



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128387** (13) **C2**
(51) МПК (2024.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: a 2019 10595</p> <p>(22) Дата подання заявки: 03.04.2018</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 04.07.2024</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 17164917.1</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 05.04.2017</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.03.2020, Бюл.№ 6</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 03.07.2024, Бюл.№ 27</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/EP2018/058385, 03.04.2018</p>	<p>(72) Винахідник(и): Кодаррі Деак Лаура (CH), Денгль Штефан (DE), Фішер Єнс (DE), Кляйн Крістіан (CH), Зебер Штефан (DE), Вебер Патрік Александер Аарон (CH), Цвік Адріан (DE)</p> <p>(73) Володілець (володільці): Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland (CH)</p> <p>(74) Представник: Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2010019570 A2, 18.02.2010 WO 2014008218 A1, 09.01.2014 WO 2015138920 A1, 17.09.2015 WO 2015164665 A1, 29.10.2015 WO 2016210129 A1, 29.12.2016 WO 2016079050 A1, 26.05.2016 Second- and third-generation drugs for immuno-oncology treatment-The more the better? / W.C.M. Dempke, K. Fenchel, P. Uciechowski et al. European journal of cancer. 2017. Vol. 74. P. 55-72</p>
---	--

(54) АНТИТИЛО ДО LAG3

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіла до LAG3, а також способу його одержання та застосування.

UA 128387 C2

Галузь техніки, до якої належить винахід

Даний винахід стосується антитіл до LAG3, способів одержання зазначених молекул і способів їх застосування.

Передумови створення винаходу

5 Ген активації лімфоцитів 3 (LAG3 або CD223) спочатку був відкритий в експерименті, запланованому для вибіркового виділення молекул, які експресуються в IL-2-залежній лінії NK-клітин (Triebel F. і ін., Cancer Lett. 235, 2006, стор. 147–153). LAG-3 являє собою унікальний трансмембранний білок, структурно гомологічний CD4 з чотирма позаклітинними доменами, подібними доменам надсімейства імуноглобулінів (D1-D4). Дистальний відносно мембрани домен IgG містить коротку амінокислотну послідовність, так названу додаткову петлю, яка не виявлена у інших білків надсімейства IgG. Внутрішньоклітинний домен містить унікальну амінокислотну послідовність (KIEELE), яка потрібна для того, щоби LAG-3 здійснював негативний вплив на Т-клітинну функцію. LAG-3 може розщеплюватися металопротеазами в сироватці. Подібно CD4 білок LAG3 зв'язується з молекулами ГКГС класу II, але з більш високою афінністю і в сайті, відмінному від сайту зв'язування CD4 (Huard і ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1997, стор. 5744-5749). LAG3 експресується Т-клітинами, В-клітинами, NK-клітинами і плазмацитоїдними дендритними клітинами (pDC) і піддається підвищувальній регуляції після активації Т-клітин. Він модулює Т-клітинну функцію, а також гомеостаз Т-клітин. Субпопуляції звичайних Т-клітин, які є анергічними або мають порушені функції, експресують LAG3. Збагачення LAG3+Т-клітинами має місце в областях пухлин і при хронічних вірусних інфекціях (Sierro і ін., Expert Opin. Ther. Targets 15, 2011, стор. 91-101). Було продемонстровано, що LAG3 приймає участь у виснаженні CD8 Т-клітин (Blackburn і ін., Nature Immunol. 10, 2009, стор. 29-37). Таким чином, існує необхідність в антитілах, які чинять антагоністичну дію щодо активності LAG3 та які можна застосовувати для викликання і відновлення імунних відповідей на пухлини.

Моноклональні антитіла до LAG3 описані, наприклад, в WO 2004/078928, в якій заявлені композиція, що містить антитіла, що специфічно зв'язуються з CD223, і протиракова вакцина. В WO 2010/019570 описані людські антитіла, які зв'язуються з LAG3, наприклад, антитіла 25F7 і 26H10. В US 2011/070238 представлено цитотоксичне антитіло до LAG3, яке можна застосовувати для лікування або попередження відторгнення трансплантата органу і аутоімунного захворювання. В WO 2014/008218 описані антитіла до LAG3, що мають оптимізовані функціональні властивості (а саме, зменшену кількість сайтів дезамідування) у порівнянні з антитілом 25F7. Крім того, антитіла до LAG3 описані в WO 2015/138920 (наприклад, BAP050), WO 2014/140180, WO 2015/116539, WO 2016/028672, WO 2016/126858, WO 2016/200782 і WO 2017/015560.

Стислий виклад суті винаходу

У винаході запропоновані антитіла до LAG3 і способи їх застосування.

У винаході запропоновано виділене антитіло, яке зв'язується з людським LAG3, де антитіло містить

40 А) (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2; (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3; (г) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (д) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5; і (е) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6; або

45 Б) (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10; (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11; (г) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12; (д) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13; і (е) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14; або

50 В) (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18; (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19; (г) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20; (д) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21; і (е) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22; або

55 Г) (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:25; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:26; (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:27; (г) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:28; (д) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:29; і (е) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30; або

60

Д) (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34; (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35; (г) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36; (д) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37; і (е) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38.

У винаході запропоновано також виділене антитіло, яке зв'язується з людським LAG3, де антитіло містить

А) (а) VH-домен, який містить (I) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1, (II) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2, і (III) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:3; і (б) VL-домен, який містить (I) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (II) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5 і (III) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6; або

Б) (а) VH-домен, який містить (I) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9, (II) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10, і (III) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:11; і (б) VL-домен, який містить (I) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12; (II) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13 і (III) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14; або

В) (а) VH-домен, який містить (I) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (II) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18, і (III) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:11; і (б) VL-домен, який містить (I) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20; (II) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21 і (III) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22; або

Г) (а) VH-домен, який містить (I) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:25, (II) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:26, і (III) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:27; і (б) VL-домен, який містить (I) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:28; (II) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:29 і (III) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30; або

Д) (а) VH-домен, який містить (I) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33, (II) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34, і (III) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:35; і (б) VL-домен, який містить (I) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36; (II) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37 і (III) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38.

У винаході запропоновано також виділене антитіло, яке зв'язується з людським LAG3, де антитіло

- I) містить VH-послідовність SEQ ID NO:7 і VL-послідовність SEQ ID NO:8;
- II) містить VH-послідовність SEQ ID NO:15 і VL-послідовність SEQ ID NO:16;
- III) містить VH-послідовність SEQ ID NO:23 і VL-послідовність SEQ ID NO:24;
- IV) містить VH-послідовність SEQ ID NO:31 і VL-послідовність SEQ ID NO:32; або
- V) містить VH-послідовність SEQ ID NO:39 і VL-послідовність SEQ ID NO:40.

У винаході запропоновано також виділене антитіло, яке зв'язується з людським LAG3, де антитіло:

I) конкурує за зв'язування з LAG3 з антитілом до LAG3, яке містить VH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:7, і VL, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, і/або

II) зв'язується з LAG3 людини і мавп ціномолгус; і/або

III) інгібує зв'язування молекул ГКГС-II, які експресуються на людських пухлинних клітинах A375; і/або

IV) підвищує вивільнення гранзиму В або IL-2 за даними аналізу реакції змішаних лімфоцитів (mMLR).

В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3, запропоноване у винаході, являє собою моноклональне антитіло.

В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3, запропоноване у винаході, являє собою людське, гуманізоване або химерне антитіло.

В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3, запропоноване у винаході, являє собою фрагмент антитіла, який зв'язується з LAG3.

В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3, запропоноване у винаході, являє собою Fab-фрагмент.

У винаході запропонована виділена нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло за будь-яким із зазначених вище пунктів.

5 У винаході запропонована клітина-хазяїн, яка містить зазначену нуклеїнову кислоту.

У винаході запропонований спосіб одержання антитіла, який включає культивування клітини-хазяїна таким чином, щоби продукувалося антитіло.

У винаході запропонований зазначений спосіб одержання антитіла, що додатково включає виділення антитіла з клітини-хазяїна.

10 У винаході запропонована фармацевтична композиція, що містить представлене в даному описі антитіло і фармацевтично прийнятний носій.

У винаході запропоновано антитіло, представлене в даному описі, призначене для застосування як лікарський засіб.

15 У винаході запропоновано антитіло, представлене в даному описі, призначене для застосування для лікування раку.

У винаході запропоновано застосування антитіла, представленого в даному описі, для приготування лікарського засобу. В одному з варіантів здійснення винаходу лікарський засіб призначений для лікування раку, для лікування або уповільнення прогресування пов'язаного з імунною системою захворювання, такого як пухлинний імунітет, або для стимуляції імунної відповіді або функції, такої як Т-клітинна активність.

20 У винаході запропонований спосіб лікування індивідуума, що має рак, що включає введення індивідууму в ефективній кількості антитіла, представленого в даному описі.

Антитіла, запропоновані в даному винаході, мають цінні властивості, що полягають в індукції вивільнення гранзиму В, вивільненні IFN- γ і секреції IL-2 людськими CD4 Т-клітинами, і тому вони можуть стимулювати імунну відповідь за допомогою Т-клітин (підвищені специфічні щодо пухлинного антигену Т-клітинні ефекторні функції) або індивідуально, або в комбінації з інгібіторами PD1.

Стислий опис креслень

На кресленнях показано:

30 на фіг. 1 – вплив антитіл до LAG-3 на вивільнення цитотоксичного гранзиму В і секрецію IL-2 людськими CD4 Т-клітинами, спільно культивованими з алогенними зрілими дендритними клітинами:

фіг. 1А: секреція гранзиму В,

фіг. 1Б: секреція IL-2;

35 на фіг. 2 - вплив антитіл до LAG-3 на вивільнення цитотоксичного гранзиму В людськими CD4 Т-клітинами, спільно культивованими з лінією лімфобластоїдних В-клітин (ARH77);

на фіг. 3 - вплив антитіл до LAG-3 на обумовлену Treg супресію вивільнення гранзиму В і IFN- γ людськими CD4 Т-клітинами, спільно культивованими з опроміненими алогенними РВМС:

фіг. 3А: вивільнення гранзиму В,

40 фіг. 3Б: вивільнення IFN- γ .

Докладний опис винаходу

В контексті даного опису поняття "акцепторна людська каркасна ділянка" являє собою каркасну ділянку, що містить амінокислотну послідовність каркасної ділянки варіабельного домену легкого ланцюга (VL) або каркасної ділянки варіабельного домену важкого ланцюга (VH), яка походить з каркасної ділянки людського імуноглобуліну або людської консенсусної каркасної ділянки, зазначеної нижче. Акцепторна людська каркасна ділянка, "яка походить з" каркасної ділянки людського імуноглобуліну або людської консенсусної каркасної ділянки, може містити ту ж саму їх амінокислотну послідовність або вона може містити зміни в амінокислотній послідовності. У деяких варіантах здійснення винаходу кількість амінокислотних змін становить

50 10 або менше, 9 або менше, 8 або менше, 7 або менше, 6 або менше, 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше, або 2 або менше. У деяких варіантах здійснення винаходу послідовність акцепторної людської каркасної ділянки VL ідентична послідовності каркасної ділянки VL людського імуноглобуліну або послідовності людської консенсусної каркасної ділянки.

55 Поняття "афінність" або "афінність зв'язування" відноситься до сумарної сили усіх нековалентних взаємодій між індивідуальним сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитіла) і її партнера зі зв'язування (наприклад, антигена). Якщо не зазначено інше, то в контексті даного опису поняття "афінність зв'язування" відноситься до властивості компонентам пари (наприклад, антитіла і антигена), що зв'язується, афінності зв'язування, що відображає взаємодію за типом 1:1. Афінність молекули X до її партнера Y можна, як правило,

60 характеризувати за допомогою константи дисоціації (K_D). Афінність можна оцінювати

загальноприйнятими методами, відомими в даній галузі, включаючи представлені в даному описі методи. Нижче описані конкретні представлені для ілюстрації і як приклади варіанти методів вимірювання афінності зв'язування.

5 Антитіло "з дозрілою афінністю" відноситься до антитіла з однією або декількома змінами в одній або декількох гіперваріабельних ділянках (HVR) у порівнянні з батьківським антитілом, яке не несе зазначених змін, зазначені зміни приводять до підвищення афінності антитіла до антигену.

10 Поняття "LAG3" в контексті даного опису відноситься до будь-якого нативного LAG3 з будь-якої хребетної тварини, що виконує функції джерела, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, людину), і гризунів (наприклад, мишей і щурів), якщо не зазначено інше. Поняття включає "повнорозмірний" непроцесований LAG3, а також будь-яку форму LAG3, що утворюється в результаті процесингу в клітині. Під поняття підпадають також варіанти LAG3, що зустрічаються в природних умовах, наприклад, сплайсингові варіанти або алельні варіанти. В одному з кращих варіантів здійснення винаходу поняття "LAG3", відноситься до людського LAG3. Амінокислотна послідовність наведеного як приклад процесованого (без сигнальних послідовностей) LAG3 представлена в SEQ ID NO: 54. Амінокислотна послідовність наведеного як приклад позаклітинного домену (ECD) LAG3 представлена в SEQ ID NO: 55.

20 Поняття "антитіло до LAG3" і "антитіло, яке зв'язується з LAG3", відносяться до антитіла, яке має здатність зв'язуватися з LAG3 з афінністю, достатньою для того, щоби антитіло можна було застосовувати як діагностичний і/або терапевтичний агент для таргетування LAG3. В одному з варіантів здійснення винаходу рівень зв'язування антитіла до LAG3 з неспорідненим відмінним від LAG3 білком становить менше ніж приблизно 10 % від рівня зв'язування антитіла з LAG3 за даними вимірювань, наприклад, за допомогою радіоімунаналізу (RIA). У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, яке зв'язується з LAG3, характеризується величиною константи дисоціації (K_D), яка становить $\leq 1\text{мкМ}$, $\leq 100\text{нМ}$, $\leq 10\text{нМ}$, $\leq 1\text{нМ}$, $\leq 0,1\text{нМ}$, $\leq 0,01\text{нМ}$ або $\leq 0,001\text{нМ}$ (наприклад, 10^{-8}М або менше, наприклад, від 10^{-8}М до 10^{-13}М , наприклад, від 10^{-9}М до 10^{-13}М). У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло до LAG3 зв'язується з епітопом LAG3, який є консервативним серед LAG3 з різних видів. В одному з кращих варіантів здійснення винаходу поняття "антитіло до LAG3", "антитіло, яке специфічно зв'язується з людським LAG3" і "антитіло, яке зв'язується з людським LAG3" відносяться до антитіла, яке специфічно зв'язується з людським антигеном LAG3 або з його позаклітинним доменом (ECD) з афінністю зв'язування, що характеризується величиною K_D , яка становить $1,0 \times 10^{-8}$ моль/л або нижче, в одному з варіантів здійснення винаходу величиною K_D , яка становить $1,0 \times 10^{-9}$ моль/л або менше, в одному з варіантів здійснення винаходу величиною K_D , яка становить від $1,0 \times 10^{-9}$ моль/л до від 35 $1,0 \times 10^{-13}$ моль/л. У цьому контексті афінність зв'язування визначають за допомогою стандартного аналізу зв'язування, такого як метод поверхневого плазмонного резонансу (BIAcore®, фірма GE-Healthcare, Упсала, Швеція), наприклад, з використанням позаклітинного домену LAG3.

40 В контексті даного опису поняття "антитіло" використовується в його найбільш широкому сенсі, і воно відноситься до різних структур антитіл, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) і фрагменти антитіл, за умови, що вони мають необхідну антигензв'язуючу активність.

45 Поняття "фрагмент антитіла" відноситься до молекули, відмінної від інтактного антитіла, яка містить частину інтактного антитіла, що має здатність зв'язуватися з антигеном, з яким зв'язується інтактне антитіло. Прикладами фрагментів антитіл є (але, не обмежуючись тільки ними) Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, димерні антитіла (діабоді), лінійні антитіла: одноланцюгові молекули антитіл (наприклад, scFv); і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл.

50 Поняття "епітоп" означає сайт на антигені, або білковий, або небілковий, з яким зв'язується антитіло до LAG3. Епітопи можуть бути утворені або суміжними амінокислотними сегментами (лінійний епітоп), або можуть містити такі, які не є суміжними, амінокислоти (конформаційний епітоп), наприклад, які стають просторово близькими в результаті фолдинга антигена, тобто при утворенні третинної структури в результаті фолдинга білкового антигена. Лінійні епітопи після контакту білкового антигена з денатуруючими агентами, як правило, все ще залишаються зв'язаними з антитілом до LAG3, в той час як конформаційні епітопи, як правило, руйнуються при обробці денатуруючими агентами. Епітоп містить принаймні 3, принаймні 4, принаймні 5, принаймні 6, принаймні 7 або 8-10 амінокислот в унікальній просторовій конформації.

60 Скринінг щодо зв'язування антитіл з конкретним епітопом (тобто антитіл, які зв'язуються з одним і тим же епітопом) можна здійснювати за допомогою методів, які є стандартними в даній галузі, такими, наприклад, як (але, не обмежуючись тільки ними) сканування аланіном, пептидні

блоти (див. Meth. Mol. Biol. 248, 2004, стор. 443-463), аналіз розщеплення пептидів, вирізання епітопа, екстракція епітопа, хімічна модифікація антигенів (див. Prot. Sci. 9, 2000, стор. 487-496) і перехресне блокування (див. Harlow і Lane, "Antibodies", вид-во Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY).

5 Метод профілювання антитіл на основі структури антигена (Antigen Structure-based Antibody Profiling, ASAP), що відомий також як профілювання з використанням модифікації (Modification-Assisted Profiling, MAP), дозволяє групувати (розподіляти по "кошиках") множини моноклональних антитіл, що специфічно зв'язуються з LAG3, на основі профілю зв'язування кожного з множини антитіл з хімічно або ферментативно модифікованими поверхнями антигена
10 (див., наприклад, US 2004/0101920). Антитіла в кожній групі зв'язуються з одним і тим же епітопом, який може або являти собою унікальний епітоп, чітко відмінний від епітопа, що відповідає іншій групі, або частково перекриватися з ним.

 Для визначення того, чи зв'язується антитіло з тим же самим епітопом LAG3, що й референс-антитіло до LAG3, або конкурує з ним за зв'язування, можна застосовувати також аналіз зв'язування в умовах конкуренції. Наприклад, вираз "антитіло, яке зв'язується з тим же самим епітопом", що й референс-антитіло до LAG3, відноситься до антитіла, яке за даними аналізу в умовах конкуренції блокує зв'язування референс-антитіла до LAG3 з його антигеном на 50 % або більше, і навпаки, референс-антитіло за даними аналізу в умовах конкуренції блокує зв'язування антитіла з його антигеном на 50 % або більше. Також, наприклад, для визначення того, чи зв'язується антитіло з тим же самим епітопом, що і референс-антитіло до LAG3, референс-антитілу дають можливість зв'язуватися з LAG3 в насичуючих умовах. Після видалення надлишку референс-антитіла до LAG3 оцінюють здатність розглянутого антитіла до LAG3 до зв'язування з LAG3. Якщо антитіло до LAG3 має здатність до зв'язування з LAG3, то можна зробити висновок про те, що розглянуте антитіло до LAG3 зв'язується з епітопом, відмінним від того, з яким зв'язується референс-антитіло до LAG3. Однак, якщо розглянуте антитіло до LAG3 не може зв'язуватися з LAG3 після зв'язування референс-антитіла до LAG3 в насичуючих умовах, то це означає, що розглянуте антитіло до LAG3 може зв'язуватися з тим же самим епітопом, з яким зв'язується референс-антитіло до LAG3. Для підтвердження того, чи зв'язується розглянуте антитіло з тим же самим епітопом або зв'язування ускладнене зі стеричних причин, можна проводити стандартні експерименти (наприклад, здійснювати пептидні мутації і аналізи зв'язування методами ELISA, PIA, поверхневого плазмонного резонансу, проточної цитометрії або будь-який кількісний або якісний аналіз зв'язування антитіла, застосовний в даній галузі). Цей аналіз слід здійснювати в двох умовах, а саме, коли кожне з обох антитіл застосовують як насичуюче антитіло. Якщо в обох умовах тільки перше (насичуюче) антитіло може зв'язуватися з LAG3, то це дозволяє зробити висновок про те, що розглянуте антитіло до LAG3 і референс-антитіло до LAG3 конкурують за зв'язування з LAG3.

 У деяких варіантах здійснення винаходу вважається, що два антитіла зв'язуються з одним і тим же або з перекриваючим епітопом, якщо 1-, 5-, 10-, 20- або 100-кратний надлишок одного антитіла інгібує зв'язування іншого принаймні на 50 %, принаймні на 75 %, принаймні на 90 % або навіть на 99 % або більше за даними аналізу зв'язування в умовах конкуренції (див., наприклад, Junghans і ін., Cancer Res. 50, 1990, стор. 1495-1502).

 У деяких варіантах здійснення винаходу вважається, що два антитіла зв'язуються з одним і тим же епітопом, якщо практично всі амінокислотні мутації в антигені, які знижують або елімінують зв'язування одного антитіла, приводять також до зниження або елімінуванню зв'язування іншого. Вважається, що два антитіла мають "епітопи, що перекриваються", якщо тільки піднабір амінокислотних мутацій, які знижують або елімінують зв'язування одного антитіла, приводить до зниження або елімінуванню зв'язування іншого.

 Поняття "химерне" антитіло відноситься до антитіла, в якому частина важкого і/або легкого ланцюга походить з конкретного джерела або конкретного виду, а інша частина важкого і/або легкого ланцюга походить з іншого джерела або іншого виду.

 Поняття "клас" антитіла відноситься до типу константного домену або константної області, що входить до важкого ланцюга. Існує п'ять основних класів антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, а деякі з них можна додатково підрозділяти на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ і IgA₂. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло має IgG4-ізотип з мутацією S228P в шарнірній області для підвищення стабільності антитіла IgG4-ізотипу. Константні домени важких ланцюгів, що відповідають різним класам імуноглобулінів, позначають як α, δ, ε, γ і μ відповідно.

 В контексті даного опису поняття "цитотоксичний агент" відноситься до субстанції, яка інгібує або перешкоджає клітинній функції і/або викликає загибель або деструкцію клітини. Цитотоксичні агенти включають (але, не обмежуючись тільки ними) радіоактивні ізотопи

(наприклад, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² і радіоактивні ізотопи Lu); хіміотерапевтичні агенти або лікарські засоби (наприклад, метотрексат, адриаміцин, алкалоїди барвінку (вінкристин, вінбластин, етопозид), доксорубіцин, мелфалан, мітоміцин С, хлорамбуцил, даунорубіцин або інші інтеркалюючі агенти); агенти, що інгібують ріст; ферменти і їх фрагменти, такі як нуклеолітичні ферменти; антибіотики; токсини, такі як низькомолекулярні токсини або токсини, що мають ферментативну активність, бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, включаючи їх фрагменти і/або варіанти; і різні протипухлинні або протиракові агенти, описані нижче.

Поняття "ефекторні функції" відноситься до видів біологічної активності, властивим Fc-області антитіла, які варіюються залежно від ізо типу антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіла включають: зв'язування з C1q і комплементзалежну цитотоксичність (CDC), зв'язування з Fc-рецептором, антитіло-обумовлену клітиннозалежну цитотоксичність (ADCC), фагоцитоз, знижуючу регуляцію рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B-клітинного рецептора) і активацію В-клітин.

Поняття "ефективна кількість" агента, наприклад, фармацевтичної композиції, відноситься до кількості, ефективній при застосуванні в дозах і протягом періодів часу, необхідних для досягнення необхідного терапевтичного або профілактичного результату.

Поняття "Fc-область" в контексті даного опису відноситься до C-кінцевої області важкого ланцюга імуноглобуліну, яка містить принаймні частину константної області. Поняття включає такі, що мають нативну послідовність, Fc-області і варіанти Fc-областей. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-область важкого ланцюга людського IgG простягається від Cys226 або від Pro230 до карбоксильного кінця важкого ланцюга. Однак C-кінцевий лізин (Lys447) Fc-області може або бути присутнім, або бути відсутнім. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3, зазначене в даному описі, являє собою антитіло IgG1-ізо типу і містить константний домен важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 51 або SEQ ID NO: 52. В одному з варіантів здійснення винаходу воно додатково містить C-кінцевий лізин (Lys447). В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3, зазначене в даному описі, являє собою антитіло IgG4-ізо типу і містить константний домен важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 53. В одному з варіантів здійснення винаходу воно додатково містить C-кінцевий лізин (Lys447). Якщо в даному описі не зазначено інше, то нумерація амінокислотних залишків в Fc-області або в константній області відповідає системі нумерації EU, яку називають також EU-індексом, який описаний у Kabat і ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-те вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Поняття "каркасна ділянка" або "FR" відноситься до залишків варіабельного домену, відмінних від залишків гіперваріабельної ділянки (HVR). FR варіабельного домену, як правило, складається з чотирьох FR-доменів: FR1, FR2, FR3 і FR4. Таким чином, послідовності HVR і FR, як правило, розташовуються в VH (або VL) в наступному порядку: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Поняття "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" і "цільне антитіло" в контексті даного опису використовують взаємозамінно для позначення антитіла, яке має структуру, практично схожу з нативною структурою антитіла, або яке має важкі ланцюги, які містять Fc-область, зазначену в даному описі.

В контексті даного опису поняття "клітина-хазяїн", "лінія клітин-хазяїв" і "культура клітин-хазяїв" використовуються взаємозамінно, і вони відносяться до клітин, в які інтродукована екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи нащадки зазначених клітин. До клітин-хазяїв відносяться "трансформанти" і "трансформовані клітини", які включають первинну трансформовану клітину, а також нащадки, виведені з неї, незалежно від кількості пересівань. Нащадки можуть не бути строго ідентичними батьківській клітині за складом нуклеїнових кислот, а можуть нести мутації. Під дане поняття підпадають мутантні нащадки, які мають таку ж функцію або біологічну активність, що й відібрана шляхом скринінгу або селекції вихідна трансформована клітина.

"Людське антитіло" являє собою антитіло, яке має амінокислотну послідовність, що відповідає послідовності антитіла, яке продукується людиною або людською клітиною, або одержана з джерела, відмінного від людини, з використанням спектра людських антитіл або інших послідовностей, які кодують людське антитіло. З зазначеного визначення людського антитіла спеціально виключене гуманізоване антитіло, що містить нелюдські антигензв'язуючі залишки. У деяких варіантах здійснення винаходу людське антитіло одержують з трансгенного ссавця крім людини, наприклад, миші, щура або кролика. У деяких варіантах здійснення винаходу людське антитіло одержують з використанням клітинною лінії гібридами.

"Людська консенсусна каркасна ділянка" являє собою каркасну ділянку, яка містить

амінокислотні залишки, що зустрічаються найчастіше, у відібраних послідовностях каркасних ділянок VL або VH людського імуноглобуліну. Як правило, відібрані послідовності каркасних ділянок VL або VH людського імуноглобуліну вибрані з підгрупи послідовностей варіабельних доменів. Як правило, підгрупа послідовностей являє собою підгрупу, описану у Kabat і ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-те вид., вид-во NIH Publication, 91-3242, Bethesda MD, 1991, т.т. 1-3. В одному з варіантів здійснення винаходу для VL підгрупа являє собою підгрупу каппа I, описану у Kabat і ін., вище. В одному з варіантів здійснення винаходу для VH підгрупа являє собою підгрупу III, описану у Kabat і ін., вище.

Поняття "гуманізоване" антитіло відноситься до химерного антитіла, яке містить амінокислотні залишки з нелюдських HVR і амінокислотні залишки з людських FR. У деяких варіантах здійснення винаходу гуманізоване антитіло може містити практично всі з принаймні одного і, як правило, двох варіабельних доменів, в яких всі або практично всі HVR (наприклад, CDR) відповідають ділянкам нелюдського антитіла, а всі або практично всі FR відповідають ділянкам людського антитіла. Гуманізоване антитіло необов'язково може містити принаймні частину константної області антитіла, яка походить з людського антитіла. Поняття "гуманізована форма" антитіла, наприклад, нелюдського антитіла, відноситься до антитіла, яке піддавали гуманізації.

