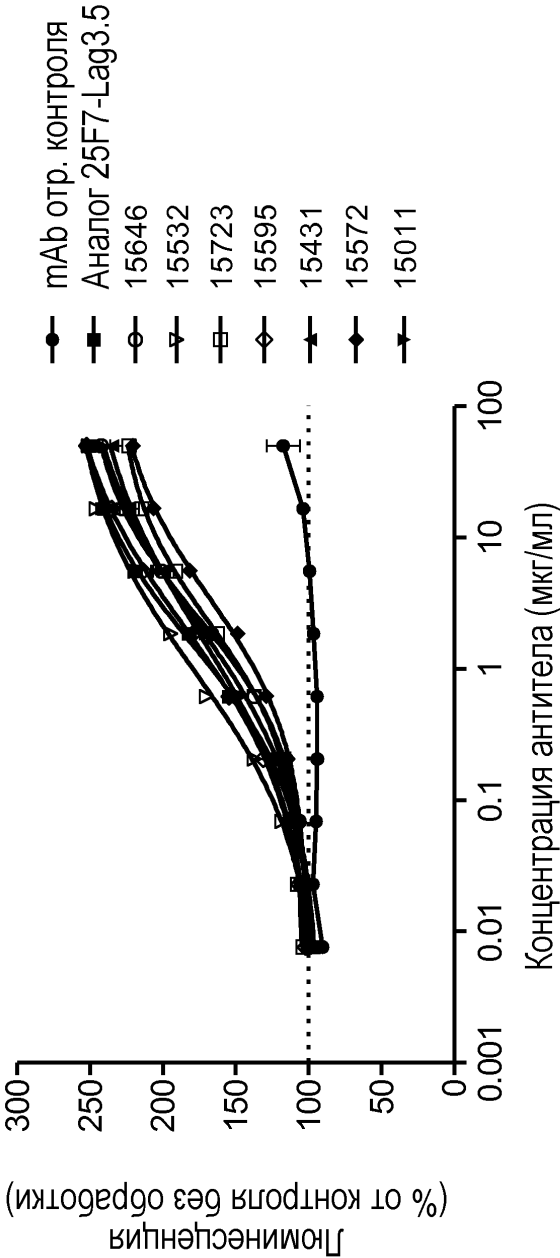
5/11

ФИГ.3

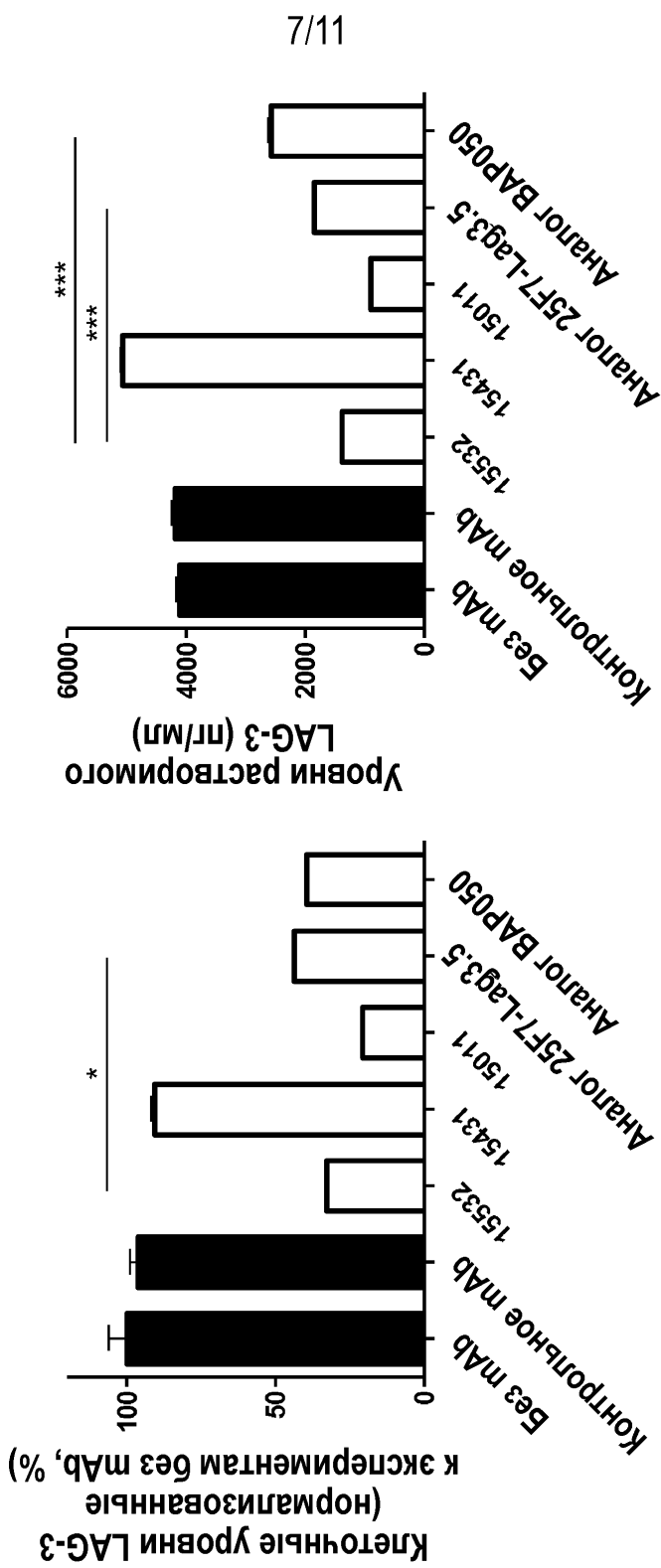


6/11

