



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/395 (2022.02); *A61P 29/00* (2022.02); *A61P 37/06* (2022.02); *C07K 16/28* (2022.02); *C07K 16/2896* (2022.02); *C07K 2317/24* (2022.02); *C07K 2317/565* (2022.02); *C07K 2317/567* (2022.02); *C07K 2317/70* (2022.02); *C07K 2317/73* (2022.02); *C07K 2317/75* (2022.02); *C07K 2317/92* (2022.02)

(21)(22) Заявка: 2020118313, 21.12.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.12.2018Дата регистрации:
04.05.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
22.12.2017 CN 201711408330.4

(43) Дата публикации заявки: 24.01.2022 Бюл. № 3

(45) Опубликовано: 04.05.2022 Бюл. № 13

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 22.07.2020(86) Заявка РСТ:
CN 2018/122534 (21.12.2018)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2019/120269 (27.06.2019)Адрес для переписки:
191002, Санкт-Петербург, а/я 5, ООО "Ляпунов
и партнеры"

(72) Автор(ы):

У Тинтин (CN),
 ЛИ Хао (CN),
 ЛЮ Сюнь (CN),
 ФУ Яюань (CN)

(73) Патентообладатель(и):

ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ МЕДСИН КО., ЛТД.
 (CN),
 ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ
 ФАРМАСЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2017037203 A1, 09.03.2017. WO
2014008218 A1, 09.01.2014. WO 2015084897 A2,
11.06.2015. EP 3182999 B1, 06.01.2021. RU
2178306 C2, 20.01.2002.C2
C1
C8
C4
C3
C1
C2

RU

2 771 384

C2

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ АНТИТЕЛО К LAG-3, И ЕЕ
ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Описана группа изобретений, включающая фармацевтическую композицию для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, способ получения вышеуказанной фармацевтической композиции, способ получения лиофилизированного препарата, содержащего антитело к LAG-3, лиофилизированный препарат для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3 (варианты), способ получения

восстановленного раствора, восстановленный раствор для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, применение фармацевтической композиции или лиофилизированного препарата или восстановленного раствора для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, способ лечения и профилактики заболевания или состояния, связанного с LAG-3, и набор для

R U 2 7 7 1 3 8 4 C 2

R U 2 7 7 1 3 8 4 C 2

лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3. Изобретение расширяет арсенал средств для лечения заболеваний или состояний,

связанных с LAG-3. 10 н. и 24 з.п. ф-лы, 10 ил., 29 табл., 21 пр.

R U 2 7 7 1 3 8 4 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 771 384⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 39/395 (2022.02); *A61P 29/00* (2022.02); *A61P 37/06* (2022.02); *C07K 16/28* (2022.02); *C07K 16/2896* (2022.02); *C07K 2317/24* (2022.02); *C07K 2317/565* (2022.02); *C07K 2317/567* (2022.02); *C07K 2317/70* (2022.02); *C07K 2317/73* (2022.02); *C07K 2317/75* (2022.02); *C07K 2317/92* (2022.02)

(21)(22) Application: 2020118313, 21.12.2018

(24) Effective date for property rights:
21.12.2018

Registration date:
04.05.2022

Priority:

(30) Convention priority:
22.12.2017 CN 201711408330.4

(43) Application published: 24.01.2022 Bull. № 3

(45) Date of publication: 04.05.2022 Bull. № 13

(85) Commencement of national phase: 22.07.2020

(86) PCT application:
CN 2018/122534 (21.12.2018)

(87) PCT publication:
WO 2019/120269 (27.06.2019)

Mail address:
191002, Sankt-Peterburg, a/ya 5, OOO "Lyapunov
i partnery"

(72) Inventor(s):

WU Tingting (CN),
LI Hao (CN),
LIU Xun (CN),
FU Yayuan (CN)

(73) Proprietor(s):

JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.
(CN),
SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL
CO., LTD. (CN)

(54) PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING ANTIBODY TO LAG-3 AND ITS USE

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology. A group of inventions is described, including a pharmaceutical composition for the treatment of a disease or condition associated with LAG-3, a method for obtaining the above pharmaceutical composition, a method for obtaining a lyophilized preparation containing an antibody to LAG-3, a lyophilized preparation for the treatment of a disease or condition associated with LAG-3 (options), a method for producing a reconstituted solution, a reconstituted solution for treating a disease or condition,

associated with LAG-3, the use of a pharmaceutical composition or a lyophilized preparation or a reconstituted solution for the preparation of a medicament for the treatment of a disease or condition associated with LAG-3, a method for treating and preventing a disease or condition associated with LAG-3, and a kit for treating the disease or a condition associated with LAG-3.

EFFECT: invention expands the arsenal of agents for the treatment of diseases or conditions associated with LAG-3.

34 cl, 10 dwg, 29 tbl, 21 ex

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области фармацевтических продуктов, в частности, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело к LAG-3 и его антиген-связывающий фрагмент, и его применению в качестве лекарственного средства.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Ген активации лимфоцитов-3, также известный как LAG-3 или CD215, является членом суперсемейства иммуноглобулинов, который может негативно регулировать различные функции и циклы выживания иммунных клеток. Исследования показали, что LAG-3 играет важную роль в вирусной инфекции, аутоиммунных заболеваниях и дисфункции иммунной системы, вызванной опухолью. Воздействуя на функцию LAG-3, можно улучшить состояние иммунной дисфункции при развитии этих заболеваний, чтобы улучшить прогноз заболеваний.

Как член суперсемейства иммуноглобулинов, LAG-3 состоит из трех областей:

внеклеточного домена, трансмембранныго региона и цитоплазматического домена. Зрелая молекула LAG-3, которая была впервые открыта Triebel et al. в 1990 году (J Exp Med, 1990, 171 (5): 1393-405), состоит из 470 аминокислот с относительной молекулярной массой 70 кДа. Исследователи обнаружили, что LAG-3, подобно CTLA-4 и PD-1, является негативной костимулирующей молекулой, активация которой может негативно регулировать функцию лимфоцитов. Конструктивно LAG-3 тесно связан с CD4, но его функция противоположна функции CD4. В частности, молекула LAG-3 имеет высокое сходство с молекулой CD4, и обе могут связываться с молекулами класса MHC-II (главный комплекс гистосовместимости). Однако avidность связывания LAG-3 с молекулами MHC-II выше, чем у CD4. Таким образом, LAG-3 вмешивается в активацию TCR, индуцированную CD4+ Т-лимфоцитами, и ингибирует активацию Т-лимфоцитов (Curr Opin Immunol, 2009, 21 (2): 179-86; Eur J Immunol, 2003, 33 (4): 970 -9). Исследования *in vitro* показали, что LAG-3 может ингибировать антиген-индуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов. Блокирование LAG-3 улучшит активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов и улучшит цитокины, секretируемые Т-хелперами 1-го типа (Th1). Huang et al. показали, что уровень LAG-3 был значительно повышен на активированной клеточной поверхности CD4+ Treg, и LAG-3 был необходимым условием, позволяющим CD4+ Treg оказывать наибольший иммуносупрессивный эффект (Immunity, 2004, 21 (4).): 503-13). Кроме того, - антитела против LAG-3 также поддерживают гомеостаз CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, блокирование LAG-3 значительно усилит способность CD8+ Т-лимфоцитов убивать опухолевые клетки (J Clin Invest, 2007, 117 (11). : 3383-92). В некоторых исследованиях заболеваний также было обнаружено, что LAG-3 играет важную роль в регуляции развития и прогрессирования заболеваний. Gandhi et al. подтвердили, что уровень экспрессии LAG-3 в Т-лимфоцитах ткани лимфомы человека связан с дисфункцией Т-лимфоцитов, и клиренс Т-лимфоцитов LAG-3⁺ может значительно повысить способность элиминации опухолевых клеток лимфоцитами (Blood, 2006, 108 (7): 2280-9). Результаты показывают, что LAG-3 является важной ингибиторной молекулой на поверхности иммунных клеток и оказывает значительное негативное регуляторное влияние на Т-лимфоциты.

LAG-3 в основном экспрессируется на Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах, NK-клетках (Естественные киллеры), Treg-клетках и DC-клетках (Дендритные клетки) (Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94 (11): 5744-9. Eur J Immunol, 2005, 35 (7): 2081-8; J Immunol, 2009, 182 (4): 1885-91). LAG-3 представляет собой класс иммунодепрессивных молекул и является одним из компонентов, составляющих корецептор TCR. Он вмешивается в

активацию TCR, индуцированную Т-лимфоцитами, и играет отрицательно регулирующую роль в активации Т-лимфоцитов. При некоторых заболеваниях экспрессия LAG-3 увеличивалась, и наблюдалась соответствующая иммуносупрессия. Gandhi et al.

обнаружили, что LAG-3 был высоко экспрессирован в лимфоцитах крови и опухолевой ткани пациентов с лимфомой Ходжкина; и функция специфических CD8+ Т-клеток, очевидно, была нарушена в опухолевых тканях, если LAG-3-позитивные Т-клетки были удалены, противоопухолевая функция была восстановлена и секреция цитокинов была увеличена. Авторы предположили, что экспрессия LAG-3 связана с негативной регуляцией иммунной функции специфическими Т-клетками, ингибирование функции

5 молекулы LAG-3 может усиливать противоопухолевый эффект Т-клеток, так что молекула LAG-3 может быть потенциальной мишенью для противоопухолевой иммунотерапии (Blood, 2006, 108 (7): 2280-9).

В настоящее время существует несколько международных фармацевтических компаний, таких как BMS и Novartis, которые занимаются изучением моноклональных 15 антител против LAG-3, которые усиливают противоопухолевый эффект Т-клеток и максимизируют собственный иммунный ответ пациентов на опухоль путем стимуляции антиген-специфических Т-клеточных ответов, и впоследствии достигают цели уничтожения опухолевых клеток.

Однако препараты на основе антител нестабильны из-за их большой молекулярной 20 массы, сложной структуры, подвержены разложению, полимеризации или нежелательной химической модификации. Исследования стабильных составов лекарственных средств на основе антител особенно важны для того, чтобы сделать антитела пригодными для введения и для поддержания стабильности при хранении и последующем использовании.

Хотя ряд компаний в настоящее время разрабатывают антитела к LAG3 и их 25 препараты, например, WO2018204374, WO2010019570, WO2014008218, WO9530750, WO2004078928, WO2008132601, WO2014140180, WO2015138920 и т. д., существует мало исследований, посвященных новому препарату антител LAG3. Все еще существует потребность в разработке фармацевтических композиций (препараторов), содержащих LAG3, которые более подходят для введения.

30 КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую антитело LAG3 или его антиген-связывающий фрагмент и буфер, причем буфер выбирают из группы, состоящей из ацетатного буфера, гистидинового буфера, цитратного буфера, сукцинатного буфера или трис-буфера.

35 В альтернативном варианте осуществления ацетатный буфер, содержащийся в фармацевтической композиции, выбран из группы, состоящей из буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, буфера из уксусной кислоты-ацетата калия, буфера из уксусной кислоты и соли гистидина, буфера из уксусной кислоты и ацетата кальция и буфера из уксусной кислоты и ацетата магния, предпочтительно буфера из уксусной 40 кислоты и ацетата натрия.

В альтернативном варианте осуществления гистидиновый буфер, содержащийся в фармацевтической композиции, выбран из группы, состоящей из буфера из гистидина и соляной кислоты, буфера из гистидина и уксусной кислоты, буфера из гистидина и фосфорной кислоты, буфера из гистидина и серной кислоты, предпочтительно 45 представляет собой буфер из гистидина и соляной кислоты.

В альтернативном варианте осуществления цитратный буфер, содержащийся в фармацевтической композиции, представляет собой буфер из лимонной кислоты и цитрата натрия; сукцинатный буфер представляет собой буфер из янтарной кислоты и

сукцинат анатрия.

В альтернативном варианте осуществления концентрация антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, содержащегося в фармацевтической композиции, составляет от примерно 1 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 10 до 90 мг/мл,

- 5 предпочтительно от примерно 20 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 30 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 40 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 50 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 60 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 70 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 80 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 10 до 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 20 до 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 30 до 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 40 до 80 мг/мл,
- 10 предпочтительно от примерно 50 до 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 60 до 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 70 до 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 10 до 70 мг/мл, предпочтительно от примерно 20 до 70 мг/мл, предпочтительно от примерно 30 до 70 мг/мл, предпочтительно от примерно 40 до 70 мг/мл, предпочтительно от примерно 50 до 70 мг/мл, предпочтительно от примерно 60 до 70 мг/мл, предпочтительно от примерно 10 до 60 мг/мл, предпочтительно от примерно 20 до 60 мг/мл,
- 15 предпочтительно от примерно 30 до 60 мг/мл, предпочтительно от примерно 40 до 60 мг/мл, предпочтительно от примерно 50 до 60 мг/мл, предпочтительно от примерно 10 до 50 мг/мл, предпочтительно от примерно 20 до 50 мг/мл, предпочтительно от примерно 30 до 50 мг/мл, предпочтительно от примерно 40 до 50 мг/мл, предпочтительно от примерно 10 до 40 мг/мл, предпочтительно от примерно 20 до 40 мг/мл, предпочтительно от примерно 30 до 40 мг/мл, предпочтительно от примерно 10 до 30 мг/мл,
- 20 предпочтительно от примерно 20 до 30 мг/мл. В качестве неограничивающего примера, концентрация антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента составляет
- 25 примерно 40 мг/мл, 41 мг/мл, 42 мг/мл, 43 мг/мл, 44 мг/мл, 45 мг/мл, 46 мг/мл, 47 мг/мл, 48 мг/мл, 49 мг/мл, 50 мг/мл, 51 мг/мл, 52 мг/мл, 53 мг/мл, 54 мг/мл, 55 мг/мл, 56 мг/мл, 57 мг/мл, 58 мг/мл, 59 мг/мл или 60 мг/мл, наиболее предпочтительно составляет 50 мг/мл.

В альтернативном варианте осуществления концентрация буфера составляет от

- 30 примерно 5 до 30 мМ, предпочтительно от примерно 10 до 30 мМ, предпочтительно от примерно 15 до 30 мМ, предпочтительно от примерно 20 до 30 мМ, предпочтительно от примерно 25 мМ до 30 мМ, предпочтительно от примерно 5 до 25 мМ,
- 35 предпочтительно от примерно 10 до 25 мМ, предпочтительно от примерно 15 до 25 мМ, предпочтительно от примерно 20 до 25 мМ, предпочтительно от примерно 5 до 20 мМ, предпочтительно от примерно 10 до 15 мМ; в качестве неограничивающего примера концентрация буфера составляет примерно 10 мМ, 12 мМ, 14 мМ, 16 мМ, 18 мМ, 20 мМ, 22 мМ, 24 мМ, 26 мМ, 28 мМ или 30 мМ, наиболее предпочтительно составляет 10 мМ.

В альтернативном варианте осуществления значение pH буфера, содержащегося в

- 40 фармацевтической композиции, составляет от примерно 5,0 до 7,5, предпочтительно от примерно 5,5 до 7,5, предпочтительно от примерно 6,0 до 7,5, предпочтительно от примерно 6,5 до 7,5, предпочтительно от примерно 7,0 до 7,5 предпочтительно от примерно 5,0 до 7,0, предпочтительно от примерно 5,5 до 7,0, предпочтительно от примерно 6,0 до 7,0, предпочтительно от примерно 6,5 до 7,0, предпочтительно от примерно 5,0 до 6,5, предпочтительно от примерно 5,5 до 6,5, предпочтительно от примерно 6,0 до 6,5, предпочтительно от примерно 5,0 до 6,0, предпочтительно от примерно 5,5 до 6,0, предпочтительно от примерно 5,0 до 5,5. В качестве неограничивающего примера, значение pH буфера может альтернативно составлять
- 45

примерно 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, более предпочтительно примерно от 5,5 до 6,0, еще более предпочтительно 5,5 или 6,0.

Кроме того, в альтернативном варианте осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит адьювант, выбранный из одного или нескольких сахаридов и поверхностно-активных веществ.

В альтернативном варианте осуществления, где сахарид представляет собой дисахарид, предпочтительно представляет собой трегалозу, сахарозу, маннит или сорбит, более предпочтительно представляет собой сахарозу. В альтернативном варианте осуществления концентрация сахарида, содержащегося в фармацевтической

композиции, составляет от примерно 30 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 60 до 90 мг/мл, от 35 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 40 до 90 мг/мл,

предпочтительно от примерно 45 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 50 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 55 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 60 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 65 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно

70 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 75 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 80 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 85 до 90 мг/мл, предпочтительно от примерно 30 до 85 мг/мл, предпочтительно от примерно 35 до 85 мг/мл,

предпочтительно от примерно 40 до 85 мг/мл, предпочтительно от примерно 45 до 85 мг/мл, предпочтительно от примерно 50 до 85 мг/мл, предпочтительно от примерно 55

до 85 мг/мл, предпочтительно от примерно 60 до 85 мг/мл, предпочтительно от 65 до 85 мг/мл, предпочтительно от примерно 70 до 85 мг/мл, предпочтительно от примерно

75 до 85 мг/мл, предпочтительно от примерно 80 до 85 мг/мл, предпочтительно от примерно 30 до 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 35 до 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 40 до 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 45 до 80 мг/мл,

предпочтительно от примерно 50 до 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 55 до 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 60 до 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 65

до 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 70 до 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 75 до 80 мг/мл, предпочтительно от примерно 30 до 75 мг/мл, предпочтительно от примерно 35 до 75 мг/мл, предпочтительно от примерно 40 до 75 мг/мл,

предпочтительно от примерно 45 до 75 мг/мл, предпочтительно от примерно 50 до 75 мг/мл, предпочтительно от примерно 55 до 75 мг/мл, предпочтительно от примерно 60

до 75 мг/мл, предпочтительно от примерно 65 до 75 мг/мл, предпочтительно от примерно 70 до 75 мг/мл, предпочтительно от примерно 30 до 70 мг/мл, предпочтительно от примерно 35 до 70 мг/мл, предпочтительно от примерно 40 до 70 мг/мл, предпочтительно от

примерно 45 до 70 мг/мл, предпочтительно от примерно 50 до 70 мг/мл, предпочтительно от примерно 55 до 70 мг/мл, предпочтительно от примерно 60 до 70 мг/мл, предпочтительно от примерно 65 до 70 мг/мл, предпочтительно от примерно 30

до 65 мг/мл, предпочтительно от примерно 35 до 65 мг/мл, предпочтительно от примерно 40 до 65 мг/мл, предпочтительно от примерно 45 до 65 мг/мл, предпочтительно от примерно

50 до 65 мг/мл, предпочтительно от примерно 55 до 65 мг/мл, предпочтительно от примерно 60 до 65 мг/мл, предпочтительно от примерно 30 до 60 мг/мл,

предпочтительно от примерно 35 до 60 мг/мл, предпочтительно от примерно 40 до 60 мг/мл, предпочтительно от примерно 45 до 60 мг/мл, предпочтительно от примерно 50

до 60 мг/мл, предпочтительно от примерно 55 до 60 мг/мл, предпочтительно от примерно 30 до 55 мг/мл, предпочтительно от примерно 35 до 55 мг/мл, предпочтительно от примерно 40

до 55 мг/мл, предпочтительно от примерно 45 до 55 мг/мл, предпочтительно от примерно 50 до 55 мг/мл, предпочтительно от примерно 30 до 50 мг/мл,

предпочтительно от примерно 35 до 50 мг/мл, предпочтительно от примерно 40 до 50

мг/мл, предпочтительно от примерно 45 до 50 мг/мл, предпочтительно от 30 до 45 мг/мл, предпочтительно от 35 до 45 мг/мл, предпочтительно от 40 до 45 мг/мл, предпочтительно от 30 до 40 мг/мл, предпочтительно от примерно 35 до 40 мг/мл, предпочтительно от примерно 30 до 35 мг/мл; в качестве неограничивающего примера,

5 концентрация сахарида, содержащегося в фармацевтической композиции, составляет примерно 60 мг/мл, 65 мг/мл, 70 мг/мл, 75 мг/мл, 80 мг/мл, 85 мг/мл или 90 мг/мл, более предпочтительно составляет от примерно 70 до 80 мг/мл, наиболее предпочтительно составляет 75 мг/мл.

В альтернативном варианте осуществления фармацевтическая композиция

10 дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активное вещество может быть выбрано из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 80, полигидроксильного углеводорода, тритона, додецилсульфоната натрия, лаурилсульфоната натрия, октилгликазида натрия, лаурилсульфо-бетамина,

15 миристилсульфо-бетамина, линолеилсульфо-бетамина, стеарилсульфо-бетамина, лаурил-сарказина, миристил-сарказина, линолеил-сарказина, стеарил-сарказина, линолеил-бетамина, миристил-бетамина, цетилбетамина, лаурамидопропил-бетамина, кокамидопропил-бетамина, линолеамидопропил-бетамина, миристамидопропил-бетамина, пальмитопропил-бетамина, изостеарамидопропил-бетамина, миристамидопропил-диметиламина, пальмитоилпропил-диметиламина, изостеарамидопропил-диметиламина,

20 метилкоакила натрия, метилолилтаурина натрия, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этилена и пропиленгликоля и так далее.

Предпочтительным поверхностно-активным веществом является полисорбат 80 или полисорбат 20, более предпочтительно полисорбат 80.

В альтернативном варианте концентрация поверхностно-активного вещества,

25 содержащегося в фармацевтической композиции, составляет от примерно 0,02 до 0,8 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,1 до 0,8 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,2 до 0,8 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,3 до 0,8 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,4 до 0,8 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,5 до 0,8 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,6 до 0,8 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,7 до

30 0,8 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,02 до 0,7 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,1 до 0,7 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,2 до 0,7 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,3 до 0,7 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,4 до 0,7 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,5 до 0,7 мг/мл, предпочтительно от 0,02 до 0,6 мг/мл, предпочтительно от 0,1 до 0,6 мг/мл,

35 предпочтительно от 0,2 до 0,6 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,3 до 0,6 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,4 до 0,6 мг/мл, предпочтительно от 0,5 до 0,6 мг/мл, предпочтительно от 0,02 до 0,5 мг/мл, предпочтительно от 0,1 до 0,5 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,2 до 0,5 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,3 до 0,5 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,4 до 0,5 мг/мл, предпочтительно от примерно

40 0,02 до 0,4 мг/мл. предпочтительно от примерно 0,1 до 0,4 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,2 до 0,4 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,3 до 0,4 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,02 до 0,3 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,1 до 0,3 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,2 до 0,3 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,02 до 0,2 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,1 до 0,2 мг/мл, предпочтительно от

45 0,02 до 0,1 мг/мл. В качестве неограничивающего примера концентрация поверхностно-активного вещества, содержащегося в фармацевтической композиции, составляет примерно 0,2 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,35 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,45 мг/мл или 0,5 мг/мл, более предпочтительно составляет от примерно 0,3 до 0,5 мг/мл.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит компоненты, приведенных в i) или) ii) ниже:

(a) от 1 до 90 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (b) от 5 до 30 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH примерно от 5,0 до 6,5, (c) от 30 до 90 мг/мл сахарозы и (d) от 0,02 до 0,8 мг/мл полисорбата 80; предпочтительно, фармацевтическая композиция содержит:

(e) от 40 до 80 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (f) от 10 до 30 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH примерно от 5,2 до 5,8, (g) 70 до 80 мг/мл сахарозы и (h) от 0,4 до 0,5 мг/мл полисорбата 80; или

ii) (a) от 1 до 90 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (b) от 5 до 30 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с pH примерно от 5,0 до 6,5, (c) 30 до 90 мг/мл сахарозы или трегалозы и (d) от 0,05 до 0,6 мг/мл полисорбата 80; предпочтительно, фармацевтическая композиция содержит:

(e) от 45 до 60 мг/мл антитела к LAG-3 или его антигенсвязывающего фрагмента, (f)

от 10 до 30 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с pH примерно от 5,5 до 6,0, (g) 60 до 90 мг/мл сахарозы и (h) 0,2 до 0,6 мг/мл полисорбата 80.

В одном варианте осуществления антитело LAG3 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащиеся в фармацевтической композиции, содержат HCDR1 (Определяющая комплементарность область тяжелой цепи), HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11 соответственно; и легкие цепи LCDR1 (Определяющая комплементарность область легкой цепи), LCDR2 и LCDR3, как представлено в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17 соответственно.

В альтернативном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит:

(a) от 1 до 90 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (b) от 5 до 30 мМ ацетатного буфера, предпочтительно pH от 5,0 до 6,5, (c) от 30 до 90 мг/мл сахарозы и (d) от 0,02 до 0,8 мг/мл полисорбата 80.

В альтернативном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит:

(a) от 40 до 80 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента,

(b) от 10 мМ до 30 мМ ацетатного буфера с pH примерно 5,0-6,0, (c) от 60 до 90 мг/мл сахарозы и (d) от 0,1 до 0,5 мг/мл полисорбата 80.

В альтернативном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит:

(a) от 50 до 60 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента,

(b) от 10 до 30 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH примерно 5,2-5,8, (c) от 70 до 80 мг/мл сахарозы и (d) от 0,4 до 0,5 мг/мл полисорбата 80.

В альтернативном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит:

(a) примерно 50 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (b) 10 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH примерно 5,5, (c) примерно 75 мг/мл сахарозы и (d) примерно 0,4 мг/мл полисорбата 80.

В альтернативном варианте осуществления антитело к LAG-3 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащийся в вышеуказанной фармацевтической композиции, представляет собой мышью антитело или его антиген-связывающий фрагмент, химерное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, гуманизированное антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

В альтернативном варианте осуществления мышью антитело LAG3, содержащееся в вышеуказанной фармацевтической композиции, содержит вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 6.

В альтернативном варианте осуществления гуманизированное антитело к LAG-3, содержащееся в вышеуказанной фармацевтической композиции, содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи представлена в любой из SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25, или имеет по меньшей мере 85%-ю идентичность с ними; и

где вариабельная область легкой цепи представлена в любой из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28 или имеет по меньшей мере 85%-ю идентичность с ними.

- 10 В альтернативном варианте осуществления вариабельная область легкой цепи антитела к LAG-3, содержащегося в фармацевтической композиции, имеет по меньшей мере 85%-ю, 86%-ю, 87%-ю, 88%-ю, 89%-ю, 90%-ю, 91%-ю, 92%-ю, 93%-ю 94%-ю, 95%-ю, 96%-ю, 97%-ю, 98%-ю, 99%-ю или 100%-ю идентичность с аминокислотной последовательностью вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28, и аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела к LAG-3 имеет по меньшей мере 85%-ю, 86%-ю, 87%-ю, 88%-ю, 89%-ю, 90%-ю, 91%-ю, 92%-ю, 93%-ю, 94%-ю, 95%-ю, 96%-ю, 97%-ю, 98%-ю, 99%-ю или 100%-ю идентичность с аминокислотной последовательностью вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25.