Поняття "гіперваріабельна ділянка" або "HVR" в контексті даного опису відноситься до кожної з ділянок варіабельного домену антитіла, послідовності яких є гіперваріабельними ("ділянки, що визначають комплементарність" або "CDR") і/або формують петлі певної структури ("гіперваріабельні петлі"), і/або містять залишки, що контактують з антигеном ("контакти з антигеном"). Як правило, антитіла містять шість HVR; три в VH (H1, H2, H3) і три в VL (L1, L2, L3).

Приклади HVR включають:

(а) гіперваріабельні петлі, що включають амінокислотні залишки 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) і 96-101 (H3) (Chothia і Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, стор. 901-917);

(б) CDR, що включають амінокислотні залишки 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) і 95-102 (H3) (Kabat і ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-те вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, публікація NIH 91-3242);

(в) області контакту з антигеном, що включають амінокислотні залишки 27с-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) і 93-101 (H3) (MacCallum і ін., J. Mol. Biol. 262, 1996, стор. 732-745); і

(г) комбінації залишків, зазначених в підпунктах (а), (б) і/або (в), що включають амінокислотні залишки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) і 94-102 (H3).

В одному з варіантів здійснення винаходу залишки HVR містять залишки, зазначені нижче в розділі "Опис амінокислотних послідовностей".

Якщо не зазначено інше, то HVR-залишки і інші залишки в варіабельному домені (наприклад, FR-залишки) нумерують в даному описі відповідно до Kabat і ін., вище.

"Імунокон'югат" являє собою антитіло, кон'юговане з однією або декількома гетерологічною(-ними) молекулою(-ами), включаючи (але, не обмежуючись тільки ним) цитотоксичний агент.

"Індивідуум" або "суб'єкт" являє собою ссавця. Ссавці включають (але, не обмежуючись тільки ними) свійських тварин (наприклад, корови, вівці, кішки, собаки і коні), приматів (наприклад, люди і примати крім людини, такі як мавпи), кроликів і гризунів (наприклад, миші і щури). У деяких варіантах здійснення винаходу індивідуум або суб'єкт являє собою людину.

"Виділене" антитіло являє собою антитіло, відокремлене від компонента його природного оточення. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло очищають до чистоти, яка перевищує 95 % або 99 % за даними, наприклад, електрофоретичних аналізів (наприклад, ДСН-ПААГ, ізоелектричне фокусування (ІЕФ), капілярний електрофорез) або хроматографічних аналізів (наприклад, як іонообмінна хроматографія або ВЕРХ з оберненою фазою). Огляд методів оцінювання чистоти антитіл див., наприклад, у Flatman і ін., J. Chrom. B, 848, 2007, стор. 79-87.

Поняття "виділена" нуклеїнова кислота відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, відділеної від компонента її природного оточення. Виділена нуклеїнова кислота включає молекулу нуклеїнової кислоти, що міститься в клітинах, які звичайно містять молекулу нуклеїнової кислоти, але молекула нуклеїнової кислоти присутня поза хромосомою або в положенні на хромосомі, відмінному від її природного положення на хромосомі.

Поняття "виділена нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло до LAG3" відноситься до однієї або декількох молекул нуклеїнових кислот, що кодують важкі і легкі ланцюги антитіла (або їх

фрагменти), включаючи таку(-і) молекулу(-и), присутню(-і) в одному векторі або окремих векторах, і таку(-і) молекулу(-и), присутню(-і) в одному або декількох положеннях в клітині-хазяїні.

5 Поняття "моноклональне антитіло" в контексті даного опису відноситься до антитіла, одержаного з популяції практично гомогенних антитіл, тобто індивідуальні антитіла, що входять до популяції, ідентичні і/або зв'язуються з одним і тим же епітопом, за винятком можливих варіантів антитіл, наприклад, таких, які містять мутації і зустрічаються в природних умовах або виникають в процесі виробництва препарату моноклонального антитіла, зазначені варіанти, як правило, присутні в мінорних кількостях. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які, як правило, включають різні антитіла до різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло з препарату моноклонального антитіла спрямоване проти однієї детермінанти на антигені. Таким чином, прикметник "моноклональний" відноситься до характеристики антитіла, що вказує на одержання з практично гомогенної популяції антитіл, і його не слід розглядати як вимогу, що обмежує одержання антитіла за допомогою будь-якого конкретного методу. 10 Наприклад, моноклональні антитіла, призначені для застосування відповідно до даного винаходу, можна одержувати різними методиками, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) метод гібридом, методи рекомбінантної ДНК, методи фагового дисплея і методи, що включають застосування трансгенних тварин, які містять всі локуси людського імуноглобуліну або їх частину, зазначені методи і інші, наведені як приклад методи створення моноклональних антитіл, представлені в даному описі. 20

Поняття "голе антитіло" відноситься до антитіла, не кон'югованого з гетерологічним фрагментом (наприклад, цитотоксичним фрагментом) або з радіоактивною міткою. Голе антитіло може бути присутнім в фармацевтичній композиції.

Поняття "нативні антитіла" відноситься до молекул імуноглобуліну, що зустрічаються в природних умовах, з різними структурами. Наприклад, нативні антитіла IgG-класу являють собою гетеротетрамерні глікопротеїни з молекулярною масою приблизно 150000 Да, що складаються з двох ідентичних легких ланцюгів і двох ідентичних важких ланцюгів, зв'язаних дисульфідами. У напрямку від N- до C-кінця кожний важкий ланцюг має варіабельну область (VH), що також називається доменом важкого ланцюга або варіабельним доменом важкого ланцюга, за яким йдуть три константних домени (CH1, CH2 і CH3). Аналогічно цьому, у напрямку від N- до C-кінця кожний легкий ланцюг має варіабельну область (VL), що також називається доменом легкого ланцюга або варіабельним доменом легкого ланцюга, за яким йде константний домен легкого ланцюга (CL). Легкий ланцюг антитіла може належати до одного з двох типів, які позначають каппа (κ) і лямбда (λ) на основі амінокислотної послідовності їх константного домену. 25 30 35

Поняття "листівка-вкладиш в упаковку" в контексті даного опису відноситься до інструкцій, які звичайно поміщують в упаковки терапевтичних продуктів, що надходять у продаж, і які містять інформацію про показання, застосування, дози, шляхи введення, комбіновану терапію, протипоказання і/або запобіжні заходи при застосуванні зазначених терапевтичних продуктів. 40

"Процент (%) ідентичності амінокислотної послідовності" відносно поліпептидної референс-послідовності визначають як процент амінокислотних залишків в послідовності-кандидаті, які ідентичні амінокислотним залишкам в поліпептидній референс-послідовності, після вирівнювання послідовностей і інтродукції при необхідності прогалин для досягнення максимального процента ідентичності послідовностей, і при цьому жодні консервативні заміни не враховуються при оцінюванні ідентичності послідовностей. Порівняльний аналіз для визначення відсотка ідентичності амінокислотних послідовностей можна здійснювати різними шляхами, які знаходяться в компетенції спеціаліста в даній галузі, наприклад, з використанням публічно доступних комп'ютерних програм, таких як програма BLAST, BLAST-2, Clustal W, Megalign (DNASTAR) або пакет програм FASTA. Спеціалісти в даній галузі можуть визначити відповідні параметри для вирівнювання послідовностей, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання по всій довжині порівнюваних послідовностей. Однак для цілей даного винаходу величину % ідентичності амінокислотних послідовностей отримують з використанням програми ggsearch з пакету програм FASTA, версія 36.3.8c або більше пізня версія, з використанням матриці для порівняння BLOSUM50. Пакет програм FASTA був розроблений W. R. Pearson і D. J. Lipman, "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85, 1988, стор. 2444-2448; W. R. Pearson "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266, 1996, стор. 227-258; і Pearson і ін. Genomics 46, 1997, стор. 24-36, і публічно доступний на сайті http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml. Альтернативно цьому, для порівняння послідовностей можна використовувати публічний сервер, доступний на сайті http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi, з використанням 45 50 55 60

програми ggsearch (global protein:protein) і опцій, що задаються за умовчанням (BLOSUM50; open: -10; ext: -2; Ktup=2) для забезпечення здійснення глобального, а не локального вирівнювання. Процент ідентичності амінокислот видається у вигляді заголовка як вихідного результату вирівнювання.

5 Поняття "фармацевтична композиція" відноситься до препарату, який знаходиться в такій формі, що він забезпечує біологічну активність присутньої у його складі діючої речовини, яка повинна проявляти ефективність, і який не містить додаткових компонентів, що мають неприйнятну токсичність для індивідуума, якому слід вводити композицію.

10 "Фармацевтично прийнятний носій" відноситься до інгредієнта в фармацевтичній композиції, відмінного від діючої речовини, який є нетоксичним для індивідуума. Фармацевтично прийнятний носій включає (але, не обмежуючись тільки ними) буфер, ексципієнт, стабілізатор або консервант.

15 В контексті даного опису поняття "лікування" (і його граматичні варіації, такі як "лікувати" або "процес лікування") відноситься до клінічного втручання з метою зміни природного перебігу хвороби у індивідуума, що підлягає лікуванню, і його можна здійснювати або для профілактики, або в процесі розвитку клінічної патології. Необхідними діями лікування є (але, не обмежуючись тільки ними) попередження виникнення або рецидиву хвороби, полегшення симптомів, зменшення будь-яких прямих або опосередкованих патологічних наслідків хвороби, попередження метастазів, зниження швидкості розвитку хвороби, полегшення або тимчасове послаблення хворобливого стану і ремісія або покращення прогнозу. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіла або біспецифічні антигензв'язуючі молекули, запропоновані у винаході, застосовують для затримки розвитку захворювання або уповільнення прогресування захворювання.

25 Поняття "варіабельна область" або "варіабельний домен" відноситься до домену важкого або легкого ланцюга антитіла, який приймає участь у зв'язуванні антитіла з антигеном. Варіабельні домени важкого ланцюга і легкого ланцюга (VH і VL відповідно) нативного антитіла, як правило, мають схожі структури, при цьому кожний домен містить чотири консервативні каркасні ділянки (FR) і три гіперваріабельні ділянки (HVR) (див., наприклад, Kindt і ін., Kuby Immunology, 6-те вид., вид-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91). Одного VH- або VL-домени може бути достатньо для забезпечення специфічності зв'язування антигена. Крім того, можна виділяти антитіла, які зв'язуються з конкретним антигеном, з використанням VH- або VL-домени з антитіла, яке зв'язується з антигеном, для скринінгу бібліотеки комплементарних VH- або VL-доменив відповідно (див., наприклад, Portolano і ін., J. Immunol. 150, 1993, стор. 880-887; Clarkson і ін., Nature, 352, 1991, стор. 624-628).

35 Поняття "вектор" в контексті даного опису відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, яка здатна здійснювати розмноження іншої нуклеїнової кислоти, з якою вона зчеплена. Поняття включає вектор, що являє собою самореplikуючу структуру нуклеїнової кислоти, а також вектор, вбудований в геном клітини-хазяїна, в яку він інтродукований. Деякі вектори мають здатність спрямовувати експресію нуклеїнових кислот, з якими вони функціонально зв'язані. Такі вектори в даному описі позначені як "експресійні вектори".

40 I. Композиції і способи

Одним з об'єктів винаходу є виділені антитіла, які зв'язуються з LAG3.

45 У деяких варіантах здійснення винаходу запропоновані антитіла, які зв'язуються з людським LAG3. Антитіла, запропоновані у винаході, можна застосовувати, наприклад, для діагностування або лікування раку, для лікування або уповільнення прогресування пов'язаного з імунною системою захворювання, такого як пухлинний імунітет, або для стимуляції імунної відповіді або функції, такої як Т-клітинна активність; або для застосування як імуностимулятор або для стимуляції секреції/вивільненні гранзиму В (GrzB), інтерферону-гамма (IFN-гамма) і/або інтерлейкіну 2 (IL-2).

50 А. Приклади антитіл до LAG3

У деяких варіантах здійснення винаходу запропоновано антитіло до LAG3, де антитіло:

I) конкурує за зв'язування з LAG3 з антитілом до LAG3 (яке містить VH і VL антитіла aLAG3(0414)), яке містить VH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:7, і VL, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, і/або

55 II) зв'язується з LAG3 людини і мавп ціномолгус; і/або

III) інгібує зв'язування молекул ГКГС-II, які експресуються на людських пухлинних клітинах A375; і/або

IV) підвищує вивільнення гранзиму В або IL-2 за даними аналізу з використанням реакції змішаних лімфоцитів (mMLR) (як продемонстровано в прикладі 3).

60 Одним з об'єктів винаходу є антитіло до LAG3, що містить принаймні одну, дві, три, чотири,

п'ять або шість HVR, які вибрані з (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2; (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3; (г) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (д) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5; і (е) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6.

Одним з об'єктів винаходу є антитіло, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VH, які вибрані з (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2, і (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3. В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1, і HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6. В наступному варіанті здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6, і HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2. В наступному варіанті здійснення винаходу антитіло містить (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2; і (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VL, які вибрані з (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (б) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5; і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло містить (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (б) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5; і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6.

В іншому об'єкті винаходу антитіло містить (а) VH-домен, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VH, які вибрані з (I) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1, (II) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2, і (III) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:3; і (б) VL-домен, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VL, які вибрані з (I) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4, (II) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5, і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6.

В іншому об'єкті винаходу антитіло містить (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2; (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3; (г) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (д) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5; і (е) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:6.

В будь-якому з зазначених вище варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3 є людським або гуманізованим. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3 містить HVR, зазначені в будь-якому з представлених вище варіантів здійснення винаходу, і додатково містить акцепторну людську каркасну ділянку, наприклад, каркасну ділянку людського імуноглобуліну або людську консенсусну каркасну ділянку.

В іншому об'єкті винаходу антитіло до LAG3 містить послідовність варіабельного домену важкого ланцюга (VH), ідентичну принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % амінокислотній послідовності SEQ ID NO:7. У деяких варіантах здійснення винаходу послідовність VH, ідентична принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), інсерції або делеції у порівнянні з референс-послідовністю, але антитіло до LAG3, що містить цю послідовність, зберігає здатність до зв'язування з LAG3. У деяких варіантах здійснення винаходу в цілому від 1 до 10 амінокислот замінені, вбудовані і/або видалені шляхом делеції в SEQ ID NO:7. У деяких варіантах здійснення винаходу заміни, інсерції або делеції мають місце в областях, що знаходяться поза HVR (тобто в FR). Необов'язково антитіло до LAG3 містить послідовність VH, представлену в SEQ ID NO:7, включаючи пост-трансляційні модифікації зазначеній послідовності. В конкретному варіанті здійснення винаходу VH містить одну, дві або три HVR, які вибрані з: (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1, (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2, і (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло до LAG3, де антитіло містить варіабельний домен легкого ланцюга (VL), ідентичний принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % амінокислотній послідовності SEQ ID NO:8.

98 %, 99 % або 100 % амінокислотній послідовності SEQ ID NO:8. У деяких варіантах здійснення винаходу послідовність VL, ідентична принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), інсерції або делеції у порівнянні з референс-послідовністю, але антитіло до LAG3, що містить цю послідовність, зберігає здатність до зв'язування з LAG3. У деяких варіантах здійснення винаходу в цілому від 1 до 10 амінокислот замінені, вбудовані і/або видалені шляхом делеції в SEQ ID NO:8. У деяких варіантах здійснення винаходу заміни, інсерції або делеції мають місце в областях, що знаходяться поза HVR (тобто в FR). Необов'язково антитіло до LAG3 містить послідовність VH, представлену в SEQ ID NO:8, включаючи пост-трансляційні модифікації зазначеній послідовності. В конкретних варіантах здійснення винаходу VH містить одну, дві або три HVR, які вибрані з: (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (б) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5; і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло до LAG3, де антитіло містить VH, зазначену в будь-якому з представлених вище варіантів здійснення винаходу, і VL, зазначену в будь-якому з представлених вище варіантів здійснення винаходу. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло містить послідовності VH і VL, представлені в SEQ ID NO:7 і SEQ ID NO:8 відповідно, включаючи пост-трансляційні модифікації цих послідовностей.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло, яке зв'язується з тим же самим епітопом, що і антитіло до LAG3, представлене в даному описі. Наприклад, у деяких варіантах здійснення винаходу, запропоновано антитіло, яке зв'язується з тим же самим епітопом, що і антитіло до LAG3, що містить послідовність VH SEQ ID NO:7 і послідовність VL SEQ ID NO:8. У деяких варіантах здійснення винаходу запропоновано антитіло, яке зв'язується з епітопом з кластеру епітопів E3 в LAG3 (див. приклад 2).

Одним з об'єктів винаходу є антитіло до LAG3, що містить принаймні одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, які вибрані з (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10; (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11; (г) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12; (д) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13; і (е) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14.

Одним з об'єктів винаходу є антитіло, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VH, які вибрані з (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10; і (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11. В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9, і HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14. В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11, HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14, і HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10. В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло містить (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10; і (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VL, які вибрані з (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12; (б) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13; і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло містить (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12; (б) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13; і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14.

В іншому об'єкті винаходу антитіло, запропоноване у винаході, містить (а) VH-домен, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VH, які вибрані з (I) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9, (II) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10, і (III) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:11; і (б) VL-домен, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VL, які вибрані з (I) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12, (II) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13, і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло, що містить (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10;

(в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11; (г) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12; (д) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13; і (е) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:14.

В будь-якому з зазначених вище варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3 є людським або гуманізованим. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3 містить HVR, зазначені в будь-якому з представлених вище варіантів здійснення винаходу, і додатково містить акцепторну людську каркасну ділянку, наприклад, каркасну ділянку людського імуноглобуліну або людську консенсусну каркасну ділянку.

В іншому об'єкті винаходу антитіло до LAG3 містить послідовність варіабельного домену важкого ланцюга (VH), ідентичну принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % амінокислотній послідовності SEQ ID NO:15. У деяких варіантах здійснення винаходу послідовність VL, ідентична принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), інсерції або делеції у порівнянні з референс-послідовністю, але антитіло до LAG3, що містить цю послідовність, зберігає здатність до зв'язування з LAG3. У деяких варіантах здійснення винаходу в цілому від 1 до 10 амінокислот замінені, вбудовані і/або видалені шляхом делеції в SEQ ID NO:15. У деяких варіантах здійснення винаходу заміни, інсерції або делеції мають місце в областях, що знаходяться поза HVR (тобто в FR). Необов'язково антитіло до LAG3 містить послідовність VH, представлену в SEQ ID NO:15, включаючи пост-трансляційні модифікації зазначеної послідовності. В конкретних варіантах здійснення винаходу VH містить одну, дві або три HVR, які вибрані з: (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9, (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10, і (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло до LAG3, де антитіло містить варіабельний домен легкого ланцюга (VL), ідентичний принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % амінокислотній послідовності SEQ ID NO:16. У деяких варіантах здійснення винаходу послідовність VL, ідентична принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), інсерції або делеції у порівнянні з референс-послідовністю, але антитіло до LAG3, що містить цю послідовність, зберігає здатність до зв'язування з LAG3. У деяких варіантах здійснення винаходу в цілому від 1 до 10 амінокислот замінені, вбудовані і/або видалені шляхом делеції в SEQ ID NO:16. У деяких варіантах здійснення винаходу заміни, інсерції або делеції мають місце в областях, що знаходяться поза HVR (тобто в FR). Необов'язково антитіло до LAG3 містить послідовність VH, представлену в SEQ ID NO:16, включаючи пост-трансляційні модифікації зазначеної послідовності. В конкретних варіантах здійснення винаходу VH містить одну, дві або три HVR, які вибрані з (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12; (б) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13; і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло до LAG3, де антитіло містить VH, зазначену в будь-якому з варіантів здійснення винаходу, представлених вище, і VL, зазначену в будь-якому з варіантів здійснення винаходу, представлених вище. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло містить VH- і VL-послідовності SEQ ID NO:15 і SEQ ID NO:16 відповідно, включаючи пост-трансляційні модифікації цих послідовностей.

Наступним об'єктом винаходу є антитіло, яке зв'язується з тим же самим епітопом, що і антитіло до LAG3, представлене в даному описі. Наприклад, у деяких варіантах здійснення винаходу, запропоновано антитіло, яке зв'язується з тим же самим епітопом, що і антитіло до LAG3, що містить послідовність VH SEQ ID NO:15 і послідовність VL SEQ ID NO:16. У деяких варіантах здійснення винаходу запропоновано антитіло, яке зв'язується з епітопом з кластеру епітопів E3 в LAG3 (див. приклад 2).

Одним з об'єктів винаходу є антитіло до LAG3, що містить принаймні одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, які вибрані з (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18; (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19; (г) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20; (д) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21; і (е) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22.

Одним з об'єктів винаходу є антитіло, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VH, які вибрані з (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18; і (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19. В іншому

варіанті здійснення винаходу, антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, і HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22. В наступному варіанті здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19, HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, і HVR-H2, що

5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18. В наступному варіанті здійснення винаходу антитіло містить (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18; і (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19.

10 Іншим об'єктом винаходу є антитіло, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VL, які вибрані з (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20; (б) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21; і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло містить (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20; (б) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21; і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну

15 послідовність SEQ ID NO:22.

В іншому об'єкті винаходу антитіло, запропоноване у винаході, містить (а) VH-домен, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VH, які вибрані з (I) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (II) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18, і (III) HVR-H3, що містить амінокислотну

20 послідовність, вибрану з SEQ ID NO:19; і (б) VL-домену, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VL, які вибрані з (I) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20, (II) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло, що містить (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18; (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19; (г) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20; (д) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21; і (е) HVR-L3 що містить амінокислотну послідовність, вибрану з

25 SEQ ID NO:22.

В будь-якому з зазначених вище варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3 є людським або гуманізованим. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3 містить HVR, зазначені в будь-якому з представлених вище варіантів здійснення винаходу, і додатково містить акцепторну людську каркасну ділянку, наприклад, каркасну ділянку людського імуноглобуліну або людську консенсусну каркасну ділянку.

30

В іншому об'єкті винаходу антитіло до LAG3 містить послідовність варіабельного домену важкого ланцюга (VH), ідентичну принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % амінокислотній послідовності SEQ ID NO:23. У деяких варіантах здійснення винаходу, послідовність VH, ідентична принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), інсерції або

35 делеції у порівнянні з референс-послідовністю, але антитіло до LAG3, що містить цю послідовність, зберігає здатність до зв'язування з LAG3. У деяких варіантах здійснення винаходу в цілому від 1 до 10 амінокислот замінені, вбудовані і/або видалені шляхом делеції в SEQ ID NO:23. У деяких варіантах здійснення винаходу заміни, інсерції або делеції мають місце в областях, що знаходяться поза HVR (тобто в FR). Необов'язково антитіло до LAG3 містить послідовність VH, представлену в SEQ ID NO:23, включаючи пост-трансляційні модифікації зазначеній послідовності. В конкретних варіантах здійснення винаходу VH містить одну, дві або

40 три HVR, яка(-і) вибрана(-і) з: (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18, і (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19.

В іншому об'єкті винаходу антитіло до LAG3 містить послідовність варіабельного домену легкого ланцюга (VL), ідентичну принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % амінокислотній послідовності SEQ ID NO:24. У деяких варіантах здійснення винаходу послідовність VL, ідентична принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), інсерції або

45 делеції у порівнянні з референс-послідовністю, але антитіло до LAG3, що містить цю послідовність, зберігає здатність до зв'язування з LAG3. У деяких варіантах здійснення винаходу в цілому від 1 до 10 амінокислот замінені, вбудовані і/або видалені шляхом делеції в SEQ ID NO:24. У деяких варіантах здійснення винаходу заміни, інсерції або делеції мають місце в областях, що знаходяться поза HVR (тобто в FR). Необов'язково антитіло до LAG3 містить

50 послідовність VL, представлену в SEQ ID NO:24, включаючи пост-трансляційні модифікації

55

60

зазначеній послідовності. В конкретних варіантах здійснення винаходу VL містить одну, дві або три HVR, яка(-і) вибрана(-і) з (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20; (б) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21; і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22.

5 Іншим об'єктом винаходу є антитіло до LAG3, де антитіло містить VH, зазначену в будь-якому з варіантів здійснення винаходу, представлених вище, і VL, зазначену в будь-якому з варіантів здійснення винаходу, представлених вище. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло містить послідовності VH і VL, представлені в SEQ ID NO:23 і SEQ ID NO:24 відповідно, включаючи пост-трансляційні модифікації цих послідовностей.

10 Іншим об'єктом винаходу є антитіло, яке зв'язується з тим же самим епітопом, що і антитіло до LAG3, представлене в даному описі. Наприклад, у деяких варіантах здійснення винаходу, запропоновано антитіло, яке зв'язується з тим же самим епітопом, що і антитіло до LAG3, що містить послідовність VH SEQ ID NO:23 і послідовність VL SEQ ID NO:24. У деяких варіантах здійснення винаходу запропоновано антитіло, яке зв'язується з епітопом з кластеру епітопів E3 в LAG3 (див. приклад 2).

15 Одним з об'єктів винаходу є антитіло до LAG3, що містить принаймні одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, які вибрані з (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:25; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:26; (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:27; (г) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:28; (д) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:29; і (е) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30.

20 Одним з об'єктів винаходу є антитіло, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VH, які вибрані з (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:25; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:26; і (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:27. В одному з варіантів здійснення винаходу, антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:27. В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:25, і HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30. В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:27, HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30, і HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:26. В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло містить (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:25; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:26; і (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:27.

35 Іншим об'єктом винаходу є антитіло, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VL, які вибрані з (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:28; (б) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:29; і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30. В одному з варіантів здійснення винаходу, антитіло містить (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:28; (б) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:29; і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30.

40 В іншому об'єкті винаходу антитіло, запропоноване у винаході, містить (а) VH-домен, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VH, які вибрані з (I) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:25, (II) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:26, і (III) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:27; і (б) VL-домен, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VL, які вибрані з (I) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:28, (II) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:29, і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30.

50 Іншим об'єктом винаходу є антитіло, яке містить (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:25; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:26; (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:27; (г) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:28; (д) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:29; і (е) HVR-L3 що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:30.

55 В будь-якому з зазначених вище варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3 є людським або гуманізованим. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3 містить HVR, зазначені в будь-якому з представлених вище варіантів здійснення винаходу, і додатково містить акцепторну людську каркасну ділянку, наприклад, каркасну ділянку людського імуноглобуліну або людську консенсусну каркасну ділянку.

60

В іншому об'єкті винаходу антитіло до LAG3 містить послідовність варіабельного домену важкого ланцюга (VH), ідентичну принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % амінокислотній послідовності SEQ ID NO:31. У деяких варіантах здійснення винаходу послідовність VH, ідентична принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), інсерції або делеції у порівнянні з референс-послідовністю, але антитіло до LAG3, що містить цю послідовність, зберігає здатність до зв'язування з LAG3. У деяких варіантах здійснення винаходу в цілому від 1 до 10 амінокислот замінені, вбудовані і/або видалені шляхом делеції в SEQ ID NO:31. У деяких варіантах здійснення винаходу заміни, інсерції або делеції мають місце в областях, що знаходяться поза HVR (тобто в FR). Необов'язково антитіло до LAG3 містить послідовність VH, представлену в SEQ ID NO:31, включаючи пост-трансляційні модифікації зазначеній послідовності. В конкретних варіантах здійснення винаходу VH містить одну, дві або три HVR, які вибрані з: (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:25; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:26, і (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:27.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло до LAG3, де антитіло містить варіабельний домен легкого ланцюга (VL), послідовність якого ідентична принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % амінокислотній послідовності SEQ ID NO:32. У деяких варіантах здійснення винаходу послідовність VL, ідентична принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), інсерції або делеції у порівнянні з референс-послідовністю, але антитіло до LAG3, що містить цю послідовність, зберігає здатність до зв'язування з LAG3. У деяких варіантах здійснення винаходу в цілому від 1 до 10 амінокислот замінені, вбудовані і/або видалені шляхом делеції в SEQ ID NO:32. У деяких варіантах здійснення винаходу заміни, інсерції або делеції мають місце в областях, що знаходяться поза HVR (тобто в FR). Необов'язково антитіло до LAG3 містить послідовність VL, представлену в SEQ ID NO:32, включаючи пост-трансляційні модифікації зазначеній послідовності. В конкретних варіантах здійснення винаходу VL містить одну, дві або три HVR, яка(-и) вибрана(-и) з (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:28; (б) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:29; і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло до LAG3, де антитіло містить VH, зазначену в будь-якому з варіантів здійснення винаходу, представлених вище. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло містить послідовності VH і VL SEQ ID NO:31 і SEQ ID NO:32 відповідно, включаючи пост-трансляційні модифікації цих послідовностей.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло, яке зв'язується з тим же самим епітопом, що і антитіло до LAG3, представлене в даному описі. Наприклад, у деяких варіантах здійснення винаходу запропоновано антитіло, яке зв'язується з тим же самим епітопом, що і антитіло до LAG3, що містить послідовність VH, представлену в SEQ ID NO:31, і послідовність VL, представлену в SEQ ID NO:32. У деяких варіантах здійснення винаходу запропоновано антитіло, яке зв'язується з епітопом з кластеру епітопів E3 в LAG3 (див. приклад 2).

