

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041483**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.28
- (21) Номер заявки
201792657
- (22) Дата подачи заявки
2016.06.07
- (51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) **СВЯЗЫВАЮЩИЕ LAG-3 МОЛЕКУЛЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

- (31) **62/172,277; 62/255,094**
- (32) **2015.06.08; 2015.11.13**
- (33) **US**
- (43) **2018.07.31**
- (86) **PCT/US2016/036172**
- (87) **WO 2016/200782 2016.12.15**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МАКРОДЖЕНИКС, ИНК. (US)
- (72) Изобретатель:
**Ла Мотт-Мохс Росс, Шан Калпана,
Смит Дуглас Х., Джонсон Лесиль С.,
Мур Пол А., Бонвини Эцио, Кoenиг
Скотт (US)**
- (74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Карпенко О.Ю., Лыу
Т.Н., Дементьев В.Н., Глухарёва А.О.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.,
Гизатуллина Е.М. (RU)**
- (56) **US-A1-20140093511
WO-A1-2014140180
US-B1-6197524
US-A1-20110150892
US-A1-20100233183**

-
- (57) Изобретение относится к связывающей LAG-3 молекуле, которая содержит связывающие LAG-3 фрагменты антител к LAG-3, и к биспецифическим молекулам, которые содержат (i) такие связывающие LAG-3 фрагменты и (ii) домен, который способен связываться с эпитопом молекулы, участвующей в регуляции иммунной контрольной точки, присутствующей на поверхности иммунных клеток. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, а также к применению биспецифической молекулы для стимуляции Т-клеточного иммунного ответа при лечении злокачественной опухоли или инфекции у субъекта, имеющего подавленную иммунную систему или в детекции LAG-3.

041483
B1

041483
B1

Ссылки на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с заявками на выдачу патента США № 62/255094 (поданной 13 ноября 2015 г.; на рассмотрении) и № 62/172277 (поданной 8 июня 2015 г.; на рассмотрении), каждая из этих заявок включена в настоящий документ при помощи ссылки в полном их объеме.

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка включает один или несколько перечней последовательностей в соответствии с 37 C.F.R. 1.821 и далее, которые раскрыты на машиночитаемом носителе (название файла: 1301_0121PCT_Sequence_Listing_ST25.txt, создан 18 мая 2016 г. и имеет размер 105774 байта), при этом данный файл включен в настоящий документ с помощью ссылки в полном его объеме.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к связывающим LAG-3 молекулам, которые содержат связывающий LAG-3 домен выбранных антител к LAG-3: LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6, которые способны связываться как с LAG-3 яванского макака, так и с LAG-3 человека. Настоящее изобретение, в частности, относится к связывающим LAG-3 молекулам, которые являются гуманизированными или химерными версиями таких антител или которые содержат связывающие LAG-3 фрагменты таких антител к LAG-3 (особенно к иммуноконъюгатам, диаталам, BiTE, биспецифическим антителам и т.д.). Настоящее изобретение, в частности, относится к таким связывающим LAG-3 молекулам, которые дополнительно способны связываться с эпитопом молекулы, участвующей в регуляции иммунной контрольной точки, которая присутствует на поверхности иммунной клетки. Настоящее изобретение также относится к способам применения таких связывающих LAG-3 молекул для детекции LAG-3 или для стимуляции иммунного ответа. Настоящее изобретение также относится к способам комбинированной терапии, при которых связывающую LAG молекулу, которая содержит один или несколько связывающих LAG-3 доменов таких выбранных антител к LAG-3, вводят в комбинации с одной или несколькими дополнительными молекулами, которые эффективны в стимуляции иммунного ответа, тем самым дополнительно усиливая, стимулируя или повышая такой иммунный ответ у субъекта.