В альтернативном варианте осуществления гуманизированное антитело LAG3, содержащееся в вышеуказанной фармацевтической композиции, содержит комбинацию вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, выбранных из группы, в которую включены:

- 25 1) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 21 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 22;
- 2) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 21 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 26;
- 3) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 21 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 27;
- 30 4) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 21 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 28;
- 5) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 22;
- 35 6) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 26;
- 7) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 27;
- 8) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 28;
- 40 9) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 24 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 22;
- 10) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 24 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 26;
- 45 11) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 24 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 27;
- 12) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 24 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 28;

13) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 25 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 22;

14) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 25 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 26;

5 15) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 25 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 27; и

16) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 25 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 28.

В альтернативном варианте осуществления гуманизированное антитело к LAG-3,

10 содержащееся в вышеуказанной фармацевтической композиции, содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, где константная область тяжелой цепи предпочтительно представлена в SEQ ID NO: 38, константная область легкой цепи предпочтительно представлена в SEQ ID NO: 39.

В альтернативном варианте осуществления тяжелая цепь гуманизированного антитела

15 к LAG-3, содержащегося в вышеуказанной фармацевтической композиции, представлена в SEQ ID NO: 40 или имеет по меньшей мере 95%-ю идентичность с SEQ ID NO: 40, и легкая цепь представлена в SEQ ID NO: 41 или имеет по меньшей мере 95%-ю идентичности с SEQ ID NO: 41.

В альтернативном варианте осуществления тяжелая цепь антитела к LAG-3,

20 содержащегося в фармацевтической композиции, имеет по меньшей мере 95%-ю, 96%-ю, 97%-ю, 98%-ю, 99%-ю или 100%-ю идентичность с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 40, и аминокислотная последовательность легкой цепи антитела к LAG-3 имеет по меньшей мере 95%-ю, 96%-ю, 97%-ю, 98%-ю, 99%-ю или 100%-ю идентичность с легкой цепью антитела,

25 представленной в SEQ ID NO: 41.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu229-013 и 10 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH 5,5.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50

30 мг/мл антитела LAG3 Hu229-013 и 10 мМ буфера из янтарной кислоты и сукцината натрия с pH 6,0.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu229-013 и 10 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с pH 6,0.

35 В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu229-013, 10 мМ буфера из янтарной кислоты и сукцината натрия с pH 6,0 и 0,1 мг/мл полисорбата 80.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu229-013, 10 мМ буфера из янтарной кислоты и сукцината натрия с pH 6,0 и 70 мг/мл сахарозы.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu229-013, 10 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH 5,5, 60 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл полисорбата 80.

45 В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu229-013, 10 мМ буфера из гистидина и уксусной кислоты с pH 6,0, 60 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл полисорбата 80.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит 1 мг/мл антитела LAG3 Hu229-013, 10-30 мМ буфера из гистидина и уксусной кислоты с

рН 5,5, 75 мг/мл сахарозы и 0,2 мг/мл полисорбата 80.

В еще других вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu229-013, 10-30 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с рН 5,2-5,8, 75 мг/мл сахарозы и 0,2 мг/мл полисорбата 80.

5 В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 60 мг/мл антитела LAG3 Hu229-013, 10 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с рН 5,5, 60 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл полисорбата 80.

10 В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50-60 мг/мл антитела LAG3 Hu229-013, 10 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с рН 5,5, 30-90 мг/мл сахарозы и 0,4-0,5 мг/мл полисорбата 80.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu229-013, 10 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с рН 5,5, 75 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл полисорбата 80.

15 В других вариантах осуществления антитело к LAG-3 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащиеся в фармацевтической композиции, включают HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14 соответственно; и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно.

В альтернативном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит:

20 (a) от 1 до 90 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (b) от 5 до 30 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с рН примерно от 5,0 до 6,5, (c) от 30 до 90 мг/мл сахарозы или трегалозы и (d) от 0,05 до 0,6 мг/мл полисорбата 80.

В альтернативном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит:

25 (a) от 45 до 60 мг/мл антитела к LAG-3 или его антигенсвязывающего фрагмента, (b) от примерно 10 до 30 мМ буфера из гистидина и гидрохлорида натрия с рН примерно от 5,0 до 6,0, (c) 60 до 90 мг/мл сахарозы или трегалозы и (d) от 0,2 до 0,6 мг/мл полисорбата 80.

В альтернативном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит:

30 (a) примерно 50 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (b) 10 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с рН примерно 5,0, (c) примерно 75 мг/мл сахарозы или трегалозы и (d) примерно 0,3 мг/мл полисорбата 80.

35 В альтернативном варианте осуществления антитело к LAG-3 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащийся в вышеуказанной фармацевтической композиции, представляет собой мышьюное антитело или его антиген-связывающий фрагмент,

химерное антитело или его антиген-связывающий фрагмент или гуманизированное антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

40 В альтернативном варианте осуществления мышьюное антитело LAG3, содержащееся в вышеуказанной фармацевтической композиции, содержит вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 8.

В альтернативном варианте осуществления гуманизированное антитело к LAG-3, содержащееся в вышеуказанной фармацевтической композиции, содержит:

45 последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из любой из SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 33, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 85%-ю идентичность с ними, и последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из любой из SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 85%-ю идентичность

с ними.

В альтернативном варианте осуществления вариабельная область легкой цепи антитела к LAG-3, содержащегося в фармацевтической композиции, имеет по меньшей мере 85%-ю, 86%-ю, 87%-ю, 88%-ю, 89%-ю, 90%-ю, 91%-ю, 92%-ю, 93%-ю, 94%-ю, 95%-ю, 96%-ю, 97%-ю, 98%-ю, 99%-ю или 100%-ю идентичность с аминокислотной последовательностью вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO : 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37, и аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела к LAG-3 имеет, по меньшей мере, 85%-ю, 86%-ю, 87%-ю, 88%-ю, 89%-ю, 90%-ю, 91%-ю, 92%-ю, 93%-ю, 94%-ю, 95%-ю, 96%-ю, 97%-ю, 98%-ю, 99%-ю или 100%-ю идентичность с вариабельной областью тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO : 31, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 33.

В альтернативном варианте осуществления гуманизированное антитело LAG3, содержащееся в вышеуказанной фармацевтической композиции, содержит комбинацию вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, выбранных из группы, в которую входят:

- 1) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 30;
- 2) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 34;
- 3) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 35;
- 4) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 36;
- 5) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 37;
- 6) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 31 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 30;
- 7) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 31 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 34;
- 8) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 31 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 35;
- 9) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 31 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 36;
- 10) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 31 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 37;
- 11) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 32 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 30;
- 12) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 32 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 34;
- 13) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 32 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 35;
- 14) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 32 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 36;
- 15) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 32 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 37;
- 16) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 30;

17) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 34;

18) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 35;

5 19) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 36; и

20) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 37.

В альтернативном варианте осуществления тяжелая цепь химерного антитела или

10 гуманизированного антитела, содержащегося в вышеуказанной фармацевтической композиции, дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, полученную из человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или их варианта, предпочтительно содержит константную область тяжелой цепи, полученную из человеческого IgG4 или его варианта, наиболее предпочтительно содержащий константную область тяжелой цепи,

15 представленную в SEQ ID NO: 38; и легкая цепь химерного антитела или гуманизированного антитела дополнительно содержит константную область легкой цепи, полученную из человеческой κ, λ-цепи или ее варианта, предпочтительно содержащую константную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 39.

В альтернативном варианте осуществления тяжелая цепь гуманизированного антитела

20 против LAG-3, содержащегося в вышеуказанной фармацевтической композиции, представлена в SEQ ID NO: 42 или имеет по меньшей мере 95%-ю идентичность с ней, а легкая цепь представлена в SEQ ID NO: 43 или имеет по меньшей мере 95%-ю идентичность с ней.

В альтернативном варианте осуществления тяжелая цепь антитела к LAG-3,

25 содержащегося в фармацевтической композиции, имеет по меньшей мере 95%-ю, 96%-ю, 97%-ю, 98%-ю, 99%-ю или 100%-ю идентичность с представленной аминокислотной последовательностью тяжелой цепи в SEQ ID NO: 42, и аминокислотная последовательность легкой цепи антитела к LAG-3 имеет по меньшей мере 95%-ю, 96%-ю, 97%-ю, 98%-ю, 99%-ю или 100%-ю идентичность с легкой цепью антитела,

30 представленной в SEQ ID NO: 43.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu303-005 и 10 mM буфера из гистидина и соляной кислоты с pH 6,0.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu303-005 и 10 mM буфера из гистидина и соляной кислоты с pH 5,0.

35 В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu303-005 и 10 mM буфера из гистидина и соляной кислоты с pH 6,5.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu303-005 и 10 mM буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH 5,5.

40 В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu303-005, 10 mM буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH 5,5, 75 мг/мл сахарозы и 0,2 мг/мл полисорбата 80.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела против LAG3 Hu303-005, 10 mM буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH 5,5, 75 мг/мл трегалозы и 0,2 мг/мл полисорбата 80.

45 В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu303-005, 10 mM буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH 5,5 и 0,4 мг/мл полисорбата 80.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu303-005, 10 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с pH 6,0, 75 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл полисорбата 80.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50

5 мг/мл антитела LAG3 Hu303-005, 10 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с pH 6,5, 75 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл полисорбата 80.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мг/мл антитела LAG3 Hu303-005, 10 мМ буфер из гистидина и соляной кислоты с pH 5,5, 75 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл полисорбата 80.

10 В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит 45-60 мг/мл антитела LAG3 Hu303-005, 10 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с pH 5,5, 75 мг/мл сахарозы и 0,2-0,6 мг/мл полисорбата 80.

15 В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит примерно 50 мг/мл антитела LAG3 Hu303-005, примерно 10 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты, примерно pH 6,0, примерно 75 мг/мл сахарозы и примерно 0,3 мг/мл полисорбата 80.

20 Настоящее изобретение также относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей антитело к LAG-3, включающему смешивание антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым наполнителем.

Настоящее изобретение также относится к способу получения лиофилизированного препарата, содержащего антитело к LAG-3, который включает этап лиофилизации вышеуказанной фармацевтической композиции.

25 В альтернативном варианте осуществления способа получения лиофилизированного препарата, содержащего антитело к LAG-3, лиофилизация включает в себя этапы предварительной заморозки, первичной сушки и вторичной сушки.

В альтернативном варианте осуществления способа получения лиофилизированного препарата, содержащего антитело к LAG-3, первичную сушку проводят при температуре от -5 до -20 °C, предпочтительно -10 °C.

30 Настоящее изобретение также относится к лиофилизированному препарату, содержащему антитело к LAG-3, полученному вышеупомянутым способом получения лиофилизированного препарата, содержащего антитело к LAG-3.

В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный препарат сохраняет свою стабильность при 2-8 °C в течение по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 35 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный препарат сохраняет свою стабильность при 40 °C в течение по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 14 дней или по меньшей мере 28 дней.

Настоящее изобретение также относится к лиофилизированному препарату, 40 содержащему антитело к LAG-3, полученному указанным выше способом лиофилизации.

Настоящее изобретение также относится к лиофилизированному препарату, содержащему антитело LAG3, характеризующееся тем, что лиофилизированный препарат может быть восстановлен для получения вышеуказанной фармацевтической композиции.

45 Настоящее изобретение также относится к способу получения восстановленного раствора из лиофилизированного препарата, содержащего антитело к LAG-3, который включает этап восстановления вышеупомянутого лиофилизированного препарата, где растворитель для восстановления выбирают, но не ограничиваясь этим, из воды для

инъекций, физиологического раствора или раствора глюкозы.

Настоящее изобретение также относится к восстановленному раствору, получаемому из лиофилизированного препарата, содержащего антитело к LAG-3, который получен способом получения восстановленного раствора из лиофилизированного препарата, 5 содержащего антитело к LAG-3.

Настоящее изобретение также относится к восстановленному раствору, содержащему антитело LAG3, которое дополнительно содержит следующие компоненты:

(a) от 1 до 90 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (b) от 5 до 30 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH примерно от 5,0 до 10 6,5, (c) от 30 до 90 мг/мл сахарозы и (d) от 0,02 до 0,8 мг/мл полисорбата 80.

Настоящее изобретение также относится к восстановленному раствору, содержащему антитело LAG3, которое дополнительно содержит следующие компоненты:

(a) от 40 до 80 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (b) от 10 до 30 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH примерно от 5,2 15 до 5,8, (c) от 70 до 80 мг/мл сахарозы и (d) от 0,4 до 0,5 мг/мл полисорбата 80.

Настоящее изобретение также относится к восстановленному раствору, содержащему антитело LAG3, которое дополнительно содержит следующие компоненты:

(a) 50 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (b) 10 мМ буфера с уксусной кислотой и ацетатом натрия с pH примерно 5,5, (c) 75 мг/мл сахарозы 20 и (d) 0,4 мг/мл полисорбата 80.

(a) от 1 до 90 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (b) от 5 до 30 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с pH примерно от 5,0 до 6,5, (c) от 30 до 90 мг/мл сахарозы и (d) от 0,05 до 0,6 мг/мл полисорбата 80.

Настоящее изобретение также относится к восстановленному раствору, содержащему 25 антитело LAG3, которое дополнительно содержит следующие компоненты:

(a) от 45 до 60 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (b) от 10 до 30 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с pH примерно от 5,5 до 6,0, (c) от 60 до 80 мг/мл сахарозы и (d) от 0,2 до 0,6 мг/мл полисорбата 80.

Настоящее изобретение также относится к восстановленному раствору, содержащему 30 антитело LAG3, которое дополнительно содержит следующие компоненты:

(a) 50 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (b) 10 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с pH примерно 6,0, (c) 75 мг/мл сахарозы и (d) 0,3 мг/мл полисорбата 80.

Изобретение дополнительно относится к изделию или набору, включающему 35 контейнер, содержащий любую из стабильных фармацевтических композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления флакон представляет собой инъекционный флакон, изготовленный из нейтрального боросиликатного стекла.

Вышеупомянутую фармацевтическую композицию или лиофилизированный препарат 40 или восстановленный раствор лиофилизированного препарата согласно настоящему изобретению можно использовать в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение также предусматривает применение вышеупомянутой фармацевтической композиции или лиофилизированного препарата или восстановленного раствора лиофилизированного препарата для получения 45 лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, где заболевание или состояние представляет собой заболевание или состояние, в которое вовлечены патогенные Т-клетки, предпочтительно представляя собой рак. Рак включает, но не ограничиваясь этим, рак яичников, меланому, рак предстательной

железы, рак кишечника, рак желудка, рак пищевода, рак молочной железы, рак легких, рак почки, рак поджелудочной железы, рак матки, рак печени, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак полости рта, рак головного мозга, рак яичка, рак кожи, рак щитовидной железы и гематологические злокачественные новообразования, включая

5 миелому и хронический и острый лейкоз.

Изобретение также относится к способу лечения и профилактики заболевания или состояния, связанного с LAG-3, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества вышеупомянутой фармацевтической

10 композиции или лиофилизированной композиции или восстановленного раствора

лиофилизированного препарата, где заболевание или состояние представляет собой заболевание или состояние, затрагивающее патогенные Т-клетки, предпочтительно представляя собой рак. Рак включает, но не ограничивается ими, рак яичников, меланому, рак предстательной железы, рак кишечника, рак желудка, рак пищевода, рак молочной железы, рак легких, рак почки, рак поджелудочной железы, рак матки,

15 рак печени, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак полости рта, рак головного мозга, рак яичка, рак кожи, рак щитовидной железы и гематологические злокачественные новообразования, включая миелому и хронический и острый лейкоз.

Настоящее изобретение также относится к изделию, включающему контейнер, содержащий вышеупомянутую фармацевтическую композицию или лиофилизированный

20 препарат или восстановленный раствор лиофилизированного препарата.

Один, некоторые или все признаки различных вариантов осуществления, описанных в этом описании, могут быть дополнительно объединены для формирования дополнительных вариантов осуществления изобретения, как хорошо известно специалистам в данной области техники. Вышеуказанные варианты осуществления

25 изобретения и другие варианты осуществления, полученные комбинацией, дополнительно иллюстрируются следующим подробным описанием.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1: Гуманизированные антитела против LAG-3 усиливают секрецию цитокина IL-2 из Т-лимфоцитов, активированных SEB (стафилококковый энтеротоксин В).

30 Результаты показывают, что кандидаты гуманизированных антител к LAG-3, Hu229-013 и Hu303-005, могут в различной степени усиливать секрецию цитокина IL-2 из активированных Т-лимфоцитов, демонстрируя эффект дозы, зависящий от концентрации лекарственного средства.

Фиг. 2: Влияние гуманизированных антител против LAG-3 на объем опухоли у мышей

35 с опухолями U-87MG. Результаты показывают, что на 14-й день после введения оба антитела к LAG-3 Hu229-013 6mpk и Hu303-005 6mpk оказывают определенные эффекты на ингибирование опухоли, и уровни ингибирования опухоли составляют 27,25 % (р менее 0,05) и 34,94 % (р менее 0,01), соответственно, и были достоверные различия по сравнению с контрольной группой (р мене 0,001 против hIGg).

40 Фиг. 3: Диаграмма тенденций, показывающая чистоту СЕ (Капиллярный электрофорез) антитела Hu229-013 при 40 °C.

Фиг. 4: Диаграмма тенденций, показывающая нейтральный пик IEC (Ионообменная хроматография) антитела Hu229-013 при 40 °C.

Фиг. 5: Диаграмма тенденций, показывающая невосстановливающий СЕ (Капиллярный электрофорез) антитела Hu303-005 при 40 °C.

Фиг. 6: Диаграмма тенденций, показывающая основной пик iCE (Капиллярный электрофорез с визуализацией) антитела Hu303-005 при 40 °C.

Фиг. 7: Диаграмма тенденций, показывающая результаты встряхивания SEC

(Эксклюзационная хроматография) Hu303-005.

Фиг. 8: Результаты подгонки, показывающие значение разности между IEC антитела Hu303-005 при 0 °C и IEC того же при 40 °C.

Фиг. 9: Графики подгонки, показывающие значение разности между чистотой СЕ

5 антитела Hu303-005 при 0 °C и чистотой СЕ того же самого при 40 °C.

Фиг. 10: Результаты подгонки, показывающие iCE/CE/DLS (DLS - динамическое
рассеивание света) препарата антитела Hu303-005 при 25 °C и при 40 °C.

Терминология

Чтобы сделать изобретение более понятным, некоторые технические и научные

10 термины конкретно определены ниже. Если специально не определено иначе в этом документе, все другие технические и научные термины, используемые в данном документе, должны иметь то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится это раскрытие.

«Буфер» относится к буферу, который устойчив к изменениям pH из-за его

15 сопряженного кислотно-основного компонента. Примеры буфера, который контролирует pH в соответствующем диапазоне, включают ацетатный буфер, сукцинатный буфер, глюконатный буфер, гистидиновый буфер, оксалатный буфер, лактатный буфер, фосфатный буфер, цитратный буфер, тартратный буфер, фумаратный буфер, глицил-глициновый и другие буфера органических кислот.

20 «Гистидиновый буфер» относится к буферу, содержащему гистидин-ионы. Примеры гистидиновых буферов включают гистидин-гидрохлоридный буфер, гистидин-ацетатный буфер, гистидин-фосфатный буфер, гистидин-сульфатный буфер и т.д., предпочтительно гистидин-гидрохлоридный буфер. Гистидин-гидрохлоридный буфер получают с помощью гистидина и соляной кислотой или гистидина и гистидин гидрохлорида.

25 «Цитратный буфер» относится к буферу, который включает цитрат-ионы. Примеры цитратного буфера включают буфер из лимонной кислоты и цитрата натрия, буфер из лимонной кислоты и цитрата калия, буфер из лимонной кислоты и цитрата кальция, буфер из лимонной кислоты и цитрата магния и т. д. Предпочтительным цитратным буфером является буфер из лимонной кислоты и цитрата натрия.

30 «Сукцинатный буфер» относится к буферу, который включает сукцинат-ионы. Примеры сукцинатного буфера включают буфер из янтарной кислоты и сукцината натрия, буфер из янтарной кислоты и сукцината калия, буфер из янтарной кислоты и сукцината кальция и т.д. Предпочтительным сукцинатным буфером является буфер из янтарной кислоты и сукцината натрия.

35 «Фосфатный буфер» относится к буферу, который включает фосфат-ионы. Примеры фосфатного буфера включают буфер из динатрийгидрофосфата и дигидрофосфата натрия и буфер из динатрийгидрофосфата и дигидрофосфата калия и т.д. Предпочтительным фосфатным буфером является буфер из динатрийгидрофосфата и дигидрофосфата натрия.

40 «Ацетатный буфер» относится к буферу, который включает ацетат-ионы. Примеры ацетатного буфера включают буфер из уксусной кислоты и ацетата натрия, буфер из уксусной кислоты и гистидина, буфер из уксусной кислоты и ацетата калия, буфер из уксусной кислоты и ацетата кальция, буфер из уксусной кислоты и ацетата магния и т.д. Предпочтительным ацетатным буфером является буфер из уксусной кислоты и ацетата натрия.

45 «Трис-буфер» относится к буферному раствору, содержащему трис (гидроксиметил) аминометан, также известный как трис-основание, Тризма, Трисамин, ТНАМ, трометамин и трометамол. pH эффективного диапазона буферизации трис-буфера

составляет от 7,0 до 9,2, а pH водного раствора трис-основания составляет примерно 10,5. Обычно соляную кислоту добавляют для доведения pH до желаемого значения, чтобы получить буфер с указанным pH.

«Сахарид» согласно настоящему изобретению включает обычную композицию

5 $(\text{CH}_2\text{O})_n$ и ее производные, включая моносахариды, дисахариды, трисахариды, полисахариды, сахаридные спирты, восстановливающие сахариды, невосстановливающие сахариды и так далее. Он может быть выбран из группы, состоящей из глюкозы, сахарозы, трегалозы, лактозы, фруктозы, мальтозы, декстрана, глицерина, эритрита, глицерина, арабитола, силитола, сорбита, маннита, мелидиозы, мелезитозы, мелитриозы, 10 маннотриозы, стахиоза, мальтозы, мальтозы, лактулозы, мальтулозы, сорбита, мальтита, лактита, изо-мальтулозы и тому подобное. Предпочтительно сахариды представляют собой невосстановливающие дисахариды, более предпочтительно сахарозу.

15 «Модификатор вязкости» представляет собой обычный фармацевтическое вещество, добавляемое для регулирования вязкости композиции. Упомянутый в данном документе модификатор вязкости в основном относится к неорганической соли и соли аминокислоты, где неорганическая соль предпочтительно выбрана из группы, состоящей из хлорида натрия, хлорида кальция, хлорида магния и ацетата кальция, и соль аминокислоты предпочтительно выбрана из группы, состоящей из гидрохлорида 20 аргинина, гидрохлорида гистидина, гидрохлорида глицина и ацетата гистидина и тому подобное.

25 «Фармацевтическая композиция» относится к смеси, содержащей одно или несколько соединений, описанных в данном документе, или их физиологически/фармацевтически приемлемой соли или их пролекарству и другим химическим компонентам, где другие химические компоненты представляют собой, например, физиологические/ фармацевтически приемлемые носители и наполнители. Назначение фармацевтической композиции состоит в том, чтобы способствовать введению в организм, что облегчает всасывание активного ингредиента, тем самым проявляя биологическую активность. В данном использовании «фармацевтическая композиция» и «препарат» не являются взаимоисключающими.

30 Что касается формы раствора фармацевтической композиции в настоящем изобретении, если не указано иное, растворитель, включенный в нее, представляет собой воду.

35 «Лиофилизованный препарат» относится к препарату или фармацевтической композиции, полученными вакуумной лиофилизацией жидкой формы или формы раствора фармацевтической композиции или препарата.

Лиофилизация согласно настоящему изобретению включает предварительное замораживание, первичную сушку и вторичную сушку. Целью предварительного замораживания является замораживание продукта для получения кристаллического твердого вещества. Температура и скорость предварительного замораживания являются 40 двумя важными параметрами процесса. В настоящем изобретении температура для предварительного замораживания установлена как -45°C , а скорость для предварительного замораживания установлена как $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Первичная сушка также известна как основная сушка, которая является основным этапом лиофилизации.

Назначение состоит в том, чтобы удалить лед с продукта, сохраняя при этом форму 45 продукта, сводя к минимуму повреждение продукта. Если температура и степень вакуума для первичного замораживания не подходят, это приведет к разрушению продукта. Более высокая температура и степень вакуума ускорят эффективность лиофилизации, но в то же время увеличат риск разрушения продукта. Температура для первичной

сушки согласно настоящему изобретению может быть обычной температурой в данной области техники, например, от -30 до 0 °C. Вторичная сушка также известна как аналитическая сушка, которая является основным этапом удаления связанной воды из продукта с помощью предельного вакуума (0,01 мбар) и повышения температуры (20-40 °C). Поскольку большинство биологических продуктов чувствительны к температуре, температура для вторичной сушки выбирается так, чтобы она находилась в нижней точке температурного диапазона, то есть 25 °C. Продолжительность лиофилизации связана с морозильной камерой, дозой лиофилизированного препарата и емкостью, содержащей лиофилизированный агент. Специалистам в данной области техники хорошо известно, как регулировать продолжительность лиофилизации.

Используемый в данном документе термин «примерно» или «приблизительно» относится к значению, которое находится в допустимом диапазоне ошибок для конкретного значения, определенного специалистом в данной области техники, которое будет частично зависеть от того, как значение измерено или определено (т.е. ограничение 15 системы измерения). Например, «примерно» может указывать стандартное отклонение в пределах 1 или более 1 для каждой практики в данной области техники. Альтернативно, «примерно» или «по существу содержащий» может означать диапазон до 20 %. Например, pH примерно 5,5 означает pH $5,5 \pm 1,1$. Кроме того, особенно в отношении биологических систем или процессов, этот термин может относиться к порядку величины 20 или к 5-кратному значению. Когда конкретные значения упоминаются в заявке и формуле изобретения, если не указано иное, следует предполагать, что значение «примерно» или «по существу состоящий из» находится в допустимом диапазоне ошибок для этого конкретного значения.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению способна достигать стабильного эффекта: антитело может по существу сохранять свою физическую 25 стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность после хранения; предпочтительно, фармацевтическая композиция по существу сохраняет свою физическую стабильность, химическую стабильность и биологическую активность после хранения. Срок годности, как правило, выбирают на основе заранее определенного срока годности фармацевтической композиции. В настоящее время существует ряд аналитических методов для измерения стабильности белка, которые могут измерять стабильность после хранения в течение выбранного периода времени при выбранной температуре.