Іншим об'єктом винаходу є антитіло до LAG3, що містить принаймні одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, які вибрані з (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34; (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35; (г) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36; (д) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37; і (е) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VH, які вибрані з послідовностей (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34; і (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35. В іншому варіанті здійснення винаходу, антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33, і HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38. В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35, HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38, і HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34. В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло містить (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34; і (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три

послідовності HVR VL, які вибрані з (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (б) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37; і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло містить (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36; (б) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37; і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38.

В іншому об'єкті винаходу антитіло, запропоноване у винаході, містить (а) VH-домен, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VH, які вибрані з (I) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33, (II) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34, і (III) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:35; і (б) VL-домен, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності HVR VL, які вибрані з (I) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36, (II) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37, і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло, яке містить (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33; (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34; (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35; (г) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36; (д) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37; і (е) HVR-L3 що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:38.

В будь-якому з зазначених вище варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3 є людським або гуманізованим. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3 містить HVR, зазначені в будь-якому з представлених вище варіантів здійснення винаходу, і додатково містить акцепторну людську каркасну ділянку, наприклад, каркасну ділянку людського імуноглобуліну або людську консенсусну каркасну ділянку.

В іншому об'єкті винаходу антитіло до LAG3 містить послідовність варіабельного домену важкого ланцюга (VH), ідентичну принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % амінокислотній послідовності SEQ ID NO:39. У деяких варіантах здійснення винаходу послідовність VH, ідентична принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), інсерції або делеції у порівнянні з референс-послідовністю, але антитіло до LAG3, що містить цю послідовність, зберігає здатність до зв'язування з LAG3. У деяких варіантах здійснення винаходу в цілому від 1 до 10 амінокислот замінені, вбудовані і/або видалені шляхом делеції в SEQ ID NO:39. У деяких варіантах здійснення винаходу заміни, інсерції або делеції мають місце в областях, що знаходяться поза HVR (тобто в FR). Необов'язково антитіло до LAG3 містить послідовність VH, представлену в SEQ ID NO:39, включаючи пост-трансляційні модифікації зазначеній послідовності. В конкретних варіантах здійснення винаходу VH містить одну, дві або три HVR, які вибрані з: (а) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33, (б) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34, і (в) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35.

В іншому об'єкті винаходу антитіло до LAG3 містить послідовність варіабельного домену легкого ланцюга (VL), ідентичну принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % амінокислотній послідовності (VL), ідентичну принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % амінокислотній послідовності SEQ ID NO:40. У деяких варіантах здійснення винаходу послідовність VL, ідентична принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), інсерції або делеції у порівнянні з референс-послідовністю, але антитіло до LAG3, що містить цю послідовність, зберігає здатність до зв'язування з LAG3. У деяких варіантах здійснення винаходу в цілому від 1 до 10 амінокислот замінені, вбудовані і/або видалені шляхом делеції в SEQ ID NO:40. У деяких варіантах здійснення винаходу заміни, інсерції або делеції мають місце в областях, що знаходяться поза HVR (тобто в FR). Необов'язково антитіло до LAG3 містить послідовність VL, представлену в SEQ ID NO:40, включаючи пост-трансляційні модифікації зазначеній послідовності. В конкретних варіантах здійснення винаходу VH містить одну, дві або три HVR, які вибрані з (а) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36; (б) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37; і (в) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло до LAG3, де антитіло містить VH, зазначену в будь-якому з варіантів здійснення винаходу, представлених вище, і VL, зазначену в будь-якому з варіантів здійснення винаходу, представлених вище. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло містить послідовності VH і VL SEQ ID NO:39 і SEQ ID NO:40 відповідно, включаючи

пост-трансляційні модифікації цих послідовностей.

В іншому об'єкті винаходу антитіло до LAG3, представлене в будь-якому з зазначених вище варіантів здійснення винаходу, являє собою моноклональне антитіло, включаючи химерне, гуманізоване або людське антитіло. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3 являє собою фрагмент антитіла, наприклад, Fv-, Fab-, Fab'-, scFv-фрагмент, димерне антитіло (діабоді) або F(ab'')₂-фрагмент. В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло являє собою повнорозмірне антитіло, наприклад, з замінами L234A, L235A і P329G (LALA-PG) в Fc-області, яка походить з Fc-області людського IgG1 (див., наприклад, WO 2012/130831 A1).

В іншому об'єкті винаходу антитіло до LAG3, представлене в будь-якому з зазначених вище варіантів здійснення винаходу, може мати індивідуально або в комбінації будь-яку з характерних особливостей, описаних нижче в розділах 1-7:

1. Афінність антитіла

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, представлене в даному описі, має константу дисоціації (Kd), що становить $\leq 1\text{мкМ}$, $\leq 100\text{нМ}$, $\leq 10\text{нММ}$, $\leq 1\text{нМ}$, $\leq 0,1\text{нМ}$, $\leq 0,01\text{нМ}$ або $\leq 0,001\text{нМ}$ (наприклад, 10^{-8}М або менше, наприклад, від 10^{-8}М до 10^{-13}М , наприклад, від 10^{-9}М до 10^{-13}М).

В одному з варіантів здійснення винаходу величину Kd вимірюють за допомогою аналізу зв'язування антигена, що несе радіоактивну мітку (RIA). В одному з варіантів здійснення винаходу RIA здійснюють з використанням версії Fab антитіла, що становить інтерес, і його антигена. Наприклад, афінність зв'язування Fab-фрагментів з антигеном в розчині вимірюють шляхом урівноваження Fab мінімальною концентрацією міченого ¹²⁵I антигена за присутності титрованих серій неміченого антигена і наступного захвату зв'язаного антигена антитілом до Fab, іммобілізованим на планшеті (див., наприклад, Chen і ін., J. Mol. Biol. 293, 1999, стор. 865-881). Для створення умов для аналізу багатолункові планшети MICROTITER® (фірма Thermo Scientific) сенсibiliзують протягом ночі з використанням 5 мкг/мл захоплюючого антитіла до Fab (фірма Cappel Labs) в 50мМ карбонату натрію (рН 9,6) і потім блокують за допомогою 2 % (мас./об) бичачого сироваткового альбуміну в 3ФР протягом 2-5 год. при кімнатній температурі (приблизно 23 °С). В планшеті без адсорбуючого покриття (фірма Nunc, № 269620) змішують 100пМ або 26пМ [¹²⁵I]-антиген з серійними розведеннями Fab, що становить інтерес (наприклад, застосовуваного для оцінювання антитіла до VEGF, Fab-12, описаного у Presta і ін., Cancer Res. 57, 1997, стор. 4593-4599). Потім Fab, що становить інтерес, інкубують протягом ночі; однак інкубацію можна продовжувати і протягом більш тривалого періоду часу (наприклад, протягом приблизно 65 год.) для того, щоби гарантувати досягнення рівноваги. Після цього суміші переносять в планшет для захвату для інкубації при кімнатній температурі (наприклад, протягом 1 год.). Потім розчин видаляють, і планшет промивають вісім разів 0,1 %-вим розчином полісорбату 20 (TWEEN-20®) в 3ФР. Після висушування планшетів додають по 150 мкл/лунку сцинтиляційної рідини (MICROSCINT-20™; фірма Packard) і планшети аналізують з використанням гамма-лічильника TOPCOUNT™ (фірма Packard) протягом 10 хв. Для застосування в аналізі зв'язування в умовах конкуренції відбирають концентрації кожного Fab, що забезпечують рівень зв'язування, який є меншим або дорівнює 20 % від максимального.

Відповідно до іншого варіанта здійснення винаходу величину Kd вимірюють за допомогою аналізу зв'язування методом поверхневого плазмонного резонансу BIACORE®. Наприклад, здійснюють аналіз за допомогою пристрою BIACORE®-2000 або BIACORE®-3000 (фірма BIAcore Inc., Піскатавей, шт. Нью-Джерсі) при 25 °С з використанням CM5-чипів з іммобілізованим антигеном при рівні іммобілізації, що відповідає ~10 одиницям відповіді (RU). В одному з варіантів здійснення винаходу біосенсорні чіпи з карбоксиметильованого декстрану (CM5, фірма BIACORE, Inc.) активують гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Антиген розводять з використанням 10мМ ацетату натрію, рН 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2мкМ) перед здійсненням ін'єкції при швидкості потоку 5 мкл/хв до досягнення приблизно 10 одиниць відповіді (RU) зв'язаного білка. Після ін'єкції антигена ін'єктують 1М етаноламін для блокування груп, які не прореагували. Для кінетичних вимірювань ін'єктують двократні серійні розведення Fab (від 0,78 до 500нМ) в 3ФР з 0,05 % поверхнево-активної речовини полісорбату 20 (TWEEN-20™) (в 3ФРТ) при 25 °С при швидкості потоку приблизно 25 мкл/хв. Швидкості реакції асоціації (kon) і швидкості реакції дисоціації (koff) розраховують з використанням простої моделі зв'язування 1:1 Ленгмюра (програма оцінювання BIACORE®, версія 3.2) шляхом одночасної апроксимації сенсограм асоціації і дисоціації. Константу рівноваги реакції дисоціації (Kd) розраховують як відношення koff/kon (див., наприклад, Chen і ін., J. Mol. Biol. 293, 1999, стор. 865-881). Якщо за даними зазначеного вище аналізу методом поверхневого плазмонного резонансу швидкість асоціації перевищує $10^6\text{ М}^{-1}\text{ с}^{-1}$, то швидкість асоціації можна визначати за

допомогою методу гасіння флуоресценції, в якому вимірюють збільшення або зменшення інтенсивності випромінювання флуоресценції (довжина хвилі збудження = 295 нм; довжина хвилі випромінювання = 340 нм, смуга пропускання 16 нм) при 25°C з використанням 20нм антитіла до антигену (Fab-форма) в ЗФР, рН 7,2, за присутності зростаючих концентрацій антигена, яке вимірюють за допомогою спектрофотометра, такого як спектрофотометр з пристроєм для зупинки потоку (фірма Aviv Instruments) або спектрофотометр SLM-AMINCO™ 8000-серії (фірма ThermoSpectronic) з перемішуваною кюветою.

2. Фрагменти антитіл

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, зазначене в даному описі, являє собою фрагмент антитіла. Поняття "фрагмент антитіла" відноситься до молекули, відмінної від інтактного антитіла, яка містить частину інтактного антитіла, яка зберігає здатність до специфічного зв'язування з антигеном. Фрагменти антитіл включають (але, не обмежуючись тільки ними) Fab, Fab², Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, одноланцюговий Fab (scFab); одноланцюгові варіабельні фрагменти (scFv) і однодоменні антитіла (dAb). Огляд деяких фрагментів антитіл представлений у Holliger і Hudson, *Nature Biotechnology* 23, 2005, стор. 1126-1136.

В одному з варіантів здійснення винаходу фрагмент антитіла являє собою Fab-, Fab'-, Fab'-SH- або F(ab')₂-фрагмент, насамперед Fab-фрагмент. Розщеплення інтактних антитіл папаїном приводить до утворення двох ідентичних антигензв'язуючих фрагментів, які називають "Fab"-фрагментами, кожний з яких містить варіабельні домени важкого і легкого ланцюгів, а також константний домен легкого ланцюга і перший константний домен (CH1) важкого ланцюга. Таким чином, в контексті даного опису поняття "Fab-фрагмент" відноситься до фрагменту антитіла, що містить фрагмент легкого ланцюга, який містить VL-домен і константний домен легкого ланцюга (CL), і VH-домен і перший константний домен (CH1) важкого ланцюга. Fab'-фрагменти відрізняються від Fab-фрагментів додаванням залишків на карбоксильний кінець CH1-домени важкого ланцюга, включаючи один або декілька залишків цистеїну з шарнірної області антитіла. Fab'-SH позначає Fab'-фрагменти, в яких залишок(-ки) цистеїну константних доменів несе(-уть) вільну тиольну групу. Обробка пепсином дозволяє одержувати F(ab')₂-фрагменти, які мають два антигензв'язуючих сайти (два Fab-фрагменти) і частину Fc-області. Обговорення Fab- і F(ab')₂-фрагментів, які містять залишки епітопа, що зв'яже рецептор порятунку, і мають збільшеним часом напівжиття, представлено в U.S. № 5869046.

В іншому варіанті здійснення винаходу фрагмент антитіла являє собою димерне антитіло (діабоді), тримерне антитіло (триабоді) або чотиримерне антитіло (тетрабоді). Діабоді являють собою фрагменти антитіл з двома антигензв'язуючими сайтами, які можуть бути двовалентними або біспецифічними (див., наприклад, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson і ін., *Nat. Med.* 9, 2003, стор. 129-134; і Hollinger і ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, стор. 6444-6448). Триаоді та тетраоді описані також у Hudson і ін., *Nat. Med.* 9, 2003, стор. 129-134.

В іншому варіанті здійснення винаходу фрагмент антитіла являє собою одноланцюговий Fab-фрагмент. "Одноланцюговий Fab-фрагмент" або "scFab" являє собою поліпептид, що складається з варіабельного домену важкого ланцюга (VH) антитіла, константного домену 1 (CH1) антитіла, варіабельного домену легкого ланцюга (VL) антитіла, константного домену легкого ланцюга (CL) антитіла та лінкера, в якому зазначені домени антитіла і зазначений лінкер мають один з наступних порядків розташування у напрямку від N-кінця до C-кінця: а) VH-CH1-лінкер-VL-CL, б) VL-CL-лінкер-VH-CH1, в) VH-CL-лінкер-VL-CH1 або г) VL-CH1-лінкер-VH-CL; і в якому зазначений лінкер являє собою поліпептид, що складається з принаймні з 30 амінокислот, переважно приблизно від 32 до 50 амінокислот. Зазначені одноланцюгові Fab-фрагменти стабілізують за допомогою дисульфідного зв'язку, що зустрічається в природних умовах, між CL-доменом і CH1-доменом. Крім того, зазначені одноланцюгові молекули Fab можна додатково стабілізувати за допомогою створення міжланцюгових дисульфідних зв'язків шляхом вбудовування залишків цистеїну (наприклад, в положення 44 в варіабельному важкому ланцюзі і в положення 100 в варіабельному легкому ланцюзі відповідно до нумерації Кебота).

В іншому варіанті здійснення винаходу фрагмент антитіла являє собою одноланцюговий варіабельний фрагмент (scFv). "Одноланцюговий варіабельний фрагмент (scFv)" являє собою злитий білок варіабельних областей важкого (V_H) і легкого (V_L) ланцюгів антитіла, з'єднаних коротким лінкером. Зокрема, лінкер являє собою короткий поліпептид, який містить від 10 до приблизно 25 амінокислот, і, як правило, він являє собою багатий гліцином лінкер для надання гнучкості, а також багатий на серин або треонін лінкер для забезпечення розчинності, і він може з'єднувати або N-кінець V_H з C-кінцем V_L, або навпаки. Зазначений білок зберігає специфічність вихідного антитіла, незважаючи на видалення константних областей і інтродукцію лінкера. Огляд scFv-фрагментів приведений, наприклад, у Pluckthün, в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, т. 113, під ред. Rosenberg і Moore, вид-во Springer-Verlag, New York, 1994, стор. 269-

315; див. також WO 93/16185; і U.S. № 5571894 і 5587458.

В іншому варіанті здійснення винаходу фрагмент антитіла являє собою однодомне антитіло. Однодомні антитіла являють собою фрагменти антитіл, що містять весь варіабельний домен важкого ланцюга або його частину або весь варіабельний домен легкого ланцюга антитіла або його частину. У деяких варіантах здійснення винаходу однодомне антитіло являє собою людське однодомне антитіло (фірма Domantis, Inc., Валтам, шт. Массачусетс; див., наприклад, US № 6248516 B1).

Фрагменти антитіла можна створювати за допомогою різних методів, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) протеолітичне розщеплення інтактного антитіла, а також одержання з використанням рекомбінантних клітин-хазяїв (наприклад, *E. coli* або фага), представлених в даному описі.

3. Химерні і гуманізовані антитіла

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, зазначене в даному описі, являє собою химерне антитіло. Деякі химерні антитіла описані, наприклад, в U.S. № 4816567; і у Morrison і ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1984, стор. 6851-6855. В одному прикладі химерне антитіло містить нелюдську варіабельну область (наприклад, варіабельну область, одержану з антитіла миші, щура, хом'яка, кролика або примату крім людини, такого як мавпа), і людську константну область. В іншому прикладі химерне антитіло являє собою антитіло "перемкненого класу", клас або підклас якого був змінений у порівнянні з батьківським антитілом. Химерні антитіла включають їх антигензв'язуючі фрагменти.

У деяких варіантах здійснення винаходу химерне антитіло являє собою гуманізоване антитіло. Як правило, нелюдське антитіло гуманізують для зниження імуногенності для людини, зберігаючи при цьому специфічність і афінність батьківського нелюдського антитіла. Як правило, гуманізоване антитіло містить один або декілька варіабельних доменів, в яких HVR, наприклад, CDR, (або їх частини) одержують з нелюдського антитіла, а FR (або їх частини) одержують з послідовностей людського антитіла. Гуманізоване антитіло необов'язково може містити також принаймні частину людської константної області. У деяких варіантах здійснення винаходу деякі залишки FR в гуманізованому антитілі замінені на відповідні залишки з нелюдського антитіла (наприклад, антитіла, з якого одержують залишки HVR), наприклад, для відновлення або підвищення специфічності або афінності антитіла.

Огляд гуманізованих антитіл і методів їх одержання представлений, наприклад, у Almagro і Fransson, Front Biosci 13, 12008, стор. 1619-1633, і вони описані також, наприклад, у Riechmann і ін., Nature 332, 1988, стор. 323-329; Queen і ін., Proc Natl Acad Sci USA 86, 1989, стор. 10029-10033; US, №№ 5821337, 7527791, 6982321 і 7087409; Kashmiri і ін., Methods 36, 2005, стор. 25-34) (опис трансплантації ділянок SDR, що визначають специфічність); Padlan, Mol Immunol 28, 1991, стор. 489-498 (опис методу зміни поверхні ("повторне покриття")); Dall'Acqua і ін., Methods 36, 2005, стор. 43-60 (опис "перестановки FR") і Osbourn і ін., Methods 36, 2005, стор. 61-68, і Klimka і ін., Br J Cancer 83, 2000, стор. 252-260 (опис підходу на основі "цілеспрямованої селекції" для перестановки FR).

Людські каркасні ділянки, які можна застосовувати для гуманізації, включають (але, не обмежуючись тільки ними): каркасні ділянки, вибрані на основі методу "найкращого підбору" (див., наприклад, Sims і ін., J. Immunol. 151, 1993, с. 2296); каркасні ділянки, одержані з консенсусної послідовності людських антитіл конкретної підгрупи варіабельних областей легких або важких ланцюгів (див., наприклад, Carter і ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1992, с. 4285; і Presta і ін., J. Immunol., 151, 1993, с. 2623); людські зрілі (піддані соматичній мутації) каркасні ділянки або каркасні ділянки людської зародкової лінії (див., наприклад, Almagro і Fransson, Front. Biosci. 13, 2008, стор.1619-1633); і каркасні ділянки, одержані в результаті скринінгу FR-бібліотек (див., наприклад, Vasa і ін., J. Biol. Chem. 272, 1997, стор. 10678-10684) і Rosok і ін., J. Biol. Chem. 271, 1996, стор. 22611-22618).

4. Людські антитіла

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, зазначене в даному описі, являє собою химерне антитіло. Людські антитіла можна одержувати за допомогою різних методів, відомих в даній галузі. Людські антитіла в цілому описані у van Dijk і van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5, 2001, стор. 368-374 і у Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20, 2008, стор. 450-459.

Людські антитіла можна одержувати шляхом введення імуногена трансгенній тварині, яка модифікована таким чином, що продукує інтактні людські антитіла або інтактні антитіла з людськими варіабельними областями у відповідь на контрольне зараження антигеном. Зазначені тварини, як правило, містять всі або частину локусів людського імуноглобуліну, якими замінені ендогенні локуси імуноглобуліну, або які присутні поза хромосом або інтегровані довільно в хромосоми тварини. У таких трансгенних мишей ендогенні локуси імуноглобуліну, як

правило, інактивовані. Огляд методів одержання людських антитіл в трансгенних тваринах див. у Lonberg, *Nat. Biotech.* 23, 2005, стор. 1117-1125. Вони описані також, наприклад, в US №№ 6075181 і 6150584, в яких описана технологія XENOMOUSE™; US № 5770429, в якому описана технологія HuMab®; US 7041870, в якому описана технологія K-M MOUSE® і в публікації заявки на патент США № 2007/0061900, в якому описана технологія VelociMouse®. Людські варіабельні області інтактних антитіл, одержані в таких тваринах, можна додатково модифікувати, наприклад, об'єднуючи з іншою людською константною областю.

Людські антитіла можна одержувати також за допомогою методів, заснованих на застосуванні гібридом. Описані клітинні лінії людської мієломи і мишачої-людської гетеромієломи, призначені для одержання людських моноклональних антитіл (див., наприклад, Kozbor, *J. Immunol.*, 133, 1984, с. 3001; Brodeur і ін., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 1987, стор. 51-63 (вид-во Marcel Dekker, Inc., New York); і Voerner і ін., *J. Immunol.*, 147, 1991, с. 86). Людські антитіла, створені за допомогою технології, заснованої на застосуванні людських В-клітинних гібридом, описані також у Li і ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 2006, стор. 3557-3562. Додаткові методи являють собою методи, описані, наприклад, в US № 7189826 (опис одержання моноклональних людських антитіл IgM-класу з клітинних ліній гібридом) і у Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4), 2006, стор. 265-268 (опис людських-людських гібридом). Технологія, заснована на застосуванні людських гібридом (Trioma-технологія), описана також у Vollmers і Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3), 2005, стор. 927-937 і Vollmers і Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3), 2005, стор. 185-191.

Людські антитіла можна створювати також шляхом виділення послідовностей варіабельного домену клону Fv, відібраних з одержаних з людини фагових дисплейних бібліотек. Потім такі послідовності варіабельного домену можна об'єднувати з необхідним людським константним доменом. Методи відбору людських антитіл з бібліотек антитіл описані нижче.

5. Антитіла, одержані з бібліотек

Антитіла, застосовувані відповідно до винаходу, можна виділяти шляхом скринінгу комбінаторних бібліотек щодо антитіл з необхідною(-ими) активністю або видами активності. Огляд методів скринінгу комбінаторних бібліотек представлений, наприклад, у Lerner і ін. в *Nature Reviews* 16, 2016, стор. 498-508. Наприклад, в даній галузі відомі різні методи створення фагових дисплейних бібліотек і скринінгу зазначених бібліотек щодо антитіл, що необхідні характеристики зв'язування. Огляд таких методів представлений, наприклад, у Frenzel і ін. в *mAbs* 8, 2016, стор. 1177-1194; Bazan і ін. в *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 8, 2012, стор. 1817-1828 і Zhao і ін., в *Critical Reviews in Biotechnology* 36, 2016, стор. 276-289, а також у Hoogenboom і ін. в *Methods in Molecular Biology*, під ред. O'Brien і ін., вид-во Human Press, Totowa, 178, 2001, стор. 1-37 і у Marks і Bradbury в *Methods in Molecular Biology*, під ред. Lo, вид-во Human Press, 248, 2003, стор. 161-175.

При здійсненні деяких методів фагового дисплея популяції VH- і VL-генів клонують окремо за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і рекомбінують довільно в фагових бібліотеках, які потім піддають скринінгу щодо антигензв'язуючого фага відповідно до методу, описаного у Winter і ін., *Ann. Rev. Immunol.*, 12, 1994, стор. 433-455. Фаг, як правило, експонує фрагменти антитіл або у вигляді одноланцюгових Fv-фрагментів (scFv), або у вигляді Fab-фрагментів. Бібліотеки, одержані з імунізованих джерел, включають антитіла, що мають високу афінність до імуногена, при цьому відсутня необхідність в створенні гібридом. Альтернативно цьому, можна клонувати необроблену ("наївну") популяцію (наприклад, з організму людини), одержуючи одне джерело антитіл до широкого спектра чужих, а також своїх антигенів без будь-якої імунізації, що описано у Griffiths і ін., *EMBO J*, 12, 1993, стор. 725-734. І, нарешті, "наївні" бібліотеки можна одержувати також методами синтезу шляхом клонування неперегрупованих сегментів V-гена зі стовбурових клітин і за допомогою ПЛР-праймерів, які містять випадкову послідовність, для кодування CDR3-ділянок, що мають високу варіабельність, і для здійснення перегруповання *in vitro* відповідно до методу, описаного у Hoogenboom і Winter, *J. Mol. Biol.*, 227, 1992, стор. 381-388. Фагові бібліотеки людських антитіл описані, наприклад, в наступних патентних публікаціях: US №№ 5750373; 7985840; 7785903 і 8679490, а також в публікаціях патентів США №№. 2005/0079574, 2007/0117126, 2007/0237764 і 2007/0292936.

Інші приклади відомих в даній галузі методів скринінгу комбінаторних бібліотек щодо антитіл з необхідною(-ими) активністю або видами активності включають рибосомний і мРНК-дисплей, а також методи дисплея і селекції антитіл на бактеріях, клітинах ссавців, клітинах комах або клітинах дріжджів. Огляд методів дисплея на поверхні дріжджів представлений, наприклад, у Scholler і ін. в *Methods in Molecular Biology* 503, 2012, стор. 135-156 і у Cherf і ін. в *Methods in Molecular Biology* 1319, 2015, стор. 155-175, а також у Zhao і ін., в *Methods in Molecular Biology*

889, 2012, стор. 73-84. Методи рибосомного дисплея описані, наприклад, у He і ін., в *Nucleic Acids Research* 25, 1997, стор. 5132-5134 і у Hanes і ін., в *PNAS* 94, 1997, стор. 4937-4942.

Антитіла або фрагменти антитіл, виділені з бібліотек людських антитіл, в контексті даного опису розглядаються як людські антитіла або фрагменти людських антитіл.

5 6. Мультиспецифічні антитіла

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, зазначене в даному описі, являє собою мультиспецифічне антитіло, наприклад, біспецифічне антитіло. Мультиспецифічні антитіла являють собою моноклональні антитіла, які мають специфічності, що зв'язуються принаймні з двома різними сайтами, тобто різними епітопами на різних антигенах або різними епітопами на одному і тому ж антигені. У деяких варіантах здійснення винаходу мультиспецифічне антитіло має три або більшу кількість зв'язуючих специфічностей. У деяких варіантах здійснення винаходу одна з специфічностей зв'язується з LAG3, а інші (дві або більша кількість) специфічностей зв'язуються з будь-яким іншим антигеном. У деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися з двома (або з більшою кількістю) різними епітопів LAG3. Мультиспецифічні (наприклад, біспецифічні) антитіла можна застосовувати також для локалізації цитотоксичних агентів або клітин в клітинах, які експресують LAG3. Мультиспецифічні антитіла можна одержувати у вигляді повнорозмірних антитіл або фрагментів антитіл.