Уровень техники

I. Клеточные иммунные ответы

Иммунная система людей и других млекопитающих отвечает за обеспечение защиты от инфекции и заболевания. Такая защита обеспечивается как гуморальным иммунным ответом, так и клеточным иммунным ответом. Гуморальный ответ приводит в результате к выработке антител и других биомолекул, которые способны распознавать и нейтрализовать инородные мишени (антигены). Для сравнения, при клеточном иммунном ответе происходит активация макрофагов, натуральных киллеров (NK) и антиген-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов Т-клетками и высвобождение различных цитокинов в ответ на распознавание антигена (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules" *Immunolog. Res.* 28(1):39-48).

Способность Т-клеток оптимально опосредовать иммунный ответ на антиген нуждается в двух различных сигнальных взаимодействиях (Viglietta, V. et al. (2007) "Modulating Co-Stimulation" *Neurotherapeutics* 4:666-675; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy" *Adv. Immunol.* 90:297-339). Во-первых, антиген, который дислоцируется на поверхности антигенпрезентирующих клеток (APC), должен быть презентируван антиген-специфической наивной CD4⁺ Т-клетке. Такое презентирование доставляет сигнал с помощью Т-клеточного рецептора (TCR), который заставляет Т-клетку инициировать иммунный ответ, который будет специфическим к презентуемому антигену. Во-вторых, серия костимулирующих и коингибирующих сигналов, опосредуемых взаимодействиями между APC и различными молекулами на поверхности Т-клеток, запускает сначала активацию и пролиферацию Т-клеток и в конечном итоге их ингибирование. Таким образом, первый сигнал придает специфичность иммунному ответу, в то время как второй сигнал служит для определения природы, величины и продолжительности ответа.

Иммунная система жестко контролируется костимулирующими и коингибирующими лигандами и рецепторами. Такие молекулы обеспечивают второй сигнал для активации Т-клеток и обеспечивают сбалансированную сеть положительных и отрицательных сигналов для максимизации иммунных ответов к инфекции, при этом ограничивая иммунитет к "своим" клеткам (Wang, L. et al. (2011) "VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses" *J. Exp. Med.* 10.1084/jem.20100619:1-16; Lepenies, B. et al. (2008) "The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections", *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 8:279-288). Ингибирующие пути, важные для сохранения аутоотолерантности и модулирования продолжительности и величины иммунных ответов, совместно называют иммунными контрольными точками. Особое значение имеет связывание лигандов B7.1 (CD80) и B7.2 (CD86) антиген-презентирующих клеток с рецепторами CD28 и CTLA-4 у CD4⁺ Т-лимфоцита (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules", *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation", *Immunol. Rev.*

229:307-321). Связывание B7.1 или B7.2 с CD28 стимулирует активацию Т-клеток; связывание B7.1 или B7.2 с CTLA-4 ингибирует такую активацию (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules", *Immunol. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation", *Immunol. Rev.* 229:307-321; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited", *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548). CD28 конститутивно экспрессируется на поверхности Т-клеток (Gross, J., et al. (1992) "Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse", *J. Immunol.* 149:380-388), в то время как экспрессия CTLA-4 быстро возрастает после активации Т-клеток (Linsley, P. et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement", *Immunity* 4:535-543). Поскольку CTLA-4 является более высокоаффинным рецептором (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126), связывание сначала инициирует пролиферацию Т-клеток (посредством CD28), а затем ингибирует ее (посредством начинающейся экспрессии CTLA-4), тем самым ослабляя эффект, если в пролиферации более нет необходимости.

Дополнительные исследования в лигандах рецептора CD28 привели к выявлению и описанию характеристик ряда родственных молекул B7 ("суперсемейство B7") (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited", *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548; Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands", *Genome Biol.* 6:223.1-223.7; Loke, P. et al. (2004) "Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T-Cells", *Arthritis Res. Ther.* 6:208-214; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy", *Adv. Immunol.* 90:297-339; Flies, D.B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity", *J. Immunother.* 30(3):251-260; Agarwal, A. et al. (2008) "The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance", *Curr. Opin. Organ Transplant.* 13:366-372; Wang, S. et al. (2004) "Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses", *Microbes Infect.* 6:759-766). В настоящее время существует несколько известных членов семейства: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), индуцируемый костимулирующий лиганд (ICOS-L), лиганд программируемой смерти 1 (PD-L1; B7-H1), лиганд программируемой смерти 2 (PD-L2; B7-DC), B7-H3, B7-H4 и B7-H6 (Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands", *Genome Biol.* 6:223.1-223.7; Flajnik, M.F. et al. (2012) "Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC", *Immunogenetics* 64(8):571-90).