Фармацевтическая композиция со стабильными антителами представляет собой 30 препарат, в котором не наблюдается значительных изменений в следующих условиях: хранение при охлажденной температуре (2-8 °C) в течение по меньшей мере 3 месяцев, предпочтительно 6 месяцев, более предпочтительно 1 года и даже более желательно до 2 лет. Кроме того, стабильная жидккая композиция включает жидкую композицию, которая проявляет желаемые характеристики при хранении, например, при температуре 40 25 °C в течение 1 месяца, 3 месяцев и 6 месяцев или при 40 °C в течение 1 месяца. Как правило, приемлемые критерии стабильности следующие: как правило, не более примерно 5 %, предпочтительно не более примерно 5 % мономеров антител разрушается по оценке с помощью SEC-HPLC (Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография). Фармацевтическая композиция антител визуально анализирует от 45 бесцветного или прозрачного до слегка опалесцирующего белого. Концентрация, pH и осмоляльность препарата изменяются не более чем на $\pm 5\%$. Как правило, наблюдается не более примерно 5 %, предпочтительно не более примерно 5 % усечения. Обычно образуется не более 5 %, предпочтительно не более 5 % агрегаций.

Считается, что антитело «сохраняет свою физическую стабильность» в фармацевтической композиции, если оно не показывает значительного увеличения агрегации, осаждения и/или денатурации при визуальном исследовании цвета и/или прозрачности или, как измерено с помощью рассеяния УФ-света, эксклюзионной хроматографии с (SEC) и динамического рассеяния света (DLS). Изменение конформации белка можно оценить с помощью флуоресцентной спектроскопии (которая определяет третичную структуру белка) и FTIR-спектроскопии (которая определяет вторичную структуру белка).

Считается, что антитело «сохраняет свою химическую стабильность» в

- 10 фармацевтической композиции, если оно не проявляет значительных химических изменений. Химическая стабильность может быть оценена путем обнаружения и количественного определения химически измененных форм белка. Процессы деградации, которые часто изменяют химическую структуру белка, включают гидролиз или усечение (оценивается такими методами, как эксклюзионная хроматография и SDS-PAGE
- 15 (Электрофорез белков в полиакриламидном геле)), окисление (оценивается такими методами, как картирование пептидов в сочетании с масс-спектроскопией или MALDI/TOF/MS (Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времепролетной масс-спектрометрией), дезамидирование (оценивается такими методами, как ионообменная хроматография, капиллярное изоэлектрическое фокусирование,
- 20 картирование пептидов, измерение изоаспарагиновой кислоты) и изомеризация (оценивается путем измерения содержания изоаспарагиновой кислоты, картирования пептидов и т. д.).

Считается, что антитело «сохраняет свою биологическую активность» в фармацевтической композиции, если биологическая активность антитела в данный

- 25 момент времени находится в пределах заранее определенного диапазона биологической активности, проявляемой во время приготовления фармацевтического препарата. Биологическую активность антитела можно определить, например, с помощью анализа связывания антитела.

Термин «LAG-3» относится к гену активации лимфоцитов-3. Термин «LAG-3»

- 30 включает варианты, изоформы, гомологи, ортологи и паралоги. Термин «человеческий LAG-3» относится к последовательности человеческого LAG-3, такой как полная аминокислотная последовательность человеческого LAG-3 Uniprot № P18627. LAG-3 также известен как в данной области, например, CD215. Последовательность человеческого LAG-3 может отличаться от последовательности человеческого LAG-3
- 35 Uniprot № P18627, например, человеческий LAG-3 имеет консервативные мутации или мутации в неконсервативных областях и имеет по существу ту же биологическую функцию, что и человеческий LAG-3 Uniprot № P18627. Например, биологическая функция человеческого LAG-3 состоит в том, что он имеет эпитоп во внеклеточном домене LAG-3, где эпитоп специфически связан с антителами, описанными в данном
- 40 документе, или биологическая функция человеческого LAG-3 состоит в его связывании с молекулами МНС класса II.

Конкретная человеческая последовательность LAG-3, как правило, имеет по меньшей мере 90%-ю идентичность с аминокислотной последовательностью человеческого LAG-3 Uniprot № P18627 и содержит аминокислотные остатки, которые

- 45 идентифицированы как аминокислотные последовательности человека по сравнению с аминокислотными последовательностями LAG-3 из других видов (например, мышиных). В определенных случаях человеческая LAG-3 может иметь по меньшей мере 85%-ю или даже по меньшей мере 95%-ю, 96%-ю, 97%-ю, 98%-ю или 99%-ю идентичность

с аминокислотной последовательностью с LAG-3 Uniprot № P18627. В некоторых вариантах осуществления последовательность LAG-3 человека будет демонстрировать не более 10 аминокислотных отличий от последовательности LAG-3 Uniprot № P18627. В некоторых вариантах осуществления LAG-3 человека может демонстрировать не более 5 или даже не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотного различия с человеческой последовательностью LAG-3 Uniprot № P18627. Процент идентичности может быть определен, как описано здесь.

Трехбуквенные коды и однобуквенные коды для аминокислотных остатков, используемых здесь, описаны в J. Biol. Chem. 243, p. 3558 (1968).

«Антитело», используемое в настоящем изобретении, относится к иммуноглобулину, который представляет собой структуру тетрапептидной цепи, соединенную между собой межцепочечными дисульфидными связями между двумя идентичными тяжелыми цепями и двумя идентичными легкими цепями.

В настоящем изобретении легкая цепь антитела согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать константную область легкой цепи, содержащую человеческую или мышнюю, κ, λ цепь, или их вариант.

В настоящем изобретении тяжелая цепь антитела согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, содержащую человеческий или мышний IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или их вариант.

Примерно 15 аминокислотных последовательностей, примыкающих к N-концу тяжелой и легкой цепей антитела, являются высоко вариабельными, известными как вариабельная область (область Fv); остальные аминокислотные последовательности, близкие к С-концу, являются относительно стабильными, известными как константные области. Вариабельная область включает три гипервариабельные области (HVR) и четыре относительно консервативных каркасных области (FR). Три гипервариабельные области, которые определяют специфичность антитела, также известны как определяющие комплементарность области (CDR). Каждая вариабельная область легкой цепи (LCVR) и каждая вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) состоит из трех областей CDR и четырех областей FR с последовательным порядком от аминоконца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Три области CDR легкой цепи относятся к LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а три области CDR тяжелой цепи относятся к HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

Антитело согласно настоящему изобретению включает мышнее антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело, предпочтительно гуманизированное антитело.

Термин «мышнее антитело» в настоящем изобретении относится к моноклональному антителу против LAG-3 человека, полученному в соответствии со знаниями и навыками в данной области. Во время приготовления испытуемому вводят антиген LAG-3, а затем выделяют гибридому, экспрессирующую антитело, имеющее желаемую последовательность или функциональные свойства.

Термин «химерное антитело» представляет собой антитело, которое образуется путем слияния вариабельной области мышного антитела с константной областью человеческого антитела, и химерное антитело может ослаблять иммунный ответ, который индуцируется мышным антителом. Для конструирования химерного антитела конструируют гибридому, которая секретирует специфическое мышное моноклональное антитело, и затем гены вариабельной области клонируют из клеток гибридомы мыши. Затем гены константной области человеческого антитела клонируют по желанию. Ген вариабельной области мыши лигируют с геном константной области человека с образованием химерного гена, который может быть вставлен в человеческий

вектор, и, наконец, молекула химерного антитела экспрессируется в промышленной системе эукариот или прокариот. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения легкая цепь химерного антитела к LAG-3 дополнительно содержит константные области легкой цепи человеческой κ, λ цепи или их варианта.

5 Тяжелая цепь химерного антитела к LAG-3 дополнительно содержит константные области тяжелой цепи человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или их варианта.

Термин «гуманизированное антитело», также известный как CDR-привитое антитело, относится к антителу, созданному путем прививки мышиных последовательностей CDR в каркас вариабельной области человеческого антитела, а именно к антителу,

10 полученному из различных типов каркасных последовательностей человеческого зародышевого антитела. Гуманизированное антитело преодолевает недостаток сильного антителного ответа, индуцированного химерным антителом, которое несет много компонентов мышиного белка. Такие каркасные последовательности могут быть 15 получены из общедоступной базы данных ДНК, охватывающей последовательности генов антител зародышевой линии или опубликованные ссылки. Например,

последовательности ДНК зародышевой линии генов вариабельной области тяжелой и легкой цепи человека можно найти в базе данных последовательностей зародышевой линии человека "VBase" (доступна на веб-сайте www.mrcspe.com.ac.uk/vbase), а также можно найти у Kabat, E A, et al, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th

20 Ed. Чтобы избежать снижения активности наряду с уменьшением иммуногенности, каркасные последовательности в вариабельной области человеческого антитела подвергают минимальным обратным мутациям или обратным мутациям для поддержания активности. Гуманизированное антитело согласно настоящему изобретению также содержит гуманизированное антитело, для которого созревание 25 аффинности CDR осуществляется с помощью фагового дисплея.

Термины «антитело против LAG-3», «анти-LAG-3», «антитело к LAG-3» и «антитело, связывающееся с LAG-3» в настоящем изобретении относятся к антителу, которое способно связываться с LAG- 3 с достаточной аффинностью, так что антитело можно использовать в качестве диагностического агента и/или терапевтического агента для 30 нацеливания на LAG-3.

Термин «связывание с LAG-3» в настоящем изобретении относится к способности взаимодействовать с человеческим LAG-3.

Термин «специфическое связывание» определяется методами, доступными в данной области, такими как конкурентный анализ ИФА (Иммуноферментный анализ), анализ

35 BIACORE® или анализ KINEXA®. Например, этот термин также применим для случая, в котором антиген-связывающий домен антитела согласно изобретению является специфичным для конкретного эпитопа, переносимого многими антигенами. В таком случае антитело, несущее антиген-связывающий домен, может специфически связываться с различными антигенами, несущими такой эпитоп.

40 Термин «конкурентное связывание» относится к тому антителу, которое распознает тот же эпитоп внеклеточной области человеческого LAG-3 (также называемый антигенней детерминантой) или его часть, которая распознается антителом согласно изобретению, и связывается с антигеном. Антитело, которое связывается с тем же эпитопом, который распознается моноклональным антителом согласно настоящему 45 изобретению, относится к антителу, которое распознает и связывается с аминокислотной последовательностью человеческого LAG-3, распознаваемой моноклональным антителом согласно настоящему изобретению.

Термин «KD» «Kd» относится к константе равновесия диссоциации конкретного

взаимодействия антитело-антиген. Как правило, антитела согласно изобретению связываются с LAG-3 с константой равновесия диссоциации (KD) менее чем приблизительно 10^{-7} М, например, менее чем приблизительно 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже ниже, например, как определено с использованием технологии 5 поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе BIACORE.

«Антиген-связывающий фрагмент», упомянутый в настоящем изобретении, относится к фрагменту Fab, фрагменту Fab' или фрагменту F(ab') 2, обладающему антиген-связывающей активностью, а также связыванию фрагмента scFv с человеческим LAG-3 и другим фрагментам, способным связываться с человеческим LAG-3, образованным 10 VH и VL анти-LAG-3 антитела; он содержит одну или несколько областей CDR антител, описанных в настоящем изобретении, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 15, 16, 17 и 12, 13, 14, 18, 19 и 20. Fv фрагмент содержит вариабельную область 15 тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи без константной области и представляет собой минимальный фрагмент антитела, обладающий всеми антиген-связывающими сайтами. Как правило, антитело Fv дополнительно содержит 20 полипептидный линкер между доменами VH и VL и способно образовывать структуру, необходимую для связывания антигена. Кроме того, различные линкеры могут быть использованы для соединения вариабельных областей двух антител с образованием полипептидной цепи, называемой одноцепочечным антителом или одноцепочечным Fv (scFv).

Термин «эпитоп» относится к части, расположенной в антигене, которая может быть распознана и связана одним или несколькими антителами.

«Консервативные модификации» или «консервативная замена» относится к заменам 25 аминокислот в белке другими аминокислотами, имеющими сходные характеристики (например, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность, конформацию и жесткость основной цепи и т. д.). Такие как что изменения часто могут быть сделаны без изменения биологической активности белка. Специалисты в данной области признают, что, как правило, одиночная аминокислотная замена в несущественных 30 областях полипептида существенно не изменяет биологическую активность (см., например, Watson et al., (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Кроме того, замены структурно или функционально сходных аминокислот с меньшей вероятностью нарушают биологическую активность.

«Аминокислотная идентичность» относится к сходству последовательностей между 35 двумя белками или между двумя полипептидами. Когда положение в обеих из двух сравниваемых последовательностей занимает один и тот же аминокислотный остаток, например, если положение в каждом из двух полипептидов занято одинаковым аминокислотным остатком, молекулы в этом положении идентичны. Примерами алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности последовательности 40 и процента сходства последовательности, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны у Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-45 и Altschul et al., (1977) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 соответственно. Программное обеспечение для проведения анализа BLAST общедоступно в Национальном центре биотехнологической информации (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Способы получения и очистки антител и антиген-связывающих фрагментов хорошо 45 известны в данной области и могут быть найдены, например, в «Antibody Experimental Technology Guide of Cold Spring Harbor», главы 5-8 и 15. Антитела или антиген-связывающие фрагменты настоящего изобретения генетически сконструированы для введения одной или нескольких каркасных областей человека (FR) в область CDR, не

происходящую от человека. Последовательности зародышевой линии человеческого FR могут быть получены путем сравнения базы данных генов зародышевой линии вариабельной области человеческого антитела IMGT и с использованием программного обеспечения MOE, из ImMunoGeneTics (IMGT) с помощью их веб-сайта <http://imgt.cines.fr> или из The Immunoglobulin FactsBook, 2001 ISBN 012441351.

Сконструированные антитела или антиген-связывающие фрагменты согласно настоящему изобретению могут быть получены и очищены обычными способами. Например, последовательности кДНК, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь, могут быть клонированы и рекомбинированы в вектор экспрессии GS. Вектор экспрессии рекомбинированного иммуноглобулина может затем стабильно трансфицироваться в клетки СНО (Яичник китайского хомячка). В качестве более рекомендуемого способа, хорошо известного в данной области, системы экспрессии млекопитающих приводят к гликозилированию антител, обычно на высококонсервативном N-конце в области Fc. Стабильные клоны могут быть получены посредством экспрессии антитела, 10 специфически связывающегося с человеческим LAG-3. Положительные клоны могут быть размножены в бессывороточной культуральной среде для продукции антител в биореакторах. Культуральная среда, в которую было секретировано антитело, может быть очищена обычными методами. Например, очистка может быть удобно выполнена с помощью колонки с протеином A или G сефарозой FF, которая была уравновешена 15 отрегулированным буфером. Колонку промывают для удаления неспецифических связующих компонентов. Связанное антитело элюируется градиентом pH, а фрагменты антитела выявляются с помощью SDS-PAGE и затем собираются. Антитело может быть отфильтровано и сконцентрировано с использованием обычных методик. Растворимая смесь и мультимеры также могут быть эффективно удалены обычными методами, 20 включая молекулярное сито или ионный обмен. Полученный продукт может быть немедленно заморожен, например, при -70 °C, или может быть лиофилизирован.

«Введение» и «лечение» при применении к животному, человеку, экспериментальному субъекту, клетке, ткани, органу или биологической жидкости относятся к контакту экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического агента или 25 композиции с животным, человеком, субъектом, клеткой, ткань, орган или биологическая жидкость. «Введение» и «лечение» могут относиться, например, к терапевтическим, фармакокинетическим, диагностическим, исследовательским и экспериментальным методам. Обработка клетки включает в себя контакт реагента с клеткой, а также контакт реагента с жидкостью, когда жидкость контактирует с клеткой. «Введение» и 30 «лечение» также означают обработку *in vitro* и *ex vivo*, например, клеткой, реагентом, диагностическим, связывающим соединением или другой клеткой. «Лечение», как оно применяется к человеку, ветеринарии или субъекту исследования, относится к терапевтическому лечению, профилактическим или предупредительным мерам, 35 исследованиям и диагностическим применением.

40 «Лечить» означает введение терапевтического агента, такого как композиция, содержащая любое из связывающих соединений согласно настоящему изобретению, внутри или снаружи пациенту, имеющему один или несколько симптомов заболевания, для которых агент обладает известной терапевтической активностью. Как правило, терапевтический агент вводят в количестве, эффективном для облегчения одного или 45 нескольких симптомов заболевания у подвергаемого лечению пациента или популяции, чтобы вызвать регрессию или ингибировать прогрессирование такого симптома(ов) до любой клинически измеримой степени. Количество терапевтического средства, которое эффективно для облегчения любого конкретного симптома заболевания (также

называемого «терапевтически эффективным количеством»), может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст и вес пациента, состояние здоровья, поведение, рацион питания пациента, времени введения, способа введения, скорости выведения, комбинации лекарственного средства и т. д., а также

5 способности лекарственного средства вызывать желательный ответ у пациента.

Облегчение симптома заболевания может быть оценено с помощью любого

клинического измерения, обычно используемого врачами или другими

квалифицированными медицинскими работниками для оценки степени тяжести или состояния прогрессирования этого симптома. Хотя вариант осуществления настоящего

10 изобретения (например, способ лечения или изделие) не может быть эффективным для ослабления каждого интересующего симптома заболевания, он должен ослаблять целевой симптом(ы) заболевания, представляющий интерес для статистически значимого числа пациентов, так как определяется любым статистическим тестом, известным в данной области, таким как t-критерий Стьюдента, критерий хи-квадрат, U-критерий

15 Манна-Уитни, критерий Крускала-Уоллиса (Н-критерий), критерий Джонкеера-Терпстры и тест Вилкоксона.

«Эффективное количество» охватывает количество, достаточное для купирования или предотвращения симптома или признака заболевания. Эффективное количество также означает количество, достаточное для разрешения или облегчения диагностики.

20 Эффективное количество для конкретного пациента или ветеринарного субъекта может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние, подлежащее лечению, общее состояние здоровья пациента, путь и доза введения и серьезность побочных эффектов. Эффективным количеством может быть максимальная доза или протокол дозирования, позволяющий избежать значительных побочных эффектов или токсических

25 эффектов.

«Значение Т_m» относится к температуре термической денатурации белка, а именно к температуре, при которой половина белков подвергается анфолдингу и пространственная структура белка разрушается. Следовательно, чем выше значение Т_m, тем выше будет термостабильность белка.

30 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение обеспечивает стабильную фармацевтическую композицию (препарат), содержащую антитело LAG3 или его антиген-связывающий фрагмент, ацетатный буфер или соль гистидина, сахарозу и полисорбат 80, и фармацевтическая композиция (препарат) является более подходящей для введения.

35 ПРИМЕРЫ

Изобретение далее подробно иллюстрируется следующими примерами. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

В примерах настоящего изобретения, где конкретные условия не описаны,

40 эксперименты обычно проводятся в обычных условиях или в условиях, предлагаемых изготовителями материала или продукта. Если источник реагентов конкретно не указан, реагенты являются коммерчески доступными обычными реагентами.

Пример 1. Получение антигена LAG-3 и антитела.

1. Дизайн и экспрессия белка

45 Белок гена активации лимфоцитов 3 UniProt (человеческий LAG-3, Uniprot: P18627) был использован в качестве матрицы LAG-3 в данном документе, и аминокислотные последовательности антигена и белка, использованного для обнаружения, были сконструированы, необязательно разные метки были слиты с белком LAG-3 и затем

клонировали в вектор pHr (произведенный собственными силами) или вектор pTT5 (Biovector, Cat #: 102762) или вектор pTargeT (Promega, A1410). Белок антигена и белок детекции согласно настоящему изобретению были временно экспрессированы в 293 клетках или стабильно экспрессированы в CHO-S, очищены и получены. Следующие 5 антигены LAG-3 относятся к человеческому LAG-3, если не указано иное.

Внеклеточный домен LAG-3 с меткой Flag: LAG-3-Flag, для иммунизации мышей.

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEVPVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLL
 RRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRTVLSVGPGLRSGRL
 PLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLDRALSCRLRLRLGQASM
 10 TASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAESFLFLPQ
 VSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNTLVLGEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVG
 TRSFLTAKWTPPGGPDLVTGDNGDFTLRLLEDVSQAQAGTYTCHIHLQEQLNATVT
 LAIITVTPKSFSGSPGSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQ
 PWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPGDYKDDDDK

15 SEQ ID NO:1

ПРИМЕЧАНИЕ. Часть MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKP представляет сигнальный пептид, а часть DYKDDDDK относится к последовательности Flag-tag.

Полная длина LAG-3: используется для конструирования линии клеток со сверхэкспрессией LAG-3, для иммунизации мышей и детекции

20 MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEVPVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLL
 RRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRTVLSVGPGLRSGRL
 PLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLDRALSCRLRLRLGQASM
 TASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAESFLFLPQ
 VSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNTLVLGEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVG
 25 TRSFLTAKWTPPGGPDLVTGDNGDFTLRLLEDVSQAQAGTYTCHIHLQEQLNATVT
 LAIITVTPKSFSGSPGSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQ
 PWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLLFLILGVLSLLLVTG
 AFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEQL

SEQ ID NO:2

30 ПРИМЕЧАНИЕ: сигнальный пептид MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKP + внеклеточная область + трансмембранный участок LLFLILGVLSLLLVTGAFGF + внутриклеточная область HLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEQL

Слитый белок внеклеточной области LAG-3 и hcG1 Fc: LAG-3-Fc, для детекции

35 MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEVPVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLL
 RRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRTVLSVGPGLRSGRL
 PLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLDRALSCRLRLRLGQASM
 TASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAESFLFLPQ
 VSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNTLVLGEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVG
 40 TRSFLTAKWTPPGGPDLVTGDNGDFTLRLLEDVSQAQAGTYTCHIHLQEQLNATVT
 LAIITVTPKSFSGSPGSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQ
 PWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPGDDDDKGSGSGEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGP
 SVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 45 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFYSKLTVDK
 SRWQQGVNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:3

ПРИМЕЧАНИЕ. Часть MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKP представляет собой

сигнальный пептид, часть DDDDKGSGSG представляет собой линкер, а часть EPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP 5 VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG представляет собой Fc.

Слитый белок внеклеточной области LAG-3 и mIG2a Fc: LAG-3-mFc, для детекции MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEVPVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLL RRA GTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHAPSSWGPRPRRTVLSVGPGLRSGRL 10 PLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRGQASM TASPPGSLRASDWVILNCFSRDPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAESFLFLPQ VSPMDSGPWCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVG TRSFLTAKWTPPGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVSQAQAGTYTCHIHLQEQQLNATVT LAIITVTPKSFSGSPGSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLTPSQRSFSGPYLEAQEAQLLSQ 15 PWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPGDDDDKGSGSGEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGG PSVFIFPPKIKDVLMISSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYN STLRVVSALPIQHWDMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEE MTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEK KNWVERNSYSCVVHEGLHNHHTKSFRTPGK

20 SEQ ID NO:4

ПРИМЕЧАНИЕ. Часть MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKP представляет собой сигнальный пептид, часть DDDDKGSGSG представляет собой линкер, а часть EPRGP TIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVIFPPKIKDVLMISSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNN VEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHWDMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPK 25 GSVRAPQVYVLPPPEEEMTKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEK DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCVVHEGLHNHHTKSFRTPGK представляет собой mFc.

2. Очистка рекомбинантного белка, связанного с LAG-3, а также гибридомных антител и рекомбинантных антител.

30 1). Этапы очистки рекомбинантного белка LAG-3-Flag с меткой Flag

Образцы центрифугировали с высокой скоростью для удаления примесей и концентрировали до нужного объема. Колонку сродства к Flag уравновешивали 0,5 × PBS (Фосфатно-солевой буфер) и промывали 2-5 объемами колонки. Супернатанты, экспрессированные клетками, загружали на колонку после удаления примесей. Колонку 35 промывали 0,5 × PBS до тех пор, пока показание A280 не уменьшилось до исходного уровня. Колонку промывали PBS, а примесные белки отмывали и затем собирали целевой белок. Целевой белок элюировали 100 мМ глицина, pH 3,0 и собирали для дальнейшей активации и очистки *in vitro*.

40 2). Очистка гибридомного, рекомбинантного антитела и слитого белка Fc

Супернатанты, экспрессированные клетками, центрифугировали с высокой скоростью для удаления примесей, супернатант, экспрессированный гибридомой, очищали на колонке с G белком, рекомбинантные антитела и супернатанты, экспрессирующие слитый белок Fc, очищали на колонке с A белком. Колонку промывали PBS до тех пор, пока показание A280 не снизилось до исходного уровня. Целевой белок элюировали 45 100 мМ уксусной кислоты (pH 3,0) и нейтрализовали 1 М трис-HCl, pH 8,0. Элюированный образец надлежащим образом концентрировали и дополнительную очистку с использованием гель-хроматографии Superdex200 (GE), которую уравновешивали PBS, пики, представляющие агрегат, исключали, а образцы собирали

и делили на аликовты для использования.

Пример 2. Получение анти-человеческого LAG-3 гибридомного моноклонального антитела.

1. Иммунизация

Моноклональные антитела против LAG-3 человека производили путем иммунизации мышей. Экспериментальные белые мыши SJL были самками 6-недельного возраста (Beijing Charles River Lab Animal Technology Co., Ltd., номер лицензии на животноводство: SCXK (Beijing) 2012-0001). Кормовая среда: уровень SPF. После приобретения мышей животных содержали в лаборатории в течение 1 недели с 12/12-часовым циклом свет/темнота, при температуре 20-25 °C и влажности 40-60 %. Мышей, которые были адаптированы к окружающей среде, иммунизировали согласно следующим схемам. Иммунный антиген представлял собой внеклеточную область LAG-3 с меткой Flag (SEQ ID NO: 1).

Схема А: Мышей подвергали перекрестной иммунизации с помощью TiterMax® Gold Aduvant (Sigma Cat №: T2684) и Thermo Imject® Alum (Thremo Cat №: 77161). Соотношение антигена и адьюванта (TiterMax® Gold Adjuvant) составляло 1:1, а соотношение антигена и адьюванта (Thermo Imject® Alum) составляло 3:1, при дозе 50 мкг/мышь (первая иммунизация) и 25 мкг/мышь (бустерная иммунизация). После того, как антиген был эмульгирован, мышей инокулировали на 0, 7, 14, 21, 28, 35 и 42 день. На 0 день мышам вводили подкожно (s.c.) в несколько сайтов 50 мкг/мышь. На 7-й день мышам внутрибрюшинно (i.p) вводили 25 мкг/мышь. В дни 14, 28, 35 и 42 либо обратная, либо внутрибрюшинная инъекция антигена была выбрана в соответствии с шишками на спине и условиями отека в брюшной полости. Образцы крови собирали в дни 21, 35, 49, и титры антител в мышиной сыворотке определяли с помощью ИФА. После 7 иммунизаций мышей с более высоким титром сывороточных антител, которые имели тенденцию быть платформой, отбирали для слияния спленоцитов. Бустерная иммунизация была выполнена внутрибрюшинно в виде инъекции раствора антигена с физиологическим раствором, 50 мкг/мышь, за 3 дня до слияния спленоцитов.