20 Методики створення мультиспецифічних антитіл включають (але, не обмежуючись тільки ними) рекомбінантну спільну експресію двох пар важких ланцюгів-легких ланцюгів імуноглобулінів, що мають різні специфічності (див. Milstein і Cuello, *Nature* 305, 1983, стор. 537), і технологію конструювання "knob-in-hole" ("виступ-у западину") (див., наприклад, US № 5731168 і Atwell і ін., *J. Mol. Biol.* 270, 1997, с. 26). Мультиспецифічні антитіла можна одержувати також шляхом створення регульованих електростатичними силами впливів для одержання молекул антитіла з гетеродимерними Fc (див., наприклад, WO 2009/089004); перехресного зв'язування двох або більшої кількості антитіл або фрагментів (див., наприклад, US № 4676980 і Brennan і ін., *Science* 229, 1985, стор. 81-83); застосування лейцинових блискавок для одержання біспецифічних антитіл (див., наприклад, Kostelny і ін., *J. Immunol.* 148(5), 1992, стор. 1547-1553 і WO 2011/034605); застосування технології загального легкого ланцюга для подолання проблеми, пов'язаної з помилковим спарюванням легких ланцюгів (див., наприклад, WO 98/50431); застосування технології "діабоді" для створення фрагментів біспецифічних антитіл (див., наприклад, Holliger і ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, стор. 6444-6448); і застосування димерів одноланцюгових Fv (sFv) (див., наприклад, Gruber і ін., *J. Immunol.* 152, 1994, с. 5368); і одержання триспецифічних антитіл відповідно до методу, описаного, 35 наприклад, у Tutt і ін., *J. Immunol.* 147, 1991, с. 60).

Під обсяг даного винаходу підпадають також сконструйовані антитіла з трьома або більшою кількістю антигензв'язуючих сайтів, включаючи, наприклад, "антитіла-восьминоги" або DVD-Ig (див., наприклад, WO 2001/77342 і WO 2008/024715). Інші приклади мультиспецифічних антитіл з трьома або більшою кількістю антигензв'язуючих сайтів описані в WO 2010/115589, WO 40 2010/112193, WO 2010/136172, WO 2010/145792 і WO 2013/026831. Біспецифічне антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент може включати також "Fab подвійної дії" або "DAF", що містить антигензв'язуючий сайт, який зв'язується з LAG3, а також з іншим антигеном або двома різними епітопами LAG3 (див., наприклад, US 2008/0069820 і WO 2015/095539).

Мультиспецифічні антитіла можуть знаходитися також в асиметричній формі з кросовером доменів в одній або декількох зв'язуючих плечах однієї і тієї ж антигенної специфічності, тобто в результаті обміну VH/VL-доменів (див., наприклад, WO 2009/080252 і WO 2015/150447), CH1/CL-доменів (див., наприклад, WO 2009/080253) або повних Fab-плечей (див., наприклад, WO 2009/080251, WO 2016/016299, див. також Schaefer і ін., *PNAS*, 108, 2011, стор. 1187-1191 і Klein і ін., *MAbs* 8, 2016, стор. 1010-1020). В одному з варіантів здійснення винаходу мультиспецифічне антитіло містить крос-Fab-фрагмент. Поняття "крос-Fab-фрагмент" або "xFab-фрагмент" або "кросовер-Fab-фрагмент" відноситься до Fab-фрагменту, в якому обмінні або варіабельні області, або константні області важкого і легкого ланцюга. Крос-Fab-фрагмент містить поліпептидний ланцюг, що складається з варіабельної області легкого ланцюга (VL) і константної області важкого ланцюга (CH1), і поліпептидний ланцюг, що складається з варіабельної області важкого ланцюга (VH) і константної області легкого ланцюга (CL). Асиметричні Fab-плечі можна конструювати також шляхом інтродукції мутацій заряджених або незаряджених амінокислот в поверхню поділу доменів для правильного спарювання Fab (див., наприклад, WO 2016/172485).

В даній галузі для мультиспецифічних антитіл відомі різні інші формати молекул, і вони 60 включені до даного опису (див., наприклад, Spiess і ін., *Mol Immunol* 67, 2015, стор. 95-106).

7. Варіанти антитіл

У деяких варіантах здійснення винаходу розглядаються варіанти амінокислотних послідовностей антитіл, представлених в даному описі. Наприклад, може виявитися бажаним підвищувати афінність зв'язування і/або інші біологічні властивості антитіла. Варіанти амінокислотних послідовностей антитіла можна одержувати шляхом інтродукції відповідних модифікацій в нуклеотидну послідовність, що кодує антитіло, або шляхом пептидного синтезу. Зазначені модифікації включають, наприклад, делеції і/або інсерції, і/або заміни залишків в амінокислотних послідовностях антитіла. Для одержання кінцевої конструкції можна використовувати будь-яку комбінацію делецій, інсерцій і замін, за умови, що кінцева конструкція має необхідні характеристики, наприклад, здатність зв'язуватися з антигеном.

а) Варіанти, одержані шляхом заміни, інсерції і делеції

У деяких варіантах здійснення винаходу запропоновані варіанти антитіл, що мають одну або декілька амінокислотних замін. Сайти, що становлять інтерес, для заміщального мутагенезу включають HVR і FR. Консервативні заміни представлені в таблиці 1 під заголовком "кращі заміни". Більш загальні заміни представлені в таблиці 1 під заголовком "Наведені як приклад заміни" і додатково описані нижче з посиланням на класи бічних ланцюгів амінокислот. Амінокислотні заміни можна інтродукувати в антитіло, що являє інтерес, і продукти піддавати скринінгу щодо необхідної активності, наприклад, збереження/підвищення здатності до зв'язування антигена, зниженої імуногенності або покращеної ADCC або CDC.

Таблиця 1

Вихідний залишок	Наведені як приклад заміни	Кращі заміни
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцін	Leu
Leu (L)	норлейцін; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцін	Leu

Амінокислоти можна групувати на основі загальних властивостей бічних ланцюгів наступним чином:

- (1) гідрофобні: норлейцін, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотні: Asp, Glu;
- (4) основні: His, Lys, Arg;
- (5) залишки, які впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro;
- (6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Під неконсервативними замінами мають на увазі заміну представника одного з зазначених класів на представника з іншого класу.

Один з типів одержаного шляхом замін варіанта включає заміну одного або декількох залишків в гіперваріабельній ділянці батьківського антитіла (наприклад, гуманізованого або людського антитіла). Як правило, одержаний(-і) варіант(-и), відібраний(-і) для подальшого дослідження, повинен(-ні) мати модифікації (наприклад, покращання) деяких біологічних властивостей (наприклад, підвищену афінність, знижену імуногенність) у порівнянні з

батьківським антитілом і/або повинні практично зберігати деякі біологічні властивості батьківського антитіла. Прикладом одержаного шляхом заміни варіанта є антитіло з дозрілою афінністю, яке можна легко створювати, наприклад, з використанням представлених в даному описі методів дозрівання афінності на основі фагового дисплея. В цілому, метод полягає в тому, що піддають мутації один або декілька залишків HVR і варіанти антитіл експонують на фагі і піддають скринінгу щодо конкретної біологічної активності (наприклад, щодо афінності зв'язування).

Зміни (наприклад, заміни) можна здійснювати в HVR, наприклад, для покращання афінності антитіла. Такі зміни можна здійснювати в "гарячих точках" HVR, тобто залишках, що кодується кодонами, які з високою частотою піддаються мутації в процесі соматичного дозрівання (див., наприклад, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207, 2008, стор. 179-196), і/або залишках, що контактують з антигеном, при цьому одержані в результаті варіанти VH або VL тестують щодо афінності зв'язування. Дозрівання афінності шляхом конструювання і повторного відбору з вторинних бібліотек описано, наприклад, у Hoogenboom і ін. в *Methods in Molecular Biology* під ред. O'Brien і ін., вид-во Humana Press, Totowa, NJ, 178, 2001, стор. 1-37). У деяких варіантах здійснення дозрівання афінності, в варіабельні гени, вибрані для дозрівання, інтродують різноманітність за допомогою різних методів (таких, наприклад, як ПЛР зниженої точності, перестановка ланцюга або олігонуклеотид-спрямований мутагенез). Потім створюють вторинну бібліотеку. Після цього здійснюють скринінг бібліотеки для ідентифікації будь-яких варіантів антитіл з необхідною афінністю. В іншому методі для інтродукції різноманітності застосовують HVR-спрямовані підходи, в яких рандомізують декілька залишків HVR (наприклад, одночасно 4-6 залишків). Залишки HVR, які приймають участь у зв'язуванні антигена, можна специфічно ідентифікувати, наприклад, з використанням аланін-скануючого мутагенезу або моделювання. Найчастіше мішенню є CDR-H3 і CDR-L3.

У деяких варіантах здійснення винаходу заміни, інсерції або делеції можуть зачіпати один або декілька HVR, якщо зазначені зміни не знижують істотно здатність антитіла зв'язуватися з антигеном. Наприклад, в HVR можуть бути зроблені консервативні зміни (наприклад, консервативні заміни, зазначені в даному описі), які не знижують істотно афінність зв'язування. Такі зміни можуть мати місце, наприклад, поза залишків, що контактують з антигеном, в HVR. У деяких варіантах послідовностей VH і VL, представлених вище, кожна HVR або залишається незмінною, або містить не більше однієї, двох або трьох амінокислотних замін.

Цінним методом ідентифікації залишків або областей антитіла, які можна піддавати мутагенезу, є так називаний "аланін-скануючий мутагенез", описаний у Cunningham і Wells, *Science* 244, 1989, стор. 1081-1085. При здійсненні цього методу залишок або групу залишків-мішеней (наприклад, заряджені залишки, такі як Arg, Asp, His, Lys і Glu) ідентифікують і замінюють на нейтральну або негативно заряджену амінокислоту (наприклад, аланін або поліаланін) для вирішення питання про те, чи буде це впливати на взаємодію антитіла з антигеном. Додаткові заміни можна інтродуктувати в ті положення амінокислот, для яких продемонстрована функціональна чутливість до початкових замін. В альтернативному або додатковому варіанті вивчають кристалічну структуру комплексу антиген-антитіло для ідентифікації точок контакту між антитілом і антигеном. Зазначені залишки, що контактують, і сусідні залишки можна розглядати як мішені або виключати з розгляду як кандидати для заміни. Варіанти можна піддавати скринінгу для вирішення питання про те, чи мають вони необхідні властивості.

Амінокислотні інсерції включають аміно- і/або карбоксикінцеві злиття, що варіюють за довжиною від одного залишку до поліпептидів, які містять 100 або більшу кількість залишків, а також інсерції одного або декількох амінокислотних залишків всередину послідовності. Приклади результату здійснення кінцевих інсерцій включають антитіло з N-кінцевим метіонільним залишком. Інші інсерційні варіанти молекули антитіла включають злиття N- або C-кінця антитіла з ферментом (наприклад, для ADEPT) або поліпептидом, який подовжує час напівжиття антитіла в сироватці.

б) Варіанти глікозилювання

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, представлене в даному описі, змінюють з метою підвищення або зниження ступеня глікозилювання антитіла. Додавання або видалення шляхом делеції сайтів глікозилювання антитіла легко можна здійснювати шляхом такої зміни амінокислотної послідовності, яка дозволяє створювати або видаляти один або декілька сайтів глікозилювання.

Якщо антитіло містить Fc-область, то можна змінювати приєднаний до неї олігосахарид. Нативні антитіла, які продукуються клітинами ссавців, як правило, містять розгалужений біантенний олігосахарид, який, як правило, приєднаний за допомогою N-зв'язку до Asn297 CH2-

домену Fc-області (див., наприклад, Wright і ін., TIBTECH 15, 1997, стор. 26-32). Олігосахарид може включати різні вуглеводи, наприклад, манозу, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), галактозу і сіалову кислоту, а також фукозу, приєднану до GlcNAc в "стеблі" біантенної олігосахаридної структури. У деяких варіантах здійснення винаходу модифікації олігосахариду в антитілі, запропонованому у винаході, можна здійснювати для створення варіантів антитіл з певними покращеними властивостями.

Одним з варіантів здійснення винаходу є варіанти антитіла, що мають нефукозилізований олігосахарид, тобто що мають олігосахаридну структуру, в якій відсутня фукоза, приєднана (прямо або опосередковано) до Fc-області. Зазначений нефукозилізований олігосахарид (який позначають також як "афукозилізований" олігосахарид), насамперед являє собою N-зчеплений олігосахарид, в якому відсутній залишок фукози, приєднаний до першого GlcNAc в "стеблі" біантенної олігосахаридної структури. Одним з варіантів здійснення винаходу є варіанти антитіл, що мають підвищену частку нефукозилізованих олігосахаридів в Fc-області у порівнянні з нативним або батьківським антитілом. Наприклад, доля нефукозилізованих олігосахаридів може становити принаймні приблизно 20 %, принаймні приблизно 40 %, принаймні приблизно 60 %, принаймні приблизно 80 % або навіть приблизно 100 % (тобто відсутність фукозилізованих олігосахаридів). Процент нефукозилізованих олігосахаридів являє собою (середню) кількість олігосахаридів, позбавлених залишків фукози, відносно суми усіх олігосахаридів, приєднаних до Asn 297 (наприклад, комплексних, гібридних структур і структур з високим вмістом манози), яку вимірюють за допомогою MALDI-TOF-мас-спектрометрії відповідно до методу, описаного, наприклад, в WO 2008/077546. Asn297 позначає залишок аспарагіну, локалізований приблизно в положенні 297 в Fc-області (EU-нумерація залишків Fc-області); однак внаслідок мінорних варіацій послідовності антитіла Asn297 може розташовуватися також приблизно на +3 амінокислоти в прямому або зворотному напрямку відносно положення 297, тобто між положеннями 294 і 300. Зазначені антитіла, що мають підвищену частку нефукозилізованих олігосахаридів в Fc-області, можуть мати підвищену здатність зв'язуватися з FcγRIIIa-рецептором і/або підвищену ефекторну функцію, насамперед підвищену ADCC-функцію (див., наприклад, US 2003/0157108; US 2004/0093621).

Прикладами клітинних ліній, які мають здатність продукувати антитіла з зниженим фукозилуванням, є CHO-клітини Lec13 з дефіцитом білкового фукозилування (Ripka і ін., Arch. Biochem. Biophys. 249, 1986, стор. 533-545; US 2003/0157108 і WO 2004/056312, див., насамперед, приклад 11), і клітинні лінії з "вимкненим" геном, наприклад, CHO-клітини з "вимкненим" геном альфа-1,6-фукозилтрансферази, FUT8 (див., наприклад, Yamane-Ohnuki і ін., Biotech. Bioeng. 87, 2004, с. 614-622); Kanda Y. і ін., Biotechnol. Bioeng., 94(4), 2006, стор. 680-688; і WO 2003/085107), або клітини зі зниженою або анульованою активністю синтезу GDP-фукози або білка-транспортера (див., наприклад, US 2004/259150, US 2005/031613, US 2004/132140, US 2004/110282).

Наступним варіантом здійснення винаходу є варіанти антитіл з бісекційними олігосахаридами, наприклад, в яких біантенний олігосахарид, приєднаний до Fc-області антитіла, бісекціонується за допомогою GlcNAc. Зазначені варіанти антитіл можуть відрізнятися зниженим фукозилуванням і/або підвищеною ADCC-функцією, що описано вище. Приклади зазначених варіантів антитіл описані, наприклад, у Umana і ін., Nat Biotechnol 17, 1999, стор. 176-180; Ferrara і ін., Biotechn Bioeng 93, 2006, стор. 851-861; WO 99/54342; WO 2004/065540, WO 2003/011878.

Запропоновані також варіанти антитіл принаймні з одним залишком галактози в олігосахариді, приєднаному до Fc-області. Зазначені варіанти антитіл можуть мати підвищену CDC-функцію. Зазначені варіанти антитіл описані, наприклад, в WO 1997/30087; WO 1998/58964 і WO 1999/22764.

в) Варіанти Fc-області

Відповідно до конкретних варіантів здійснення винаходу можна інтродукувати в Fc-область антитіла, представленого в даному описі, одну або декілька амінокислотних модифікацій, створюючи тим самим варіант Fc-області. Варіант Fc-області може містити послідовність людської Fc-області (наприклад, Fc-області людського IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4), що включає амінокислотну модифікацію (наприклад, заміну) в одному або декількох амінокислотних положень).

Деякі варіанти здійснення винаходу відносяться до варіанта антитіла, яке має деякі, але не всі ефекторні функції, що робить його перспективним кандидатом для шляхів застосування, для яких є важливим час напівжиття *in vivo*, однак деякі ефекторні функції (такі як комплементзалежна цитотоксичність (CDC) і ADCC) не є необхідними або є шкідливими. Можна здійснювати аналізи цитотоксичності *in vitro* і/або *in vivo* для підтвердження

зниження/виснаження CDC- і/або ADCC-активності. Наприклад, можна здійснювати аналізи зв'язування Fc-рецептора (FcR) для гарантії того, що у антитіла відсутня здатність до зв'язування з Fc γ R (і тому, ймовірно, відсутня ADCC-активність), але зберігається здатність зв'язуватися з FcRn. Первинні клітини, що опосередковують ADCC, тобто NK-клітини, експресують тільки Fc γ RIII, в той час як моноцити експресують Fc γ RI, Fc γ RII і Fc γ RIII. Дані про експресію FcR на гематопоетичних клітинах узагальнені в таблиці 3 на с. 464 у Ravetch і Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9, 1991, стор. 457-492. Прикладами аналізів *in vitro* ADCC-активності молекули, яка становить інтерес, є (але, не обмежуючись тільки ними) аналізи, описані в US № 5500362 (див., наприклад, Hellstrom I. і ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1986, стор. 7059-7063 і Hellstrom I. і ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1985, стор.1499-1502); US № 5821337 (див. Bruggemann M. і ін., *J. Exp. Med.* 166, 1987, стор. 1351-1361). В альтернативному варіанті можна застосовувати нерадіоактивні методи аналізу (див., наприклад, нерадіоактивний аналіз цитотоксичності АСТІ™ на основі проточної цитометрії (фірма CellTechnology, Inc. Маунтін-Вью, шт. Каліфорнія); і нерадіоактивний аналіз цитотоксичності CytoTox 96® (фірма Promega, Медисон, шт. Вісконсин). Придатними для таких аналізів ефекторними клітинами є мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMC) і природні клітини-кілери (NK). В альтернативному або додатковому варіанті ADCC-активність молекули, яка становить інтерес, можна оцінювати *in vivo*, наприклад, на тваринній моделі, наприклад, як описано у Clynes і ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1998, стор. 652-656. Можна здійснювати також аналізи зв'язування C1q для підтвердження того, що антитіло не може зв'язувати C1q і тому у нього відсутня CDC-активність (див., наприклад, опис ELISA для оцінювання зв'язування C1q і C3c в WO 2006/029879 і WO 2005/100402). Для оцінювання активації комплементу можна здійснювати CDC-аналіз (див., наприклад, Gazzano-Santoro і ін., *J. Immunol. Methods* 202, 1996, стор. 163-171; Cragg M.S. і ін., *Blood* 101, 2003, стор.1045-1052; і Cragg M.S. і M.J. Glennie, *Blood* 103, 2004, стор. 2738-2743). Визначення FcRn-зв'язування і кліренсу/часу напівжиття *in vivo* можна здійснювати також з використанням методів, відомих в даній галузі (див., наприклад, Petkova S.B. і ін., *Int'l. Immunol.* 18(12), 2006, стор. 1759-1769); WO 2013/120929 A1).

Антитіла зі зниженою ефекторною функцією включають антитіла з заміною одного або декількох наступних залишків Fc-області, таких як 238, 265, 269, 270, 297, 327 і 329 (див., наприклад, US № 6737056). До зазначених мутантів Fc відносяться мутанти Fc із замінами в двох або більшій кількості з наступних амінокислотних положень: 265, 269, 270, 297 і 327, включаючи так називаний мутант "DANA" Fc-області, що несе заміну залишків 265 і 297 на аланін (US № 7332581).

Описані деякі варіанти антитіл з підвищеною або зниженою здатністю зв'язуватися з FcR (див., наприклад, US № 6737056; WO 2004/056312 і Shields і ін., *J. Biol. Chem.* 276, 2001, стор. 6591-6604).

Відповідно до конкретних варіантів здійснення винаходу варіант антитіла містить Fc-область з однією або декількома амінокислотними замінами, які підвищують ADCC, наприклад, з замінами в положеннях 298, 333, і/або 334 Fc-області (EU-нумерація залишків).

У деяких варіантах здійснення винаходу варіант антитіла містить Fc-область з однією або декількома амінокислотними замінами, які підвищують зв'язування FcRn, наприклад, з замінами в положеннях 252 і/або 254, і/або 256 Fc-області (EU-нумерація залишків). У деяких варіантах здійснення винаходу варіант антитіла містить Fc-область з амінокислотними замінами в положеннях 252, 254, і 256. В одному з варіантів здійснення винаходу заміни являють собою M252Y, S254T і T256E в Fc-області, одержаної з Fc-області людського IgG1.

У деяких варіантах здійснення винаходу варіант антитіла містить Fc-область з амінокислотними замінами, які знижують зв'язування Fc γ R, наприклад, заміни в положеннях 234 і 235 Fc-області (EU-нумерація залишків). В одному з варіантів здійснення винаходу заміни являють собою L234A і L235A (LALA). У деяких варіантах здійснення винаходу варіант антитіла додатково містить D265A і/або P329G в Fc-області, одержаної з Fc-області людського IgG1. В одному з варіантів здійснення винаходу заміни являють собою L234A, L235A і P329G (LALA-PG) в Fc-області, одержаної з Fc-області людського IgG1 (див., наприклад, WO 2012/130831 A1). В іншому варіанті здійснення винаходу заміни являють собою L234A, L235A і D265A (LALA-DA) в Fc-області, одержаної з Fc-області людського IgG1.

У деяких варіантах здійснення винаходу в Fc-області здійснюють зміни, які приводять до зміненої (тобто або підвищеної, або зниженої) здатності зв'язувати C1q і/або комплементзалежної цитотоксичності (CDC), що описано, наприклад, в US № 6194551, WO 99/51642 і у Idusogie і ін., *J. Immunol.* 164, 2000, стор. 4178-4184.

Антитіла з подовженим часом напівжиття і підвищеною здатністю до зв'язування з неонатальним Fc-рецептором (FcRn), який відповідальний за перенесення материнських IgG

ембріону (Guyer і ін., J. Immunol. 117, 1976, стор. 587-593 і Kim і ін., J. Immunol. 24, 1994, стор. 2429-2434), описані в US 2005/0014934 A1 (на ім'я Hinton і ін.). Ці антитіла містять Fc-область з однією або декількома замінами, які підвищують зв'язування Fc-області з FcRn. Зазначені варіанти Fc-області включають варіанти з замінами одного або декількох наступних залишків Fc-області: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434, наприклад, заміну залишку 434 в Fc-області (US № 7371826); Dall'Acqua W.F., і ін., J. Biol. Chem. 281, 2006, стор. 23514-23524).

За допомогою сайтспрямованого мутагенезу були ідентифіковані залишки в Fc-області, що мають вирішальне значення для взаємодії: мишача Fc-область-мишачий FcRn (див., наприклад, Dall'Acqua W.F. і ін., J. Immunol 169, 2002, стор. 5171-5180). У взаємодії приймають участь залишки I253, H310, H433, N434 і H435 (EU-нумерація відповідно до Кебота) (Medesan C. і ін., Eur. J. Immunol. 26, 1996, с. 2533; Firan M. і ін., Int. Immunol. 13, 2001, с. 993; Kim J.K. і ін., Eur. J. Immunol. 24, 1994, с. 542). Було встановлено, що залишки I253, H310 і H435 мають вирішальне значення для взаємодії людської Fc з мишачим FcRn (Kim J.K. і ін., Eur. J. Immunol. 29, 1999, с. 2819). Дослідження комплексу людська Fc-людський FcRn продемонстрували, що залишки I253, S254, H435 і Y436 мають вирішальне значення для взаємодії (Firan M. і ін., Int. Immunol. 13, 2001, с. 993; Shields R.L. і ін., J. Biol. Chem. 276, 2001, стор. 6591-6604). У Yeung Y.A. і ін., J. Immunol. 182, 2009, стор. 7667-7671 описані і досліджені різні мутанти залишків з 248 по 259 і з 301 по 317, і з 376 по 382, і з 424 по 437.

У деяких варіантах здійснення винаходу варіант антитіла містить Fc-область з однією або декількома амінокислотними замінами, які знижують зв'язування FcRn, наприклад, з замінами в положеннях 253 і/або 310, і/або 435 Fc-області (EU-нумерація залишків). У деяких варіантах здійснення винаходу варіант антитіла містить Fc-область з амінокислотними замінами в положеннях 253, 310 і 435. В одному з варіантів здійснення винаходу заміни являють собою I253A, H310A і H435A в Fc-області, одержаної з Fc-області людського IgG1 (див. наприклад, Grevys A. і ін., J. Immunol. 194, 2015, стор. 5497-5508).

У деяких варіантах здійснення винаходу варіант антитіла містить Fc-область з однією або декількома амінокислотними замінами, які знижують зв'язування з FcRn, наприклад, заміни в положеннях 310 і/або 433, і/або 436 Fc-області (EU-нумерація залишків). У деяких варіантах здійснення винаходу варіант антитіла містить Fc-область з амінокислотними замінами в положеннях 310, 433 і 436. В одному з варіантів здійснення винаходу заміни являють собою H310A, H433A і Y436A в Fc-області, одержаної з Fc-області людського IgG1 (див., наприклад, WO 2014/177460 A1).

Додаткові приклади, що стосуються інших варіантів Fc-області, описані також у Duncan і Winter, Nature 322, 1988, стор. 738-740; в US № 5648260; US № 5624821 і WO 94/29351.

Б. Методи рекомбінації і композиції

Антитіла можна одержувати з використанням методів рекомбінацій і композицій, наприклад, описаних в US 4816567. Для цих методів одержують одну виділену амінокислоту або декілька виділених амінокислот, що кодує(-ють) антитіло.

У випадку нативного антитіла або фрагмента нативного антитіла потрібні дві нуклеїнові кислоти, одна для легкого ланцюга або його фрагмента і одна для важкого ланцюга або його фрагмента. Така(-и) нуклеїнова(-и) кислота(-и) кодує(-ють) амінокислотну послідовність, що містить VL і/або амінокислотну послідовність, що містить VH антитіла (наприклад, легкий і/або важкий ланцюг(-и) антитіла). Ці нуклеїнові кислоти можуть знаходитися в одному і тому ж експресійному векторі або в різних експресійних векторах.

У випадку біспецифічного антитіла з гетеродимерними важкими ланцюгами потрібні чотири нуклеїнові кислоти, одна для першого легкого ланцюга, одна для другого легкого ланцюга, що містить першу гетеромономерну Fc-область поліпептиду, одна для другого легкого ланцюга і одна для другого важкого ланцюга, що містить другу гетеромономерну Fc-область поліпептиду. Чотири нуклеїнові кислоти можуть міститися в одній або декількох молекулах нуклеїнової кислоти або експресійних векторах. Така(-и) нуклеїнова(-и) кислота(-и) кодує(-ють) амінокислотну послідовність, що містить перший VL, і/або амінокислотну послідовність, що містить перший VH, включаючи першу гетеромономерну Fc-область, і/або амінокислотну послідовність, що містить другий VL, і/або амінокислотну послідовність, що містить другий VH, включаючи другу гетеромономерну Fc-область антитіла (наприклад, перший і/або другий легкий, і/або перший, і/або другий важкий ланцюги антитіла). Ці нуклеїнові кислоти можуть знаходитися в одному і тому ж експресійному векторі або в різних експресійних векторах, в нормі ці нуклеїнові кислоти знаходяться в двох або трьох експресійних векторах, тобто один вектор може містити більше однієї з зазначених нуклеїнових кислот. Прикладами таких біспецифічних антитіл є CrossMab і біспецифічні антитіла, що активують Т-клітини (див., наприклад, Schaefer W. і др, PNAS, 108,

2011, стор. 11187-1191). Наприклад, один з гетеромономерних важких ланцюгів містить так називані "мутації, що приводять до утворення виступу" (Т366W і необов'язково одну з S354C або Y349C), а інший містить так називані "мутації, що приводять до утворення западини" (Т366S, L368A і Y407V і необов'язково Y349C або S354C) (див., наприклад, Carter P. і ін., Immunotechnol. 2, 1996, с. 73).