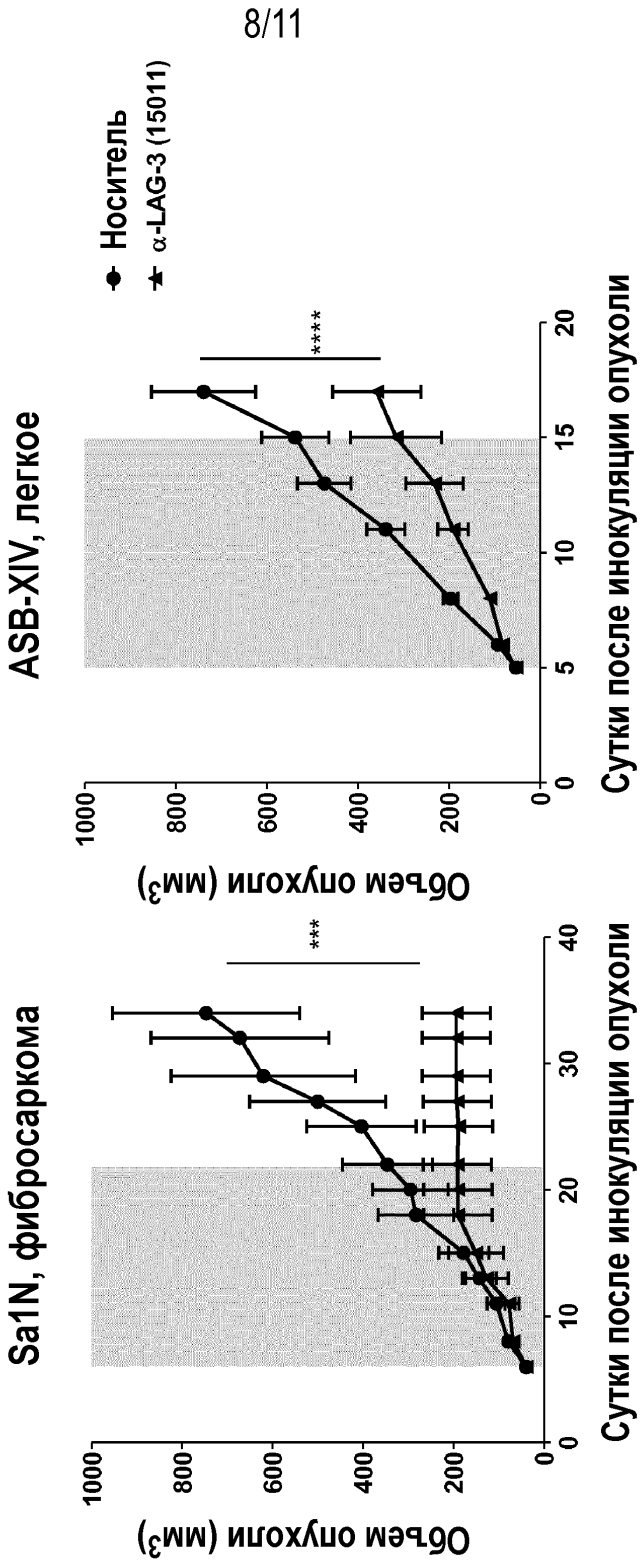
ФИГ.4



ФИГ.5

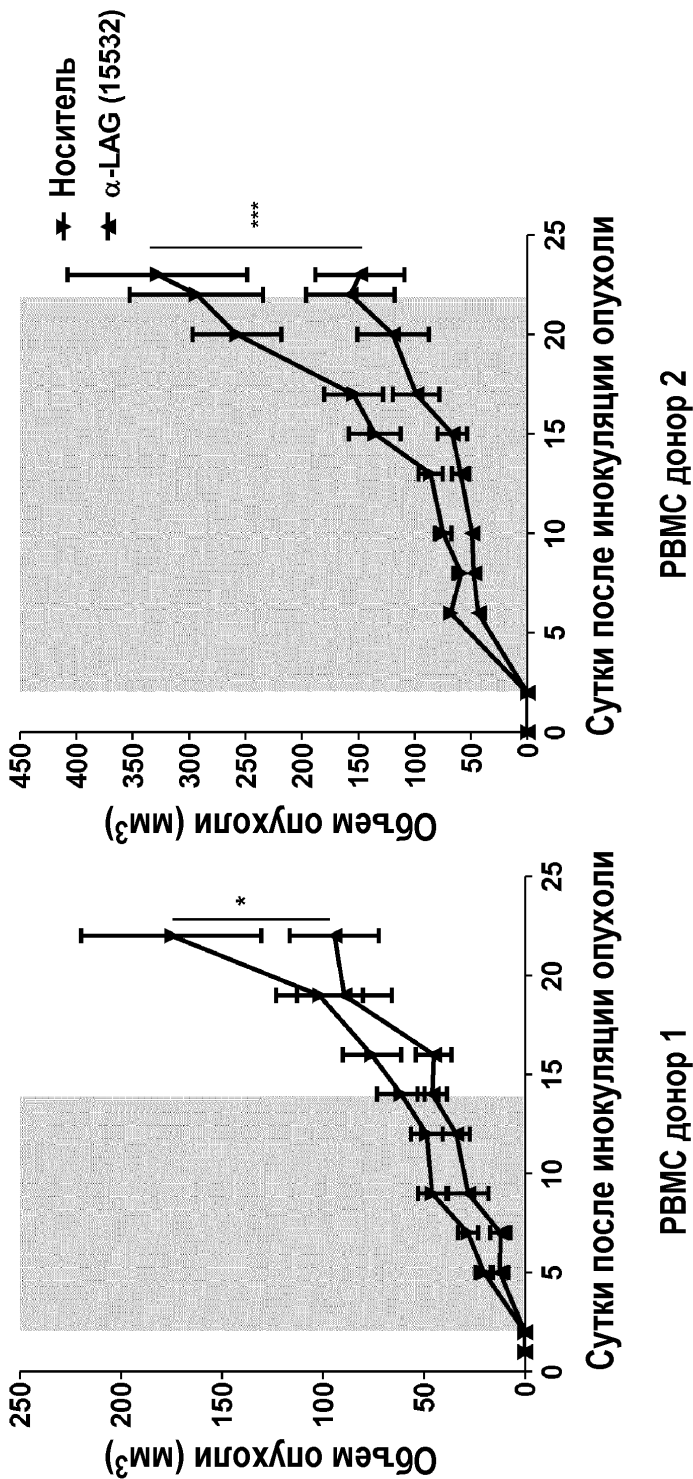


ФИГ.6