Схема В: Мышей иммунизировали с помощью QuickAntibody-Mouse5W (KX0210041). Соотношение антигена и адьюванта составляло 1: 1, 25 мкг/мышь один раз (первая иммунизация/бустерная иммунизация). Антиген и адьювант быстро смешивали и использовали для инокуляции в дни 0, 21 и 35. В день 0 мышам вводили антигены через задние икроножные мышцы (i.m.), 25 мкг/мышь. В дни 21 и 35 инъекции повторяли в таким же образом, 25 мкг/мышь (независимо от того, была ли проведена третья иммунизация или нет, зависит от титра антител). Образцы крови собирали на 28 и 42 дни. Титр антител в мышиной сыворотке определяли методом ИФА. Мышей с более высоким титром сывороточных антител, которые имели тенденцию к платформе, отбирали для слияния спленоцитов. Бустерная иммунизация была выполнена внутрибрюшинно в виде инъекции раствора антигена с физиологическим раствором, 50 мкг/мышь, за 3 дня до слияния спленоцитов.

2. Слияние спленоцитов

Клетки гибридомы получали путем слияния лимфоцитов селезенки с клетками миеломы Sp2/0 (ATCC® CRL-8287™) с использованием оптимизированной PEG-опосредованной процедуры слияния. Полученные слитые гибридомные клетки ресуспенсировали в полной среде (среде DMEM (минимальная эссенциальная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко), содержащей 20 % FBS, 1 × НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин) и 1 × ОРІ (оксалоацетат, пируват, инсулин) при плотности $0,5-1 \times 10^6$ /мл и высевали в 96-луночные планшеты для культивирования

клеток. 100 мкл/лунку. После инкубации при 37 °C, 5 % CO₂, в течение 3-4 дней, добавляли 100 мкл/лунку полной среды НАТ, и культуру выдерживали в течение 3-4 дней для образования иглоподобных клонов. Супернатанты удаляли и добавляли 200 мкл/лунку полной среды НТ (среда RPMI-1640, содержащая 20 % FBS, 1 × НАТ, 1 × ОП), 5 культивировали при 5 % CO₂, 37 °C в течение трех дней и затем определяли с помощью анализа ИФА.

3. Скрининг гибридомных клеток

Супернатанты гибридомной культуры детектировали путем ИФА на связывание в соответствии с плотностью роста клеток гибридомы. Эксперименты по блокировке 10 клеток проводили на клеточных супернатантах в положительных лунках, обнаруженных с помощью связывания ИФА. Клетки, которые были положительными как в экспериментах по связыванию, так и в экспериментах по блокированию, быстро размножались и подвергались криоконсервации, и клетки субклонировали от двух до трех раз до тех пор, пока не был получен клон одной клетки.

15 После каждой процедуры субклонирования клетки подвергали ИФА связывания с LAG-3 и анализу блокирования клеток. Клоны гибридомы получали с помощью вышеупомянутых экспериментов по скринингу, и антитела дополнительно получали с помощью бессывороточного метода культивирования клеток, а затем очищали в соответствии с примером очистки для использования в тестовом примере.

20 4. Секвенирование положительного гибридомного клона

Процесс клонирования последовательностей положительной гибридомы был следующим: сбор клеток гибридомы на логарифмической фазе роста и выделение РНК 25 с тризолом (Invitrogen Cat № 15596-018) в соответствии с инструкциями производителя, а затем выполнение обратной транскрипции с помощью PrimeScriptTM набора для обратной транскриптазы (Takara, кат. № 2680A). кДНК, полученные путем обратной транскрипции, амплифицировали с помощью ПЦР с использованием мышиного набора Ig-Primer (Novagen, TB326 Rev.B 0503), и секвенирование выполняла секвенирующая компания. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, соответствующие последовательностям ДНК гибридомного клона mAb229, 30 представлены в SEQ ID NO: 5, 6 и SEQ ID NO: 7, 8 соответственно.

mAb229-VH

35 QIQLVQSGPELKPGETVKISCKASGYTFTSGMSWVKQAPGKGLKWMGWINTYSG
VPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARDNYDARDVYYYAMDY
WGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 5

mAb229-VL

40 DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQGKSPQLLVYAAATNLADG
VPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYCQHFWITPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 6

mAb303-VH

45 EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTLTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGVINPYN
GDTAYNQFKKGKATLTVDKSSNTAYMEINSLTSEDSAVYYCTRDDGYYDYYFDVWGT
GTTVTVSS

SEQ ID NO: 7

mAb303-VL

DIQMTQSPSSLSASLGERVILTCRASQDIGSRLNWLQQGPDGTFKRLIYATSTLDGVP
KRFSGSRSGSDFSLTISSLESEDFVDYYCLQLASSPPTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 8.

Таблица 1. Последовательность области CDR каждой тяжелой и легкой цепи				
	Тяжелая цепь		Легкая цепь	
5	mAb229	HCDR1	TSGMS SEQ ID NO: 9	LCDR1 RASENIYSNLA SEQ ID NO: 15
		HCDR2	WINTYSGVPTYADDKG SEQ ID NO: 10	LCDR2 AATNLAD SEQ ID NO: 16
		HCDR3	DNYDARDVYYYAMDY SEQ ID NO: 11	LCDR3 QHFWITPWT SEQ ID NO: 17
10	mAb303	HCDR1	DYYMN SEQ ID NO: 12	LCDR1 RASQDIGSRLN SEQ ID NO: 18
		HCDR2	VINPYNGDTAYNQKFKG SEQ ID NO: 13	LCDR2 ATSTLDS SEQ ID NO: 19
		HCDR3	DDGYYDYYFDV SEQ ID NO: 14	LCDR3 LQLASSPPT SEQ ID NO: 20

Полученные положительные клоны подвергали ИФА связывания с человеческим LAG-3 (результаты значения EC50 для активности связывания белка показаны в таблице 2), ИФА на связывание с человеческими LAG-3-сверхэкспрессирующими клетками CHO (результаты значений EC50 для активности связывания клеток показаны в таблице 2), а также анализу блокирования связывания между антигеном LAG-3 и клетками Дауди (результаты значения EC50 для активности блокирования показаны в таблице 2) и анализу на сродство к белку LAG-3 человека (результаты показаны в таблице 3).

Таблица 2. Активность мышного антитела против LAG-3 in vitro				
Антитело-кандидат	Активность связывания белка EC50 (нМ)	Активность связывания клеток EC50 (нМ)	Активность блокирования IC50 (нМ)	
mAb229	0,129	0,191	1,327	
mAb303	0,172	0,279	0,596	

Таблица 3. Сродство мышного антитела к LAG-3		
Стационарная фаза	Мобильная фаза	Сродство (M)
mAb229	LAG-3-Flag	4,26E-10
mAb303	LAG-3-Flag	4,70E-10

Результаты, представленные в таблице 2, демонстрируют, что оба LAG-3 антитела mAb229 и mAb303 показали превосходную активность связывания с белком LAG-3 человека. Антитела к LAG-3 mAb229 и mAb303 также показали превосходную активность связывания с клетками CHO-S, сверхэкспрессирующими полноразмерный белок LAG-3 человека. Как антитело к LAG-3 mAb229, так и mAb303 значительно блокировали связывание человеческого антигена LAG-3 с клетками Дауди.

Результаты, представленные в таблице 3, демонстрируют, что антитела к LAG-3 mAb229 и mAb303 согласно настоящему изобретению проявляли более сильную активность связывания и сродство к белку LAG-3 человека.

Пример 3. Гуманизация мышного моноклонального антитела к LAG-3 против человеческого гибридомного моноклонального антитела mAb229.

Посредством сопоставления базы данных генов зародышевой линии тяжелой и легкой цепи человеческого антитела IMGT программным обеспечением MOE, гены зародышевой линии вариабельной области тяжелой и легкой цепи с высокой гомологией к mAb229 были отобраны в качестве матриц, CDR, полученные из мышных антител, были привиты в соответствующему человеческому исходному шаблону для формирования последовательности вариабельной области в порядке FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Аминокислотные остатки были идентифицированы и аннотированы в соответствии с системой нумерации Kabat.

1. Выбор основы для гуманизации гибридомного клона mAb229

Шаблон легкой цепи для гуманизации мышиного антитела mAb229 представляет собой IGKV1-39*01 и hjk4.1, а шаблон тяжелой цепи для гуманизации представляет собой IGHV7-4-1*01 и hjh6.1, последовательности гуманизированной вариабельной области являются следующими:

5 Hu229VH-CDR трансплантат
 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTSGMSWVRQAPGQGLEWMGWINTYS
 GVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDNYDARDVYYYAMD
 YWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 21
 10 Hu229VL-CDR трансплантат
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAAATNLADG
 VPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQHFWITPWTFGGGTKVEIK
 SEQ ID NO: 22

ПРИМЕЧАНИЕ. Порядок: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, последовательности
 15 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT...WVRQAPGQGLEWMG...RFVFSLDTSV
 STAYLQISSLKAEDTAVYYCAR...WGQGTTVTVSS, DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC...
 WYQQKPGKAPKLLIY...GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYY...FGGGTKVEIK
 представляют собой последовательности FR, а последовательности TSGMS...WINTY
 S...GVPTYADDFKG...DNYDARDVYYYAMDY,

20 RASENIYSNL...AATNLAD...QHFWITPWT представляют собой последовательности
 CDR.

2. Выбор шаблона и дизайн обратной мутации для гибридомного клона mAb229, см.
 Таблицу 4 ниже:

25

Таблица 4. Выбор шаблона и дизайн обратной мутации для mAb229			
Hu229_VL		Hu229_VH	
Hu229_VL.1	Привитый	Hu229_VH.1	Привитый
Hu229_VL.1A	I48V, F71Y	Hu229_VH.1A	E46K
Hu229_VL.1B	D70Q, F71Y, I48V	Hu229_VH.1B	E46K, R38K, V93T
Hu229_VL.1C	D70Q, F71Y, I48V, A43S	Hu229_VH.1C	E46K, R38K, V93T, Y95F

30 ПРИМЕЧАНИЕ. Например, I48V обозначает обратную мутацию от I до V в
 положении 48 в соответствии с системой нумерации Kabat. «Привитый» указывает, что
 CDR мышиного антитела был имплантирован в последовательности FR зародышевой
 линии человека.

35

Таблица 5: Комбинация последовательностей для гуманизации мышиного антитела mAb229				
	Hu229_VL.1	Hu229_VL.1A	Hu229_VL.1B	Hu229_VL.1C
Hu229_VH.1	Hu229-004	LF 229-005	Hu229-006	Hu229-007
Hu229_VH.1A	Hu229-008	Hu229-009	Hu229-010	Hu229-011
Hu229_VH.1B	Hu229-012	Hu229-013	Hu229-014	Hu229-015
Hu229_VH.1C	Hu229-016	Hu229-017	Hu229-018	Hu229-019

40 ПРИМЕЧАНИЕ. В этой таблице показаны различные комбинации
 последовательностей различных мутаций. Например, Hu229-005 указывает, что в
 гуманизированном мышном антителе Hu229-005 присутствуют две мутации (легкая
 цепь HumAb229_VL.1A и тяжелая цепь HumAb229_VH.1), а остальные можно объяснить
 таким же образом.

45 Последовательности гуманизированного антитела mAb229 являются следующими:
 Hu229VH.1 (идентичный трансплантату Hu229VH-CDR)
 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTSGMSWVRQAPGQGLEWMGWINTYS
 GVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDNYDARDVYYYAMD

YWQGQTTTVVSS

SEQ ID NO: 21

Hu229VH.1A

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSGMSWVRQAPGQGLKWMGWINTYS

5 GVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDNYDARDVYYYAMD

YWQGQTTTVVSS

SEQ ID NO: 23

Hu229VH.1B

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSGMSWVKQAPGQGLKWMGWINTYS

10 GVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYYCARDNYDARDVYYYAMD

YWQGQTTTVVSS

SEQ ID NO: 24

Hu229VH.1C

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSGMSWVKQAPGQGLKWMGWINTYS

15 GVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYFCARDNYDARDVYYYAMDY

WGQGTTTVVSS

SEQ ID NO: 25

Hu229VL.1 (идентичный трансплантату Hu229VL-CDR)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYNSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAAATNLADG

20 VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHFWITPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 22

Hu229VL.1A

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYNSNLAWYQQKPGKAPKLLVYAAATNLADG

VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWITPWTFGGGTKVEIK

25 SEQ ID NO: 26

Hu229VL.1B

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYNSNLAWYQQKPGKAPKLLVYAAATNLADG

VPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWITPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 27

30 Hu229VL.1C

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYNSNLAWYQQKPGKSPKLLVYAAATNLADG

VPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWITPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 28

35 Пример 4. Гуманизация мышного анти-человеческого LAG-3 гибридомного моноклонального антитела mAb303

Посредством сопоставления базы данных генов зародышевой линии тяжелой и легкой цепи человеческого антитела IMGT программным обеспечением MOE в качестве матриц были отобраны гены зародышевой линии вариабельной области тяжелой и легкой цепи с высокой гомологией с mAb303, CDR, полученные из мышных антител, 40 были привиты в соответствующий человеческий исходный шаблон для формирования последовательности вариабельной области в порядок FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Аминокислотные остатки были идентифицированы и аннотированы в соответствии с системой нумерации Kabat.

1. Выбор основы для гуманизации гибридомного клона mAb303

45 Шаблон легкой цепи для гуманизации мышного антитела mAb303 представляет собой IGKV1-39*01 и hjk4.1, а шаблон тяжелой цепи для гуманизации представляет собой IGHV1-3*01 и hjh6.1, последовательности гуманизированной вариабельной области являются следующими:

Hu303VH-CDR трансплантат
 QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGVINPY
 NGDTAYNQKFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDDGYYDYYFDVWG
 QGTTTVVSS

5 SEQ ID NO: 29

Hu303VL-CDR трансплантат
 DIQMTQSPSSLASAVGDRVTITCRASQDIGSRLNWYQQKPGKAPKLLIYATSTLDSGV
 PSRFSFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 30

10 ПРИМЕЧАНИЕ. Порядок таков: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, последовательности QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFT...WVRQAPGQRLE WMG...RVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR...WGQGTTTVSS, DIQMTQSP SSLSASAVGDRVTITC...WYQQKPGKAPKLLIY...GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYC...FGGGTKVEIK представляют собой последовательности FR, а 15 последовательности DDGYYDYYFDV...VINPYNGDTAYNQKFKG...DYYMN, RASQDIGSRLN...ATSTLDS...LQLASSPPT представляют собой последовательность CDR.

2. Выбор шаблона и дизайн обратной мутации гибридомного клона mAb303, см. Таблицу 6:

20

Таблица 6. Обратные мутации для гуманизации гибридомного клона mAb303			
Hu303_VL		Hu303_VH	
Hu303_VL.1	Привитый	Hu303_VH.1	Привитый
Hu303_VL.1A	L46R, G66R	Hu303_VH.1A	R72V, T74K, A97T
Hu303_VL.1B	L46R, G66R, S60K	Hu303_VH.1B	R72V, T74K, A97T, F29L
Hu303_VL.1C	L46R, G66R, S60K, P44F, Y36L	Hu303_VH.1C	R72V, T74K, F29L, A97T, M48I, V68A, I70L
Hu303_VL.1D	L46R, G66R, S60K, P44F, Y36L, K42G, I21L, T85D		

25

ПРИМЕЧАНИЕ. Например, L46R обозначает обратную мутацию от L до R в положении 46 согласно системе нумерации Kabat. «Привитый» указывает, что CDR мышного антитела был имплантирован в последовательности FR зародышевой линии человека.

30 Последовательности комбинаций различных мутаций следующие:

35

Таблица 7: Комбинации последовательностей для гуманизации мышного антитела mAb303					
	Hu303_VL.1	Hu303_VL.1A	Hu303_VL.1B	Hu303_VL.1C	Hu303_VL.1D
Hu303_VH.1	Hu303-004	Hu303-005	Hu303-006	Hu303-007	Hu303-008
Hu303_VH.1A	Hu303-009	Hu303-010	Hu303-011	Hu303-012	Hu303-013
Hu303_VH.1B	Hu303-014	Hu303-015	Hu303-016	Hu303-017	Hu303-018
Hu303_VH.1C	Hu303-019	Hu303-020	Hu303-021	Hu303-022	Hu303-023

ПРИМЕЧАНИЕ. В этой таблице показаны различные комбинации

40 последовательностей различных мутаций. Например, Hu303-005 указывает, что две мутации (легкая цепь HumAb303_VL.1A и тяжелая цепь HumAb303_VH.1) присутствуют в гуманизированном мышном антителе Hu303-005, а остальные можно объяснить таким же образом.

Последовательности гуманизированного антитела mAb303 являются следующими:

45 Hu303_VH.1 (идентичный трансплантату Hu303VH-CDR)

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGVINPY
 NGDTAYNQKFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDDGYYDYYFDVWG
 QGTTTVVSS

SEQ ID NO: 29

Hu303_VH.1A

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGVINPY
NGDTAYNQKFKGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRDDGYYDYYFDVWG

5 QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 31

Hu303_VH.1B

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGVINPY
NGDTAYNQKFKGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRDDGYYDYYFDVWG

10 QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 32

Hu303_VH.1C

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWIGVINPYN
GDTAYNQKFKGRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRDDGYYDYYFDVWG

15 QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 33

Hu303_VL.1 (идентичный трансплантату Hu303VL-CDR)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWYQQKPGKAPKLLIYATSTLDSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

20 SEQ ID NO: 30

Hu303_VL.1A

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWYQQKPGKAPKRLIYATSTLDSGV
PSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 34

25 Hu303_VL.1B

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWYQQKPGKAPKRLIYATSTLDSGV
PKRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 35

Hu303_VL.1C

30 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWLQQKPGKAFKRLIYATSTLDSGV

PKRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 36

Hu303_VL.1D

DIQMTQSPSSLSASVGDRVLTLCRASQDIGSRLNWLQQKPGGAFKRLIYATSTLDSGV

35 PKRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFADYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 37

Пример 5. Рекомбинация и получение гуманизированного антитела

Антитело было сконструировано с константной областью, полученной из каппа IgG4 тяжелой цепи человека/легкой цепи в комбинации с каждой вариабельной областью,

40 и была произведена мутация S228P в Fc для увеличения стабильности антитела IgG4.

Другие мутации, известные в данной области, также могут быть использованы для повышения его эффективности.

Константная область тяжелой цепи:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQ

45 SSGLYSLSSVVTVPSPLLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGP

SVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF

NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ

EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK

SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 38

Константная область легкой цепи:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT

5 EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

SEQ ID NO: 39

Аминокислотные последовательности тяжелой цепи Hu229-013:

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTSGMSWVKQAPGQGLKWMGWINTYS

GVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYYCARDNYDARDVYYYAMD

10 YWGQGTTTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALT

SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC

PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH

NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR

EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS

15 FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 40

Аминокислотные последовательности легкой цепи Hu229-013:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYNSNLAWYQQKPGKAPKLLVYATNLADG

VPSRFSGSGSGTDTLTISSLQPEDFATYYCQHFWITPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF

20 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS

STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

SEQ ID NO: 41

Аминокислотные последовательности тяжелой цепи Hu303-005:

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGVINPY

25 NGDTAYNQKFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYYDYYFDVWG

QGTTTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVH

TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPA

PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVNAKT

KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREGQVY

30 TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS

RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 42

Аминокислотные последовательности легкой цепи Hu303-005:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWYQQKPGKAPKRLIYATSTLDGV

35 PSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP

SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST

LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

SEQ ID NO: 43

1. Молекулярное клонирование рекомбинантного антитела

40 Последовательности гена, кодирующего вариабельную область, были получены

путем секвенирования молекул положительных антител, полученных в результате

скрининга гибридомы. Праймеры конструировали в соответствии с полученной

последовательностью, секвенирование гена использовали в качестве матрицы, и

различные фрагменты гена VH/VK антитела конструировали с помощью ПЦР и затем

45 восстанавливали с помощью вектора экспрессии pHr ((CH1-FC/CL) фрагмент с

сигнальным пептидом и константной областью hIgG4/hkappa) путем гомологичной

рекомбинации для конструирования экспрессионной плазмида VH-CH1-FC-pHr/VL-CL-

pHr для полноразмерного рекомбинантного антитела.

2. Молекулярное клонирование гуманизированного антитела

Сконструированную последовательность гуманизированного антитела подвергали оптимизации кодонов и получали кодирующую последовательность, имеющую предпочтительные кодоны человека. Были сконструированы праймеры, и различные фрагменты антител VH/VK антител были сконструированы с помощью ПЦР и восстановлены с помощью вектора экспрессии pHg (с сигнальным пептидом и фрагментом константной области hIgG4/h kappa (CH1-FC/CL)) путем гомологичной рекомбинации, чтобы конструируют экспрессионную плазмиду VH-CH1-FC-pHg/VL-CL-pHg для полноразмерного гуманизированного антитела.

10 3. Экспрессия и очистка рекомбинационных и гуманизированных антител

Плазмиды для раздельной экспрессии легкой цепи и тяжелой цепи антитела совместно трансфицировали в клетку HEK293E в соотношении 1:1,2. Супернатант экспрессии собирали через 6 дней, и примеси удаляли высокоскоростным центрифугированием и затем очищали на колонке с протеином A. Колонку промывали PBS до тех пор, пока

15 показание A280 не уменьшилось до исходного уровня. Целевой белок элюировали кислотным буфером для элюирования, pH 3,0-рН 3,5, и нейтрализовали 1 М трис-HCl, pH 8,0-9,0. Элюент надлежащим образом концентрировали и дополнительно очищали гель-хроматографией Superdex200 (GE), которую уравновешивали PBS. Пики, представляющие агрегат, были исключены, и один пик был собран и аликовотирован

20 для использования.

Эффективность и преимущества антител согласно настоящему изобретению были подтверждены биохимическими методами испытаний, как показано ниже.

Пример 6. ИФА связывания антитела к LAG-3 с белком LAG-3 человека.

Способность антитела анти-LAG-3 связываться с белком LAG-3 человека определяли

25 с помощью ИФА. Слитый белок LAG-3 с меткой Fc или mFc иммунизировали в 96-луночном планшете для микротитрования путем связывания с антителом против Fc или против mFc, нанесенным на планшет для микротитрования, для определения силы сигнала после добавления антитела использовали для определения Активность связывания антитела с LAG-3 конкретным экспериментальным методом заключается

30 в следующем.

Козы антитела против человеческого Fc (Jackson Immuno Research, № по каталогу 109-005-008) или козы антитела против мышного Fc (Sigma, № по каталогу M3534-1ML) разбавляли до концентрации 2 мкг/мл буфером PBS при pH 7,4 (Sigma, № по каталогу P4417-100TAV) и добавляли в 96-луночный планшет в объеме 50 мкл/лунку,

35 а затем планшет инкубировали в инкубаторе при 37 °C в течение 2 часов. После удаления жидкости планшеты блокировали 200 мкл/лунку блокирующего раствора, содержащего 5 % обезжиренного молока (Bright Dairy, порошок обезжиренного молока) в PBS, и инкубировали в инкубаторе при 37 °C в течение 2,5 часов или в течение ночи при 4 °C (16-18 часов). После блокирования блокирующий раствор отбрасывали и планшет

40 промывали 5 раз буфером PBST (pH7.4 PBS, содержащий 0,05 % твин-20). Слитый белок LAG-3-Fc (SEQ ID NO: 3, произведенный собственными силами) или слитый белок LAG-3-mFc (SEQ ID NO: 4, произведенный собственными силами) разбавляли разбавителем образца (PBS pH7.4, содержащий 1 % BSA) до 1 мкг/мл и добавляли в каждую лунку по 50 мкл/лунку. Затем планшет инкубировали в инкубаторе при 37 °C в течение 1 часа

45 или в течение ночи при 4 °C. После инкубации реакционный раствор в планшете отбрасывали, и планшет промывали 6 раз PBST, а затем добавляли 50 мкл/лунку тестируемых антител различных концентраций (гибридомное очищенное антитело или гуманизированное антитело), которые были разбавлены образцом разбавителя, и

планшет инкубировали при 37 °C в течение 1 часа. Планшеты промывали 5 раз PBST после инкубации и добавляли 100 мкл/лунку козьего антимышиного (Jackson Immuno Research, № по каталогу 115-035-003) или козьего вторичного антichelовеческого антитела (Jackson Immuno Research, № по каталогу 109-035-003) метили HRP, разводили в разбавителе образца и планшет инкубировали при 37 °C в течение 1 часа. После 6-кратного промывания планшетов PBST в каждую лунку добавляли 50 мкл/лунку хромогенного субстрата TMB (KPL, № по каталогу 52-00-03) и инкубировали при комнатной температуре в течение 5-15 минут, реакцию останавливали с помощью добавления 50 мкл/лунку 1 M H₂SO₄ в каждую лунку. Величину OD при длине волны 10 450 нм считывали на считающем устройстве для микропланшетов NOVOStar, а затем рассчитывали значения EC 50 связывания антитела к LAG-3 с человеческим LAG-3. Результаты показаны в таблице 8. Данные показали, что все гуманизированные антитела, полученные способом скрининга в настоящем изобретении, показали превосходную активность связывания с человеческим белком LAG-3.

15

20

25

30

35

40

45

Таблица 8. Определение значения EC 50 антитела-кандидата в анализе связывания

Антитело-кандидат	Связывающий ИФА EC50 (нМ)
mAb229	0,129
Hu229-008	0,506
Hu229-009	0,152
Hu229-010	0,174
Hu229-011	0,201
Hu229-012	0,268
Hu229-013	0,106
Hu229-014	0,153
Hu229-015	0,156
Hu229-016	0,154
Hu229-017	0,048
Hu229-019	0,068
mAb303	0,172
Hu303-004	0,278
Hu303-005	0,309
Hu303-006	0,288
Hu303-007	0,135
Hu303-008	0,140
Hu303-009	0,316
Hu303-010	0,137
Hu303-011	0,314
Hu303-012	0,164
Hu303-013	0,166
Hu303-014	0,232
Hu303-015	0,172
Hu303-016	0,161
Hu303-017	0,168
Hu303-018	0,244
Hu303-019	0,277
Hu303-020	0,140
Hu303-021	0,170
Hu303-022	0,145
Hu303-023	0,152

Пример 7. Анализ связывания антитела к LAG-3 с человеческими LAG-3 сверхэкспрессирующими клетками CHO-S.

Способность антитела анти-LAG-3 связываться с клетками CHO-S со сверхэкспрессией белка LAG-3 определяли анализом связывания. Плазмиду LAG-3 полной длины (производимую самостоятельно, SEQ ID NO: 2) трансфицировали в клетки CHO-S путем электропорации, и уровень экспрессии LAG-3 определяли после двух недель скрининга в условиях стресса. Клетки со сверхэкспрессией LAG-3 фиксировали на дне 96-луночного планшета, и силу сигнала после добавления антитела использовали для определения активности связывания антитела со сверхэкспрессирующими LAG-3 клетками CHO-S, конкретный экспериментальный метод заключается в следующем.