Одним з варіантів здійснення винаходу є виділені нуклеїнові кислоти, що кодують антитіло, яке застосовується в способах, представлених в даному описі.

Іншим варіантом здійснення винаходу є один або декілька векторів (наприклад, експресійних векторів), які містять таку(-і) нуклеїнову(-і) кислоту(-и).

Іншим варіантом здійснення винаходу є клітина-хазяїн, яка містить таку(-і) нуклеїнову(-і) кислоту(-и).

В одному з таких варіантів здійснення винаходу клітина-хазяїн містить (наприклад, трансформована):

- у випадку антитіла, що складається з двох ідентичних легких ланцюгів і двох ідентичних важких ланцюгів, які зв'язані дисульфідним зв'язком, або його фрагмента, що містить VH і VL:

(1) вектор, що містить нуклеїнові кислоти, які кодують амінокислотну послідовність, що містить VL антитіла, і амінокислотну послідовність, що містить VH антитіла, або

(2) перший вектор, що містить нуклеїнову кислоту, який кодує амінокислотну послідовність, що містить VL антитіла, і другий вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить VH антитіла;

- у випадку біспецифічного антитіла з гетеродимерними важкими ланцюгами:

(1) перший вектор, що містить першу пару нуклеїнових кислот, які кодують амінокислотні послідовності, одна з яких містить перший VL, а інша містить перший VH антитіла, і другий вектор, що містить другу пару нуклеїнових кислот, які кодують амінокислотні послідовності, одна з яких містить другий VL, а інша містить другий VH антитіла, або

(2) перший вектор, що містить першу нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить один з варіабельних доменів (переважно варіабельний домен легкого ланцюга), другий вектор, що містить пару нуклеїнових кислот, які кодують амінокислотні послідовності, одна з яких містить варіабельний домен легкого ланцюга, а інша містить варіабельний домен першого важкого ланцюга, і третій вектор, що містить пару нуклеїнових кислот, які кодують амінокислотні послідовності, одна з яких містить відповідний варіабельний домен легкого ланцюга, відмінний від того, який зазначений для другого вектора, а інша містить варіабельний домен другого важкого ланцюга, або

(3) перший вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить перший VL антитіла, другий вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить перший VH антитіла, третій вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить другий VL антитіла, і четвертий вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить другий VH антитіла.

В одному з варіантів здійснення винаходу клітина-хазяїн являє собою еукаріотичну клітину, наприклад, клітину яєчника китайського хом'ячка (CHO) або лімфоїдну клітину (наприклад, YO-, NS0-, Sp20-клітину). В одному з варіантів здійснення винаходу запропонований спосіб одержання антитіла до LAG3, де спосіб включає культивування клітини-хазяїна, що містить нуклеїнові кислоти, що кодують антитіло, зазначене вище, в умовах, придатних для експресії антитіла, і необов'язково виділення антитіла з клітини-хазяїна (або культурального середовища для клітини-хазяїна).

Для рекомбінантного одержання антитіла до LAG3 нуклеїнові кислоти, що кодують антитіло, наприклад, описане вище, виділяють і вбудовують в один або декілька векторів для подальшого клонування і/або експресії в клітині-хазяїні. Такі нуклеїнові кислоти можна легко виділяти і секвенувати із застосуванням загальноприйнятих процедур (наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів, які мають здатність специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі і легкі ланцюги антитіла) або одержувати методами рекомбінації, або одержувати шляхом хімічного синтезу.

Прийнятні клітини-хазяї для клонування або експресії векторів, що кодують антитіло, включають прокаріотичні або еукаріотичні клітини, представлені в даному описі. Наприклад, антитіла можна одержувати в бактеріях, зокрема, коли не вимагається глікозилування і зв'язана з Fc ефекторна функція. Відомості про експресію фрагментів антитіла і поліпептидів в бактеріях див. наприклад, в US № 5648237, US № 5789199 і US № 5840523 (див. також у Charlton K.A. в: Methods in Molecular Biology, під ред. Lo B.K.C., вид-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, стор. 245-254 опис експресії фрагментів антитіл в E. coli.). Після експресії антитіло можна

виділяти з пасти бактеріальних клітин в розчинній фракції і можна додатково очищувати.

Окрім прокаріотичних організмів як хазяї, придатні для клонування або експресії векторів, які кодують антитіло, можна використовувати еукаріотичні мікроорганізми, такі як нитчасті гриби або дріжджі, включаючи штами грибів і дріжджів, шляхи глікозилування яких були "гуманізовані", що дозволяє одержувати антитіло з частково або повністю людською схемою глікозилування (див. Gerngross T.U., *Nat. Biotech.* 22, 2004, стор. 1409-1414 і Li і ін., *Nat. Biotech.* 24, 2006, стор. 210-215).

Клітини-хазяї, які можна застосовувати для експресії глікозилуваного антитіла, одержують також з багатоклітинних організмів (безхребетних і хребетних тварин). Прикладами клітин безхребетних є клітини комах, а також можна застосовувати клітини рослин. Були виявлені численні штами бакуловірусів і відповідні придатні для них як хазяї клітини комах, насамперед для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*.

Як хазяї можна застосовувати також культури рослинних клітин (див., наприклад, US № 5959177, US № 6040498, US № 6420548, US № 7125978 і US № 6417429 (опис технології PLANTIBODIES™ для одержання антитіл в трансгенних рослинах).

Як хазяї можна застосовувати також клітини хребетних. Наприклад, можна використовувати клітинні лінії ссавців, які адаптовані до росту в суспензії. Іншими прикладами прийнятних ліній клітин-хазяїв ссавців є лінія клітин нирки мавпи CV1, трансформована за допомогою OB40 (COS-7); лінія клітин нирки ембріона людини (HEK 293-клітини або клітини лінії 293, описані, наприклад, у Graham F.L. і ін., *J. Gen. Virol.*, 36, 1977, стор. 59-74); клітини нирки дитинчати хом'яка (BHK); клітини Сертолі миші (TM4-клітини, описані, наприклад, у Mather J.P., *Biol. Reprod.*, 23, 1980, стор. 243-251); клітини нирки мавпи (CV1); клітини нирки африканської зеленої мартишки (VERO-76); клітини карциноми шийки матки людини (HELA); клітини нирки собаки (MDCK); клітини печінки бичачого щура (BRL 3A); клітини легені людини (W138); клітини печінки людини (Hep G2); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562); клітини TRI, описані, наприклад, у Mather J.P. і ін., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383, 1982, стор. 44-68); клітини MRC 5 і клітини FS4. Іншими цінними лініями клітин-хазяїв ссавців є клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), включаючи DHFR-CHO-клітини (Urlaub G. і ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1980, стор. 4216-4220); і клітинні лінії міеломи, такі як Y0, NS0 і Sp2/0. Огляд конкретних ліній клітин-хазяїв ссавців, які можна застосовувати для виробництва антитіл, див., наприклад, у Yazaki P. і Wu A.M., в: *Methods in Molecular Biology* під ред. B.K.C. Lo, вид-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, стор. 255-268.

В. Аналізи

Антитіла до LAG3, представлені в даному описі, можна ідентифікувати, піддавати скринінгу або характеризувати їх фізичні/хімічні властивості і/або види біологічної активності за допомогою різних аналізів, відомих в даній галузі.

1. Аналізи зв'язування і інші аналізи

В одному з об'єктів винаходу антитіло, запропоноване у винаході, тестують щодо його антигензв'язуючої активності, наприклад, за допомогою відомих методів, таких як ELISA, вестерн-блотинг і т.д.

В іншому об'єкті винаходу можна застосовувати аналізи в умовах конкуренції для ідентифікації антитіла, яке конкурує з aLAG3(0414) за зв'язування з LAG3. У деяких варіантах здійснення винаходу таке конкуруюче антитіло зв'язується з тим же самим епітопом (наприклад, лінійним або конформаційним епітопом), з яким зв'язується aLAG3(0414). Докладний опис наведених як приклади методів картування епітопа, з яким зв'язується антитіло, представлено у Morris, "Epitope Mapping Protocols" в *Methods in Molecular Biology*, т. 66, вид-во Humana Press, Totowa, NJ, 1996.

У представленому як приклад аналізі в умовах конкуренції іммобілізований LAG3 інкубують в розчині, що містить перше мічене антитіло, яке зв'язується з LAG3 (наприклад, aLAG3(0414)), і друге немічене антитіло, яке тестують щодо його здатності конкурувати з першим антитілом за зв'язування з LAG3. Друге антитіло може бути присутнім в супернатанті гібридоми. Як контроль інкубують іммобілізований LAG3 в розчині, що містить перше мічене антитіло, але не містить друге немічене антитіло. Після інкубації в умовах, придатних для зв'язування першого антитіла з LAG3, видаляють надлишок незв'язаного антитіла і вимірюють кількість мітки, асоційованої з іммобілізованим LAG3. Якщо кількість мітки, асоційованої з іммобілізованим LAG3, значно знижена в тестованому зразку у порівнянні з контрольним зразком, то це свідчить про те, що друге антитіло конкурує з першим антитілом за зв'язування з LAG3. Див. Harlow і Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, глава 14, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988.

2. Аналізи активності

В одному з об'єктів винаходу запропоновані аналізи для ідентифікації антитіл до LAG3, що мають біологічну активність. Біологічна активність може включати, наприклад, вплив антитіл до LAG3 (індивідуально або в комбінації з антитілами до PDL1) на вивільнення цитотоксичного гранзіму В і секрецію IL-2 людськими CD4 Т-клітинами за даними аналізу реакції змішаних лімфоцитів (mMLR) або вплив антитіл до LAG-3 на опосередковане Treg пригнічення вивільненні гранзіму В і IFN- γ людськими CD4 Т-клітинами; або інгібування антитілами до LAG3 зв'язування LAG-3 з молекулами ГКГС-II, що експресуються на людських пухлинних клітинах. Запропоновані також антитіла, що мають таку біологічну активність *in vivo* і/або *in vitro*.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, тестують щодо зазначеної біологічної активності, що більш детально описано нижче в прикладах 2 і 3.

Г. Способи і композиції для діагностування і детекції

У деяких варіантах здійснення винаходу будь-яке з антитіл до LAG3, представлених в даному описі, можна застосовувати для детекції присутності LAG3 в біологічному зразку. Поняття "детекція (виявлення, визначення)" в контексті даного опису включає кількісну і якісну детекцію. У деяких варіантах здійснення винаходу біологічний зразок містить клітину або тканину, таку як пухлинна тканина.

Одним з варіантів здійснення винаходу є антитіло до LAG3, призначене для застосування в способі діагностування або детекції. Іншим об'єктом винаходу є спосіб виявлення присутності LAG3 в біологічному зразку. У деяких варіантах здійснення винаходу спосіб включає приведення в контакт біологічного зразка з антитілом до LAG3, зазначеним в даному описі, в умовах, в яких відбувається зв'язування антитіла до LAG3 з LAG3, і визначення того, чи утворюється комплекс між антитілом до LAG3 і LAG3. Зазначений спосіб може являти собою спосіб *in vitro* або *in vivo*. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло до LAG3 застосовують для відбору пацієнтів, яких можна піддавати терапії з використанням антитіла до LAG3, наприклад, коли LAG3 є біомаркером для відбору пацієнтів.

Приклади порушень, які можна діагностувати з використанням антитіла, запропонованого у винаході, включають рак в різних формах, такий як хронічний лімфоцитарний лейкоз (CLL), рак молочної залози і т.д. (див. також наведений нижче перелік видів раку).

Деякими варіантами здійснення винаходу є мічені антитіла до LAG3. Мітки включають (але, не обмежуючись тільки ними) мітки або фрагменти, які можна виявляти безпосередньо (такі як флуоресцентні, хромоформні, електронно-щільні, хемілюмінесцентні і радіоактивні мітки), а також фрагменти, такі як ферменти або ліганди, які визначають опосередковано, наприклад, за допомогою ферментативної реакції або молекулярного взаємодії. Приклади міток включають (але, не обмежуючись тільки ними) радіоактивні ізотопи ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , і ^{131}I , флуорофори, такі як хелати рідкісноземельних металів або флуоресцеїн і його похідні, родамін і його похідні, дансил, убіліферон, люциферрази, наприклад, люциферазу світляка і бактеріальну люциферазу (U.S. № 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофталазиндіони, пероксидазу з хрину (HRP), лужну фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамілазу, лізоцим, оксидази сахаридів, наприклад, глюкозооксидазу, галактозооксидазу і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу, оксидази гетероциклічних сполук, такі як уриказа і ксантиоксидаза, зшита з ферментом, який використовує пероксид водню для окиснення попередника барвника, такого як HRP, лактопероксидаза або мікропероксидаза, біотин/авідин, спінові мітки, мітки бактеріофагів, стабільні вільні радикали і т.п.

Д. Фармацевтичні композиції

Фармацевтичні композиції антитіла до LAG3, представленого в даному описі, одержують шляхом змішування зазначеного антитіла, що має необхідний ступінь чистоти, з одним або декількома необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-те вид. під ред. Osol A., 1980) у формі ліофілізованих композицій або водних розчинів. Фармацевтично прийнятні носії, як правило, є нетоксичними для реципієнтів в використовуваних дозах і концентраціях, вони включають (але, не обмежуючись тільки ними): буфери, такі як фосфатний, цитратний буфери, а також буфери на основі інших органічних кислот; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти (такі як хлорид октадецилдиметилбензиламонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію; хлорид бензетонію; фенол; бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол; резорцінол; циклогексанол; 3-пентанол і мета-крезол); поліпептиди з низькою молекулярною масою (що містять менше приблизно 10 залишків); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полі(вінілпіролідон); амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди і інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, такі як ЕДТА; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт;

солеутворюючі протіони, такі як натрій; комплекси, що містять метал (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, такі як поліетиленгліколь (ПЕГ). В контексті даного опису приклади фармацевтично прийнятних носіїв включають також диспергуючі агенти інтерстиціальних лікарських засобів, такі як розчинні активні в нейтральному середовищі глікопротеїни гіалуронідази (sHASEGP), наприклад, людські розчинні глікопротеїни гіалуронідази PH-20, такі як rHuPH20 (HYLENEX®, фірма Baxter International, Inc.). Деякі приклади sHASEGP і методи їх застосування, в тому числі rHuPH20, описані в US 2005/0260186 і US 2006/0104968. Відповідно до одного з об'єктів винаходу sHASEGP об'єднують з одним або декількома додатковими глікозаміногліканазами, такими як хондроїтинази.

Приклади ліофілізованих композицій антитіл описані в US № 6267958. Водні композиції антитіл включають композиції, описані в US № 6171586 і WO 2006/044908, останні композиції включають гістидин-ацетатний буфер.

Композиція, запропонована у винаході, може містити також більше однієї діючої речовини, якщо це необхідно для конкретного показання, що підлягає лікуванню, переважно речовини з додатковими видами активності, які не чинять негативного впливу одна на одну. Наприклад, може виявитися бажаним додатково застосовувати антитіла до PD1 або до PDL1, або антитіла до TIM3. Такі діючі речовини повинні бути присутнім в комбінації в кількостях, ефективних для вирішення поставленого завдання.

Діючі речовини можна включати також в мікрокапсули, наприклад, одержані за допомогою методів коацервації або міжфазової полімеризації, наприклад в гідроксиметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули і полі(метилметакрилатні) мікрокапсули відповідно, в колоїдні системи введення лікарського засобу (наприклад в ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемульсії, наночастинки і нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методи описані в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-те вид., під ред. Osol A., 1980.

Можна приготувати препарати з уповільненим вивільненням. Прийнятними прикладами препаратів з уповільненим вивільненням є напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, що включають кільцевий злитий поліпептид, такі матриці являють собою виробу певної форми, наприклад, плівки або мікрокапсули.

Композиції, призначені для застосування *in vivo*, як правило, повинні бути стерильними. Стерильність можна легко забезпечувати, наприклад, шляхом фільтрації через стерильні фільтруючі мембрани.

Е. Терапевтичні способи і композиції

Будь-яке з антитіл до LAG3, представлених в даному описі, можна застосовувати в терапевтичних способах.

Одним з об'єктів винаходу є антитіло до LAG3, призначене для застосування як лікарський засіб. Іншими об'єктами винаходу є антитіло до LAG3 або його застосування для лікування раку. У деяких варіантах здійснення винаходу запропоновано антитіло до LAG3 для застосування в способі лікування. У деяких варіантах здійснення винаходу запропоновано антитіло до LAG3 для застосування в способі лікування індивідуума, що має рак, що включає введення індивідууму в ефективній кількості антитіла до LAG3. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло призначене для застосування для лікування або уповільнення прогресування пов'язаного з імунною системою захворювання, такого як пухлинний імунітет. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло призначене для застосування для стимуляції імунної відповіді або функції, такої як Т-клітинна активність.

В інших варіантах здійснення винаходу запропоновано антитіло до LAG3 для застосування як імуностимулятор або для стимуляції секреції/вивільненні гранзиму В (GrzB), інтерферону-гамма (IFN-гамма) і або інтерлейкіну 2 (IL-2). У деяких варіантах здійснення винаходу, запропоновано антитіло до LAG3 для застосування в способі секреції/вивільненні гранзиму В (GrzB), інтерферону-гамма (IFN-гамма) і або інтерлейкіну 2 (IL-2) у індивідуума, що включає введення індивідууму в ефективній кількості антитіла до LAG3 для секреції/вивільненні гранзиму В (GrzB), інтерферону-гамма (IFN-гамма) і або інтерлейкіну 2 (IL-2).

"Індивідуум" відповідно до будь-якого із зазначених вище варіантів здійснення винаходу переважно являє собою людину. В іншому об'єкті винаходу запропоновано застосування антитіла до LAG3 для приготування або одержання лікарського засобу. В одному з варіантів здійснення винаходу лікарський засіб призначений для лікування раку. В іншому варіанті здійснення винаходу лікарський засіб призначений для застосування в способі лікування раку, що включає введення індивідууму, що має рак, в ефективній кількості лікарського засобу. В іншому варіанті здійснення винаходу лікарський засіб призначений для індукції опосередкованого клітинами лізису ракових клітин у індивідуума, що страждає на рак, що включає введення індивідууму в ефективній кількості лікарського засобу для індукції апоптозу

ракових клітин або інгібування проліферації ракових клітин. "Індивідуум" відповідно до будь-якого із зазначених вище варіантів здійснення винаходу може являти собою людину.

Поняття "рак", що використовується в даному описі, може означати, наприклад, рак легені, недрібноклітинний рак легені (NSCL), бронхоальвеолярно-клітинний рак легені, рак кістки, рак підшлункової залози, рак шкіри, рак голови або шиї, шкірну або внутрішньоочну меланому, рак матки, рак яєчника, ректальний рак, рак анальної ділянки, рак шлунку, гастральний рак, рак ободової кишки, рак молочної залози, карциному фаллопієвих труб, карциному ендометрію, карциному шийки матки, карциному піхви, карциному вульви, хворобу Ходжкіна, рак стравоходу, рак тонкого кишечника, рак ендокринної системи, рак щитовидної залози, рак парацитовидної залози, рак наднирників, саркому м'яких тканин, рак сечівника, рак пеніса, рак передміхурової залози, рак сечового міхура, рак нирки або сечоводу, нирково-клітинну карциному, карциному ниркової миски, мезотеліому, печінково-клітинний рак, біліарний рак, неоплазми центральної нервової системи (ЦНС), пухлини хребта, гліому стовбура головного мозку, мультиформну гліобластому, астроцитому, шваноми, епендіоми, медулобластоми, менингіоми, плоскоклітинні карциноми, аденому гіпофіза, лімфому, лімфоцитарний лейкоз, включаючи рефрактерні варіанти будь-якого з зазначених вище видів раку або комбінації одного або декількох з зазначених вище видів раку. В одному з кращих варіантів здійснення винаходу зазначений рак являє собою рак молочної залози, колоректальний рак, меланому, рак голови і шиї, рак легені або рак передміхурової залози. В одному з кращих варіантів здійснення винаходу зазначений рак являє собою рак молочної залози, рак яєчника, рак шийки матки, рак легені або рак передміхурової залози. В іншому кращому варіанті здійснення винаходу зазначений рак являє собою рак молочної залози, рак легені, рак ободової кишки, рак яєчника, меланому, рак сечового міхура, ренальний рак, рак нирки, рак печінки, рак голови і шиї, колоректальний рак, рак підшлункової залози, гастральну карциному, рак стравоходу, мезотеліому, рак передміхурової залози, лейкоз, лімфому, мієломи. В одному з кращих варіантів здійснення винаходу зазначені види раку додатково характеризуються наявністю експресії або надекспресії LAG3.

В іншому об'єкті винаходу запропонований спосіб лікування раку. В одному з варіантів здійснення винаходу спосіб включає введення індивідууму, що має рак, в ефективній кількості антитіла до LAG3. "Індивідуум" відповідно до будь-якого із зазначених вище варіантів здійснення винаходу може являти собою людину.

Іншим об'єктом винаходу є спосіб індукції опосередкованого клітинами лізису ракових клітин у індивідуума, що страждає на рак. В одному з варіантів здійснення винаходу спосіб включає введення індивідууму в ефективній кількості антитіла до LAG3 для індукції опосередкованого клітинами лізису ракових клітин у індивідуума, що страждає на рак. В одному з варіантів здійснення винаходу "індивідуум" являє собою людину.

Іншим об'єктом винаходу є фармацевтичні композиції, які містять будь-яке з антитіл до LAG3, представлених в даному описі, наприклад, для застосування в будь-якому із зазначених вище терапевтичних способів. В одному з варіантів здійснення винаходу фармацевтична композиція містить будь-яке з антитіл до LAG3, представлених в даному описі, і фармацевтично прийнятний носій.

Наступним об'єктом винаходу є фармацевтичні композиції, які містять будь-яке з антитіл до LAG3, представлених в даному описі, наприклад, для застосування в будь-якому із зазначених вище терапевтичних способів. В одному з варіантів здійснення винаходу фармацевтична композиція містить будь-яке з антитіл до LAG3, представлених в даному описі, і фармацевтично прийнятний носій. В іншому варіанті здійснення винаходу фармацевтична композиція містить будь-яке з антитіл до LAG3, представлених в даному описі, і принаймні один додатковий терапевтичний агент, наприклад, описаний нижче.

Антитіла, запропоновані у винаході, можна застосовувати в терапії або індивідуально, або в комбінації з іншими агентами. Наприклад, антитіло, запропоноване у винаході, можна вводити спільно принаймні з одним додатковим терапевтичним агентом. У деяких варіантах здійснення винаходу додатковий терапевтичний агент являє собою антитіло до LAG3 або антитіло до PDL1, або антитіло до TIM3.

На додаток до антитіла до LAG3 можна вводити також хіміотерапевтичний засіб. В одному з варіантів здійснення винаходу такі додаткові хіміотерапевтичні засоби, які можна вводити у сполученні з антитілом до LAG3, представленим в даному описі, включають (але, не обмежуючись тільки ними) антинеопластичні засоби, такі як алкілюючі речовини, включаючи: азотисті похідні гірчичного газу, такі як мехлоретамін, циклофосфамід, іфосфамід, мелфалан і хлорамбуцил; нітрозосечовини, такі як кармустин (BCNU), ломустин (CCNU) і семустин (метил-CCNU); Temodal™ (темозоламід), етиленіміни/метилмеламіни, такі як триетиленмеламін (TEM),

триетилен, тіофосфорамід (тіотепа), гексаметилмеламін (HMM, алтретамін; алкілсульфонати, такі як бусульфан; триазини, такі як дакарбазин (DTIC)); антиметаболіти, включаючи аналоги фолієвої кислоти, такі як метотрексат і триметрексат, аналоги піримідину, такі як 5-фторурацил (5FU), фтордезоксіуридин, гемцитабін, цитозинарабінозид (AraC, цитарабін), 5-азацитидин, 2,2'-дифтордезоксіцитидин, аналоги пурину, такі як 6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, азатіоприн, Т-дезоксикоформіцин (пентостатин), еритрогідроксिनоніладенін (EHNA), флударабіну фосфат і 2-хлордезоксіаденозин (кладрибін, 2-CdA); антимітотичні лікарські засоби, одержані з природних продуктів, такі як паклітаксел, алкалоїди барвінку, включаючи вінбластин (VLB), вінкристин і вінорелбін, таксотер, естрамустин і естрамустину фосфат; епіподофілотоксини, такі як етопозид, теніпозид; антибіотики, такі як актиноміцин D, дауноміцин (рубідоміцин), доксорубіцин, мітоксантрон, ідарубіцин, блеоміцини, плікаміцин (мітраміцин), мітоміцин С і актиноміцин; ферменти, такі як L-аспарагінуза; модифікатори біологічної відповіді, такі як інтерферон-альфа, IL-2, G-CSF, GM-CSF; змішані речовини, включаючи координовані комплекси на основі платини, такі як оксаліплатин, цисплатин і карбоплатин, антраценодіони, такі як мітоксантрон, заміщена сечовина, така як гідроксисечовина, похідні метилгідразину, включаючи N-метилгідразин (MH) і прокарбазин, адренкортикальні депресанти, такі як мітоган (o, p'-DDD) і аміноглутетімід; гормони і антагоністи, включаючи адренкортикостероїдні антагоністи, такі як преднізон і його еквіваленти, дексаметазон і аміноглутетімід; Gemzar™ (гемцитабін), прогестин, такий як гідроксипрогестерону капроат, медропрогестерону ацетат і мегестролу ацетат; естрогени, такі як діетилстилбесртол і еквіваленти етинілестрадіолу; антиестроген, такий як тамоксифен; андрогени, включаючи тестостерону пропіонат і флуоксиместерон/еквіваленти; антиандрогени, такі як флутамід, аналоги гонадотропінвизволяючого гормону і леупролід; і нестероїдні антиандрогени, такі як флутамід. Терапії, мішенню яких є епігенетичний механізм, включають (але, не обмежуючись тільки ними) застосування інгібіторів гістондеацетилаз, деметилуючих агентів (наприклад, вайдаза) і терапій, що забезпечують вивільнення факторів репресії транскрипції (ATRA (повністю транс-ретіноєва кислота), можна об'єднувати також з антигензв'язуючими білками. В одному з варіантів здійснення винаходу хіміотерапевтичний засіб вибирають з групи, що включає таксани (наприклад, паклітаксел (таксол), доцетаксел (таксотер), модифікований паклітаксел (наприклад, абраксан і опаксіо, доксорубіцин, сунітиніб (сутент), сорафеніб (нексавар) і інші мультикіназні інгібітори, оксаліплатин, цисплатин і карбоплатин, етопозид, гемцитабін і вінбластин. В одному варіанті здійснення винаходу хіміотерапевтичний засіб вибирають з групи, що включає таксани (такі, наприклад, як таксол (паклітаксел), доцетаксел (таксотер), модифікований паклітаксел (наприклад, абраксан і опаксіо)). В одному варіанті здійснення винаходу хіміотерапевтичний засіб вибирають з 5-фторурацилу (5-FU), леоковорину, іринотекану або оксаліплатину. В одному варіанті здійснення винаходу хіміотерапевтичний засіб являє собою 5-фторурацил, леуковорин і іринотекан (FOLFIRI (фолфіри)). В одному варіанті здійснення винаходу хіміотерапевтичний засіб являє собою 5-фторурацил і оксаліплатин (FOLFOX (фолфокс)).