II. Ген активации лимфоцитов 3 ("LAG-3")

Ген активации лимфоцитов 3 кодирует белок рецептора клеточной поверхности, который называют "LAG-3" или CD223 (Triebel, F. et al. (1990) "LAG-3, A Novel Lymphocyte Activation Gene Closely Related To CD4", *J. Exp. Med.* 171 (5): 1393-1405). LAG-3 экспрессируется у активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток и конститутивно экспрессируется у плазматоидных дендритных клеток. LAG-3 не экспрессируется у В-клеток, моноцитов или клеток любого другого протестированного типа (Workman, C.J. et al. (2009) "LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis", *J. Immunol.* 182(4): 1885-1891).

Было обнаружено, что LAG-3 является близкородственным Т-клеточному корецептору CD4 (Triebel, F. et al. (1990) "LAG-3, A Novel Lymphocyte Activation Gene Closely Related To CD4", *J. Exp. Med.* 171(5): 1393-1405; Grosso, J.F. et al. (2009) "Functionally Distinct LAG-3 and PD-1 Subsets on Activated and Chronically Stimulated CD8 T-Cells", *J. Immunol.* 182(11):6659-6669; Huang, C.T. et al. (2004) "Role Of LAG-3 In Regulatory T-Cells", *Immunity* 21:503-513; Workman, C.J. et al. (2009) "LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis", *J. Immunol.* 182(4): 1885-1891). Как и CD4, LAG-3 также связывается с молекулами MHC II класса, но делает это со значительно более высокой аффинностью (Workman, C.J. et al. (2002) "Phenotypic Analysis Of The Murine CD4-Related Glycoprotein, CD223 (LAG-3)", *Eur. J. Immunol.* 32:2255-2263; Huard, B. et al. (1995) "CD4/Major Histocompatibility Complex Class II Interaction Analyzed With CD4-And Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3)-Ig Fusion Proteins", *Eur. J. Immunol.* 25:2718-2721; Huard, B. et al. (1994) "Cellular Expression And Tissue Distribution Of The Human LAG-3-Encoded Protein, AnMHC Class II Ligand", *Immunogenetics* 39:213-217).

Исследования показали, что LAG-3 играет важную роль в отрицательной регуляции Т-клеточной пролиферации, функции и гомеостазе (Workman C.J. et al. (2009) "LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis", *J. Immunol.* 182(4): 1885-1891; Workman C.J. et al. (2002) "Cutting Edge: Molecular Analysis Of The Negative Regulatory Function Of Lymphocyte Activation Gene-3", *J. Immunol.* 169:5392-5395; Workman, C.J. et al. (2003) "The CD4-Related Molecule, LAG-3 (CD223), Regulates The Expansion Of Activated T-Cells", *Eur. J. Immunol.* 33:970-979; Workman, C.J. (2005) "Negative Regulation Of T-Cell Homeostasis By Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223)", *J. Immunol.* 174:688-695; Hannier, S. et al. (1998) "CD3/TCR Complex-Associated Lymphocyte Activation Gene-3 Molecules Inhibit CD3/TCR Signaling", *J. Immunol.* 161:4058-4065; Huard, B. et al. (1994) "Lymphocyte-Activation Gene 3/Major Histocompatibility Complex Class II Interaction Modulates The Antigenic Response Of CD4⁺ T Lymphocytes", *Eur. J. Immunol.* 24:3216-3221).