100 мкл/лунку клеток высевали в 96-луночный планшет с плотностью 4×10^5 /мл и инкубировали в течение ночи. Супернатант отбрасывали, и планшет трижды промывали PBS и фиксировали 4 % PFA (Параформальдегид) (100 мкл/лунку) в течение получаса при комнатной температуре, а затем планшет трижды промывали PBS. После удаления жидкости планшет блокировали 200 мкл/лунку блокирующего раствора, содержащего 5 % обезжиренного молока (Bright Dairy, порошок обезжиренного молока), разведенного в PBS, и инкубировали при 37 °C в течение 2,5 часов. После блокирования блокирующий раствор отбрасывали и планшет промывали 5 раз буфером PBST (pH 7,4 PBS, содержащим 0,05 % твин-20), добавляли 50 мкл/лунку тестируемых антител различной концентрации (гибридомное очищенное антитело или гуманизированное антитело), которые были разбавлены разбавителем образца, а затем инкубированы в инкубаторе при 37 °C в течение 1 часа. Планшет 5 раз промывали PBST после инкубации, добавляли 100 мкл/лунку козьего антимышиного (Jackson Immuno Research, № по каталогу 115-035-003) или козьего античеловеческого вторичного антитела (Jackson Immuno Research, № по каталогу 109-035-003) метили HRP, разводили в разбавителе образца, и планшет инкубировали при 37 °C в течение 1 часа. После 6-кратного промывания планшетов PBST в каждую лунку добавляли 50 мкл хромогенного субстрата TMB (KPL, № по каталогу 52-00-03) и инкубировали при комнатной температуре в течение 5-15 минут, реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 M H₂SO₄ в каждую лунку. Значение OD при длине волны 450 нм считывали на считающем устройстве для микропланшетов NOVOStar, а затем рассчитывали значения EC 50 связывания антитела к LAG-3 с клетками CHO-S со сверхэкспрессией LAG-3.

Пример 8. Анализ антител против LAG-3 при блокировании связывания антигена LAG-3 с клетками Дауди.

Клетки Дауди (клетки лейкемии человека, приобретенные в банке клеток в Академии наук Китая) высевали в 96-луночный планшет с плотностью 3×10^5 /лунку. После центрифугирования при 1000 об/мин супернатант отбрасывали и затем планшет фиксировали 4 % PFA в течение 30 минут при комнатной температуре. Планшет промывали 4 раза PBS после удаления фиксированного раствора, и планшет блокировали 200 мкл/лунку блокирующего раствора, содержащего 5 % обезжиренного молока (Bright Dairy, порошок обезжиренного молока), разведенного в PBS, и инкубировали при 37 °C 2,5 часа. После блокирования блокирующий раствор отбрасывали и планшет промывали 5 раз буфером PBST (pH 7,4 PBS, содержащим 0,05 % твин-20), добавляли 50 мкл/лунку смеси меченного биотином (набор для маркировки биотином, Dojindo Chemical, № по каталогу LK03) слитого белка LAG-3-Fc (произведенный собственными силами, SEQ ID NO: 3) и градиента концентраций тестируемого антитела, где меченный биотином слитый белок LAG-3-Fc разбавлен образцом разбавителя (pH 7,4 PBS, содержащий 1 % BSA) в конечной концентрации 0,4 мкг/мл, и предварительно перемешивали в течение часа, затем планшет инкубировали

при 37 °C в течение 1 часа. Реакционный раствор отбрасывали и планшет промывали 5 раз PBST после инкубации, добавляли 50 мкл/лунку меченного HRP стрептавидина (Sigma, № по каталогу S2438), разбавленного разбавителем образца, и планшет инкубировали при 37 °C в течение 1ч. После 5-кратного промывания планшета PBST

5 в каждую лунку добавляли 50 мкл/лунку хромогенного субстрата TMB (KPL, № по каталогу 52-00-03) и инкубировали при комнатной температуре в течение 5-15 минут, реакцию останавливали с помощью добавления 50 мкл 1 M H₂SO₄ в каждую лунку.

10 Значение OD при длине волны 450 нм считывали на считающем устройстве для микропланшетов NOVOSTar, а затем рассчитывали активность антитела к LAG-3 в блокировании связывания антигена с клетками Дауди. Результаты показаны в таблице 9. Данные показывают, что все гуманизированные антитела, полученные способом скрининга в настоящем изобретении, значительно блокировали связывание человеческого антигена LAG-3 с клетками Дауди.

15

Таблица 9. Определение значения IC50антител-кандидатов в анализе блокирования	
Антитело-кандидат	Анализ связывания IC50 (нМ)
mAb229	1,327
Hu229-009	0,559
Hu229-010	0,453
Hu229-011	0,566
Hu229-013	0,39
Hu229-014	0,718
Hu229-015	0,808
Hu229-016	0,875
Hu229-017	0,239
Hu229-019	0,289
mAb303	0,596
Hu303-004	0,502
Hu303-005	0,622
Hu303-006	0,821
Hu303-007	0,343
Hu303-008	0,346
Hu303-009	0,417
Hu303-010	0,346
Hu303-011	0,728
Hu303-012	0,361
Hu303-013	0,347
Hu303-014	0,467
Hu303-015	0,398
Hu303-016	0,395
Hu303-017	0,398
Hu303-018	0,608
Hu303-019	0,471
Hu303-020	0,345
Hu303-021	0,456
Hu303-022	0,360
Hu303-023	0,369

20

25

30

35

40

45

Пример 9. Анализ BIAcore на сродство антитела к LAG-3.

1. Мышиное антитело против захвата было ковалентно связано с биочипом CM5 (№ по каталогу BR-1000-12, GE) в соответствии с методом, предложенным в инструкции к мышенному набору против захвата (№ по каталогу BR-1008- 38, GE), так что тестируемые антитела были захвачены с помощью сродства. Затем антиген LAG-3-Flag

(производимый самостоятельно, SEQ ID NO: 1) пропускали через поверхность биочипа, и сигнал реакции детектировали в режиме реального времени с использованием прибора Biacore для получения кривых связывания и диссоциации, значение сродства было получено путем подгонки, см. таблицу 2 выше. После того, как каждый цикл диссоциации был завершен в эксперименте, биочип был промыт и регенерирован с помощью регенерационного раствора, предоставленного в мышином наборе против захвата. Результаты демонстрируют, что антитела к LAG-3 mAb229 и mAb303 продемонстрировали превосходную активность связывания и сродство к белку LAG-3 человека.

- 10 2. Человеческое антитело против захвата было ковалентно связано с биочипом CM5
(№ по каталогу BR-1000-12, GE) в соответствии со способом, предложенным в
инструкции к человеческому набору против захвата (№ по каталогу BR-1008- 39, GE),
так что тестируемые антитела были захвачены с помощью сродства. Затем антиген
LAG-3-Flag (производимый самостоятельно, SEQ ID NO: 1) пропускали через поверхность
биочипа, и сигнал реакции детектировали в реальном времени с использованием прибора
Biacore для получения кривых связывания и диссоциации, значение сродства было
получено путем подгонки, см. таблицу 10 ниже. После завершения каждого цикла
диссоциации в эксперименте биочип промывали и регенерировали с помощью
регенерационного раствора, поставляемого в наборе против захвата человека.
15
20 Результаты демонстрируют, что антитела, полученные способом скрининга согласно
настоящему изобретению, показали превосходную активность связывания и сродство
к белку LAG-3 человека.

Таблица 10. Средство анти-LAG-3-антитела

Таблица 10. Сродство анти-LAG-3-антитела		
Стационарная фаза	Мобильная фаза	Сродство (M)
мAb229	LAG-3-Flag	1,72E-11
Hu229-009		4,88E-11
Hu229-010		3,82E-11
Hu229-013		2,81E-11
Hu229-014		3,74E-11
Hu229-015		4,59E-11
Hu229-017		6,71E-11
Hu229-019		7,29E-11
мAb303		7,49E-11
Hu303-004		1,06E-09
Hu303-005		7,15E-11
Hu303-006		7,53E-11
Hu303-009		9,43E-10
Hu303-010		1,47E-10
Hu303-014		4,91E-10
Hu303-016		7,48E-11

Пример 10. Активация РВМС-Т лимфоцитов

Для изучения влияния антитела к LAG-3 на активацию Т-лимфоцитов мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) собирали и очищали. Уровень секреции цитокинов IL-2 измеряли после стимуляции супер-антителом энтеротоксина В *Staphylococcus aureus* (SEB) *in vitro* в течение 72 часов. Экспериментальный процесс кратко описан ниже:

Свежевыделенные и очищенные PBMC (мононуклеарные клетки периферической крови) высевали в 96-луночный планшет для культивирования клеток при плотности клеток примерно 1×10^5 /лунку и добавляли 100 нг/мл стимула супер-антисигнала SEB, а

также градиентно разбавленные образцы антител (разбавленные средой) или среду в качестве пустого контроля добавляли одновременно. Планшет инкубировали при 37 °C, 5 % CO₂ в течение 72 ч, супернатант клеточной культуры собирали. Уровень секреции IL-2 в культуральном супернатанте измеряли с помощью ИФА (BD, № по каталогу 550611). Подробные процедуры указаны в руководстве производителя.

Результат показан на Фиг. 1. Оба гуманизированных антитела к LAG-3 Hu229-013 и Hu303-005 могут повышать уровни цитокина IL-2, секреции активированными Т-лимфоцитами, в разной степени, причем эффект дозы зависит от концентрации лекарственного средства.

Пример 11. Ингибирование подкожно инокулированной опухоли U-87MG антителом к LAG-3.

В этом исследовании измеряли влияние гуманизированного антитела к LAG-3 на объем опухоли у мышей с опухолью U-87 MG.

100 мкл клеток глиомы U87 MG человека ($3,5 \times 10^6$ клеток) инокулировали подкожно в правые ребра мышей NOD-SCID (приобретено у Changzhou Cavion Experimental Animal Co., Ltd.). Когда опухоль выросла до 40 мм^3 через 10-14 дней, мышей, исключая тех, у кого был слишком большой или слишком маленький вес тела или объем опухоли, случайным образом разделили на три группы: контрольная группа изотипического hIgG, сопоставимого с изотипом, группа гуманизированного LAG-3 антитела-кандидата Hu229-013 и группа гуманизированного антитела-кандидата LAG-3 Hu303-005, согласно объему опухоли (группировка и дозировка указаны в таблице 11), каждая группа из 8 мышей (D0). PBMC, стимулированные антителом CD3, инъецировали в опухолевые ткани в количестве 5×10^5 клеток/60 мкл, и инъекцию антител, подлежащих тестированию, начинали внутрибрюшинные инъекции три раза в неделю, всего 6 раз. У мышей измеряли объем опухоли два раза в неделю, данные записывали. Объем опухоли (V) рассчитывали как:

$$\text{Объем опухоли (TV)} = 1/2 \times L_{\text{длинный}} \times L_{\text{короткий}}^2,$$

30 Объем опухоли в каждой группе выражали как среднее \pm стандартная ошибка (среднее \pm SEM) и наносили на график с помощью программного обеспечения Graphpad Prism 5, анализировали с помощью двухстороннего статистического анализа ANOVA, и степень ингибирования опухоли рассчитывали согласно следующей формуле:

$$\text{Степень пролиферации опухоли (T/C\%)} = (T - T_0/C - C_0) \times 100 \%$$

$$\text{Степень ингибирования опухоли \% TGI} = 1 - T/C \%$$

Результаты показаны в Таблице 11 и на Фиг. 2. Оба антитела к LAG-3 Hu229-013 и Hu303-005 обладают определенным противоопухолевым эффектом через 14 дней после введения, и уровни ингибирования опухоли составляли 27,25 % (р менее 0,05) и 34,94 % (р менее 0,01) соответственно. Была значительная разница по сравнению с контрольной группой (р менее 0,001 vs hIgG).

Таблица 11. Влияние гуманизированного антитела против LAG-3 на подкожно инокулированную опухоль U-87MG у мышей.					
Группа	Доза (mpk)	День 0 Среднее \pm SEM (мм^3)	День 14 Среднее \pm SEM (мм^3)	P (vs hIgG)	%TGI в День14
hIgG control	6	37,9 \pm 2,6	247,1 \pm 26,5	-	-
Hu229-013	6	37,9 \pm 2,5	190,1 \pm 26,2*	Менее 0,05	27,25 %
Hu303-005	6	37,7 \pm 2,4	173,5 \pm 26,5**	Менее 0,01	34,94 %

Примечание: D0: первое введение; * р менее 0,05, ** р менее 0,01, *** р менее 0,001 vs hIgG при двухстороннем ANOVA.

Пример 12. РК (Фармако-кинетический) анализ гуманизированных антител против

LAG-3 Hu229-013 и Hu303-005 на мышах.

Восемнадцать мышей-самцов ICR весом от 18 до 22 г были приобретены у Sippr-BK Lab Animal Co., Ltd. В течение периода кормления мыши получали доступ к воде и диете ad libitum, мыши были адаптированы к лабораторной среде для не менее 3 дней, с

5 регулированием цикла свет/темнота 12/12 часов, при температуре 16-26 °C и относительной влажности 40-70 %. Мыши ICR были пронумерованы и случайным образом разделены на разные группы за один день до эксперимента, каждая группа из 3 мышей. В день эксперимента двум группам мышей внутривенно вводили гуманизированное антитело-кандидат (Hu229-013) в дозах 3 мг/кг и 10 мг/кг

10 соответственно; Другим двум группам мышей внутривенно вводили гуманизированное антитело-кандидат (Hu303-005) в дозах 3 мг/кг и 10 мг/кг соответственно. Объем для внутривенного введения составляет 20 мл/кг.

Образцы крови собирали в моменты времени 15 минут, 8 часов, 1 день, 2 дня, 4 дня, 7 дней, 10 дней, 14 дней, 21 день, 28 дней и 35 дней после введения. Каждый раз примерно 15 0,1 мл цельной крови помещали в пробирку для центрифугирования без антикоагулянта, помещали при 4 °C на 30 мин и затем центрифугировали при 1000 г в течение 15 мин. Супернатант пипеткой переносили в пробирку ЕР и хранили при -80 °C.

20 Концентрацию лекарственного средства в сыворотке измеряли с помощью ИФА, а T1/2 и другие основные параметры рассчитывали с помощью программного обеспечения Winnolin. Основные фармакокинетические параметры приведены в Таблице 12:

Таблица 12. Фармакокинетические параметры Hu229-013 и Hu303-005 у мышей

	Hu229-013		Hu303-005	
Дозировка (мг/кг)	3мг/кг	10мг/кг	3мг/кг	10мг/кг
25 T _{макс} (час)	0,25	0,25	0,25	0,25
C _{макс} (мкг/мл)	51,6±1,2	130±20,2	68,2±8,4	243,2±19,9
AUC _{0-t} (мкг/мл*ч)	5556±891	17120±4177	6386±453	22609±1567
AUC _{0-∞} (мкг/мл*ч)	5871±1036	19736±6142	7124±581	27061±5154
30 t _{1/2} (ч)	183±54	276±193	232±24	330±194
CL _Z /F(мл/мин/кг)	0,0087±0,0015	0,0092±0,0034	0,007±0,0006	0,0063±0,0011
V _Z /F(мл/кг)	134±16	186±107	141±14	168±66
MRT _{0-∞} (ч)	241±59	353±191	324±37	411±181

25 Воздействие in vivo на гуманизированные антитела к LAG-3 Hu229-013 и Hu303-005 на мышах было сходным, а количество и пиковые концентрации этих двух антител в дозах 3 мг/кг и 10 мг/кг линейно коррелировали с увеличением дозы, показывая линейную фармакокинетическую характеристику.

35 Примерный способ получения фармацевтических композиций антител (препараторов)

Этап 1. Пропускание исходного раствора препарата, содержащего антитело к LAG-3, через PVDF-фильтр 0,22 мкм, отбор пробы фильтрата для теста на стерильность и сбор фильтрата.

40 Этап 2: Доведение объема загрузки до 5,3 мл, загрузка фильтрата в 6 мл пробирку с пробкой; и обнаружение различий в объеме путем отбора проб в начале, во время и в конце процедуры загрузки, соответственно.

Этап 3: Укупорка алюминиевой крышки с помощью укупорочной машины.

45 Этап 4: Выполнение визуального осмотра, чтобы подтвердить, есть ли какие-либо дефекты, такие как неточная загрузка. Печать и наклеивание этикетки на флакон. Распечатывание этикетки для бумажного лотка, складывание бумажного лотка и помещение флаконов в бумажный лоток и вставка этикетки в бумажный лоток.

Примерный способ приготовления фармацевтических композиций антител

Этап 1: Пропускание исходного раствора препарата, содержащего Hu303-005, через PVDF-фильтр 0,22 мкм, отбор пробы фильтрата для теста на стерильность и сбор фильтрата.

Этап 2: Доведение объема загрузки до 5,3 мл, загрузка фильтрата в пробирку на 20

5 мл, вставка пробки наполовину в пробирку и лиофилизация исходного раствора и герметизация пробирки с резиновой пробкой.

Этап 3: Укупорка алюминиевой крышки с помощью укупорочной машины.

Этап 4: Выполнение визуального осмотра, чтобы подтвердить, есть ли какой-либо дефект, такого как коллапс во время замораживания. Печать и наклеивание этикетки 10 на флакон. Распечатывание этикетки для бумажного лотка, складывание бумажного лотка и помещение флаконов в бумажный лоток и вставка этикетки в бумажный лоток.

Пример 13. Скрининг буферной системы для препарата антитела к LAG-3.

Препараты антитела к LAG-3 Hu229-013 или Hu303-005 готовили в серии 10 мМ буферов, pH 5,0-7,5, при концентрации белка 50 мг/мл, и каждый препарат фильтровали 15 и добавляли в пробирку с пробкой, и флакон был закрыт и запечатан. Образцы подвергали испытанию на принудительное разложение, например, при высокой температуре 40 °C, встряхиванию, и оценивали по внешнему виду эксклюзионной хроматографии (SEC), капиллярному электрофорезу с невосстановливающим 20 додецилсульфатом натрия (CE-SDS) и ионообменной хроматографии (IEC), или капиллярным электрофорезом с изоэлектрическим фокусированием и детектированием всей колонки (iCIEF). Результаты показаны в таблице 13-1 и таблице 13-2, а результаты статистического анализа показаны на Фиг. 3 - 6.

Таблица 13-1. Результаты скрининга для буферной системы Hu229-013

буфер/pH	состояние	внешний вид	SEC % мономер	Невосстановливающий CE %	IEC %		
					кислый	нейтральный	щелочной
Уксусная кислота-ацетат натрия (AA)/5,0	D0	чистый, содержащий несколько частиц	99,3	97,1	10,4	78,2	11,4
	D12	чистый, содержащий несколько нитевидных частиц	99,1	94,9	13,9	63,4	22,8
	40 °C D31	N/A	98,5	87,2	20,6	50,5	28,9
	Встряхивание D6	мутный	99,0	96,7	10,9	75,8	13,3
	Встряхивание D12	чистый, содержащий несколько мелких частиц	98,8	97,0	11,0	75,0	13,9
Уксусная кислота-ацетат натрия/5,5	D0	чистый, содержащий несколько частиц	99,3	97,2	10,5	78,4	11,1
	40 °C D12	чистый, содержащий несколько частиц	99,1	95,5	15,4	66,5	18,1
	40 °C D31	N/A	98,6	91,7	24,6	55,0	20,4
	Встряхивание D6	мутный	99,0	96,6	10,9	76,2	12,8
	Встряхивание D12	опалесцирующий, содержащий несколько мелких частиц	99,0	97,0	11,2	75,7	13,1
Янтарная кислота-сукцинат натрия (SA)/5,5	D0	чистый, содержащий несколько частиц	99,3	97,1	12,6	76,3	11,2
	40 °C D12	гораздо больше нитевидных частиц	99,0	95,5	15,5	65,2	19,3
	40 °C D31	N/A	98,5	86,6	24,1	53,4	22,5
	Встряхивание D6	мутный, содержащий крупные нитевидные частицы или осадок	99,1	96,6	11,0	76,1	12,8
	Встряхивание D12	чистый, содержащий несколько мелких частиц	99,1	97,0	11,3	75,1	13,7
Янтарная кислота-сукцинат натрия /6,0	D0	чистый, содержащий несколько частиц	99,3	97,2	13,0	76,2	10,8
	40 °C D12	чистый, содержащий несколько нитевидных частиц	99,0	96,0	15,6	70,2	14,3
	40 °C D31	N/A	98,4	92,4	27,5	57,2	15,3

5	Лимонная кислота-цитрат натрия (CA)/5,5	Встряхивание D6	мутный, содержащий крупные нитевидные частицы или осадок	99,0	96,6	11,2	76,3	12,6
		Встряхивание D12	гораздо больше мелких частиц	99,2	97,0	11,3	76,4	12,3
10	Лимонная кислота-цитрат натрия/6,0	D0	чистый, содержащий несколько частиц	99,3	97,1	13,1	76,3	10,6
		40 °C D12	гораздо больше нитевидных частиц	99,0	95,2	15,4	64,9	19,7
		40 °C D31	N/A	98,2	90,4	24,2	51,7	24,1
		Встряхивание D6	мутный, содержащий крупные нитевидные частицы или осадок	99,2	96,7	11,0	76,0	13,0
		Встряхивание D12	мутный, мелкие частицы осадка	99,2	96,9	11,2	75,1	13,7
15	Гистидин-соляная кислота (His-HCl)/5,5	D0	чистый, содержащий несколько частиц	99,3	97,3	12,8	76,8	10,4
		40 °C D12	гораздо больше нитевидных частиц	99,0	95,9	14,6	63,0	22,3
		40 °C D31	N/A	98,7	92,1	25,7	58,2	16,0
		Встряхивание D6	мутный, содержит крупные нитевидные частицы или осадок	99,0	96,8	11,1	76,3	12,5
		Встряхивание D12	мутный, мелкие частицы осадка	99,0	97,0	14,0	73,8	12,1
20	Гистидин-соляная кислота /6,0	D0	чистый, содержащий несколько частиц	99,3	96,7	10,5	78,3	11,1
		40 °C D12	гораздо больше нитевидных частиц	99,1	95,1	16,9	66,6	16,5
		40 °C D31	N/A	98,7	90,2	21,7	51,4	26,9
		Встряхивание D6	мутный	99,0	96,7	10,7	76,3	12,9
		Встряхивание D12	гораздо больше мелких частиц	99,2	96,9	11,0	75,7	13,3
25	Трис 7,5	D0	чистый, содержащий несколько частиц	99,3	96,4	10,3	79,2	10,5
		40 °C D12	гораздо больше нитевидных частиц	99,1	95,7	16,6	65,8	17,6
		40 °C D31	N/A	98,8	92,0	25,7	57,0	17,3
		Встряхивание D6	мутный, содержащий крупные нитевидные частицы или осадок	99,1	96,8	10,9	77,2	11,9
		Встряхивание D12	гораздо больше мелких частиц	99,2	96,9	11,5	76,3	12,2
30		D0	чистый, содержащий несколько частиц	99,1	96,4	11,0	79,8	9,2
		40 °C D12	гораздо больше нитевидных частиц	98,8	95,6	27,9	62,0	10,1
		40 °C D31	N/A	98,0	92,0	45,9	45,9	8,3
		Встряхивание D6	мутный, содержащий крупные нитевидные частицы или осадок	99,1	96,7	12,7	77,6	9,7
		Встряхивание D12	мутный, мелкие частицы осадка	99,0	97,0	14,0	76,7	9,3

Примечание: 0,01 мг/мл полисорбата 80 были добавлены для приготовления образца встряхивания D12, а другие образцы не содержали полисорбат 80; D указывает на день.

Таблица 13-2. Результаты скрининга для буферной системы Hu303-005					
буфер/pH	состояние	внешний вид	нейтральный пик iCIEF %	невосстановливающий CE-SDS %	
Уксусная кислота-ацетат натрия(AA) 5,0	D0	чистый	55,7	97,28	
	40 °C D11	N/A	26,0	92,57	
	Встряхивание D3	чистый	N/A	N/A	
Уксусная кислота-ацетат натрия 5,5	D0	чистый	57,0	97,63	
	40 °C D11	N/A	32,9	94,27	
	Встряхивание D3	несколько частиц	N/A	N/A	
Янтарная кислота-сукцинат натрия (SA) 5,0	D0	чистый	56,9	97,48	
	40 °C D11	N/A	19,6	90,11	
	Встряхивание D3	чистый, опалесцирующий	N/A	N/A	
Янтарная кислота-сукцинат натрия 5,5	D0	чистый, опалесцирующий	55,2	97,23	
	40 °C D11	N/A	29,0	92,11	
	Встряхивание D3	много частиц	N/A	N/A	
Янтарная кислота-сукцинат	D0	чистый	59,1	97,41	

5	натрия 6,0	40 °C D11	N/A	37,7	94,55
		Встряхивание D3	много частиц	N/A	N/A
	Гистидин-соляная кислота (His-HCl) 5,5	D0	чистый	55,8	97,11
		40 °C D11	N/A	25,5	91,31
		Встряхивание D3	чистый	N/A	N/A
	Гистидин-соляная кислота 6,0	D0	чистый	59,9	97,41
		40 °C D11	N/A	37,3	95,38
		Встряхивание D3	много мелких частиц	N/A	N/A
	Гистидин-соляная кислота 6,5	D0	чистый	57,0	97,63
		40 °C D11	N/A	45,9	94,38
		Встряхивание D3	много мелких частиц	N/A	N/A
10	Лимонная кислота-цитрат натрия (CA) 5,5	D0	чистый, опалесцирующий	55,2	97,64
		40 °C D11	N/A	24,5	90,57
		Встряхивание D3	прозрачные нити, белковый осадок	N/A	N/A
	Лимонная кислота-цитрат натрия 6,0	D0	чистый, опалесцирующий	56,6	97,05
		40 °C D11	N/A	36,4	93,53
		Встряхивание D3	несколько частиц	N/A	N/A
15	Лимонная кислота-цитрат натрия 6,5	D0	чистый, опалесцирующий	55,4	97,48
		40 °C D11	N/A	43,3	94,64
		Встряхивание D3	несколько частиц	N/A	N/A
	Гидрофосфат натрия-дина-трий гидрофосфат (PB) 6,0	D0	много частиц	54,9	97,30
		40 °C D11	N/A	36,8	95,16
		Встряхивание D3	много мелких частиц	N/A	N/A
20	Гидрофосфат натрия-дина-трий гидрофосфат 6,5	D0	много частиц	55,2	97,28
		40 °C D11	N/A	47,0	94,07
		Встряхивание D3	много мелких частиц	N/A	N/A
	Гидрофосфат натрия-дина-трий гидрофосфат 7,0	D0	много частиц	56,4	97,69
		40°C D11	N/A	46,5	93,71
		Встряхивание D3	много мелких частиц	N/A	N/A

Примечание: D обозначает день; N/A означает не обнаружено.