Такі зазначені вище комбіновані терапії включають спільне введення (при якому два або більша кількість терапевтичних засобів включені в одну і ту ж або окремі препаративні форми), і окреме введення, при якому введення антитіла, запропонованого у винаході, можна здійснювати до, одночасно або після введення додаткового(-их) терапевтичного(-их) засобу або засобів. В одному з варіантів здійснення винаходу введення антитіла до LAG3 і введення додаткового терапевтичного засобу здійснюють в межах приблизно одного місяця або в межах приблизно одного, двох або трьох тижнів, або в межах приблизно одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти або шести днів між введеннями кожного із засобів. Антитіла, запропоновані у винаході, можна застосовувати також в комбінації з променевою терапією.

Антитіло, запропоноване у винаході (і будь-який додатковий терапевтичний засіб), можна вводити будь-якими прийнятними шляхами, включаючи парентеральну, внутрішньолегеневу і внутрішньоназальну і при необхідності місцеву обробку, введення в ушкодження. Парентеральні інфузії включають внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревне або підшкірне введення. Введення доз можна здійснювати за допомогою будь-якого прийнятного шляху, наприклад, за допомогою ін'єкцій, таких як внутрішньовенні або підшкірні ін'єкції, залежно, в тому числі, від того, чи є введення короткочасним або хронічним. У даному винаході передбачаються різні схеми дозування, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) однократні або багатократні введення в різні моменти часу, болюсне введення і імпульсну інфузію.

Антитіла, запропоновані у винаході, можна включати до складу препаратів, дозувати і вводити відповідно до належної медичної практики. Фактори, які повинні враховуватися в цьому

контексті, включають конкретне порушення, що підлягає лікуванню, конкретного ссавця, що підлягає лікуванню, клінічний стан конкретного пацієнта, причину порушення, область доставки агента, метод введення, схему введення і інші фактори, відомі практикуючим медичним фахівцям. Антитіло можна (але це не є необхідним) включати до складу препаративної форми у сполученні з одним або декількома агентами, застосовуваними в даний час для попередження або лікування порушення, що розглядається. Ефективна кількість таких інших агентів залежить від кількості антитіла, присутнього в препаративній формі, типу порушення або лікування і інших описаних вище факторів. Як правило, їх застосовують в тих же дозах і з використанням тих же шляхів введення, які описані вище, або в дозах, що становлять приблизно від 1 до 99 % від доз, зазначених в даному описі, і з використанням будь-якого шляху введення, який є придатним з емпіричною/клінічною точкою зору.

Придатна для попередження або лікування захворювання доза антитіла, запропонованого у винаході (при його застосуванні індивідуально або в комбінації з одним або декількома іншими додатковими терапевтичними засобами), повинна залежати від типу захворювання, що підлягає лікуванню, типу антитіла, серйозності і протікання захворювання, від того, вводять антитіло в профілактичних чи терапевтичних цілях, попередньої терапії, клінічної історії пацієнта і відповіді на антитіло, і від рішення лікуючого лікаря. Антитіло можна вводити пацієнту однократно або шляхом серії обробок. Залежно від типу і серйозності захворювання можлива початкова доза антитіла для введення пацієнту, наприклад, з використанням одного або декількох індивідуальних введень або за допомогою безперервної інфузії, може становити приблизно від 1 мкг/кг до 15 мг/кг (наприклад, 0,1–10 мг/кг). Типова добова доза може становити від приблизно 1 мкг/кг до 100 мг/кг або більше залежно від зазначених вище факторів. Для повторних введень протягом декількох днів або більш тривалого періоду залежно від стану лікування, як правило, повинно продовжуватись до досягнення необхідного пригнічення наявних симптомів захворювання. Як приклад, доза антитіла може становити від приблизно 0,05 до приблизно 10 мг/кг. Так, пацієнту можна вводити одну або декілька доз, що становлять приблизно 0,5, 2,0, 5,0 або 10 мг/кг (або будь-яку їх комбінацію). Зазначені дози можна вводити переривчасто, наприклад, щотижня або кожні три тижні (наприклад, таким чином, щоби пацієнт одержував від приблизно двох до приблизно двадцяти або, наприклад, приблизно шість доз антитіла). Можна вводити початкову більш високу ударну дозу, після якої застосовувати одну або декілька більш низьких доз. Однак можна використовувати інші схеми введення доз. Успіх такої терапії легко оцінювати за допомогою загальноприйнятих методик і аналізів.

Слід розуміти, що будь-який з зазначених вище препаратів або терапевтичних методів можна застосовувати з використанням імунокон'югату, запропонованого у винаході, замість антитіла до LAG3 або на додаток до нього.

Ж. Вироби

Іншим об'єктом винаходу є виріб, який містить продукти, застосовувані для лікування, попередження і/або діагностування зазначених вище порушень. Виріб являє собою контейнер і етикетку або листівку-вкладиш в упаковку, яка розміщена на контейнері або додаються до нього. Прийнятними контейнерами є, наприклад банки, пляшечки, шприци, пакети для внутрішньовенного (IV) розчину і т.д. Контейнери можна виготовляти з різних матеріалів, таких як скло або пластмаса. Контейнер містить композицію, яка сама по собі або у сполученні з іншою композицією є ефективною для лікування, попередження і/або діагностування стану, і може мати стерильний порт доступу (наприклад, контейнер може являти собою пакет для внутрішньовенного розчину або пляшечку, забезпечений(-у) пробкою, яку можна проколювати за допомогою голки для підшкірних ін'єкцій). Принаймні одна діюча речовина в композиції являє собою антитіло, запропоноване у винаході. На етикетці або листівці-вкладиші в упаковці зазначено, що композицію застосовують для лікування вибраного стану. Крім того, виріб може включати (а) перший контейнер з композицією, що знаходиться в ньому, де композиція містить антитіло, запропоноване у винаході; і (б) другий контейнер з композицією, що знаходиться в ньому, де композиція містить додатковий цитотоксичний або інший терапевтичний засіб. Відповідно до цього варіанту здійснення винаходу виріб може містити листівку-вкладиш в упаковку, яка містить інформацію про те, що композиції можна використовувати для лікування конкретного стану. В альтернативному або додатковому варіанті виріб може додатково включати другий (або третій) контейнер з фармацевтично прийнятним буфером, таким як бактеріостатична вода для ін'єкцій (БСВІ), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера і розчин декстрази. Крім того, він може включати інші матеріали, необхідні з комерційної точки зору і з точки зору споживача, зокрема, інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки і шприци.

Опис амінокислотних послідовностей і нуклеотидних послідовностей

- SEQ ID NO: 1 HVR-H1 важкого ланцюга, aLAG3(0414)
 SEQ ID NO: 2 HVR-H2 важкого ланцюга, aLAG3(0414)
 SEQ ID NO: 3 HVR-H3 важкого ланцюга, aLAG3(0414)
 SEQ ID NO: 4 HVR-L1 легкого ланцюга, aLAG3(0414)
 5 SEQ ID NO: 5 HVR-L2 легкого ланцюга, aLAG3(0414)
 SEQ ID NO: 6 HVR-L3 легкого ланцюга, aLAG3(0414)
 SEQ ID NO: 7 варіабельний домен важкого ланцюга VH, aLAG3(0414)
 SEQ ID NO: 8 варіабельний домен легкого ланцюга VL, aLAG3(0414)
 10 SEQ ID NO: 9 HVR-H1 важкого ланцюга, aLAG3(0403)
 SEQ ID NO: 10 HVR-H2 важкого ланцюга, aLAG3(0403)
 SEQ ID NO: 11 HVR-H3 важкого ланцюга, aLAG3(0403)
 SEQ ID NO: 12 HVR-L1 легкого ланцюга, aLAG3(0403)
 SEQ ID NO: 13 HVR-L2 легкого ланцюга, aLAG3(0403)
 SEQ ID NO: 14 HVR-L3 легкого ланцюга, aLAG3(0403)
 15 SEQ ID NO: 15 варіабельний домен важкого ланцюга VH, aLAG3(0403)
 SEQ ID NO: 16 варіабельний домен легкого ланцюга VL, aLAG3(0403)
 SEQ ID NO: 17 HVR-H1 важкого ланцюга, aLAG3(0411)
 SEQ ID NO: 18 HVR-H2 важкого ланцюга, aLAG3(0411)
 SEQ ID NO: 19 HVR-H3 важкого ланцюга, aLAG3(0411)
 20 SEQ ID NO: 20 HVR-L1 легкого ланцюга, aLAG3(0411)
 SEQ ID NO: 21 HVR-L2 легкого ланцюга, aLAG3(0411)
 SEQ ID NO: 22 HVR-L3 легкого ланцюга, aLAG3(0411)
 SEQ ID NO: 23 варіабельний домен важкого ланцюга VH, aLAG3(0411)
 SEQ ID NO: 24 варіабельний домен легкого ланцюга VL, aLAG3(0411)
 25 SEQ ID NO: 25 HVR-H1 важкого ланцюга, aLAG3(0417)
 SEQ ID NO: 26 HVR-H2 важкого ланцюга, aLAG3(0417)
 SEQ ID NO: 27 HVR-H3 важкого ланцюга, aLAG3(0417)
 SEQ ID NO: 28 HVR-L1 легкого ланцюга, aLAG3(0417)
 SEQ ID NO: 29 HVR-L2 легкого ланцюга, aLAG3(0417)
 30 SEQ ID NO: 30 HVR-L3 легкого ланцюга, aLAG3(0417)
 SEQ ID NO: 31 варіабельний домен важкого ланцюга VH, aLAG3(0417)
 SEQ ID NO: 32 варіабельний домен легкого ланцюга VL, aLAG3(0417)
 SEQ ID NO: 33 HVR-H1 важкого ланцюга, aLAG3(0416)
 SEQ ID NO: 34 HVR-H2 важкого ланцюга, aLAG3(0416)
 35 SEQ ID NO: 35 HVR-H3 важкого ланцюга, aLAG3(0416)
 SEQ ID NO: 36 HVR-L1 легкого ланцюга, aLAG3(0416)
 SEQ ID NO: 37 HVR-L2 легкого ланцюга, aLAG3(0416)
 SEQ ID NO: 38 HVR-L3 легкого ланцюга, aLAG3(0416)
 SEQ ID NO: 39 варіабельний домен важкого ланцюга VH, aLAG3(0416)
 40 SEQ ID NO: 40 варіабельний домен легкого ланцюга VL, aLAG3(0416)
 SEQ ID NO: 41 варіабельний домен важкого ланцюга VH, BMS-986016 (WO 2014/008218 і US
 2016/0326248)
 SEQ ID NO: 42 варіабельний домен легкого ланцюга VL BMS-986016 (WO 2014/008218 і US
 2016/0326248)
 45 SEQ ID NO: 43 варіабельний домен важкого ланцюга VH, MDX25F7 (25F7) (US 2011/0150892
 і WO 2014/008218)
 SEQ ID NO: 44 варіабельний домен легкого ланцюга VL, MDX25F7 (25F7) (US 2011/0150892
 і WO 2014/008218)
 SEQ ID NO: 45 варіабельний домен важкого ланцюга VH, гуманізоване BAP050 (LAG525)
 50 (US 2015/0259420)
 SEQ ID NO: 46 варіабельний домен легкого ланцюга VL, гуманізоване BAP050 (LAG525) (US
 2015/0259420)
 SEQ ID NO: 47 варіабельний домен важкого ланцюга VH, MDX26H10 (26H10) (US
 2011/0150892)
 55 SEQ ID NO: 48 варіабельний домен легкого ланцюга VL, MDX26H10 (26H10) (US
 2011/0150892)
 SEQ ID NO: 49 константна область людського легкого каппа-ланцюга
 SEQ ID NO: 50 константна область людського легкого лямбда-ланцюга
 SEQ ID NO: 51 константна область людського важкого ланцюга, що походить з IgG1
 60 SEQ ID NO: 52 константна область людського важкого ланцюга, що походить з IgG1. 3

мутаціями L234A, L235A і P329G

SEQ ID NO: 53 константна область людського важкого ланцюга, що походить з IgG4

SEQ ID NO: 54 приклад послідовності людського LAG3 (без сигнальної послідовності)

SEQ ID NO: 55 позаклітинний домен (ECD) людського LAG3 (ECD)

5 SEQ ID NO: 56 праймер rbHC.up

SEQ ID NO: 57 праймер rbHCf.do

SEQ ID NO: 58 праймер VcPCR_FHLC_leader.fw

SEQ ID NO: 59 праймер VcPCR_huCKappa.rev

10 Нижче перераховані амінокислотні послідовності VH- і VL-доменів, включаючи відмічені HVR (HVR виділені жирним шрифтом і підкреслені) антитіло до LAG3 з aLAG3(0403) по aLAG3(0417):

1) aLAG3(0403)

SEQ ID NO 15: VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDDYTMHWVRQAPGKGLEWVSLVSWDGG

GTYYTNSVYKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYFCAKATTDTSLYGYDYWGQ

GHLVTVSS

SEQ ID NO 16: VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGNAPKLLIYAASSLSQSGVPS

15 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSIPLTFGGGTKVEIK

2) aLAG3(0411)

SEQ ID NO 23: VH

EVHLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIVDDDYTMNWVYRQAPGKGLEWVSYISWDGGA

FYYADSVYKGRFTISRDDFKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLTDDTLYGSDYWGQ

GHLVTVSS

SEQ ID NO 24: VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQSISVSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLSQSGVPS

20 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSIPLTFGGGTKVEIK

3) aLAG3(0414)

SEQ ID NO 7: VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIEDDDYTMNWVYRQAPGKGLEWVAYISWDGGG

FYYTDSVYKGRFTISRDDFKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLTDDTLYGSDYWGQ

GHLVTVSS

SEQ ID NO 8: VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLSQSGVPS

25 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSIPLTFGGGTKVEIK

4) aLAG3(0416)

SEQ ID NO 39: VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGFTFSDYAMSWVYRQAPGKGLEWVSGIDNSGY

FYYTDSVYKGRFTISRDDVKNTLYLQMNSLRAEDTAVYLCTKTHSGLIVNDAFDIWGQ

GTMVTVSS

SEQ ID NO 40: VL

DIQLTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQSGVPSR

30 RFSGSGSGTDATLTISSLQPEDFATYYCQQSYSSTPLTFGGGTKVEIK

5) aLAG3(0417)

SEQ ID NO 31: VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGFTFSDYAMSWVYRQAPGKGLEWVSGIDNSGY

FYYTDSVYKGRFTISRDDVKNTLYLQMNSLRAEDTAVYLCTKTHSGLIVNDAFDIWGQ

GTMVTVSS

SEQ ID NO 32: VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLSQSGVPS

35 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSIPLTFGGGTKVEIK

Нижче перераховані конкретні варіанти здійснення винаходу:

1. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським LAG3, де антитіло містить

A) (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; (б) HVR-H2, що містить

7. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським LAG3, де антитіло містить послідовність VH SEQ ID NO:15 і послідовність VL SEQ ID NO:16.
8. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським LAG3, де антитіло містить послідовність VH SEQ ID NO:23, і послідовність VL SEQ ID NO:24.
- 5 9. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським LAG3, де антитіло містить послідовність VH SEQ ID NO:31, і послідовність VL SEQ ID NO:32.
10. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським LAG3, де антитіло містить послідовність VH SEQ ID NO:39, і послідовність VL SEQ ID NO:40.
- 10 11. Антитіло до LAG3 за будь-яким з попередніх варіантів здійснення винаходу, де антитіло характеризується незалежно однією або декількома з наступних властивостей:
антитіло до LAG3
- I) конкурує за зв'язування з LAG3 з антитілом до LAG3, яке містить VH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:7, і VL, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, і/або
- 15 II) зв'язується з LAG3 людини і мавп ціномолгус; і/ або
- III) інгібує зв'язування молекул ГКГС-II, які експресуються на людських пухлинних клітинах A375; і/або
- IV) підвищує вивільнення гранзиму B або IL-2 за даними аналізу реакції змішаних лімфоцитів (mMLR) (що описано в прикладі 3).
- 20 12. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським LAG3, де антитіло:
- I) конкурує за зв'язування з LAG3 з антитілом до LAG3, яке містить VH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:7, і VL, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, і/ або
- 25 II) зв'язується з LAG3 людини і мавп ціномолгус; і/ або
- III) інгібує зв'язування молекул ГКГС-II, які експресуються на людських пухлинних клітинах A375; і/або
- IV) підвищує вивільнення гранзиму B або IL-2 за даними аналізу реакції змішаних лімфоцитів (mMLR) (що описано в прикладі 3).
- 30 13. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів здійснення винаходу, яке являє собою моноклональне антитіло.
14. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів здійснення винаходу, яке являє собою людське, гуманізоване або химерне антитіло.
15. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів здійснення винаходу, яке являє собою фрагмент антитіла, який зв'язується з LAG3.
- 35 16. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів здійснення винаходу, яке являє собою повнорозмірне антитіло IgG1-ізотипу.
17. Антитіло за будь-яким з попередніх варіантів здійснення винаходу, яке являє собою повнорозмірне антитіло IgG1-ізотипу з мутаціями L234A, L235A і P329G (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).
- 40 18. Виділена нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло за будь-яким з попередніх варіантів здійснення винаходу.
19. Клітина-хазяїн, яка містить нуклеїнову кислоту за варіантом здійснення винаходу 18.
20. Спосіб одержання антитіла, який включає культивування клітини-хазяїна за варіантом здійснення винаходу 19 таким чином, щоби продукувалося антитіло.
- 45 21. Спосіб за варіантом здійснення винаходу 20, який додатково включає виділення антитіла з клітини-хазяїна.
22. Фармацевтична композиція, що містить антитіло за будь-яким з варіантів здійснення винаходу 1-17 і фармацевтично прийнятний носій.
23. Антитіло за будь-яким з варіантів здійснення винаходу 1-17, призначене для застосування як лікарський засіб.
- 50 24. Антитіло за будь-яким з варіантів здійснення винаходу 1-17, призначене для застосування для лікування раку.
25. Застосування антитіла за будь-яким з варіантів здійснення винаходу 1-17 для приготування лікарського засобу.
- 55 26. Застосування за варіантом здійснення винаходу 25, де лікарський засіб призначений для лікування раку.
27. Спосіб лікування індивідуума, що має рак, де спосіб включає введення індивідууму в ефективній кількості антитіла за варіантом здійснення винаходу 1.
28. Спосіб лікування або уповільнення прогресування пов'язаного з імунною системою захворювання, такого як пухлинний імунітет, де спосіб включає введення індивідууму в
- 60

ефективній кількості антитіла за варіантом здійснення винаходу 1.

29. Спосіб стимулювання імунної відповіді або функції, такої як Т-клітинна активність, де спосіб включає введення індивідууму в ефективній кількості антитіла за варіантом здійснення винаходу 1.

5 III. Приклади

Нижче представлені приклади способів і композицій, запропонованих у винаході. Як має бути очевидним, можна втілювати на практиці різні інші варіанти здійснення винаходу в цілому з урахуванням представленого вище опису винаходу.

10 Хоча представлений вище винахід було детально описано з використанням ілюстрацій і прикладів для ясності розуміння, описи і приклади не слід розглядати як такі, що обмежують обсяг винаходу. Описи всіх патентів і наукових публікацій спеціально повністю включені в даний опис як посилання.

Приклад 1:

Створення антитіл до LAG3

15 Імунізація кроликів

Трансгенних кроликів, що є власністю фірми Roche, в організмі яких експресувався спектр гуманізованих антитіл, імунізували плазмідною ДНК, що експресує LAG3.

20 Групу з 3 кроликів генетично імунізували з використанням плазмідного експресійного вектора, що кодує повнорозмірний людський LAG3 (15352_plntronA_fl-hLag3_DNA-IMS), шляхом внутрішньошкірного введення 400 мкг векторної ДНК, після чого здійснювали електропорацію (5 квадратних імпульсів по 750 В/см, тривалість 10 мс, інтервал 1 с). Здійснювали 7 послідовних імунізацій кроликів в дні 0, 14, 28, 49, 70, 98 і 126. Зразки крові (10 % від оціненого загального об'єму крові) брали в дні 35, 77, 105 і 133. Одержували сироватку, яку використовували для визначення титру за допомогою ELISA (див. нижче), і виділяли мононуклеарні клітини периферійної крові, які використовували як джерело антигенспецифічних В-клітин в описаному нижче процесі клонування В-клітин.

Визначення титрів в сироватці (ELISA)

30 Людський рекомбінантний білок LAG3 в концентрації 2 мкг/мл, 100 мкл/лунку, в ЗФР іммобілізували на 96-лунковому планшеті NUNC Maxisorp, після чого: блокували планшет, використовуючи 2 % кротейну С в ЗФР, 200 мкл/лунку; вносили з дублюванням серійні розведення антисироватки в 0,5 % кротейну С в ЗФР, 100 мкл/лунку; проводили виявлення з використанням або (1) кон'югованого з HRP ослиного антитіла до кролячого IgG (фірма Jackson Immunoresearch/Dianova 711-036-152; 1/16 000), або (2) кон'югованого з HRP кролячого антитіла до людського IgG (фірма Pierce/Thermo Scientific 31423; 1/5000), або (3) біотинізованого козячого антитіла до людського каппа-ланцюга (фірма Southern Biotech/Biozol 2063-08, 1/5 000) і стрептавідину-HRP; кожного, розведеного в 0,5 % кротейну С в ЗФР, 100 мкл/лунку. Для всіх стадій планшети інкубували протягом 1 год. при 37°C. У проміжку між усіма стадіями планшети промивали 3 рази з використанням 0,05 % Твін 20 в ЗФР. Сигнал генерували шляхом додавання розчинного субстрату BM Blue POD (фірма Roche), 100 мкл/лунку; і реакцію припиняли шляхом додавання 1М HCl, 100 мкл/лунку. Абсорбцію зчитували при 450 нм, довжину хвилі 690 нм приймали як референс-довжину хвилі. Титр визначали як розведення антисироватки, при якому рівень сигналу становив половину від максимального.

Виділення мононуклеарних клітин периферійної крові кролика (PBMC)

45 У імунізованих трансгенних кроликів брали зразки крові. EDTA, що містить цільну кров, двократно розводили 1×ЗФР (фірма PAA, Пашінг, Австрія) перед здійсненням центрифугування в градієнті густини з використанням середовища Лімфоліт для клітин ссавців (Lympholyte Mammal, фірма Cedarlane Laboratories, Бурлінгтон, Онтаріо, Канада) відповідно до специфікацій виробника. PBMC промивали двічі 1×ЗФР.

Середовище EL-4 B5

50 Застосовували середовище RPMI 1640 (фірма Pan Biotech, Айденабах, Німеччина), доповнене 10 % FCS (фірма Hyclone, Логан, шт. Юта, США), 2мМ глутаміном, 1 %-вим розчином пеніциліну/стрептоміцину (фірма PAA, Пашінг, Австрія), 2мМ піруватом натрію, 10мМ HEPES (фірма Pan Biotech, Айденабах, Німеччина) і 0,05мМ b-меркаптоетанолом (фірма Gibco, Пейслі, Шотландія).

Сенсибілізація планшетів білковим антигеном

55 Стерильні 6-лункові планшети для клітинних культур сенсибілізували людським ECD LAG3, кон'югованим з людським Fc-фрагментом (2 мкг/мл) в карбонатному буфері (0,1М бікарбонат натрію, 34мМ вторинний кислий карбонат натрію, рН 9,55) протягом ночі при 4 °С. Планшети тричі промивали стерильним ЗФР перед застосуванням.

60 Виснаження клітин

(а) Стерильні 6-лункові планшети (придатної для клітинних культур чистоти), покриті конфлюентним моношаром клітин СНО, застосовували для виснаження макрофагів/моноцитів за допомогою неспецифічної адгезії, а також неспецифічного зв'язування лімфоцитів.

5 (б) Пусті стерильні 6-лункові планшети (придатної для клітинних культур чистоти) застосовували для виснаження макрофагів і моноцитів, а також інших клітин за допомогою неспецифічної адгезії.

Половину зразка РВМС використовували для здійснення виснаження відповідно до п. (а) і половину для виснаження відповідно до п. (б).

10 Кожну лунку заповнювали до максимуму, вносячи в 4 мл середовища по 6×10^6 РВМС з імунізованих кроликів, і давали зв'язуватися протягом 1 год. при 37°C в інкубаторі. Клітини, що знаходяться в супернатанті (лімфоцити периферійної крові (PBL)), використовували для стадії пенінга антигена.

Збагачення В-клітин на антигені LAG3

Білковий антиген

15 В 6-лункові планшети для культур тканини, сенсibiliзовані білком LAG3-ECD-huFc, висівали по 6×10^6 PBL на 4 мл середовища, одержаних на стадіях виснаження з використанням пустого 6-лункового планшета, і давали зв'язуватися протягом 1 год. при 37°C в інкубаторі. Клітини, що не прикріпилися, видаляли шляхом обережного 1-2-кратного промивання лунок $1 \times 3\text{ФР}$. Прилиплі клітини, що залишилися, відокремлювали шляхом обробки трипсином протягом 10 хв при 37°C в інкубаторі. Обробку трипсином припиняли шляхом додавання середовища EL-4 B5. Клітини витримували на льоді до здійснення імунофлуоресцентного забарвлення.

Антиген клітинною поверхні

25 В 6-лункові планшети для культур тканини, покриті моношаром людських LAG3-позитивних клітин СНО, висівали по 6×10^6 PBL на 4 мл середовища, одержаних на стадіях виснаження з використанням 6-лункових планшетів, покритих СНО, і давали зв'язуватися протягом 1 год. при 37°C в інкубаторі. Клітини, що не прикріпилися, видаляли шляхом обережного 1-2-кратного промивання лунок $1 \times 3\text{ФР}$. Прилиплі клітини, що залишилися, відокремлювали шляхом обробки трипсином протягом 10 хв при 37°C в інкубаторі. Обробку трипсином припиняли шляхом додавання середовища EL-4 B5. Клітини витримували на льоді до здійснення імунофлуоресцентного забарвлення.

Імунофлуоресцентне забарвлення і проточна цитометрія

35 Для сортирування одиничних клітин використовували антитіло анти-IgG FITC (фірма AbD Serotec, Дюссельдорф, Німеччина) і анти-huCk PE (фірма Dianova, Гамбург, Німеччина). Для забарвлення поверхні клітини, одержані після стадії виснаження і збагачення, інкубували з антитілом анти-IgG FITC і анти-huCk PE в 3ФР і інкубували протягом 45 хв в темряві при 4°C . Після забарвлення РВМС двократно промивали охолодженою на льоді 3ФР. На завершення РВМС ресуспендували в охолодженому на льоді 3ФР і відразу ж піддавали FACS-аналізу. Перед здійсненням FACS-аналізу добавляли йодид пропідію в концентрації 5 мкг/мл (фірма BD Pharmingen, Сан-Дієго, шт. Каліфорнія, США) для того, щоби розрізнити мертві і живі клітини.

40 Для сортирування одиничних клітин застосовували пристрій Becton Dickinson FACSAria, забезпечений комп'ютером і програмним забезпеченням FACSDiva (фірма BD Biosciences, США).

Культивування В-клітин

45 Культивування кролячих В-клітин здійснювали відповідно до методу, описаного у Seeber зі співавторами (S. Seeber і ін., PLoS One 9 (2), e86184., 4 лютого 2014 р.). В цілому, метод полягав у наступному. Відсортовані поодинокі кролячі В-клітини інкубували в 96-лункових планшетах з 200 мкл/лунку середовища EL-4 B5, що містить клітини Pansorbin ($1:100000$) (фірма Calbiochem (фірма Merck), Дармштадт, Німеччина), 5 %-вий супернатант кролячих тимоцитів (фірма MicroCoat, Бернрид, Німеччина) і оброблені гамма-випромінюванням мишачі клітини тімоми EL-4 B5 (5×10^5 клітин/лунку) протягом 7 днів при 37°C в інкубаторі. Супернатанти В-клітинною культури відбирали для скринінгу, а клітини, що залишилися, відразу негайно заморожували при -80°C в 100 мкл буфера RLT (фірма Qiagen, Гільден, Німеччина).