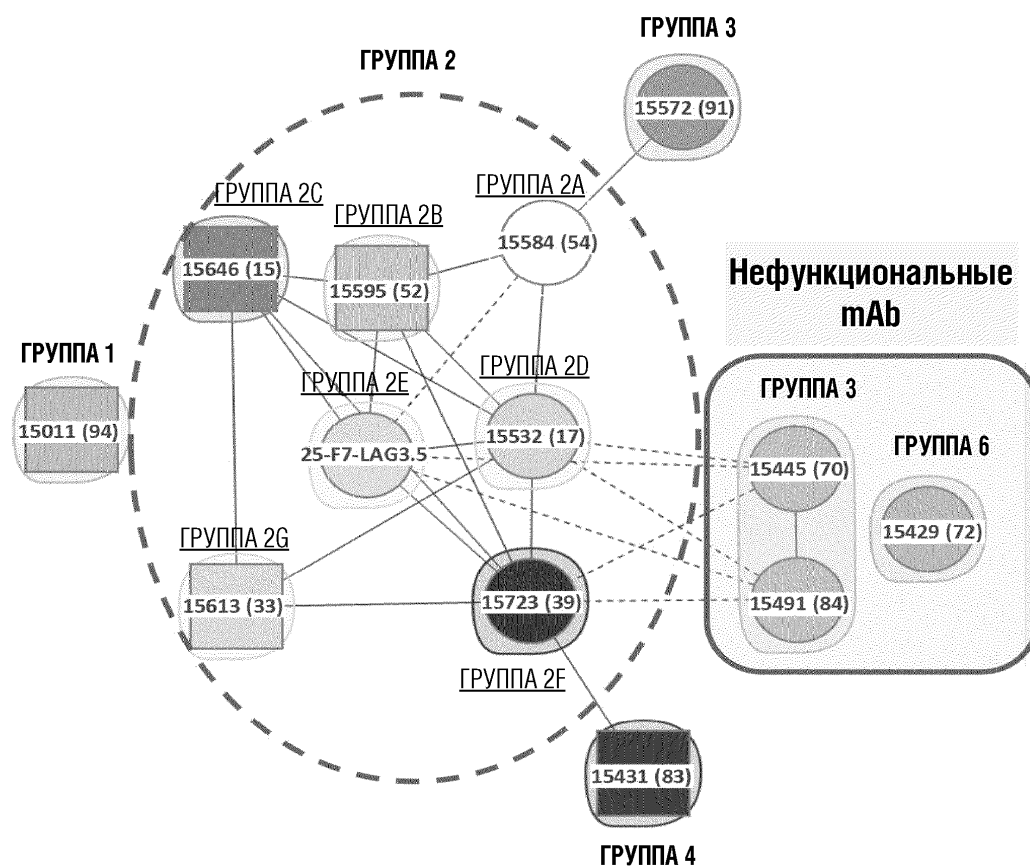


9/11

ФИГ.7
Ксенотрансплантат А375 меланомы человека



ФИГ.8



11/11

ФИГ.9