Результаты показали:

(1) Антитело Hu229-013 продемонстрировало наилучший внешний вид в системе

30 уксусная кислота-ацетат натрия (AA), затем следуют система янтарная кислота-сукцинат натрия (SA) и гистидин-соляная кислота (His-HCl). 40 °C CE, чистота IEC была выше у системы уксусной кислоты и ацетата натрия (AA), pH 5,5, янтарной кислоты-сукцината натрия (SA), pH 6,0, лимонной кислоты-цитрата натрия (CA), pH 6,0, гистидина-соляной кислоты (His), pH 6,0. Учитывая внешний вид и CE, результаты IEC, антитело к LAG-3

35 Hu229-013 было относительно стабильным в системе AA (pH 5,5), SA (pH 6,0), His-HCl (pH 6,0), см. Фиг. 3 и Фиг. 4.

(2) Данные внешнего вида при встряхивании антитела Hu303-005 показали, что внешний вид был лучше, когда pH был ниже, а буферная система гистидин-соляная кислота (His-HCl) и уксусная кислота-ацетат натрия (AA) были превосходными. CE-

40 SDS (невосстановливающий) и iCIEF указывают на значительное снижение в условиях ускорения при 40 °C, где данные CE-SDS показали, что pH 6,0 был выше, а буферная система уксусная кислота-ацетат натрия, гистидин-соляная кислота (His-HCl) и фосфатная система были превосходными. Данные iCE показали, что нейтральные пики уменьшались меньше при более высоком pH, см. Фиг.5 и Фиг.6. Предпочтительная буферная система после общего рассмотрения представляет собой 10 mM His-HCl pH 6,0.

Пример 14. Скрининг адьюванта для препарата антитела к LAG-3.

(1) Препараты против LAG-3 Hu229-013 готовили в 10 mM буфере янтарная кислота-

сукцинат натрия, pH 6,0, с концентрацией белка 50 мг/мл, с различными концентрациями поверхностно-активного вещества и сахарида, как указано ниже. Результаты показаны в таблице 14-1.

1) 0,1 мг/мл полисорбата 20 (PS20)

5 2) 0,1 мг/мл полисорбата 80 (PS80)

3) 70 мг/мл сахарозы

4) 70 мг/мл трегалозы

5) 50 мг/мл маннита

6) 50 мг/мл сорбита

10 (2) Препараты антител Hu303-005 готовили в 10 мМ уксусной кислоте (натрий), pH

5,5, при концентрации антител 50 мг/мл, с различными концентрациями поверхностно-активного вещества и сахарида, как указано ниже. Результаты показаны на Фиг. 7 и Таблице 14-2.

15 1) 75 мг/мл сахарозы + 0,2 мг/мл PS80

2) 75 мг/мл трегалозы + 0,2 мг/мл PS80

3) 0,05 мг/мл полисорбата 20 (PS20)

4) 0,05 мг/мл полисорбата 80 (PS80)

5) 0,2 мг/мл PS20

6) 0,2 мг/мл PS80

20 7) 0,4 мг/мл PS20

8) 0,4 мг/мл PS80

Каждый препарат фильтровали и добавляли в закупоренный флакон, а флакон закрывали и герметизировали. Образцы были подвергнуты испытанию на принудительное разложение, таким как высокая температура 40 °C, многократное

25 замораживание-оттаивание, встряхивание. Результаты показаны в таблице 14 и на Фиг. 7.

Таблица 14-1. Влияние различных адьювантов на стабильность Hu229-013

Препарат адьюванта	состоиние	внешний вид	SEC %	IEC %	Невосстановли-вающий CE-SDS %
			мономер	ней- траль- ный	
0,1 мг/мл PS 20	D0	чистый	99,2	73,5	97,0
	замораживание - отта- ивание	чистый	N/A	N/A	N/A
	40 °C D14	чистый, несколько мелких частиц	98,9	68,3	95,2
	встряхивание D9	опалесцирующий, содержащий много крупных частиц	98,9	74,6	96,2
0,1 мг/мл PS 80	D0	чистый	99,2	74,1	96,9
	замораживание - отта- ивание	чистый	N/A	N/A	N/A
	40 °C D14	чистый, несколько мелких частиц	99,0	68,7	95,4
	встряхивание D9	чистый	99,2	74,3	96,5
70 мг/мл сахароза	D0	чистый, содержащий несколько частиц	99,2	74,9	96,7
	замораживание - отта- ивание	несколько частиц	N/A	N/A	N/A
	40 °C D14	чистый, много мелких частиц	98,9	68,9	95,2
	встряхивание D9	опалесцирующий, крупный хлопьевидный осадок	98,9	74,0	96,6
70 мг/мл трегалоза	D0	чистый, содержащий несколько частиц	99,2	74,0	96,5
	замораживание - отта- ивание	много частиц	N/A	N/A	N/A
	40 °C D14	чистый, много мелких частиц	98,9	69,1	95,3
	встряхивание D9	опалесцирующий, крупный хлопьевидный осадок	99,1	73,9	96,7

5	50 мг/мл маннитол	D0	чистый, содержащий несколько частиц	99,2	74,3	96,3
		замораживание - оттаивание	содержащий частицы	N/A	N/A	N/A
		40 °C D14	чистый, много мелких частиц	98,9	68,3	95,1
		встряхивание D9	крупный хлопьевидный осадок	99,1	74,5	96,6
10	50 мг/мл сорбита	D0	чистый, содержащий несколько частиц	99,1	74,1	95,9
		замораживание - оттаивание	содержащий частицы	N/A	N/A	N/A
		40 °C D14	чистый, много мелких частиц	99,0	67,7	94,6
		встряхивание D9	крупный хлопьевидный осадок	99,2	74,1	96,7

Примечание: D обозначает день.

Таблица 14-2. Влияние различных адьювантов на стабильность Hu303-005				
	Препарат	состояние	внешний	SEC
15	75 мг/мл сахарозы +0,2 мг/мл PS80	D0	чистый	99,2
		встряхивание D9	очень мало частиц	96,0
20	75 мг/мл трегалозы +0,2 мг/мл PS80	D0	чистый	99,3
		встряхивание D9	чистый	94,8
25	0,05 мг/мл полисорбата 20(PS20)	D0	чистый	99,3
		встряхивание D9	чистый, глубоко опалесцирующий	17,5
30	0,05 мг/мл полисорбата 80(PS80)	D0	чистый	99,2
		встряхивание D9	чистый, глубоко опалесцирующий	19,7
35	0,2 мг/мл PS20	D0	чистый	99,1
		встряхивание D9	чистый	89,3
40	0,2 мг/мл PS80	D0	чистый	98,9
		встряхивание D9	чистый	94,4
45	0,4 мг/мл PS20	D0	чистый	99,1
		встряхивание D9	чистый	98,4
50	0,4 мг/мл PS80	D0	чистый	99,2
		встряхивание D9	чистый	98,3

Примечание: D обозначает день.

Результаты показали, что:

- (1) Появление препарата антитела Hu229-013 в группе со встряхиванием PS80 было лучше, чем в группе со встряхиванием PS20; после однократного замораживания и оттаивания в группе сахарозы появилось несколько частиц, а в группе трегалозы появилось много частиц; не было никакой разницы между другими группами; следовательно, адьювант предпочтительно представлял собой полисорбат 80 и сахарозу.
- (2) Внешний вид композиции антитела Hu303-005 был немного лучше в группе с трегалозой, но результаты SEC показали, что группа с сахарозой была немного лучше; в целом не было очевидной разницы между сахарозой и трегалозой. Внешний вид и данные SEC показали, что PS80 превосходит PS20, и увеличение содержания полисорбата может значительно улучшить внешний вид и стабильность SEC, как показано на Фиг. 7. Следовательно, PS80 является предпочтительным, и концентрация PS должна быть больше 0,2 мг/мл.

Пример 15. Оценка стабильности антитела к LAG-3

- (1) Композиции антитела к LAG-3 Hu229-013 готовили в различных буферах, как указано ниже, при концентрации белка 50 мг/мл, содержащей 60 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл полисорбата 80:
- 1) 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия (AA) pH 5,5;
 - 2) 10 мМ гистидин-уксусная кислота (His-AA), pH 6,0;
 - 3) 10 мМ гистидин-соляная кислота (His-HCl), pH 6,0;

4) 10 мМ янтарная кислота-сукцинат натрия (SA), pH 6,0.

(2) Препараты Hu303-005 получали в различных буферах, как указано ниже, при содержании белка 50 мг/мл, включая 75 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл PS 80:

1) 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия (AA) pH 5,5

5 2) 10 мМ гистидин-соляная кислота (His-HCl) pH 6,0

3) 10 мМ гистидин-соляная кислота (His-HCl) pH 6,5.

Каждый препарат фильтровали и загружали в закупоренный флакон, а флакон закрывали и герметизировали. Подготовленные образцы помещали при 25 или 4 °C для наблюдения за стабильностью. Элементами обнаружения были внешний вид, SEC,

10 IEC или iCE, CE-SDS (невосстановливающий).

Таблица 15-1. Результаты стабильности Hu229-013

буфер/pH	время	внешний вид	SEC мономер %	IEC нейтральный пик %	CE чистота %
15 AA5.5	M0	чистый	99,2	75,0	97,0
	4 °C M3.5	чистый прозрачный	99,2	75,1	96,7
	25 °C M3.5	чистый прозрачный	98,8	65,4	95,0
20 His-AA6.0	M0	чистый	99,1	75,4	97,2
	4 °C M3.5	чистый прозрачный	99,2	76,9	96,9
	25 °C M3.5	чистый прозрачный	99,0	68,6	95,3
His-HCl 6.0	M0	чистый	99,3	75,4	97,3
	4 °C M3.5	чистый прозрачный	99,2	75,7	96,7
	25 °C M3.5	несколько частиц	99,0	67,9	95,2
SA6.0	M0	чистый	99,2	74,9	97,2
	4 °C M3.5	чистый прозрачный	99,2	76,7	96,9
	25 °C M3.5	несколько частиц	98,8	68,1	96,5

Примечание: M3.5 означает 3,5 месяца

25

Таблица 15-2 Результаты стабильности Hu303-005 при 4 °C

буфер/pH	Время (M)	Внешний вид	SEC Мономер %	Невосстановлива- ющий CE-SDS %	iCIEF%		
					кислотный	нейтраль- ный	щелочной
30 AA5.5	0	чистый	99,1	97,1	22,9	55,9	21,2
	1	чистый	99,1	97,0	23,6	59,6	16,8
	3	N/A	99,2	97,0	20,2	57,5	22,2
35 His-HCl 6.0	0	чистый	99,1	97,6	23,3	58,2	18,5
	1	чистый	99,1	97,1	23,4	60,7	15,9
	3	N/A	99,1	97,2	22,1	59,4	18,6
His-HCl 6.5	0	чистый	99,2	97,5	22,9	57,8	19,3
	1	чистый	98,9	96,9	23,2	63,3	13,5
	3	N/A	99,1	96,3	23,8	61,4	14,9

Примечание: М указывает на месяц, а N/A не указывает на детекцию.

Результаты показали:

(1) Антилого к LAG-3 Hu229-013 было более стабильным в 10 мМ AA pH 5,5, 10 мМ

40 His-AA pH 6,0.

(2) После помещения в течение 3 месяцев при 4 °C CE антитела Hu303-005 слегка уменьшился в группе His-HCl (pH 6,5), ICE антитела был слегка изменен при AA pH 5,5, и His-HCl pH 6,5, и антилого было наиболее стабильным в His-HCl (pH 6,0).

Пример 16. Оптимизация препарата антител к LAG-3

45 Для дальнейшей оптимизации типа, pH и ионной силы буфера концентрацию антитела Hu229-013 устанавливали на 50 мг/мл, и планирование эксперимента было разработано с использованием программного обеспечения JMP. Ряд препаратов был получен с использованием модели RSM (модель Рейнольдса на основе анализа механических

напряжений). IEC, CE(невосстановливающий) и микрофлюидная визуализация (MFI) использовались в качестве показателей оценки в способах принудительной деградации. Результаты были статистически проанализированы методом наименьших квадратов. Параметры планирования эксперимента показаны в Таблице 16. Препараты и

5 результаты испытаний показаны в Таблице 17 и Таблице 18.

Таблица 16. Факторы и их уровни, учитываемые в планировании эксперимента		
фактор	уровень	наблюдения
Буферная система	AA/His-AA	
pH	От 5,0 до 5,8	
Ионная сила	От 10 до 30 мМ	Высокая температура 25/40 °C, встряхивание, замораживание-оттаивание#

Таблица 17. Планирование эксперимента: составы препаратов Hu229-013				
Серийный номер	Буферная система	Ионная сила	pH	Другие адьюванты
1	Гистидин-уксусная кислота (His-AA)	20	5,5	75 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл PS80
2	His-AA	10	5,8	
3	Уксусная кислота-ацетат натрия(АА)	20	5,8	
4	His-AA	10	5,2	
5	His-AA	30	5,8	
6	AA	10	5,5	
7	AA	20	5,2	
8	AA	30	5,5	
9	His-AA	30	5,2	
10	His-AA	20	5,5	

Таблица 18. Результаты скрининга планирования эксперимента по составу препарата									
Серийный номер	MFI (более 2 мкм частиц/мл)			IEC-нейтральный пик %			Невосстановливающий CE-SDS %		
	D0	Замораживание-оттаивание 5 раз	встряхивание	D0	25 °C M1	D21	D0	25 °C M1	D21
1	7594	7589	264	72,7	70,9	57,2	96,8	96,8	93,0
2	9184	7213	2422	73,1	70,9	59,7	96,9	96,9	93,7
3	10136	11806	274	76,5	68,4	59,1	96,7	96,8	94,1
4	16711	8399	474	76,0	70,2	56,7	96,6	96,6	92,8
5	32780	2975	604	75,6	67,6	56,9	96,6	96,7	93,5
6	11503	4013	1751	75,5	67,7	57,4	96,6	96,5	93,8
7	5973	11522	790	75,9	67,4	55,6	96,6	96,5	92,5
8	29206	10532	159	74,9	67,6	57,4	96,5	96,5	93,2
9	5625	4878	660	75,9	67,9	53,8	96,8	96,6	91,6
10	12970	3588	1464	76,1	69,2	56,9	96,7	96,7	93,1

Примечание: M1 означает один месяц, а D означает день.

Данные, полученные при принудительном разложении, были подвергнуты аппроксимации, и результаты показали, что: антитело к LAG-3 Hu229-013 показало хорошую стабильность в 10-30 мМ системе буфера уксусная кислота-ацетат натрия (АА) или гистидин-уксусная кислота (His-AA), pH 5,2-5,8. Предпочтительно буферная система представляет собой 10-30 мМ уксусная кислота-ацетат натрия (АА), pH 5,5.

40 Пример 17. Тестирование стабильности композиции антитела к LAG-3.

Композицию против LAG-3 Hu229-013 получали в 10 мМ буфере уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,5, с концентрацией белка 60 мг/мл, содержащей 60 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл полисорбата 80.

45 Препаратор фильтровали и добавляли в закупоренный флакон, а флакон закрывали и герметизировали. Подготовленные образцы помещали при 4 °C для наблюдения за стабильностью. Элементы обнаружения включают внешний вид, SEC, IEC, CE-SDS

(невосстановливающий).

5	Время (М)	Внешний вид	SEC %			Невосстановливающий CE-SDS %	IEC %			
			агрегат	мономер	фрагмент		IEC %			
							кислый	нейтральный	щелочной	
10	0	чистый	1,1	98,9	0,0	97,6	14,4	72,0	13,6	
9	1	чистый	1,0	98,9	0,1	96,2	14,5	71,8	13,6	
15	3	чистый	1,0	98,8	0,1	96,8	16,2	68,4	15,5	
20	6	чистый	1,2	98,7	0,1	96,9	14,0	73,0	13,0	
25	9	чистый	1,2	98,8	0,1	97,3	13,8	71,4	14,9	

Результаты показали, что препарат Hu229-013 сохранял свою стабильность в течение 9 месяцев при 4 °C.

Пример 18. Оптимизация препарата антитела к LAG-3

(1) Оптимизация компонентов, входящих в препарат Hu229-013

Для дальнейшей оптимизации концентрации белка, сахарозы и полисорбата 80 в

буфере устанавливали 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,5. Планирование эксперимента было выполнено с использованием программного обеспечения JMP. Ряд препаратов был получен с использованием модели RSM, а IEC и CE (невосстановливающий) были использованы в качестве показателей оценки в методах принудительной деградации. Результаты были статистически проанализированы методом наименьших квадратов. Параметры планирования эксперимента показаны в Таблице 20. Результаты испытаний показаны в Таблице 21. Результаты статистического анализа показаны на Фиг. 8, Фиг. 9 и Таблице 21.

Таблица 20. Факторы и их уровни, учитываемые в планировании эксперимента				Наблюдение Высокая температура 40 °C	
Фактор		Уровень			
Конц. белка		От 40 до 80мг/мл			
Конц. сахарозы		От 30 до 90мг/мл			
Конц. PS80		От 0,1 до 0,5 мг/мл			

Таблица 21. Планирование эксперимента: составы препаратов и результаты скрининга							
число	Конц. белка мг/мл	Конц. сахарозы мг/мл	Конц. PS80 мг/мл	IEC нейтральный пик %		Невосстановливающий CE-SDS чистота %	
				D0	D16	D0	D16
1	60	60	0,1	78,0	60,6	95,1	94,4
2	40	30	0,1	77,2	60,7	96,4	94,3
3	40	60	0,3	77,8	60,5	96,1	94,2
4	60	90	0,5	74,6	59,8	94,6	94,5
5	60	30	0,3	77,4	60,0	94,6	94,5
6	40	90	0,1	77,5	59,8	96,0	94,3
7	40	60	0,3	77,6	59,9	96,1	94,2
8	80	30	0,1	75,8	59,6	94,8	94,4
9	80	90	0,3	77,6	58,9	95,1	94,4
10	60	60	0,3	77,7	59,6	94,6	94,2
11	80	60	0,5	77,6	59,6	95,2	94,1
12	40	30	0,5	77,5	60,0	95,6	94,0

Данные, полученные в результате различных принудительных деградаций, были подвергнуты подгонке, и результаты были следующими:

Значения разности между значениями IEC при D0 и значениями ICE при 40 °C были подвергнуты подгонке. R^2 более 0,98, Р менее 0,06, модель была действительной, и результат был показан на Фиг. 8. Значения разности между значениями чистоты CE при D0 и значениями чистоты CE при 40 °C были подвергнуты подгонке. R^2 более 0,99,

Р менее 0,05, модель была действительной, и результат был показан на Фиг. 9.

Результаты подгонки IEC 40 °C показали, что более предпочтительный препарат: концентрация белка от 40 до 60 мг/мл, концентрация от 30 до 90 мг/мл концентрации сахарида и от 0,4 до 0,5 мг/мл концентрации PS80; Результаты подгонки CE при 40 °C

показали, что более предпочтительный препарат: концентрация белка от 50 до 80 мг/мл, концентрация сахарида от 30 до 90 мг/мл и концентрация PS80 от 0,1 до 0,5 мг/мл. Поэтому наиболее предпочтительный диапазон составляет: концентрация белка от 50 до 60 мг/мл, концентрация сахарозы от 30 до 90 мг/мл и концентрация PS80 от 0,4 до 0,5 мг/мл.

(2) Оптимизация компонентов, содержащихся в препарате антитела Hu303-005

Концентрация сахарозы была установлена на 75 мг/мл, и планирование эксперимента было разработано со значениями pH 10 mM His буфера, концентрации белка и концентрации полисорбата, используемых в качестве переменных. Модель RSM была использована для получения серии препаратов. Препараты приведены в Таблице 22.

В качестве оценочных показателей в методах принудительной деградации были использованы iCIEF, CE (невосстановливающие) и DLS. Результаты были статистически проанализированы методом наименьших квадратов. Результаты показаны в Таблице 23 и на Фиг. 10.

Таблица 22. Скрининг планирования эксперимента по составу для препарата антитела Hu303-005

No.	pH	PS80 мг/мл	Конц. белка мг/мл
1	5,5	0,1	50
2	6,5	0,35	40
3	5,5	0,6	60
4	5,5	0,35	40
5	6	0,35	60
6	6,5	0,6	60
7	6	0,35	50
8	6,5	0,1	50
9	6	0,1	40
10	6	0,1	60
11	6	0,6	40
12	6	0,35	50

Таблица 23. Результаты скрининга планирования эксперимента по составу препарата антитела Hu303-005

No.	состояние	DLS	iCIEF нейтральный пик (%) 中	Невосстановливающий CE-SDS%
		Средний размер частиц нм		
1	D0	НД (нет данных)	58,3	97,60
	25 °C -D13	НД	46,8	97,46
	40 °C -D13	11.5	22,4	96,55
2	D0	НД	57,3	98,47
	25 °C -D13	НД	54,8	96,92
	40 °C -D13	12.2	40,8	96,12
3	D0	НД	57,5	97,54
	25 °C -D13	НД	47,1	97,35
	40 °C -D13	11.6	23,5	96,79
4	D0	НД	56,1	98,46
	25 °C -D13	НД	47,7	97,19
	40 °C -D13	11.7	22,9	96,23
5	D0	НД	59,3	97,82
	25 °C -D13	НД	51,9	97,58
	40 °C -D13	12.0	32,7	96,86

5	6	D0	НД	58,5	97,61
		25 °C -D13	НД	55,3	97,37
		40 °C -D13	13,0	42,6	96,57
10	7	D0	НД	59,1	97,65
		25 °C -D13	НД	51,4	97,51
		40 °C -D13	11,9	32,3	96,69
15	8	D0	НД	57,0	97,43
		25 °C -D13	НД	55,0	97,38
		40 °C -D13	12,5	42,1	95,89
20	9	D0	НД	57,0	97,31
		25 °C -D13	НД	52,8	97,75
		40 °C -D13	11,8	31,4	96,38
25	10	D0	НД	56,4	97,30
		25 °C -D13	НД	50,5	97,56
		40 °C -D13	12,1	32,3	96,88
30	11	D0	НД	57,1	97,07
		25 °C -D13	НД	51,2	97,30
		40 °C -D13	11,9	31,9	96,34
35	12	D0	НД	58,7	97,36
		25 °C -D13	НД	50,7	97,09
		40 °C -D13	12,1	32,3	96,88

Данные, полученные в результате принудительной деградации, были подвергнуты аппроксимации, а данные iCIEF/CE/DLS при 25 °C и 40 °C были хорошо подобраны, и модель была действительной. Результаты были показаны на Фиг. 10.

Результаты показали, что в условиях высоких температур увеличение pH приведет к увеличению размера частиц и нейтрального пика. Изменение скорости iCIEF будет замедлено с понижением температуры. Данные CE были самыми превосходными при pH 6,0. В сочетании с предыдущими экспериментальными результатами (более стабильными при 10 mM His pH 6,0), наиболее предпочтительный pH определяется как 6,0; Данные CE, полученные при 40 °C, показывают, что концентрация белка 45-60 мг/мл является более предпочтительной, следовательно, наиболее предпочтительно, концентрация составляет 50 мг/мл; В сочетании с результатами, показывающими влияние концентраций полисорбата на стабильность белка в различных условиях, и результатами скрининга концентрации полисорбата в других экспериментах (концентрация более 0,2 мг/мл была более предпочтительной), концентрация PS80 установлена на уровне 0,3 мг/мл.; Для жидкой композиции антитела Hu303-005 в этом и других примерах iCIEF показал значительное снижение в условиях высокой температуры, и предполагается, что его готовят в виде лиофилизированной композиции. Чтобы обеспечить хорошую форму и подходящее осмотическое давление лиофилизированного препарата, концентрацию сахарозы устанавливают равной 75 мг/мл.

Пример 19. Лиофилизация препарата антитела к LAG-3.

Лиофилизированный препарат Hu303-005 готовили в 10 mM гистидин-соляной кислоте, pH 5,5 или 6,0, при содержании белка 50 мг/мл, содержащем 75 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл PS80. Процедуры лиофилизации были следующими:

Таблица 24. Лиофилизирующие процедуры

процедуры	Заданная температура °C	Заданное время (мин)	Время разделения	степень вакуума (мБар)
предварительное замораживание		10	60 мин	НД
		50	120 мин	НД
Первичная сушка		120	36 ч	0,1
вторичная сушка		60	5 ч	0,01

Образцы помещали при 4 °C и 25 °C для наблюдения стабильности. Пробы отбирали в различные моменты времени и восстанавливали подходящим количеством воды для инъекций. Результаты показаны в Таблице 25 и Таблице 26. Результаты показали, что не было значительных изменений в различных показателях препарата Hu303-005 во время теста на акселерацию при 25 °C во время длительного хранения при 4 °C для М3, и стабильность была хорошей.

Таблица 25. Результаты стабильности лиофилизированного препарата Hu303-005 при 4 °C					
Серийный номер	Время (М)	Внешний вид восстановительного раствора	Мономер SEC %	Невосстанавливющий CE-SDS %	нейтральный пик iCIEF %
pH 5,5	0	чистый	99,9	98,2	68,5
	3	чистый	99,8	97,5	69,0
pH 6,0	0	чистый	99,9	98,1	69,8
	3	чистый	99,9	97,5	70,1

Таблица 26. Результаты стабильности лиофилизированного препарата Hu303-005 при 25 °C					
Серийный номер	Время (М)	Внешний вид восстановительного раствора	Мономер SEC %	Невосстанавливющий CE-SDS %	нейтральный пик iCIEF %
pH 5,5	0	чистый	99,9	98,2	68,5
	1	чистый	99,8	97,8	68,1
	3	чистый	99,8	97,7	68,1
pH 6,0	0	чистый	99,9	98,1	69,8
	1	чистый	99,8	97,7	69,4
	3	чистый	99,7	97,2	69,4

В то же время была определена стабильность раствора для восстановления лиофилизированного антитела Hu229-013. Композицию антитела к LAG-3 готовили в 10 mM уксусной кислоте-ацетате натрия, pH 5,5, с концентрацией белка 50 мг/мл, содержащей 75 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл полисорбата 80. Антитело помещали в 2 мл флакон, 1,1 мл/флакон, помещали в лиофилизационный бокс и лиофилизировали. Сравнение было сделано на образцах до и после лиофилизации, чтобы наблюдать стабильность. Результаты показали, что не было никаких изменений в качестве антитела Hu229-013 до и после лиофилизации, и лиофилизированная композиция имела хорошую стабильность при хранении.

Пример 20. Оптимизация параметров в процессе лиофилизации

Получали композицию, содержащую 50 мг/мл антитела Hu303-005, 10 mM гистидин-соляную кислоты, pH 6,0, 75 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл PS80 и лиофилизировали.