Виділення V-доменів антитіл до LAG3

ПЛР-ампліфікація V-доменів

55 Одержували загальну РНК з В-клітинних лізатів (ресуспендованих в буфері RLT, фірма Qiagen, каталожний № 79216) з використанням набору NucleoSpin 8/96 RNA (фірма Macherey&Nagel; 740709.4, 740698) відповідно до протоколу виробника. РНК елювали з використанням 60 мкл вільної від РНКаз води. Використовували 6 мкл РНК для одержання кДНК за допомогою реакції зі зворотною транскриптазою із застосуванням Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (фірма Invitrogen, 18080-400) і оліго dT-праймера відповідно до

інструкцій виробника. Всі стадії здійснювали з використанням системи Hamilton ML Star. Використовували 4 мкл кДНК для ампліфікації варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів (VH і VL) імуноглобуліну із застосуванням AccuPrime Supermix (фірма Invitrogen, 12344-040) в кінцевому об'ємі 50 мкл з використанням праймерів rbHC.up і rbHC.do для важкого ланцюга і BcPCR_FHLC_leader.fw і BcPCR_huCkappa.rev для легкого ланцюга (таблиця 1.1). Всі прямі праймери мали специфічність щодо сигнального пептиду (відповідно VH і VL), в той час як зворотні праймери мали специфічність щодо константних областей (відповідно VH і VL). Умови ПЛР для RbVH були наступними: гарячий старт при 94 °C протягом 5 хв; 35 циклів по 20 с при 94 °C, 20 с при 70 °C, 45 с при 68 °C і кінцеве подовження при 68 °C протягом 7 хв. Умови ПЛР для HuVL були наступними: гарячий старт при 94 °C протягом 5 хв; 40 циклів по 20 с при 94 °C, 20 с при 52 °C, 45 с при 68 °C і кінцеве подовження при 68 °C протягом 7 хв.

Таблиця 1.1

SEQ ID NO: 56 rbHC.up	AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTC
SEQ ID NO: 57 rbHCf.do	CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG
SEQ ID NO: 58 BcPCR_FHLC_leader.fw	ATGGACATGAGGGTCCCCGC
SEQ ID NO: 59 BcPCR_huCkappa.rev	GATTTCAACTGCTCATCAGATGGC

8 мкл з 50 мкл розчину для ПЛР завантажували на 2 %-вий гель 48 E-Gel (фірма Invitrogen, G8008-02). Позитивні ПЛР-продукти очищали з використанням набору NucleoSpin Extract II (фірма Macherey&Nagel; 740609250) відповідно до протоколу виробника і елюювали за допомогою 50 мкл буфера для елюювання. Всі стадії очистки здійснювали з використанням системи Hamilton ML Starlet.

Рекомбінантна експресія кролячих моноклональних двовалентних антитіл

Для здійснення рекомбінантної експресії кролячих моноклональних двовалентних антитіл ПЛР-продукти, що кодують VH або VL, клонували у вигляді кДНК в експресійних векторах методом клонування з виступаючими кінцями (R.S. Haun і ін., Biotechniques, 13, 1992, стор. 515-518; M.Z. Li і ін., Nature Methods, 4, 2007, стор. 251-256). Експресійні вектори містили касету експресії, що складається з 5'-промотора CMV, що включає інтрон А, і 3'-последовності поліаденілування BGH. Окрім касети експресії плазміді містили сайт ініціації реплікації з рUC18 і ген бета-лактамази, що обумовлює стійкість до ампіциліну, для ампліфікації плазмідів E.coli. Використовували три варіанти основної плазміді: одна плазміді містила константну область кролячого IgG, призначену для включення VH-областей, і при цьому містила константну область людського легкого каппа-ланцюга LC, призначену для включення VL-областей.

Лінеаризовані експресійні плазміді, що кодують константні області каппа- або гамма-ланцюга і VL/VH-вставки, ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням праймерів, що перекриваються.

Очищені ПЛР-продукти інкубували з ДНК-полімеразою T4, яка створювала одноланцюгові виступи. Реакцію припиняли шляхом додавання дЦТФ.

На наступній стадії об'єднували плазміді і вставки і інкубували з gcsA, яка індукувала сайтспецифічну рекомбінацію. Рекомбінантними плазмідіами трансформували E.coli. На наступний день вирости колонії відбирали і тестували щодо правильності рекомбінантної плазміді, здійснюючи одержання препарату, рестрикційний аналіз і ДНК-секвенування.

Для експресії антитіл виділеними плазмідіами для HC і LC короткочасно трансфектували клітини HEK293 і через 1 тиждень збирали супернатант.

Приклад 2:

Характеризація антитіл до LAG3

Таблиця 2:

Узагальнення результатів характеристики різних антитіл до LAG3

Антитіла до Lag3	aLA G3 (0403)	aLA G3 (411)	aLA G3 (414)	aLA G3 (416)	aLA G3 (417)	MDX-25F7 (25F7)	BM S-986016	MDX-26H10 (26H10)	Гуманізоване BAP 050 (LAG525)
KD [M] одновалентне двовалентне	tbd tbd	tbd tbd	4.63 E-10 tbd	2.82 E-11 tbd	tbd tbd	tbd tbd	tbd tbd	tbd tbd	tbd tbd
kd [1/s]	5,00 E-06	3,87 E-05	1,95 E-04	2,21 E-04	9,48 E-05	3,86 E-04		3,99 E-04	
епітоп Bin	E3	E3	E3	E2b	E3	E5 (D1-петля)	E5	E4	E2b
ГКГСII/ELISA IC50 [нМ]	0,9	0,8	0,9	0,9	0,9	0,8/0,6	/0,4	0,9/0,6	/1,0
СНО-клітина ELISA точка перегибу [нг/мл]	30,9	41,3	48,1	37,2	27,8	75			

ELISA для людського Lag3

- 5 Планшети Nunc maxisorp (фірма Nunc, 464718) сенсibiliзували з розрахунку 25 мкл/лунку химерним білком рекомбінантний людський LAG-3-Fc (фірма R&D Systems, 2319-L3) при концентрації білка 800 нг/мл і інкубували при 4 °C протягом ночі або протягом 1 год. при кімнатній температурі. Після промивання (3×90 мкл/лунку ЗФРТ-буфера) кожен лунку інкубували з 90 мкл блокуючого буфера (ЗФР + 2 % БСА + 0,05 % Твін 20) протягом 1 год. при кімнатній температурі. Після промивання (3×90 мкл/лунку ЗФРТ-буфера) добавляли 25 мкл зразків антитіла до Lag3 в концентрації 1-9 мкг/мл (розведення в співвідношенні 1:3 в буфері OSEP) і інкубували протягом 1 год. при КТ. Після промивання (3×90 мкл/лунку ЗФРТ-буфера) добавляли 25 мкл/лунку кон'югату козяче антитіло до к-ланцюга людського Ig-HRP (фірма Millipore, AP502P) в розведенні 1:2000 і інкубували при КТ протягом 1 год. Після промивання (3×90 мкл/лунку ЗФРТ-буфера) добавляли 25 мкл/лунку субстрату TMB (фірма Roche, 11835033001) і інкубували протягом 2-10 хв. Вимірювання проводили з використанням пристрою Tecan Safire 2 при 370/492 нм.

ELISA для оцінювання зв'язування Lag3 з клітинною поверхнею

- 20 Висівали по 25 мкл/лунку несучі Lag3 клітини (рекомбінантні СНО-клітини, що експресують Lag3, 10000 клітин/лунку) в оброблені 384-лункові планшети для тканинної культури (фірма Corning, 3701) і інкубували при 37 °C протягом одного або двох днів. На наступний день після видалення середовища добавляли 25 мкл зразків антитіла до Lag3 (розведення в співвідношенні 1:3 в буфері OSEP, починаючи з концентрації 6-40нМ) і інкубували протягом 2 год. при 4 °C. Після промивання (1×90 мкл/лунку ЗФРТ) клітини фіксували шляхом додавання по 30 мкл/лунку глутарового альдегіду до кінцевої концентрації 0,05 % (фірма Sigma, каталожний №: G5882) протягом 10 хв при кімнатній температурі. Після промивання (3×90 мкл/лунку ЗФРТ-буфера)

добавляли по 25 мкл/лунку кон'югату козяче антитіло до к-ланцюга людського Ig (фірма Milipore, AP502P) в розведенні 1:1000 і інкубували при КТ протягом 1 год. Після промивання (3×90 мкл/лунку ЗФРТ-буфера) добавляли по 25 мкл/лунку субстрат ТМВ (фірма Roche, 11835033001) і інкубували протягом 6-10 хв. Вимірювання проводили з використанням пристрою Tecan Safire 2 при 370/492 нм.

Характеризація антитіл до LAG3 методом SPR (фірма Biacore)

Аналіз на основі методу поверхневого плазмонного резонансу (SPR) застосовували для визначення кінетичних параметрів зв'язування між антитілом до Lag3 у вигляді одновалентних Fab-фрагментів і міченими людським Fc позаклітинними доменами (ECD) людського Lag3 при 25 °С.

Для цього підготовляли дві проточні комірки біосенсорного чіпа С1 в пристрої Biacore T200 шляхом іммобілізації нейтравідину, розведеного до концентрації 25 мкг/мл ацетатним буфером, рН 4,5, з використанням "майстра іммобілізації" ("immobilization wizard"). Це приводило до досягнення рівнів іммобілізації, що відповідають приблизно 1900 RU. Потім зв'язували кон'югат біотин-антитіло до IgG-Fc (людський) CaptureSelect™ з нейтравідином, використовуючи розведення 20 мкг/мл в рухомому буфері (HBS-EP+, фірма GE Healthcare).

Сам метод полягав у виконанні чотирьох команд на цикл. Перша команда: захват ~46 RU huLag3-Fc (20 с, 10 мкл/хв). Друга команда: ін'єкція зразка протягом 120 с з наступною дисоціацією тривалістю 1200 с при швидкості потоку 30 мкл/хв. Третя і четверта команда: регенерація за допомогою ін'єкції гліцин-HCl, рН 1,5, протягом 30 с.

Потім за допомогою раніше описаного метода здійснювали вимірювання для серійних розведень (3,13-200нМ, двократні розведення в рухомому буфері) кожного Fab-фрагмента антитіла і додаткових порожніх циклів. Після цього застосовували програму оцінювання для Biacore T200 для одержання кінетичних величин, використовуючи апроксимацію на основі моделі зв'язування 1:1 Ленгмюра, встановлюючи параметр для апроксимації Rmax: "локальний", оскільки рівні захвату не були ідеально відтворюваними. Результати представлені в таблиці 2.

Аналіз на основі методу поверхневого плазмонного резонансу (SPR) застосовували для визначення позірних афінностей, що характеризують взаємодію між зв'язуючими агентами aLag3 в їх двовалентному форматі та позаклітинними доменами (ECD) людського Lag3 при 25 °С.

Для цього підготовляли біосенсорний чіп фірми Biacore для аналізу з використанням пристрою Biacore T200 шляхом іммобілізації специфічного антитіла, що містить точкову мутацію, до рівня, що відповідає як мінімуму приблизно 800 RU, в стандартних умовах амінного сполучення.

Після цього в кожному циклі здійснювали захват зразка антитіла і в систему вносили ECD huLag3 в одній з концентрацій з серії концентрацій (що складається в цілому з чотирьох концентрацій) на період часу, що становить 200 с, за яким слідував період дисоціації тривалістю 1200 с. Потім здійснювали регенерацію біосенсорного чіпа.

Одержані експериментальні дані оцінювали з використанням характеристик "Карти взаємодій", одержаної за допомогою програми Ridgeview Diagnostics TraceDrawer, для розрахунку індивідуального вкладу в позірну афінність зв'язування кожного зразка.

Результати представлені в таблиці 2.

Картування епітопів

Групування епітопів (поділ на групи, "кошки") здійснювали за допомогою аналізу на основі методу поверхневого плазмонного резонансу (SPR). Для цього зв'язуючі агенти aLag3 зв'язували з huLag3 в пристрої Biacore T200. Потім оцінювали доступність раніше сформованого комплексу зв'язуючий агент aLag3-huLag3 для інших зв'язуючих агентів.

Для здійснення цього аналізу використовували набір SA CAP (фірма GE Healthcare). Якщо не зазначено інше, то цей аналіз здійснювали відповідно до керівництва для набору SA CAP.

Аналіз включав тільки один тип циклу. Після гібридизації давали можливість біотинілованому міченому huFc huLag3 в концентрації 10нМ зв'язуватися з стрептавідином на сенсорному чіпі протягом 20 с при швидкості потоку 10 мкл/хв. Потім ін'єктували перший зразок, розведений до 200нМ в рухомому буфері, протягом 180 с при швидкості потоку 30 мкл/хв, після чого негайно ін'єктували другий зразок в тих же самих умовах. Після цього поверхню регенерували.

Потім зразки приписували до різних епітопних груп зі схожими схемами конкуренції. Першу групу категоризацію здійснювали на основі відносної відповіді на другу ін'єкцію з використанням порогового рівня, що становить 6,1 RU, який був трохи вище найбільшої величини, одержаної у тому випадку, коли зв'язуючий агент ін'єктували як перший і другий зразок. Всі величини і

результати остаточно валідували після візуального обстеження сенсограмм.

Результати представлені в таблиці 2. Ідентифіковані три основні епітопні групи (E1, E2 і E3) на основі схем конкуренції. Оскільки aLag3-0416 і гуманізоване BAP 050 були віднесені до однієї і тієї ж групи, але не повністю інгібували одне одного, їх віднесли до підгруп E2b і E2c.

5 Зв'язування антитіл до Lag3, виділених з tg-кроликів, з рекомбінантними позитивними за супо-Lag3 НЕК-клітинами

На додаток до аналізу зв'язування з використанням НЕК-клітин, що рекомбінантно експресують на своїй поверхні людський Lag3, оцінювали також зв'язування з позитивними за Lag3 мавп ціномолгус НЕК-клітинами. Для цього експерименту заморожені НЕК293F-клітини, раніше короткочасно трансфектовані супо-LAG-3, піддавали відтаюванню, центрифугували і доповнювали 3ФР/2 % FBS. Висівали по $1,5 \times 10^5$ клітин/лунку в 96-лункові планшети. Додаляли антитіла до Lag3 до досягнення кінцевої стандартизованої концентрації 10 мкг/мл. В цьому експерименті для порівняння і як контролі одержували антитіла, застосовувані як позитивний контроль (Medarex 25F7), а також контроль ізотипу (hulgG1 фірми Sigma, каталожний номер 15154, дані не представлені), і проводили вимірювання автофлуоресценції. НЕК-клітини інкубували з зазначеними антитілами протягом 45 хв на льоді, промивали двічі 200 мкл/лунку охолодженого на льоді буфера 3ФР, що містить 2 % FBS, перед додаванням вторинного антитіла (мічене APC козяче антитіло до каппа-ланцюга людського IgG, фірма Invitrogen, каталожний № MH10515) (розведене в співвідношенні 1:50 в FACS-буфері) і інкубували ще 20 протягом 30 хв на льоді. Клітини знову двічі промивали 200 мкл охолодженого на льоді буфера 3ФР/2 % FBS, після чого зразки остаточно ресуспендували в 150 мкл FACS-буфера і вимірювали зв'язування з використанням модуля FACS CANTO-II HTS.

Результати

В представленій нижче таблиці наведені дані про зв'язування різних антитіл до Lag3 з НЕК293-клітинами, що експресують супо-LAG3, і їх перехресну реактивність або у вигляді % позитивних клітин, або у вигляді середньої геометричної величини (GeoMean) інтенсивності сигналу:

Антитіло до LAG3	% позитивних клітин	GeoMean
референс-антитіло до LAG3 MDX25F7	41.2	3062
aLAG3(0411)	88.6	11007
aLAG3(0414)	81.6	9169
aLAG3(0416)	67.9	4221
aLAG3(0417)	75.9	7115
aLAG3(0403)	82.0	7457

30 Зв'язування антитіл до Lag3, виділених з tg-кроликів, з (активованими) PBMC/T-клітинами мавп ціномолгус, що експресують Lag3

Після зв'язування з рекомбінантним білком Lag3 і Lag3, що рекомбінантно експресується на клітинах ссавців, оцінювали/підтверджували зв'язування з Lag3, що експресується на активованих T-клітинах мавп ціномолгус.

35 Характеристики зв'язування новостворених антитіл до Lag3 (одержаних з використанням трансгенних кроликів фірми Roche) з Lag3, що експресується на клітинній поверхні T-клітин або PBMC мавп ціномолгус, підтверджували за допомогою FACS-аналізу. В той час як Lag3 не експресувався на наївних T-клітинах, він піддавався підвищувальній регуляції після активації і/або на виснажених T-клітинах. Таким чином, одержували мононуклеарні клітини периферійної 40 крові (PBMC) зі свіжої крові мавп ціномолгус і потім активували шляхом попередньої обробки за допомогою CD3/CD28 (1 мкг/мл) протягом 2-3 днів. Після цього активовані клітини аналізували щодо експресії Lag3. В цілому, метод полягав у наступному: $1-3 \times 10^5$ активованих клітин забарвлювали протягом 30-60 хв на льоді з зазначеними антитілами до Lag3 і відповідними контрольними антитілами в кінцевій концентрації 10 мкг/мл. Зв'язані антитіла до Lag3 виявляли 45 з використанням кон'югованих з флуорохромом вторинних антитіл до людського IgG або до кролячого IgG. Після забарвлення клітини промивали двічі 3ФР/2 % FCS і аналізували за допомогою FACS Fortessa (фірма BD).

Результати

50 В представленій нижче таблиці узагальнені дані при процент Lag3-позитивних клітин серед активованих PBMC мавп ціномолгус:

Антитіла до Lag3/контрольні антитіла	% позитивних клітин мавп ціномолгус (PBL) після активації за допомогою CD3/CD28
тільки вторинне антитіло (hu)	7,62
DP47 (людський ізотип)	9,19
референс-антитіло до LAG3 (MDX25F7)	22,1
референс-антитіло до LAG3 BMS-986016	18,6
референс-антитіло до LAG3 (гуманізоване BAP050(LAG525))	50,7
тільки вторинне антитіло (rb)	5,26
aLAG3(0403)	44,2
aLAG3(0411)	46,6
aLAG3(0414)	43,0
aLAG3(0416)	38,9
aLAG3(0417)	35,3

Продемонстровано, що на активованих Т-клітинах мавп ціномолгус всі кролячі антитіла до Lag3 значимо зв'язувались з Lag3⁺-клітинами. При цьому для всіх новостворених антитіл мав місце більш високий відсоток позитивних клітин у порівнянні з людськими референс-антитілами до Lag3 (такими, наприклад, як MDX25F7, BMS-986016).

Інгібування зв'язування LAG-3 з молекулами ГКГС-II, що експресуються на людських пухлинних клітинах A375 (за даними ELISA)

Клітини A375 висівали в об'ємі 25 мкл/лунку (10000 клітин/лунку) в оброблені 384-лункові планшети для культур тканин (фірма Corning, 3701) і інкубували при 37 °C протягом ночі. Антитіла до Lag3 попередньо інкубували протягом 1 год. з біотинілованим Lag3 (250 нг/мл) у середовищі для клітинної культури з використанням розведень в співвідношенні 1:3, починаючи з концентрації антитіла 3 мкг/мл. Після видалення середовища з лунок з висіяними клітинами перенесли в лунки по 25 мкл попередньо інкубованих сумішей антитіло-Lag3 і інкубували протягом 2 год. при 4 °C. Після промивання (1 × 90 мкл в 3ФРТ) клітини фіксували шляхом додавання по 30 мкл/лунку глутарового альдегіду до кінцевої концентрації 0,05 % (фірма Sigma, каталожний № G5882) протягом 10 хв при кімнатній температурі. Після промивання (3 × 90 мкл 3ФРТ-буфером) добавляли по 25 мкл/лунку полі-HRP40-стрептавідину (фірма Fitzgerald, 65R-S104PHRPx) в розведенні 1:2000 або 1:8000 і інкубували при КТ протягом 1 год. Після промивання (3 × 90 мкл 3ФРТ-буфером) добавляли по 25 мкл/лунку субстрату TMB (фірма Roche, 11835033001) і інкубували протягом 2-10 хв. Вимірювання проводили з використанням пристрою Tecan Safire 2 при 370/492 нм.

Інгібування зв'язування LAG-3 з молекулами ГКГС-II, що експресуються на людських пухлинних клітинах A375 (за даними FACS-аналізу)

Принцип аналізу

Для дослідження антагоністичної функції антитіл до Lag3 проводили аналіз ГКГСII:Lag3 в умовах конкуренції. Людські ГКГСII⁺-A375-клітини забарвлювали створеним в лабораторії заявника біотинілованим злитим білком Lag3:Fc з попередньо інкубованими антитілами до Lag3 або без них. Цей аналіз здійснювали в умовах конкуренції методом FACS: A375-клітини (ATCC, № CRL-1619) культивували, здійснюючи 2-3 пересівання, у середовищі Ігла EM, доповненому EBSS (фірма PAN, каталожний № P04-00509), 10 % FBS, 2мМ L-глутаміном, 1× NEAA і 1-кратним пірватом натрію. Всі антитіла розводили в FACS-буфері до кінцевої концентрації 20 мкг/мл в об'ємі 25 мкл (в 96-лункових планшетах з U-подібним дном). Добавляли 25 мкл створеного в лабораторії заявника біотинілованого рекомбінантного злитого білка LAG-3:Fc до досягнення кінцевої концентрації 10 мкг/мл або до середовища, або до антитіл до Lag3 або контролів і здійснювали попередню інкубацію протягом 30 хв при кімнатній температурі. A375-клітини промивали 3ФР і густину клітин доводили до 3×10⁶ клітин/мл в 3ФР. Висівали по 100 мкл на лунку в 96-лунковий планшет з V-подібним дном. Планшети центрифугували і видалляли супернатант. Потім до клітин додавали попередньо інкубовану суміш злитий білок LAG-3:Fc/антитіло (50 мкл/лунку) і інкубували протягом 1 год. при кімнатній температурі. Після цього клітини промивали 200 мкл FACS-буфера. Для виявлення біотинілованого білка Lag3:Fc, зв'язаного з присутніми на клітинах молекулами ГКГСII, використовували кон'юговане з APC козяче антитіло до біотину з розрахунку 3 мкл/зразок (фірма Miltenyi Biotec, каталожний № 130-090-856) і інкубували ще протягом 10-15 хв. Після забарвлення клітини знову промивали і потім перенесли в 150 мкл FACS-буфера (3ФР/2 % FBS) в планшет з U-подібним дном і аналізували за допомогою пристрою FACS Canto-II з використанням модуля HTS.

Два антитіла до Lag3 (клони 25F7 і 26H10; фірма Medarex) використовували як позитивні

контролі, а людський IgG1 (фірма Sigma, каталожний номер I5154) як відповідний контроль ізотипу. Всі антитіла застосовували в кінцевій концентрації 10 мкг/мл.

Результати

В представленій нижче таблиці наведені результати FACS-аналізу, що демонструють відсоток інгібування зв'язування белка Lag3 з молекулами ГКГС-II на клітинах (розрахований за зменшенням сигналу зв'язування у порівнянні з максимальною величиною за відсутності блокуючого антитіла):

Антитіло до LAG3	% інгібування
aLAG3(0403)	34,9
aLAG3(0414)	67,3
aLAG3(0411)	45,6
aLAG3(0416)	68,6
aLAG3(0417)	59,1
референс-антитіло MDX25F7	70,0
референс-антитіло MDX26H10	71,7
контроль ізотипу	-2,9
без МАТ	0,0

Ці дані підтверджують функціональну взаємодію всіх протестованих антитіл з Lag3 і блокаду клітинної взаємодії.

Нейтралізуюча здатність нових антитіл до Lag3 за даними стандартного біо/репортерного аналізу блокади LAG3

Для тестування нейтралізуючої здатності нових антитіл до Lag3 щодо відновлення пригніченої Т-клітинної відповіді *in vitro* застосовували репортерну систему, що надходить у продаж. Ця система складається з ефекторних Lag3+NFAT Jurkat-клітин (фірма Promega, каталожний № CS194801), ГКГС-II+Раї-клітин (ATCC, № CLL-86) і суперантигена. В цілому, репортерна система заснована на здійсненні трьох стадій: (1) індукованої суперантигеном активації NFAT-клітин, (2) інгібування сигналу активації, опосередкованого інгібуючою взаємодією між ГКГСII (Раї-клітини) і ефекторними Lag3+NFAT Jurkat-клітинами і (3) відновлення сигналу активації NFAT за допомогою антагонізуючих/нейтралізуючих Lag3 злитих конструкцій aVH-Fc.

Для цього експерименту Раї-клітини і ефекторні Lag-3+Jurkat/NFAT-luc2 Т-клітини культивували відповідно до інструкцій постачальника. Приготували серійні розведення (40 пг/мл-50 мкг/мл) декількох антитіл до Lag3 і референс-антитіл у середовищі для аналізу (RPMI 1640 (фірма PAN Biotech, каталожний № P04-18047), 1 %FCS) в 96-лункових культуральних планшетах з білим плоским дном (фірма Costar, каталожний № 3917). До розчину антитіл добавляли по 1×10^5 Lag3+NFAT-Jurkat-клітин/лунку. Після цієї стадії до суміші Jurkat-клітини/антитіло добавляли по $2,5 \times 10^4$ Раї-клітин/лунку, а також суперантиген SED (фірма Toxin technology, каталожний № DT303) в кінцевій концентрації 50 нг/мл. Після інкубації протягом 6 год. при 37 °C і 5 % CO₂ нагрівали до кімнатної температури субстрат Bio-Glo (фірма Promega, каталожний № G7940) і добавляли по 75 мкл на лунку, інкубували протягом 5-10 хв перед вимірюванням загальної люмінесценції за допомогою рідера Tecan Infinite відповідно до рекомендацій виробника набору.