Температура, при которой произошел коллапс Hu303-005, составляла примерно -19 °C, что измеряли с помощью лиофилизированного микроскопа. Температура для первичной сушки является важным параметром процесса лиофилизации. Поэтому температура шельфа в процессе первичной сушки была тщательно оптимизирована. Параметры лиофилизации показаны в Таблице 27. Результаты показаны в Таблице 28. Внешний вид лиофилизированного порошка при каждой температуре удовлетворяет требованиям. Тем не менее, несколько частиц появились в появлении после восстановления при -5 °C. Следовательно, температура полки для первичной сушки была установлена равной -10 °C.

Таблица 27. Параметры сублимационной сушки для скрининга температуры полки при первичной сушке				
Элемент скрининга	Температура для первичной сушки			
параметр	Заданная температура	Заданное время	Время раздела	Степень вакуума
Предварительное замораживание		10 мин	60 мин	НД

		50 мин	120 мин	НД
Первичная сушка	1	120 мин	От 1000 до 3000 мин	0,10 мбар
	2			
	3			
Вторичная сушка		60 min	От 300 до 540 min	0,01 mbar

5

Таблица 28. Сравнение внешнего вида до и после восстановления лиофилизированных образцов, полученных различными способами

группа	Температура для первичной сушки	Внешний вид лиофилизированного порошка	Внешний вид после восстановления
1		Белый порошок, полный внешний вид, без коллапса	чистый
2		Белый порошок, полный внешний вид, без коллапса	чистый
3		Белый порошок, полный внешний вид, без коллапса	несколько частиц

Конечный процесс лиофилизации был следующим:

15

Таблица 29. Процесс лиофилизации

20

	Заданная температура	Заданное время (мин)	Время раздела (мин)	Степень вакуума (мБар)
Предварительное замораживание		10	60	НД
		50	120	НД
Первичная сушка		120	2000*	0.10
Вторичная сушка		60	300*	0.01

* Время первичной и вторичной сушки зависит от конкретной партии и теста на повышение давления.

Пример 21. Другие альтернативные препараты

Настоящее изобретение также относится к следующим стабильным фармацевтическим препаратам, содержащим любой, выбранный из группы, состоящей из:

25

- (1) 90 мг/мл антитела к LAG-3 Hu229-013, 80 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл полисорбата 80, 15 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, pH 5,5;
- (2) 90 мг/мл антитела к LAG-3 Hu229-013, 80 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл полисорбата 80, 15 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, pH 6,5;
- (3) 90 мг/мл антитела к LAG-3 Hu229-013, 50 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл полисорбата 80, 25 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, pH 5,5;
- (4) 70 мг/мл антитела к LAG-3 Hu229-013, 50 мг/мл сахарозы, 0,3 мг/мл полисорбата 80, 10 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, pH 5,5;
- (5) 70 мг/мл антитела к LAG-3 Hu229-013, 80 мг/мл сахарозы, 0,3 мг/мл полисорбата 80, 15 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, pH 5,2;
- (6) 40 мг/мл антитела к LAG-3 Hu229-013, 75 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл полисорбата 80, 10 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, pH 6,0;
- (7) 55 мг/мл антитела к LAG-3 Hu229-013, 75 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл полисорбата 80, 10 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, pH 5,7;
- (8) 30 мг/мл антитела к LAG-3 Hu229-013, 70 мг/мл сахарозы, 0,5 мг/мл полисорбата 80, 10 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, pH 5,5;
- (9) 20 мг/мл антитела к LAG-3 Hu229-013, 70 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 10 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, pH 5,4;
- (10) 15 мг/мл антитела к LAG-3 Hu229-013, 85 мг/мл сахарозы, 0,1 мг/мл полисорбата 80, 25 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, pH 5,6;
- (11) 50 мг/мл антитела к LAG-3 Hu229-013, 85 мг/мл сахарозы, 0,3 мг/мл полисорбата 80, 25 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, pH 5,8;
- (12) 50 мг/мл антитела к LAG-3 Hu229-013, 75 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл полисорбата 80, 25 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, pH 6,0;

40

45

- (13) 55 мг/мл антитела к LAG-3 Hu229-013, 90 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл полисорбата 80, 10 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, pH 5,3;
- (14) 50 мг/мл антитела к LAG-3 Hu229-013, 90 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл полисорбата 80, 10 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, pH 5,0;
- 5 (15) 90 мг/мл антитела к LAG-3 Hu303-005, 75 мг/мл сахарозы, 0,3 мг/мл полисорбата 80, 30 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты, pH 6,0;
- (16) 90 мг/мл антитела к LAG-3 Hu303-005, 75 мг/мл сахарозы, 0,3 мг/мл полисорбата 80, 30 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты, pH 5,5;
- (17) 75 мг/мл антитела к LAG-3 Hu303-005, 75 мг/мл сахарозы, 0,3 мг/мл полисорбата 10 80, 30 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты, pH 5,0;
- (18) 1 мг/мл антитела к LAG-3 Hu303-005, 75 мг/мл сахарозы, 0,3 мг/мл полисорбата 80, 5 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты, pH 6,0;
- (19) 70 мг/мл антитела к LAG-3 Hu303-005, 30 мг/мл сахарозы, 0,3 мг/мл полисорбата 80, 5 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты, pH 6,0;
- 15 (20) 50 мг/мл антитела к LAG-3 Hu303-005, 60 мг/мл трегалозы, 0,3 мг/мл полисорбата 80, 10 мМ буфера гистидина и соляной кислоты, pH 6,0;
- (21) 50 мг/мл антитела к LAG-3 Hu303-005, 90 мг/мл трегалозы, 0,3 мг/мл полисорбата 80, 10 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты, pH 6,0.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- 20 <110> ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ МЕДСИН КО., ЛТД.; ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ ФАРМАСЮТИКАЛ КО., ЛТД.
- <120> ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ АНТИТЕЛО К LAG-3, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ
- <160> 43
- 25 <170> SIPOSequenceListing 1.0
- <210> 1
- <211> 442
- <212> БЕЛОК
- <213> Искусственная последовательность
- 30 <220>
- <221> Пептид
- <223> Внеклеточный домен LAG-3 с меткой Flag: LAG-3-Flag
- <400> 1
- Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
 35 1 5 10 15
- Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
 20 25 30
- Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
 35 40 45
- 40 Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
 50 55 60
- His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
 65 70 75 80
- Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
 45 85 90 95
- Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
 100 105 110
- Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln

	115	120	125
	Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala		
	130	135	140
	Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys		
5	145	150	155
	Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro		
	165	170	175
	Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser		
	180	185	190
10	Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln		
	195	200	205
	Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser		
	210	215	220
	Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly		
15	225	230	235
	Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn		
	245	250	255
	Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala		
	260	265	270
20	Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val		
	275	280	285
	Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly		
	290	295	300
	Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu		
25	305	310	315
	Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His		
	325	330	335
	Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr		
	340	345	350
30	Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu		
	355	360	365
	Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser		
	370	375	380
	Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala		
35	385	390	395
	Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln		
	405	410	415
	Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser		
	420	425	430
40	Pro Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys		
	435	440	
	<210> 2		
	<211> 525		
	<212> БЕЛОК		
45	<213> Homo sapiens		
	<220>		
	<221> Пептид		
	<223> Полноразмерный LAG3		

<400> 2
 Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
 1 5 10 15
 Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
 5 20 25 30
 Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
 35 40 45
 Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
 50 55 60
 10 His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
 65 70 75 80
 Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
 85 90 95
 Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
 15 100 105 110
 Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
 115 120 125
 Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
 130 135 140
 20 Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
 145 150 155 160
 Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
 165 170 175
 Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
 25 180 185 190
 Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
 195 200 205
 Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
 210 215 220
 30 Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
 225 230 235 240
 Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
 245 250 255
 Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
 35 260 265 270
 Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val
 275 280 285
 Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 40 Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
 305 310 315 320
 Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His
 325 330 335
 Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr
 45 340 345 350
 Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu
 355 360 365
 Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser

RU 2771384 C2

	370	375	380
	Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala		
385	390	395	400
	Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln		
5	405	410	415
	Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser		
	420	425	430
	Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly		
	435	440	445
10	His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu		
	450	455	460
	Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro		
465	470	475	480
	Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln		
15	485	490	495
	Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro		
	500	505	510
	Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu		
	515	520	525
20	<210> 3		
	<211> 675		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
25	<221> Пептид		
	<223> Слитый белок внеклеточной области LAG-3 и Fc hIgG1		
	<400> 3		
	Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp		
1	1	5	10
			15
30	Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val		
	20	25	30
	Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile		
	35	40	45
	Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln		
35	50	55	60
	His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu		
	65	70	75
			80
	Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro		
	85	90	95
40	Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly		
	100	105	110
	Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln		
	115	120	125
	Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala		
45	130	135	140
	Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys		
	145	150	155
	Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro		

	165	170	175
	Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser		
	180	185	190
5	Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln		
	195	200	205
	Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser		
	210	215	220
	Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly		
	225	230	235
10	240		
	Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn		
	245	250	255
	Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala		
	260	265	270
15	Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val		
	275	280	285
	Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly		
	290	295	300
	Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu		
	305	310	315
20	320		
	Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His		
	325	330	335
	Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr		
	340	345	350
	Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu		
25	355	360	365
	Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser		
	370	375	380
	Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala		
	385	390	395
30	400		
	Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln		
	405	410	415
	Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser		
	420	425	430
	Pro Gly Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Ser Gly Glu Pro Lys Ser		
35	435	440	445
	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
	450	455	460
	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
	465	470	475
40	480		
	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
	485	490	495
	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
	500	505	510
	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
45	515	520	525
	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
	530	535	540
	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		

545	550	555	560
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
565	570	575	
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val			
5	580	585	590
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
595	600	605	
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
610	615	620	
10 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
625	630	635	640
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
645	650	655	
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
15 660	665	670	
Ser Pro Gly			
675			
<210> 4			
<211> 677			
20 <212> БЕЛОК			
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<221> Пептид			
<223> Слитый белок внеклеточной области LAG-3 и Fc mIgG2a			
25 <400> 4			
Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp			
1 5 10 15			
Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val			
20 25 30			
30 Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile			
35 40 45			
Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln			
50 55 60			
His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu			
35 65 70 75 80			
Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro			
85 90 95			
Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly			
100 105 110			
40 Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln			
115 120 125			
Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala			
130 135 140			
Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys			
45 145 150 155 160			
Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro			
165 170 175			
Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser			

	180	185	190
	Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln		
	195	200	205
	Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser		
5	210	215	220
	Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly		
	225	230	235
	Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn		
	245	250	255
10	Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala		
	260	265	270
	Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val		
	275	280	285
	Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly		
15	290	295	300
	Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu		
	305	310	315
	Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His		
	325	330	335
20	Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr		
	340	345	350
	Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu		
	355	360	365
	Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser		
25	370	375	380
	Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala		
	385	390	395
	Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln		
	405	410	415
30	Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser		
	420	425	430
	Pro Gly Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Ser Gly Glu Pro Arg Gly		
	435	440	445
	Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu		
35	450	455	460
	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val		
	465	470	475
	Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
	485	490	495
40	Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val		
	500	505	510
	Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser		
	515	520	525
	Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met		
45	530	535	540
	Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala		
	545	550	555
	Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro		

	565	570	575
5	Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln		
	580	585	590
	Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr		
10	595	600	605
	Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr		
	610	615	620
	Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu		
	625	630	635
15	Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser		
	645	650	655
	Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser		
	660	665	670
	Arg Thr Pro Gly Lys		
20	675		
	<210> 5		
	<211> 124		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Mus musculus		
25	<220>		
	<221> Домен		
	<223> mAb229-VH		
	<400> 5		
	Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu		
30	1	5	10
	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ser		
	20	25	30
	Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met		
	35	40	45
35	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val 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 Tyr		
	65	70	75
	Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys		
40	85	90	95
	Ala Arg Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Asp Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp		
	100	105	110
	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
45	<210> 6		
	<211> 107		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Mus musculus		
	<220>		
	<221> Домен		
	<223> mAb229-VL		
	<400> 6		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly		

RU 2771384 C2

1	5	10	15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn			
20	25	30	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val			
5	35	40	45
Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser			
65	70	75	80
10	Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp		
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	
<210> 7			
15	<211> 120		
<212> БЕЛОК			
<213> Mus musculus			
<220>			
<221> Домен			
20	<223> mAb303-VH		
<400> 7			
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr			
25	20	25	30
Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe			
	50	55	60
30	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr		
	65	70	75
Met Glu Ile Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Thr Arg Asp Asp Gly Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr			
35	100	105	110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210> 8			
<211> 107			
40	<212> БЕЛОК		
<213> Mus musculus			
<220>			
<221> Домен			
<223> mAb303-VL			
45	<400> 8		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Val Ile Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Arg			

	20	25	30
Leu Asn Trp Leu Gln Gln Gly Pro Asp Gly Thr Phe Lys Arg Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly			
5 50	55	60	
Ser Arg Ser Gly Ser Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Ala Ser Ser Pro Pro			
85	90	95	
10 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	
<210> 9			
<211> 5			
<212> БЕЛОК			
15 <213> Mus musculus			
<220>			
<221> Домен			
<223> mAb229 HCDR1			
<400> 9			
20 Thr Ser Gly Met Ser			
1 5			
<210> 10			
<211> 17			
<212> БЕЛОК			
25 <213> Mus musculus			
<220>			
<221> Домен			
<223> mAb229 HCDR2			
<400> 10			
30 Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys			
1 5 10 15			
Gly			
<210> 11			
<211> 15			
35 <212> БЕЛОК			
<213> Mus musculus			
<220>			
<221> Домен			
<223> mAb229 HCDR3			
40 <400> 11			
Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Asp Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr			
1 5 10 15			
<210> 12			
<211> 5			
45 <212> БЕЛОК			
<213> Mus musculus			
<220>			
<221> Домен			

<223> mAb303 HCDR1
 <400> 12
 Asp Tyr Tyr Met Asn
 1 5
 5 <210> 13
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus
 <220>
 10 <221> Домен
 <223> mAb303 HCDR2
 <400> 13
 Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 15 Gly
 <210> 14
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus
 20 <220>
 <221> Домен
 <223> mAb303 HCD3
 <400> 14
 Asp Asp Gly Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Val
 25 1 5 10
 <210> 15
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus
 30 <220>
 <221> Домен
 <223> mAb229 LCDR1
 <400> 15
 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
 35 1 5 10
 <210> 16
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus
 40 <220>
 <221> Домен
 <223> mAb229 LCDR2
 <400> 16
 Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
 45 1 5
 <210> 17
 <211> 9
 <212> БЕЛОК

<213> Mus musculus
 <220>
 <221> Домен
 <223> mAb229 LCDR3
 5 <400> 17
 Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 18
 <211> 11
 10 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> Домен
 <223> mAb303 LCDR1
 15 <400> 18
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Arg Leu Asn
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 7
 20 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> Домен
 <223> mAb303 LCDR2
 25 <400> 19
 Ala Thr Ser Thr Leu Asp Ser
 1 5
 <210> 20
 <211> 9
 30 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> Домен
 <223> mAb303 LCDR3
 35 <400> 20
 Leu Gln Leu Ala Ser Ser Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 21
 <211> 124
 40 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> Домен
 <223> Hu229VH.1
 45 <400> 21
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ser

	20	25	30
5	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
	35	40	45
	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr		
	65	70	75
	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
10	Ala Arg Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Asp Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp		
	100	105	110
	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
15	<210> 22		
	<211> 107		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<221> Домен		
20	<223> Hu229VL.1		
	<400> 22		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1	5	10
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn		
25	20	25	30
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
	35	40	45
	Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60
30	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
	65	70	75
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp		
	85	90	95
	Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
35	100	105	
	<210> 23		
	<211> 124		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
40	<220>		
	<221> Домен		
	<223> Hu229VH.1A		
	<400> 23		
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala		
45	1	5	10
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ser		
	20	25	30
	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met		

	35	40	45
	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr		
5	65	70	75
	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Ala Arg Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Asp Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp		
	100	105	110
10	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
	<210> 24		
	<211> 124		
	<212> БЕЛОК		
15	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<221> Домен		
	<223> Hu229VH.1B		
	<400> 24		
20	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala		
	1	5	10
	15		
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ser		
	20	25	30
	Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met		
25	35	40	45
	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr		
	65	70	75
	80		
30	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Ala Arg Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Asp Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp		
	100	105	110
	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
35	115	120	
	<210> 25		
	<211> 124		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
40	<220>		
	<221> Домен		
	<223> Hu229VH.1C		
	<400> 25		
45	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala		
	1	5	10
	15		
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ser		
	20	25	30
	Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met		

	35	40	45
	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr		
5	65	70	75
	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys		80
	85	90	95
	Ala Arg Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Asp Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp		
	100	105	110
10	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
	<210> 26		
	<211> 107		
	<212> БЕЛОК		
15	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<221> Домен		
	<223> Hu229VL.1A		
	<400> 26		
20	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 Glu Asn Ile Tyr Ser Asn		
	20	25	30
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val		
25	35	40	45
	Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
	65	70	75
			80
30	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp		
	85	90	95
	Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100	105	
	<210> 27		
35	<211> 107		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<221> Домен		
40	<223> Hu229VL.1B		
	<400> 27		
	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 Glu Asn Ile Tyr Ser Asn		
45	20	25	30
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val		
	35	40	45
	Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		

50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp			
5	85	90	
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	
<210> 28			
<211> 107			
10	<212> БЕЛОК		
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<221> Домен			
<223> Hu229VL.1C			
15	<400> 28		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn			
	20	25	
		30	
20	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val		
	35	40	
Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
25	70	75	
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp			
	85	90	
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	
30	<210> 29		
<211> 120			
<212> БЕЛОК			
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
35	<221> Домен		
<223> Hu303_VH.1			
<400> 29			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	
1			15
40	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
	20	25	
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met			
	35	40	
Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe			
45	50	55	
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr			
	65	70	
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
		75	
		80	

	85	90	95
	Ala Arg Asp Asp Gly Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln		
	100	105	110
	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
5	115	120	
	<210> 30		
	<211> 107		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
10	<220>		
	<221> Домен		
	<223> Hu303_VL.1		
	<400> 30		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
15	1	5	10
			15
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Arg		
	20	25	30
	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
	35	40	45
20	Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Asp 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 Leu Gln Leu Ala Ser Ser Pro Pro		
25	85	90	95
	Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100	105	
	<210> 31		
	<211> 120		
30	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<221> Домен		
	<223> Hu303_VH.1A		
35	<400> 31		
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
	1	5	10
			15
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
	20	25	30
40	Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met		
	35	40	45
	Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr		
45	65	70	75
			80
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Thr Arg Asp Asp Gly Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln		

	100	105	110	
	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115	120		
	<210> 32			
5	<211> 120			
	<212> БЕЛОК			
	<213> Искусственная последовательность			
	<220>			
	<221> Домен			
10	<223> Hu303_VH.1B			
	<400> 32			
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
	1	5	10	15
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr			
15	20	25	30	
	Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met			
	35	40	45	
	Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe			
	50	55	60	
20	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr			
	65	70	75	80
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95	
	Thr Arg Asp Asp Gly Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln			
25	100	105	110	
	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115	120		
	<210> 33			
	<211> 120			
30	<212> БЕЛОК			
	<213> Искусственная последовательность			
	<220>			
	<221> Домен			
	<223> Hu303_VH.1C			
35	<400> 33			
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
	1	5	10	15
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr			
	20	25	30	
40	Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45	
	Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe			
	50	55	60	
	Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr			
45	65	70	75	80
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95	
	Thr Arg Asp Asp Gly Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln			

	100	105	110
	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
5	<210> 34		
	<211> 107		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<221> Домен		
10	<223> Hu303_VL.1A		
	<400> 34		
	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 Asp Ile Gly Ser Arg		
15	20 25 30		
	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile		
	35 40 45		
	Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50 55 60		
20	Ser Arg 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 Leu Gln Leu Ala Ser Ser Pro Pro		
	85 90 95		
	Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
25	100 105		
	<210> 35		
	<211> 107		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
30	<220>		
	<221> Домен		
	<223> Hu303_VL.1B		
	<400> 35		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
35	1 5 10 15		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Arg		
	20 25 30		
	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile		
	35 40 45		
40	Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly		
	50 55 60		
	Ser Arg 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 Leu Gln Leu Ala Ser Ser Pro Pro		
45	85 90 95		
	Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100 105		
	<210> 36		

<211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <221> Домен
 <223> Hu303_VL.1C
 <400> 36
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 10 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Arg
 20 25 30
 Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Phe Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
 15 50 55 60
 Ser Arg 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 Leu Gln Leu Ala Ser Ser Pro Pro
 85 90 95
 20 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 37
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> Домен
 <223> Hu303_VL.1D
 <400> 37
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 30 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Arg
 20 25 30
 Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Phe Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 40 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Ala Ser Ser Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 38
 45 <211> 327
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<221> Домен
 <223> Константная область тяжелой цепи, мутация S228P
 <400> 38

	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg	
5	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	
10	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	
15	85 90 95	
	Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro 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	
20	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	
25	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	
30	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu	
	210 215 220	
	Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
	225 230 235 240	
	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys	
35	245 250 255	
	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
	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	
40	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 Lys	
45	325	
	<210> 39	
	<211> 107	
	<212> БЕЛОК	

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> Домен
 <223> константная область легкой цепи каппа
 5 <400> 39
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 10 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 15 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105
 20 <210> 40
 <211> 451
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <221> ЦЕЛЬ
 <223> аминокислотная последовательность тяжелой цепи
 Hu229-013
 <400> 40
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 30 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 35 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 40 85 90 95
 Ala Arg Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Asp Val Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 45 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 130 135 140
 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160

1	5	10	15													
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Asn	
				20					25						30	
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Val	
				35			40					45				
Tyr	Ala	Ala	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
				50			55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
				65			70			75			80			
10	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp	Ile	Thr	Pro	Trp
				85				90					95			
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
				100			105					110				
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
				115			120					125				
15	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
				130			135					140				
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
				145			150			155			160			
20	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165				170					175			
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
				180			185					190				
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	
				195			200					205				
25	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
				210												
<210>	42															
<211>	447															
30	<212>	БЕЛОК														
<213>	Искусственная	последовательность														
<220>																
<221>	ЦЕПЬ															
<223>	аминокислотная	последовательность тяжелой цепи														
35	Hu303-005															
<400>	42															
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5				10					15			
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	
				20				25					30			
40	Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Met
				35				40					45			
Gly	Val	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Gly	Asp	Thr	Ala	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
				50			55					60				
45	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
				65			70			75			80			
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85				90					95			

Ala Arg Asp Asp Gly Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

5 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 10 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205

15 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

25 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 30 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

35 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 40 405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

45 <210> 43
 <211> 214
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> ЦЕПЬ
 <223> аминокислотная последовательность легкой цепи
 Hu303-005

5 <400> 43
 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 Asp Ile Gly Ser Arg
 20 25 30
 10 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 15 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Ala Ser Ser Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 20 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 25 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 30 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

35 (57) Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, содержащая:

от 1 до 90 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента и от 5 до 30 мМ буфера,

40 где буфер выбран из группы, состоящей из ацетатного буфера, гистидинового буфера, цитратного буфера, сукцинатного буфера и трис-буфера;

антитело к LAG-3 или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где:

(i) вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит HCDR1 (HCDR -

45 определяющая комплементарность область тяжелой цепи), как представлено в SEQ ID NO: 12, HCDR2, как представлено в SEQ ID NO: 13, и HCDR3, как представлено в SEQ ID NO: 14; и вариабельная область легкой цепи антитела содержит LCDR1 (LCDR - определяющая комплементарность область легкой цепи), как представлено в SEQ ID

NO: 18, LCDR2, как представлено в SEQ ID NO: 19, и LCDR3, как представлено в SEQ ID NO: 20; или

(ii) вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит HCDR1, как представлено в SEQ ID NO: 9, HCDR2, как представлено в SEQ ID NO: 10, и HCDR3, как представлено в SEQ ID NO: 11; и вариабельная область легкой цепи антитела содержит LCDR1, как представлено в SEQ ID NO: 15, LCDR2, как представлено в SEQ ID NO: 16, и LCDR3, как представлено в SEQ ID NO: 17;

где LAG-3 представляет собой ген активации лимфоцитов-3.

2. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного

с LAG-3, по п. 1, где ацетатный буфер выбран из буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия; где гистидиновый буфер выбран из группы, состоящей из буфера из гистидина и соляной кислоты и буфера из гистидина и уксусной кислоты; где цитратный буфер представляет собой буфер из лимонной кислоты и цитрата натрия; где сукцинатный буфер представляет собой буфер из янтарной кислоты и сукцината натрия;

15 предпочтительно буфер представляет собой буфер из гистидина и соляной кислоты или буфер из уксусной кислоты и ацетата натрия.

3. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, по п. 1 или 2, где концентрация антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента составляет от 40 до 80 мг/мл, предпочтительно от 40 до 60 мг/мл, более

20 предпочтительно 50 мг/мл.

4. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, по любому из пп. 1-3, где буфер имеет pH от примерно 5,0 до 6,5, предпочтительно от примерно 5,0 до 6,0.

5. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного

25 с LAG-3, по любому из пп. 1-4, где концентрация буфера составляет от 10 до 30 мМ, предпочтительно от 10 до 20 мМ.

6. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, по любому из пп. 1-5, дополнительно включающая адьювант, где адьювант представляет собой один или несколько элементов, выбранных из группы, состоящей из сахарида и поверхностно-активного вещества.

7. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, по п. 6, где сахарид представляет собой дисахарид, предпочтительно трегалозу, сахарозу, маннит или сорбит, более предпочтительно сахарозу.

8. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного

35 с LAG-3, по п. 7, где концентрация сахарозы составляет от 30 до 90 мг/мл, предпочтительно от 60 до 90 мг/мл, более предпочтительно 75 мг/мл.

9. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, по п. 6, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, где полисорбат выбран из группы, состоящей из полисорбата 80 и полисорбата 20,

40 предпочтительно представляет собой полисорбат 80.

10. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, по п. 9, где концентрация поверхностно-активного вещества составляет от 0,02 до 0,8 мг/мл, предпочтительно от 0,2 до 0,6 мг/мл, более предпочтительно от 0,3 до 0,5 мг/мл.

45 11. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, по любому из пп. 1-10, которая содержит компоненты, приведенные в следующих пунктах i) или ii):

i) (a) от 1 до 90 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента,

(b) от 5 до 30 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH примерно от 5,0 до 6,5, (c) от 30 до 90 мг/мл сахарозы и (d) от 0,02 до 0,8 мг/мл полисорбата 80; или

ii) (a) от 1 до 90 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента,

(b) от 5 до 30 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с pH примерно от 5,0 до 6,5,

5 (c) от 30 до 90 мг/мл сахарозы или трегалозы и (d) от 0,05 до 0,6 мг/мл полисорбата 80, предпочтительно, фармацевтическая композиция содержит:

(e) от 40 до 80 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента,

(f) от 10 до 30 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH примерно от 5,2 до 5,8, (g) от 70 до 80 мг/мл сахарозы и (h) от 0,4 до 0,5 мг/мл полисорбата 80; или

10 фармацевтическая композиция содержит:

(e) от 45 до 60 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента,

(f) от 10 до 30 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с pH примерно от 5,5 до 6,0,

(g) от 60 до 90 мг/мл сахарозы или трегалозы и (h) от 0,2 до 0,6 мг/мл полисорбата 80.

12. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного

15 с LAG-3, по любому из пп. 1-11, где антитело к LAG-3 представляет собой

гуманизированное антитело к LAG-3, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи представлена в любой из SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25; и

20 где аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи

представлена в любой из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28.

13. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, по п. 12, содержащая:

25 (a) от 1 до 90 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (b)

от 5 до 30 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата с pH примерно от 5,0 до 6,5, (c) от 30 до 90 мг/мл сахарозы и (d) от 0,02 до 0,8 мг/мл полисорбата 80;

предпочтительно, фармацевтическая композиция содержит:

(e) от 40 до 80 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента,

30 (f) от 10 до 30 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH примерно от 5,2 до 5,8, (g) от 70 до 80 мг/мл сахарозы и (h) от 0,4 до 0,5 мг/мл полисорбата 80;

более предпочтительно, фармацевтическая композиция содержит:

(i) примерно 50 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента,

(j) 10 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH примерно 5,5, (k) примерно

35 75 мг/мл сахарозы и (l) примерно 0,4 мг/мл полисорбата 80.

14. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного

с LAG-3, по п. 13, где гуманизированное антитело к LAG3 содержит комбинацию вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, как показано ниже:

40 1) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 21 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 22;

2) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 21 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 26;

3) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 21 и вариабельная область легкой

45 цепи SEQ ID NO: 27;

4) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 21 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 28;

5) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 и вариабельная область легкой

цепи SEQ ID NO: 22;

6) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 26;

7) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 и вариабельная область легкой

5 цепи SEQ ID NO: 27;

8) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 28;

9) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 24 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 22;

10 10) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 24 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 26;

11) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 24 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 27;

12) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 24 и вариабельная область легкой

15 цепи SEQ ID NO: 28;

13) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 25 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 22;

14) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 25 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 26;

20 15) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 25 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 27; и

16) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 25 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 28.

15. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного

25 с LAG-3, по любому из пп. 12-14, где гуманизированное антитело к LAG-3 содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, где константная область тяжелой цепи предпочтительно представлена в SEQ ID NO: 38; где константная область легкой цепи предпочтительно представлена в SEQ ID NO: 39.

16. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного

30 с LAG-3, по п. 15, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи гуманизированного антитела к LAG-3 представлена в SEQ ID NO: 40, и аминокислотная последовательность легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 41.

17. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, по любому из пп. 1-11, где антитело к LAG-3 представляет собой

35 гуманизированное антитело к LAG-3, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи представлена в любой из SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 33, и

где аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи

40 представлена в любой из SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37.

18. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, по п. 17, содержащая:

(а) от 1 до 90 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (б)

45 от 5 до 30 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с pH примерно от 5,0 до 6,5, (с) от 30 до 90 мг/мл сахарозы или трегалозы и (д) от 0,05 до 0,6 мг/мл полисорбата 80; предпочтительно, фармацевтическая композиция содержит:

(е) от 45 до 60 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента,

(f) от примерно 10 до 30 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с рН примерно от 5,5 до 6,0, (g) от 60 до 90 мг/мл сахарозы или трегалозы и (h) от 0,2 до 0,6 мг/мл полисорбата 80;

более предпочтительно, фармацевтическая композиция содержит:

- 5 (i) примерно 50 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (j) 10 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с рН примерно 6,0, (k) примерно 75 мг/мл сахарозы, (l) примерно 0,3 мг/мл полисорбата 80.

- 10 19. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, по п. 18, где гуманизированное антитело к LAG3 содержит комбинацию вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, как показано ниже:

- 15 1) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 30;
- 2) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 34;
- 3) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 35;
- 4) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 36;
- 20 5) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 37;
- 6) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 31 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 30;
- 7) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 31 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 34;
- 25 8) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 31 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 35;
- 9) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 31 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 36;
- 30 10) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 31 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 37;
- 11) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 32 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 30;
- 35 12) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 32 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 34;
- 13) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 32 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 35;
- 14) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 32 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 36;
- 40 15) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 32 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 37;
- 16) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 30;
- 45 17) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 34;
- 18) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 35;
- 19) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 и вариабельная область легкой

цепи SEQ ID NO: 36; и

20) вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 и вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 37.

20. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного

5 с LAG-3, по любому из пп. 17-19, где гуманизированное антитело к LAG-3 содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, где константная область тяжелой цепи предпочтительно представлена в SEQ ID NO: 38; и константная область легкой цепи предпочтительно представлена в SEQ ID NO: 39.

21. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, связанного

10 с LAG-3, по п. 20, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи гуманизированного антитела к LAG-3 представлена в SEQ ID NO: 42, и аминокислотная последовательность легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 43.

22. Способ получения фармацевтической композиции по любому из пп. 1-21,

включающий смешивание антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента 15 с буфером, где буфер выбран из группы, состоящей из буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия, буфера из гистидина и соляной кислоты, буфера из лимонной кислоты и цитрата натрия, буфера из янтарной кислоты и сукцината натрия и три-буфера, предпочтительно представляет собой буфер из уксусной кислоты и ацетата натрия или буфер из гистидина и соляной кислоты.

20 23. Способ получения лиофилизированного препарата, содержащего антитело к LAG-3 или его антиген-связывающий фрагмент, включающий этап лиофилизации фармацевтической композиции по любому из пп. 1-21.

24. Способ получения лиофилизированного препарата, содержащего антитело к LAG-3 или его антиген-связывающий фрагмент, по п. 23, где лиофилизация включает 25 в себя последовательные этапы предварительного замораживания, первичной сушки и вторичной сушки.

25. Способ получения лиофилизированного препарата, содержащего антитело к LAG-3 или его антиген-связывающий фрагмент, по п. 24, где первичную сушку проводят при температуре от -5 до -20 °C, предпочтительно -10 °C.

30 26. Лиофилизированный препарат для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, содержащий антитело к LAG-3 или его антиген-связывающий фрагмент, полученный способом по любому из пп. 23-25.

27. Лиофилизированный препарат для лечения заболевания или состояния, связанного 35 с LAG-3, содержащий антитело к LAG3 или его антиген-связывающий фрагмент, характеризующийся тем, что лиофилизированный препарат может быть восстановлен для получения фармацевтической композиции по любому из пп. 1-21.

28. Способ получения восстановленного раствора, содержащего антитело к LAG-3 или его антиген-связывающий фрагмент, включающий этап восстановления лиофилизированного препарата по п. 26 или 27, где растворителем для восстановления 40 предпочтительно является вода для инъекций.

29. Восстановленный раствор для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, содержащий антитело к LAG-3 или его антиген-связывающий фрагмент, полученный способом по п. 28.

30. Восстановленный раствор для лечения заболевания или состояния, связанного 45 с LAG-3, по п. 29, содержащий следующие компоненты:

i) (а) от 40 до 80 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (б) от 10 до 30 мМ буфера из уксусной кислоты и ацетата натрия с pH примерно от 5,2 до 5,8, (с) от 70 до 80 мг/мл сахарозы и (д) от 0,4 до 0,5 мг/мл полисорбата 80; или

ii) (a) от 45 до 60 мг/мл антитела к LAG-3 или его антиген-связывающего фрагмента, (b) от 10 до 30 мМ буфера из гистидина и соляной кислоты с pH примерно от 5,5 до 6,0, (c) от 60 до 90 мг/мл сахарозы или трегалозы и (d) от 0,2 до 0,6 мг/мл полисорбата 80.

31. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-21 или лиофилизированный

5 препарат по п. 26 или 27 или восстановленный раствор по п. 29 или 30 в качестве лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3.

32. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 1-21 или лиофилизированного препарата по п. 26 или 27 или восстановленного раствора по п. 29 или 30 для получения лекарственного средства для лечения заболевания или

10 состояния, связанного с LAG-3, где заболевание или состояние представляет собой заболевание или состояние, в которое вовлечены патогенные Т-клетки, предпочтительно представляет собой рак; рак выбран из группы, состоящей из рака яичников, меланомы, рака предстательной железы, рака кишечника, рака желудка, рака пищевода, рака молочной железы, рака легких, рака почки, рака поджелудочной железы, рака матки, 15 рака печени, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака полости рта, рака мозга, рака яичка, рака кожи, рака щитовидной железы и гематологических злокачественных новообразований, включая миелому, хронический и острый лейкоз.

33. Способ лечения и профилактики заболевания или состояния, связанного с LAG-3, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного

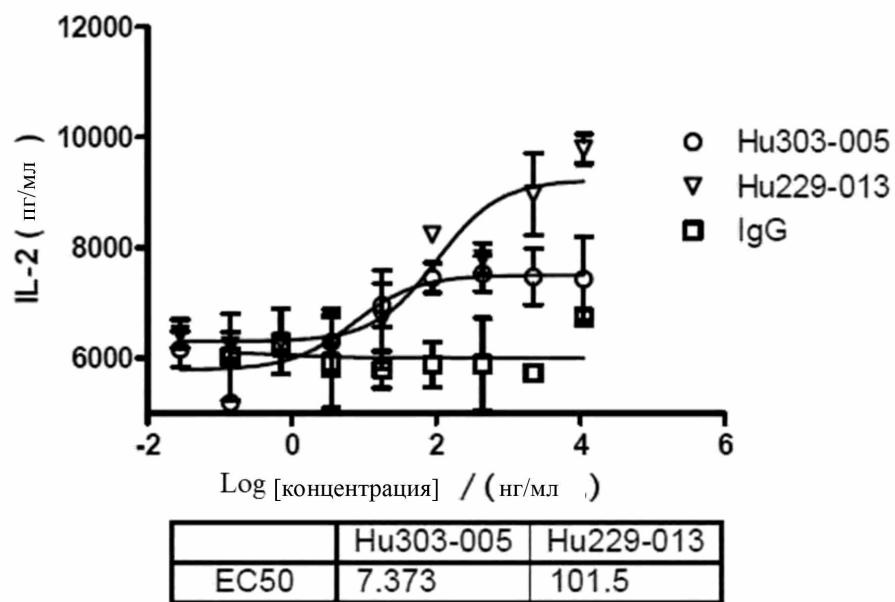
20 количества фармацевтической композиции по любому из пп. 1-21 или лиофилизированного препарата по п. 26 или 27 или восстановленного раствора по п. 29 или 30, где заболевание или состояние представляет собой заболевание или состояние, в которое вовлечены патогенные Т-клетки, предпочтительно представляет собой рак; рак выбран из группы, состоящей из рака яичников, меланомы, рака предстательной 25 железы, рака кишечника, рака желудка, рака пищевода, рака молочной железы, рака легких, рака почки, рака поджелудочной железы, рака матки, рака печени, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака полости рта, рака мозга, рака яичка, рака кожи, рака щитовидной железы и гематологических злокачественных новообразований, включая миелому, хронический и острый лейкоз.

30 34. Набор для лечения заболевания или состояния, связанного с LAG-3, включающий контейнер, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп. 1-21, или лиофилизированный препарат по п. 26 или 27, или восстановленный раствор по п. 29 или 30.

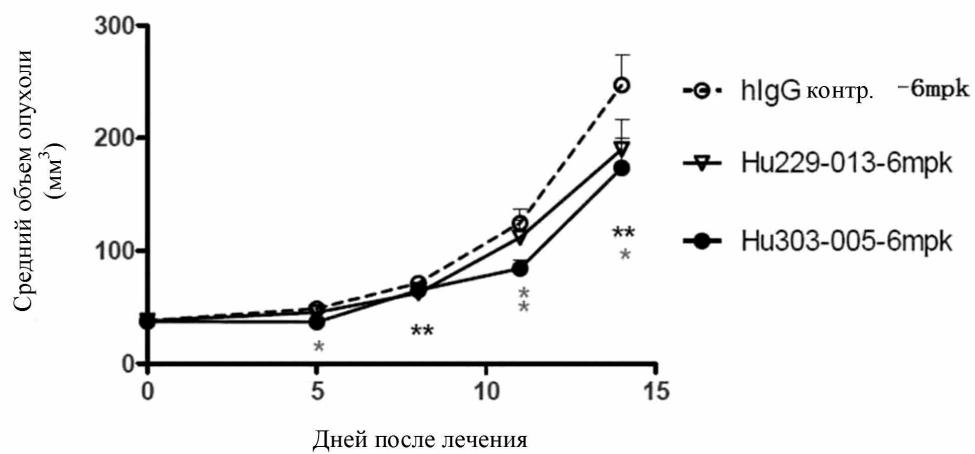
35

40

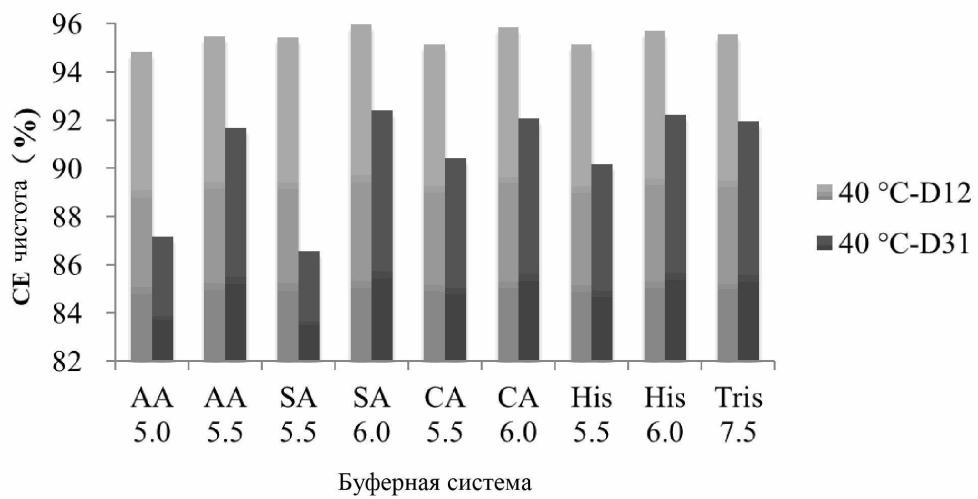
45



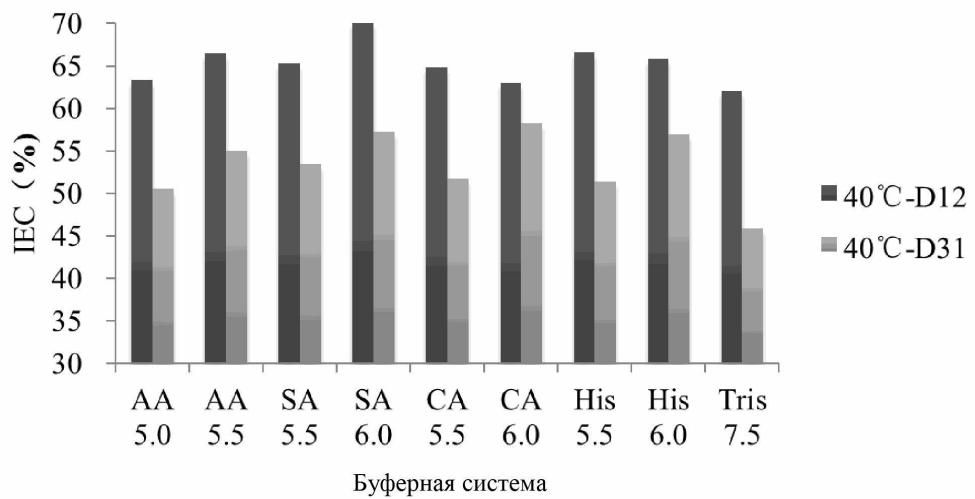
Фиг. 1



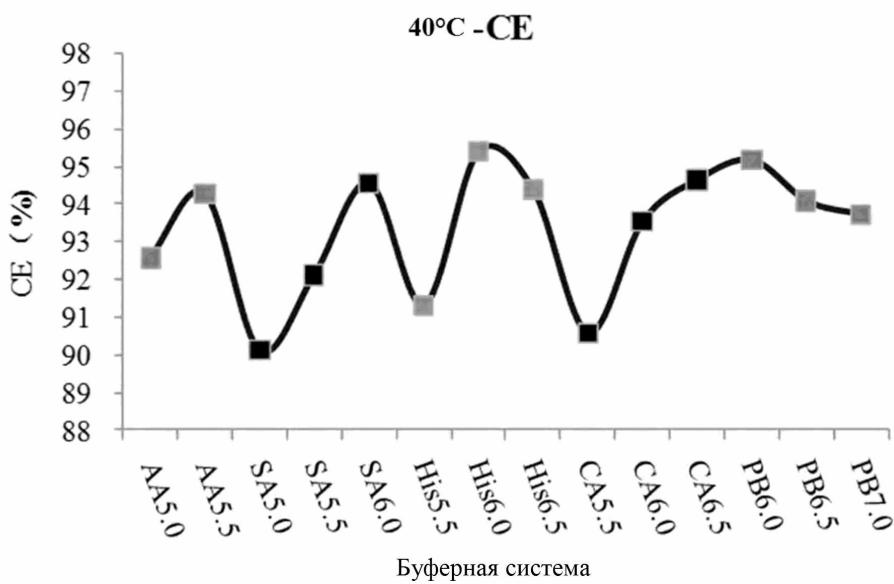
Фиг. 2



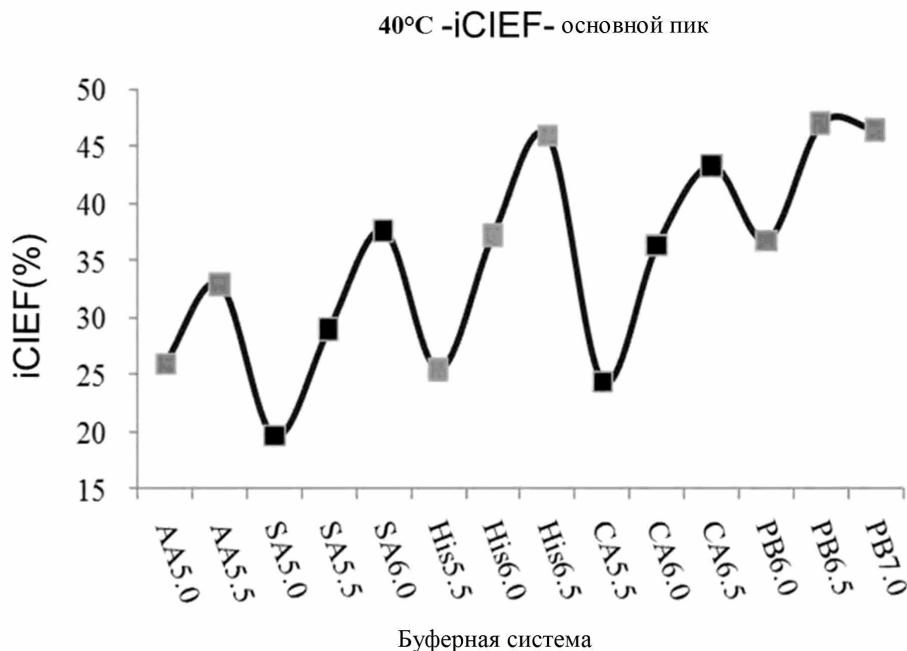
Фиг. 3



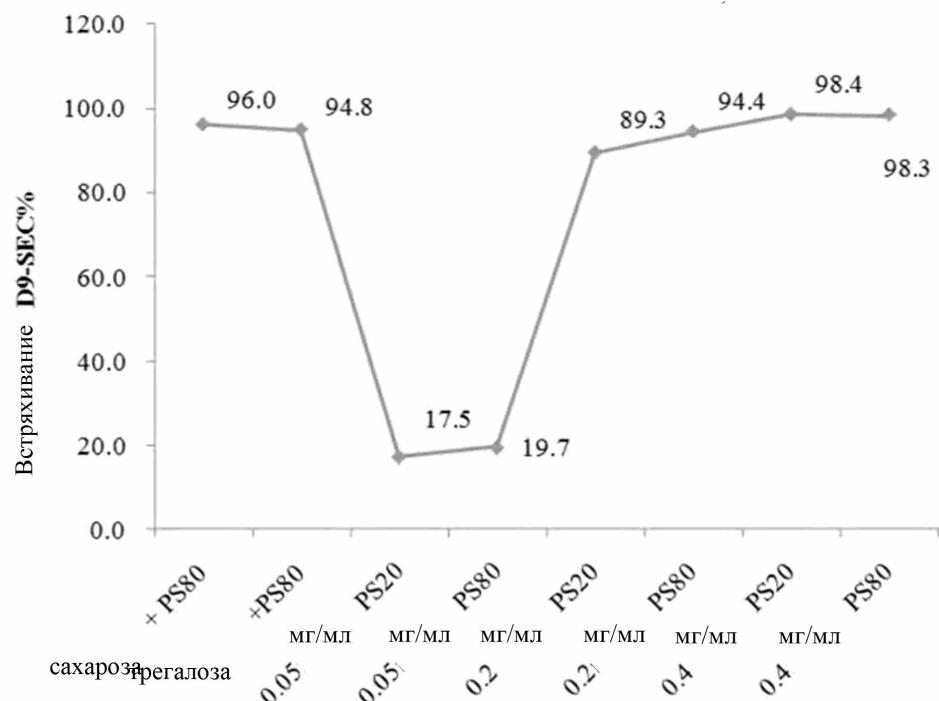
Фиг. 4



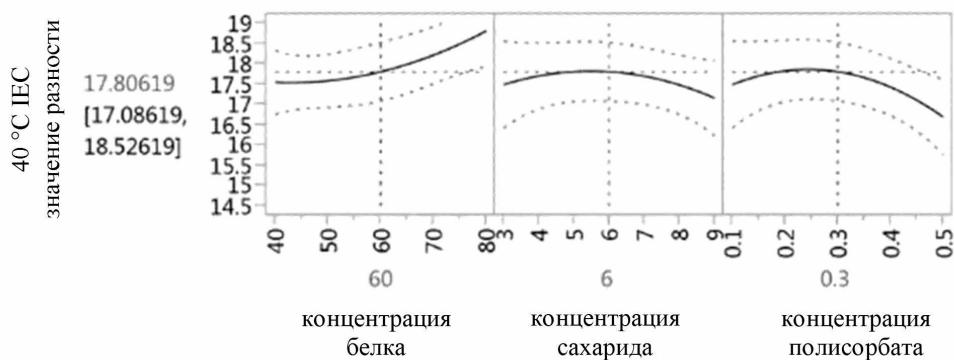
Фиг. 5



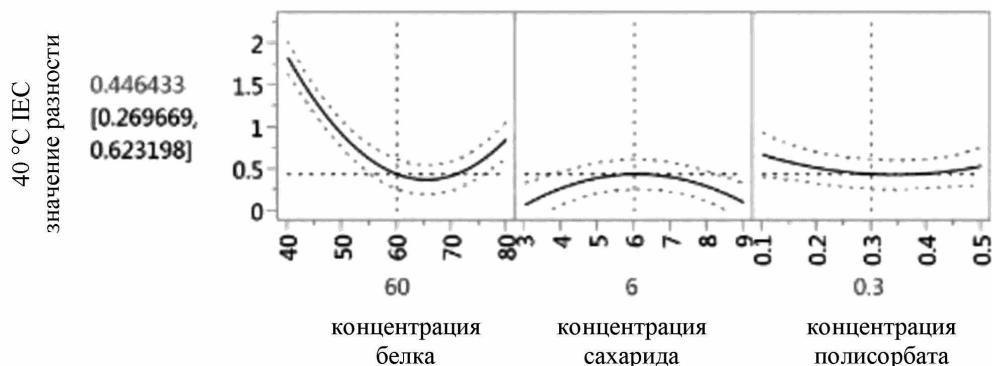
Фиг. 6



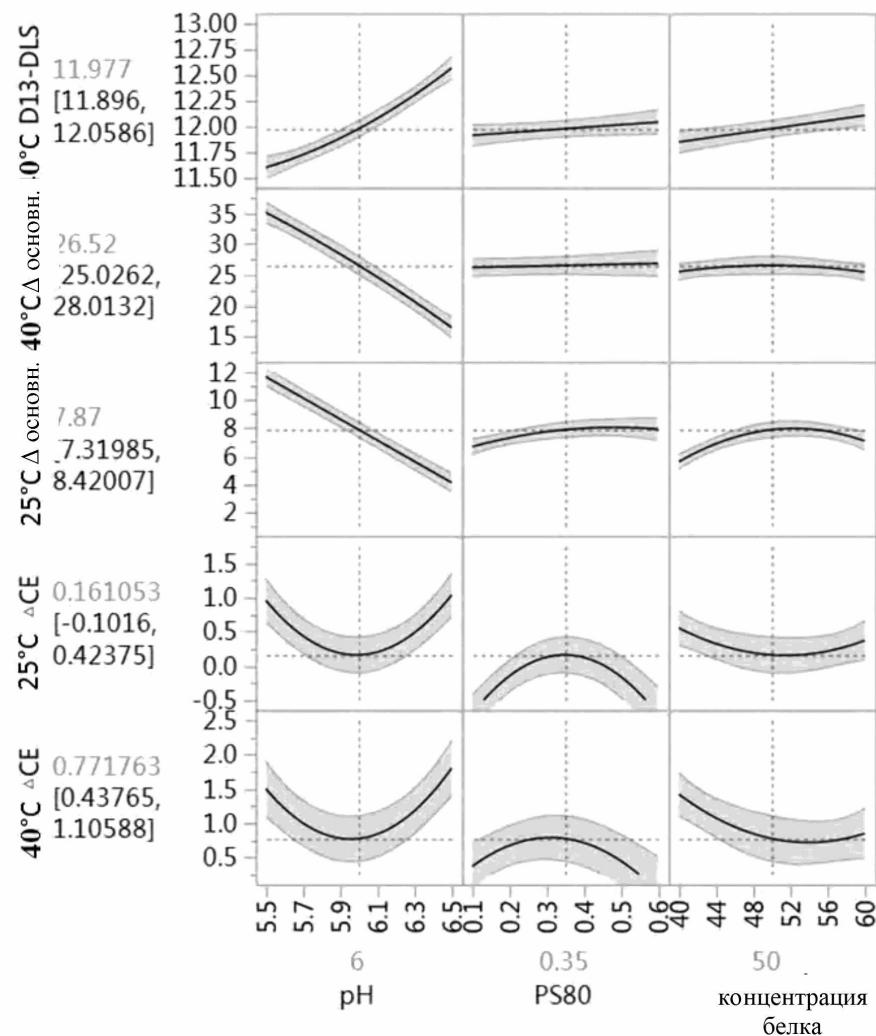
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10