На діаграмах продемонстровано відновлення опосередкованої ГКГСII/Lag3 супресії люциферазного сигналу NFAT різними антитілами до Lag3 після стимуляції SED (дані представлені у вигляді величин EC₅₀):

Антитіло до LAG3	EC50 [нМ] для Jurkat LAG3+SED+Раї		
	1-й аналіз	2-й аналіз	3-й аналіз
референс-антитіло MDX25F7	7,8/5.9	8,6	n.t.
референс-антитіло BMS-986016	n.t.	9,6	n.t.
гуманізоване референс-антитіло BAP050(LAG525)	n.t.	22,6	n.t.
Lag3 IgG-Fc	n.t.	немає впливу	n.t.
aLAG3(0411)	1,1	1,0	n.t.
aLAG3(0414)	1,1	1,0	1,8

Антитіло до LAG3	EC50 [нМ] для Jurkat LAG3+SED+Раї		
	1-й аналіз	2-й аналіз	3-й аналіз
aLAG3(0416)	3,1	2,5	3,5
aLAG3(0417)	1,0	n.t.	n.t.

n.t. молекули не тестували в цьому експерименті

Приклад 3: Біологічна активність за даними різних аналізів: вплив різних антитіл до LAG3 (індивідуально або в комбінації з антитілами до PD1)

5

Таблиця 3:

Узагальнення даних про біологічну активність різних антитіл до LAG3 (індивідуально або в комбінації з антитілами до PD1)

Тип аналізу	Антитіло до Lag3 aLAG3 (0403)	Антитіло до Lag3 aLAG3 (0411)	Антитіло до Lag3 aLAG3 (0414)	Антитіло до Lag3 aLAG3 (0416)	Антитіло до Lag3 aLAG3 (0417)	Референс-антитіло 1 BMS 986016	Гуманізов. референс-антитіло 2 BAP050 (LAG525)
mMLR (GrzB)	+	-	+++	++	+	-	++
mMLR (IL-2)	-	-	+	+	++	+	++
CD4+AR H77			+++	+++		+	+
Treg-пригнічення (GrzB)			+++	+		-	+
Treg-пригнічення (IFN-g)			+++	++		+	+
PBMC пацієнта з меланомою			+++				

Вплив блокади PD-1 і LAG-3 на вивільнення цитотоксичного гранзиму В і секрецію IL-2 людськими CD4 Т-клітинами при спільному культивуванні з алогенними зрілими дендритними клітинами

- 10 При створенні винаходу для скринінгу блокуючих антитіл до LAG-3 в комбінації з антитілом до PD-1 в алогенних умовах був розроблений аналіз, в якому свіжоочищені CD4 Т-клітини спільно культивували протягом 5 днів за присутності алогенних зрілих дендритних клітин, що походять з моноцитів (mDC). Моноцити виділяли зі свіжих PBMC за один тиждень до цього за допомогою їх прикріплення до пластику і наступного видалення клітин, що не прикріпилися.
- 15 Після цього з моноцитів одержували незрілі DC шляхом культивування протягом 5 днів у середовищі, що містить GM-CSF (50 нг/мл) і IL-4 (100 нг/мл). Для індукції дозрівання iDC до культурального середовища додавали TNF-альфа, IL-1-бета і IL-6 (кожний по 50 нг/мл) і культивували ще протягом 2 днів. Потім оцінювали дозрівання DC шляхом вимірювання експресії на їх поверхні молекул головного комплексу гістосумісності класу II (ГКГСII), CD80, CD83 і CD86 методом проточної цитометрії (фірма LSRFortessa, BD Biosciences).
- 20

У день мінімальної реакції змішаних лімфоцитів (mMLR) проводили збагачення CD4 Т-клітин з використанням набору мікрогранул (фірма Miltenyi Biotec) з 10^8 PBMC, одержаних з організму

неспорідненого донора. Перед культивуванням CD4 Т-клітини мітили за допомогою 5мкМ складного карбоксифлуоресцеїнсукцинімідилового ефіру (CFSE). Потім висівали 10^5 CD4 Т-клітин в 96-лунковий планшет разом зі зріпими ало-DC (5:1) за присутності або за відсутності блокуючого антитіла до PD-1 aPD1(0376) (тобто PD1-0103-0312, описаного в заявці PCT PCT/EP 2016/073248) індивідуально або в комбінації з химерними антитілами до LAG-3 (з aLAG3(0403) по aLAG(0418) (з (0403) по (0418)) або референс-антитілами (гуманізоване BAP050 (LAG525) і BMS 986016) в концентрації 10 мкг/мл. DP47 являє собою людський IgG, що не зв'язується, з мутацією LALA в Fc-області для уникнення його розпізнавання FcγR, і його застосовували як негативний контроль.

Через 5 днів збирали супернатанти клітинних культур, які пізніше використовували для вимірювання рівнів IL-2 за допомогою ELISA (фірма R&D systems), і залишали клітини при 37°C ще на 5 год. за присутності Golgi Plug (бркфелдин А) і Golgi Stop (монензин). Потім клітини промивали, забарвлювали поверхню антитілом до людського CD4 і фіксуємим барвником Live/Dead Aqua (фірма Invitrogen) перед здійсненням фіксації/пермеабілізації Fix/Perm-буфером (фірма BD Bioscience). Здійснювали внутрішньоклітинне забарвлення щодо гранзиму В (фірма BD Bioscience) і IFN-γ (фірма eBioscience). Результати представлені на фіг. 1А і 1Б.

Вплив блокади PD-1 і LAG-3 на вивільнення цитотоксичного гранзиму В людськими CD4 Т-клітинами, спільно культивованими з В-клітинною лімфобластоїдною клітинною лінією (ARH77).

При створенні винаходу для проведення функціональних аналізів здійснювали спільне культивування CD4 Т-клітин з пухлинною лінією клітин ARH77, В-клітинною лімфобластоїдною клітинною лінією, яка відрізняється більш низькими рівнями експресії PDL-1, ніж mDC, для того, щоби краще характеризувати антагоністичний внесок LAG-3 в блокаду PD-1. Інші умови експерименту і зчитування даних були такими ж, що і у випадку здійснення mMLR. Для запропонованих у винаході антитіл до LAG-3 (aLAG3(0414) і aLAG3(0416), вибраних на основі їх здатності спільно секретувати IL-2 і гранзим В при здійсненні mMLR), в комбінації з антитілом до PD-1 було встановлено значуще збільшення секреції гранзиму В CD4 Т-клітинами у порівнянні з референс-антитілами до LAG-3 ((гуманізоване BAP050 (LAG525) і BMS 986016)) ($P < 0,05$) і тільки антитілом до PD-1 ($P < 0,01$), див. фіг. 2.

Вплив блокади PD-1 і LAG-3 на Treg-опосередковану супресію вивільнення гранзиму В і IFN-γ людськими CD4 Т-клітинами, спільно культивованими з опроміненими алогенними РВМС.

При здійсненні функціональних досліджень з використанням аналізу обумовленої регуляторними Т-клітинами (Treg) супресії, виділені з одного і того ж донора РВМС розділяли на два зразки: один, збагачували CD4 Т-клітинами, а інший збагачували Treg, які визначали як CD4⁺CD25^{high} CD127^{low} Т-клітини за допомогою набору мікрогранул (фірма Miltenyi Biotec). Після очистки двох популяцій CD4 Т-клітини мітили 5мкМ складним карбоксифлуоресцеїнсукцинімідиліловим ефіром (CFSE), в той час як Treg мітили 5мкМ барвником Cell-Trace-Violet (CTV) для того, щоби пізніше розрізнити їх при проведенні FACS-аналізу.

Потім як CD4 Т-клітини (10^5), так і Treg (10^5), спільно культивували в 96-лунковому планшеті в співвідношенні 1:1 разом з опроміненими РВМС (10^5), одержаними з організму неспорідненого донора, за присутності або за відсутності запропонованих у винаході антитіл до LAG-3 (aLAG3(0414) і aLAG3(0416) або референс-антитіл до LAG-3 (гуманізоване BAP050 (LAG525) і BMS 986016) в комбінації з запропонованим у винаході антитілом до PD-1 в концентрації 10 мкг/мл. Як контроль для оцінювання рівня супресії ефекторних функцій CD4 Т-клітин Treg-клітинами, CD4 Т-клітини (10^5) культивували також спільно з опроміненими РВМС (10^5) за відсутності Treg.

Через 5 днів збирали супернатанти клітинних культур, які пізніше використовували для вимірювання рівнів IFN-γ за допомогою ELISA (фірма R&D systems), і клітини витримували при 37°C ще протягом 5 год. за присутності Golgi Plug (брефелдин А) і Golgi Stop (монензин). Потім клітини промивали, забарвлювали поверхню антитілом до людського CD4 і фіксуємим барвником Live/Dead Aqua (фірма Invitrogen) перед здійсненням фіксації/пермеабілізації Fix/Perm-буфером (фірма BD Bioscience). Здійснювали внутрішньоклітинне забарвлення щодо гранзиму В (фірма BD Bioscience) і IFN-γ (фірма eBioscience). Результати представлені на фіг. 3А і 3Б.

Антитіла до LAG-3 (aLAG3(0414) і aLAG3(0416) в комбінації з антитілом до PD-1 aPD1(0376) (тобто PD1-0103-0312, описане в заявці PCT PCT/EP2016/073248) приводили до вислизання Tconv від строгого контролю, здійснюваного регуляторними Т-клітинами, про що свідчила секреція ними значно більшої кількості гранзиму В, ніж Tconv-клітинами за присутності тільки антитіла до PD-1 ($P < 0,05$) або за відсутності інгібіторів контрольних точок ($P < 0,001$). Референс-антитіла до LAG-3 (гуманізоване BAP050 (LAG525) і BMS 986016) в комбінації з антитілом до

PD-1 не приводили до значимого порятунку ефекторних функцій Tconv від супресорної дії Treg. Подібні результати були отримані для IFN- γ , навіть незважаючи на те, що різниця не була статистично значущою, оскільки в аналізі використовували тільки 4 донори.

5 Вплив блокади PD-1 і LAG-3 на секрецію гранзиму B і IFN-гамма CD4 T-клітинами з PBMC пацієнта з меланомою після повторної обробки пептидними пулами імуногенних антигенів, асоційованих з меланомою.

Раніше було описано, що PBMC пацієнта з меланомою містять в кількостях, що піддаються виявленню, специфічні щодо пухлинного антигену T-клітини. Тому при створенні винаходу для цілей перевірки концепції (POC) тестували антитіло до LAG-3 (0414) плюс антитіло до PD-1 або 10 тільки антитіло до PD-1 на PBMC пацієнта з меланомою, повторно стимульованих протягом ночі пептидними пулами імуногенних антигенів, асоційованих з меланомою.

Від 10^5 до 10^6 PBMC з організму пацієнтів з меланомою інкубували при кімнатній температурі за присутності і за відсутності насичуючих концентрацій (10 мкг/мл) антитіла до PD-1 (0376) індивідуально або в комбінації з антитілом до LAG-3 (aLAG3(0414) = (0414), 10 мкг/мл). 15 Потім T-клітини повторно стимулювали протягом ночі пулом імуногенних пов'язаних з пухлиною антигенів, таких як MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4, Melan-A/MART-1, NYESO-1, білок меланоцитів Pmel 17 gp100, тирозиназа, споріднений тирозиназі білок 2 за присутності інгібіторів транспорту білків Golgi Plug (брефелдин cA) і Golgi Stop (монензин).

Після цього клітини промивали, забарвлювали поверхню антитілом до людського CD4 і 20 фіксуючим барвником Live/Dead Aqua (фірма Invitrogen) перед здійсненням фіксації/пермеабілізації за допомогою буфера Fix/Perm (фірма BD Bioscience). Здійснювали внутрішньоклітинне забарвлення щодо гранзиму B (фірма BD Bioscience) і IFN- γ (фірма eBioscience).

Комбінація антитіл до LAG-3 і до PD-1 ($P < 0,01$ і $P < 0,001$) значимо ($P < 0,01$ і $P < 0,0001$) 25 підвищувала ефекторні функції специфічних щодо пухлинних антигенів T-клітин (тобто секрецію гранзиму B і IFN- γ), в той час як блокада тільки PD-1 не чинила ніякої дії (дані не представлені).

Спеціаліст у даній галузі за аналогією з вищевикладеним може поширити описані вище в прикладі 3 дослідження, проведені на клітинній культурі/тваринах, на методи лікування людини.

30

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським LAG3, де антитіло містить:

(a) VH-домен, який містить (I) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1, (II) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2, і (III) HVR-H3, що містить 35 амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:3; і

(б) VL-домен, який містить (I) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (II) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5, і (III) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6.

2. Антитіло за п. 1, де антитіло містить:

40 послідовність VH SEQ ID NO:7 і послідовність VL SEQ ID NO:8.

3. Антитіло за п. 1 або 2, де антитіло:

I) конкурує за зв'язування з LAG3 з антитілом до LAG3, яке містить VH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:7, і VL, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, і/або

45 II) зв'язується з LAG3 людини і мавпи циномогус; і/або

III) інгібує зв'язування молекул ГКГС-II, які експресуються на людських пухлинних клітинах A375; і/або

IV) підвищує вивільнення гранзиму B або IL-2 за даними аналізу реакції змішаних лімфоцитів (mMLR).

4. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, яке являє собою людське, гуманізоване або 50 химерне антитіло.

5. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, яке являє собою повнорозмірне антитіло IgG1-ізо типу з мутаціями L234A, L235A і P329G (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

6. Виділена нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло за будь-яким з попередніх пунктів.

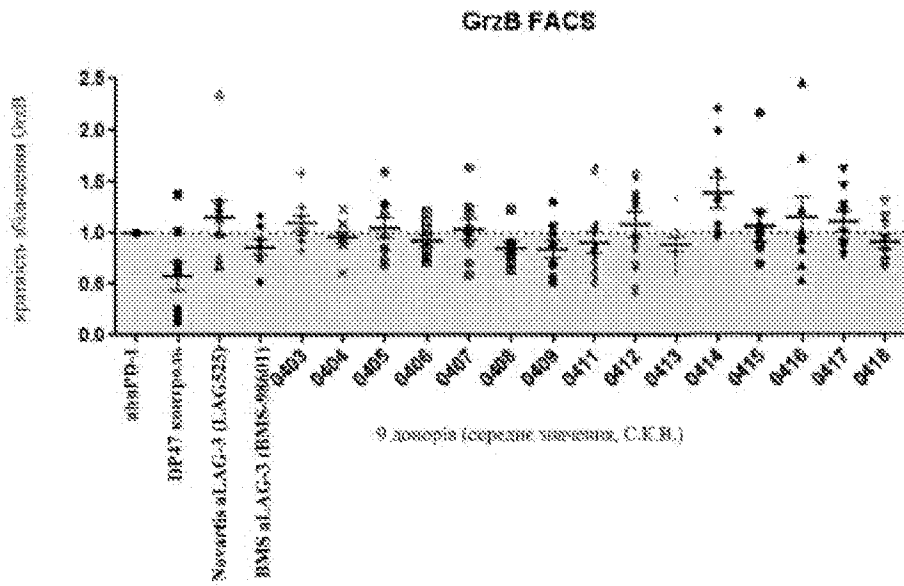
7. Клітина-хазяїн, яка містить нуклеїнову кислоту за п. 6.

55 8. Спосіб одержання антитіла, який включає культивування клітини-хазяїна за п. 7 таким чином, щоб продукувалося антитіло.

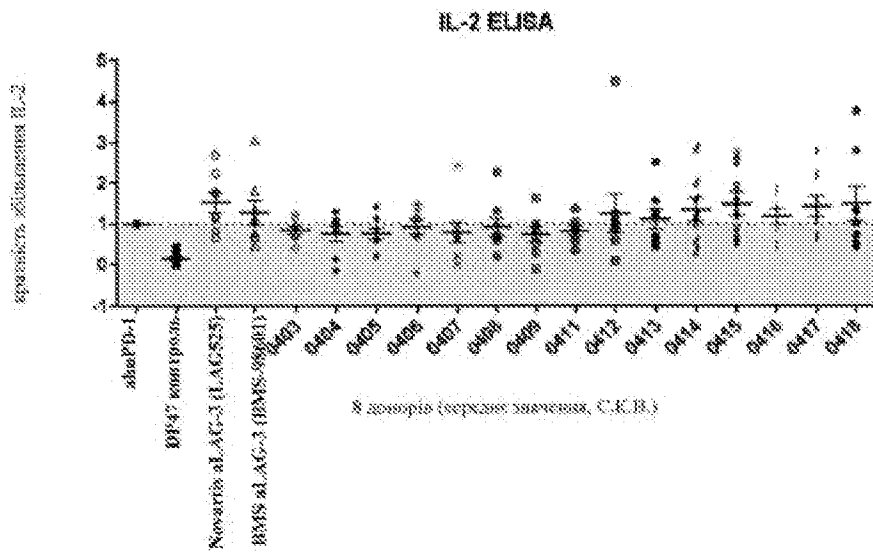
9. Спосіб за п. 8, який додатково включає виділення антитіла з клітини-хазяїна.

10. Фармацевтична композиція, що містить антитіло за будь-яким з пп. 1-5 і фармацевтично прийнятний носій.

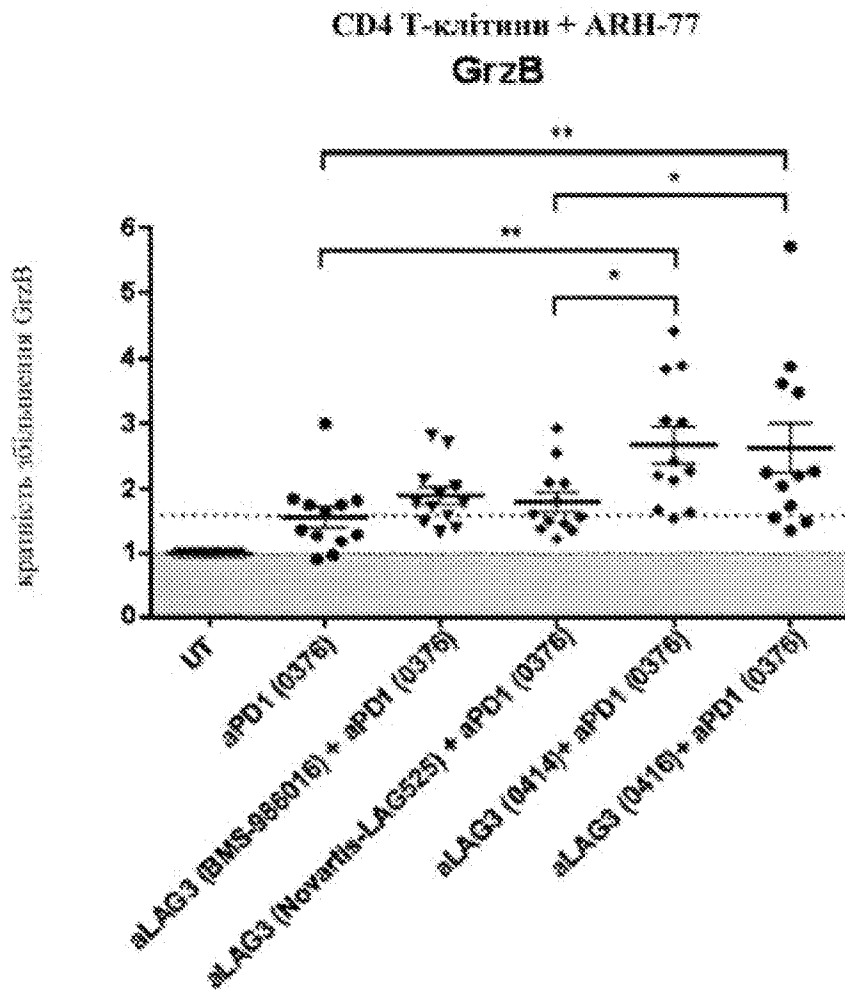
60 11. Антитіло за будь-яким з пп. 1-5, призначене для застосування для лікування раку.



Фиг. 1А

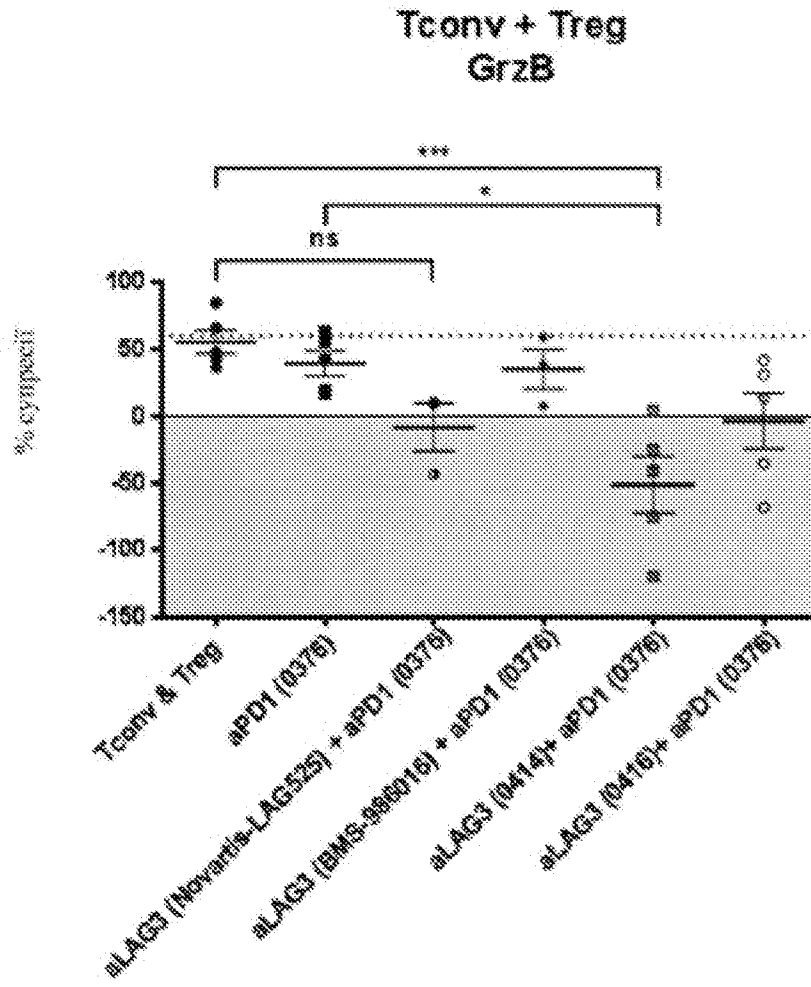


Фиг. 1Б



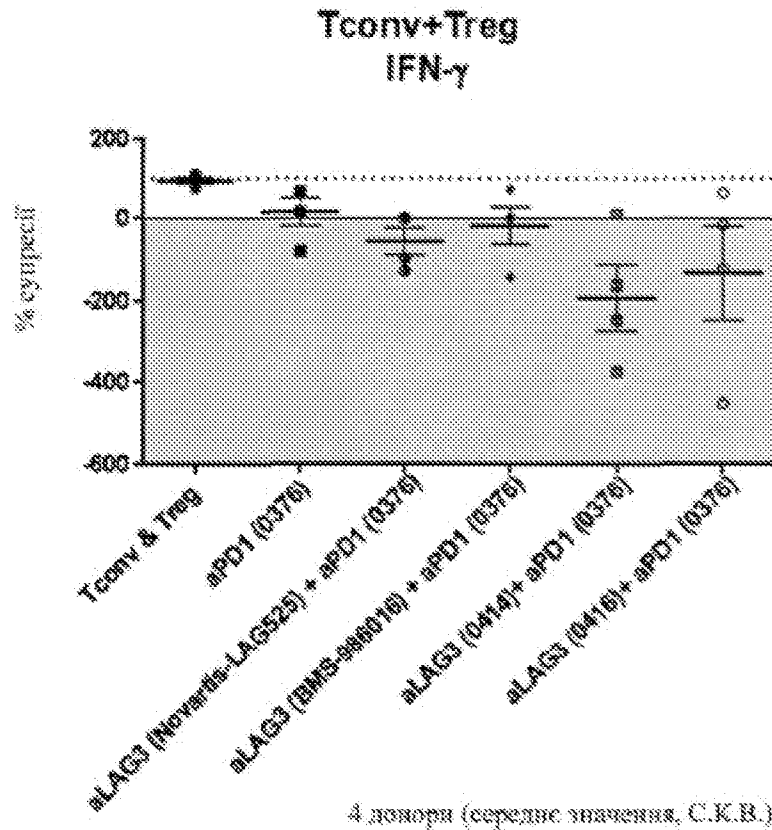
12 донорів (середнє значення, С.К.В.)

Фиг. 2



5 донорів (середнє значення, С.К.В.)

Fig. 3A



Фиг. 3Б

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ

<120> Антитіла до LAG3

<130> P34228

<150> EP17164917.1

<151> 2017-04-05

<160> 59

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Asp Tyr Thr Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

Gly Leu Thr Asp Thr Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 5

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 6

Gln Gln Thr Tyr Ser Ser Pro Leu Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 7

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 Ile Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Gly Leu Thr Asp Thr Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser 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 Tyr

20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Thr 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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Ser Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 9

Asp Tyr Thr Met His
 1 5

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 10

Leu Val Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asn Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 11

Ala Ile Thr Asp Thr Ser Leu Tyr Gly Tyr Asp Tyr
 1 5 10

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 12

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 13

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 14

Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 15
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 15

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 Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Leu Val Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asn Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Lys Ala Ile Thr Asp Thr Ser Leu Tyr Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 16

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser 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 Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 17

Asp Tyr Thr Met Asn
 1 5

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 18

Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 19

Gly Leu Thr Asp Asp Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr
 1 5 10

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 20

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Val Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 21

Ala Ser Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 22

Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 23
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 23

Glu Val His 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 Ile Val Asp Asp Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Gly Leu Thr Asp Asp Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 24

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

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

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

Tyr Ala Ser 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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 25

Asp Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 26

Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 27

Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 29

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 30

Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 31
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Val Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys
 85 90 95

Thr Lys Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 32
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser 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 Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 33

Asp Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 34

Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 35

Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 36

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 37

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 38

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 39

<211> 122

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Val Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys
 85 90 95

Thr Lys Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 40

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser 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 Tyr
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 41

<211> 120

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, BMS-986016 (WO2014/008218 і US2016/0326248)

<400> 41

Gln Val Gln Leu Gln 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 Asp Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn 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 Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>
 <223> варіабельний домен легкого ланцюга VL BMS-986016 (WO2014/008218 і US2016/0326248)

<400> 42

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

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
 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 Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 43
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>
 <223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, MDX25F7 (25F7) (US2011/0150892 і WO2014/008218)

<400> 43

Gln Val Gln Leu Gln 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 Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 44
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>
 <223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, MDX25F7 (25F7) (US2011/0150892 і WO2014/008218)

<400> 44

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

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
 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 Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 45
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>
 <223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, гуманізоване BAP050 (LAG525) (US2015/0259420)

<400> 45

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Ser
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Pro Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Asn Asn Ala Glu Ala Met
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 46
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>
 <223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, гуманізоване BAP050 (LAG525)
 (US2015/0259420)

<400> 46

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

<210> 47
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>
 <223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, MDX26H10 (26H10) (US
 2011/0150892)

<400> 47

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Trp Ala Val Ala Ser Trp Asp Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 48

<211> 108

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, MDX26H10 (26H10) (US
 2011/0150892)

<400> 48

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Ser
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 49

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

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

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

<210> 50
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 50

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 51
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 51

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

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
 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
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu 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
 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
 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
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 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
 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
 325

<210> 52

<211> 329
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 52

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
 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
 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

Lys 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
 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

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 Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

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
 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
 325

<210> 53

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 53

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 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
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 325

<210> 54

<211> 497

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 54

Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys
 1 5 10 15

Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly
 20 25 30

Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro
 35 40 45

Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
 50 55 60

Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly
 65 70 75 80

Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu
 85 90 95

Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg
 115 120 125

Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr
 130 135 140

Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn
 145 150 155 160

Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg
 165 170 175

Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His

180 185 190
 Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser
 195 200 205
 Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser
 210 215 220
 Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu
 225 230 235 240
 Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu
 245 250 255
 Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro
 260 265 270
 Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe
 275 280 285
 Thr Leu Arg Leu Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr
 290 295 300
 Cys His Ile His Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu
 305 310 315 320
 Ala Ile Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu
 325 330 335
 Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe
 340 345 350
 Val Trp Ser Ser Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro
 355 360 365
 Trp Leu Glu Ala Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys
 370 375 380
 Gln Leu Tyr Gln Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr
 385 390 395 400
 Glu Leu Ser Ser Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala
 405 410 415
 Leu Pro Ala Gly His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser
 420 425 430
 Leu Leu Leu Leu Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg
 435 440 445
 Gln Trp Arg Pro Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro
 450 455 460
 Pro Gln Ala Gln Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro
 465 470 475 480
 Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln
 485 490 495
 Leu

<210> 55
 <211> 422
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 55

Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys
 1 5 10 15

Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly
 20 25 30

Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro
 35 40 45

Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
 50 55 60

Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly
 65 70 75 80

Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu
 85 90 95

Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg
 115 120 125

Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr
 130 135 140

Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn
 145 150 155 160

Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg
 165 170 175

Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His
 180 185 190

Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser
 195 200 205

Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser
 210 215 220

Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu
 225 230 235 240

Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu
 245 250 255

Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro
 260 265 270

Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe
 275 280 285

Thr Leu Arg Leu Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr
 290 295 300

Cys His Ile His Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu
 305 310 315 320

Ala Ile Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu
 325 330 335

Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe
 340 345 350

Val Trp Ser Ser Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro
 355 360 365

Trp Leu Glu Ala Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys
 370 375 380

Gln Leu Tyr Gln Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr
 385 390 395 400

Glu Leu Ser Ser Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala
 405 410 415

Leu Pro Ala Gly His Leu
 420

<210> 56
 <211> 37
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> праймер rbHC.up

<400> 56
 aagcttgcca ccatggagac tgggctgcbc tggcttc 37

<210> 57
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> праймер rbHCf.do

<400> 57
 ccattggtga gggtgccccga g 21

<210> 58
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> праймер BcPCR_FHLC_leader.fw

<400> 58
atggacatga gggccccgc 20

<210> 59
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> праймер ВсPCR_huСкаппа.rev

<400> 59
gattcaact gctcatcaga tggc 24