Исследования показали, что ингибирование функции LAG-3 посредством блокады антителами мо-

жет обращать LAG-3-опосредованное ингибирование иммунной системы и частично восстанавливать эффекторную функцию (Grosso, J.F. et al. (2009) "Functionally Distinct LAG-3 and PD-1 Subsets on Activated and Chronically Stimulated CD8 T-Cells", J. Immunol. 182(11):6659-6669; Grosso, J.F. et al. (2007) "LAG-3 Regulates CD8⁺ T-Cell Accumulation And Effector Function During Self And Tumor Tolerance", J. Clin. Invest. 117:3383-3392). Было обнаружено, что LAG-3 отрицательно регулирует размножение Т-клеток посредством ингибирования TCR-индуцируемых кальциевых потоков и контролирует размер пула Т-клеток памяти (Matsuzaki, J. et al. (2010) "Tumor-Infiltrating NY-ESO-1-Specific CD8⁺ T-Cells Are Negatively Regulated By LAG-3 and PD-1 In Human Ovarian Cancer", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 107(17):7875-7880; Workman C.J., et al. (2004) "Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223) Regulates The Size Of The Expanding T-Cell Population Following Antigen Activation in vivo", J. Immunol. 172:5450-5455).

Тем не менее, несмотря на все такие предыдущие достижения, сохраняется потребность в усовершенствованных композициях, способных сильнее заставлять иммунную систему организма атаковать клетки злокачественной опухоли или инфицированные патогеном клетки, особенно в более низких терапевтических концентрациях. Даже несмотря на то, что адаптивная иммунная система может быть сильным защитным механизмом от злокачественной опухоли и заболевания, она зачастую подавляется иммуносупрессорными механизмами в опухолевом микроокружении, таком как экспрессия LAG-3. Кроме того, коингибирующие молекулы, экспрессируемые опухолевыми клетками, иммунными клетками и стромальными клетками в опухолевой среде, могут доминантно ослаблять Т-клеточные ответы на клетки злокачественной опухоли. Таким образом, сохраняется потребность в высокоактивных связывающих LAG-3 молекулах. Так, в частности, существует потребность в связывающих LAG-3 молекулах, которые имеют требуемый профиль кинетики связывания, связывают различные эпитопы LAG-3 и/или характеризуются активностью в отношении отдельного агента, что может повысить терапевтическое значение для пациентов, страдающих от злокачественной опухоли или других заболеваний или состояний. Настоящее изобретение относится к решению этих и других задач.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к связывающим LAG-3 молекулы, которые содержат связывающий LAG-3 домен выбранных антител к LAG-3: LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6, которые способны связываться как с LAG-3 яванского макака, так и с LAG-3 человека. Настоящее изобретение, в частности, относится к связывающим LAG-3 молекулам, которые являются гуманизированными или химерными версиями таких антител или которые содержат связывающие LAG-3 фрагменты таких антител к LAG-3 (особенно к иммуноконъюгатам, диаталам, BiTE, биспецифическим антителам и т.д.). Настоящее изобретение, в частности, относится к таким связывающим LAG-3 молекулам, которые дополнительно способны связываться с эпитопом молекулы, участвующей в регуляции иммунной контрольной точки, которая присутствует на поверхности иммунной клетки. Настоящее изобретение также относится к способам применения таких связывающих LAG-3 молекул для детекции LAG-3 или для стимуляции иммунного ответа. Настоящее изобретение также относится к способам комбинированной терапии, при которых связывающую LAG молекулу, которая содержит один или несколько связывающих LAG-3 доменов таких выбранных антител к LAG-3, вводят в комбинации с одной или несколькими дополнительными молекулами, которые эффективны в стимуляции иммунного ответа, тем самым дополнительно усиливая, стимулируя или повышая такой иммунный ответ у субъекта.

Если подробно, настоящее изобретение относится к связывающей LAG-3 молекуле, которая способна связываться как с LAG-3 человека, так и с LAG-3 яванского макака, причем указанная молекула содержит три домена CDR тяжелой цепи: CDR_H1, CDR_H2 и CDR_H3, и три домена CDR легкой цепи: CDR_L1, CDR_L2 и CDR_L3, причем:

(A) (1) домен CDR_H1, домен CDR_H2 и домен CDR_H3 представляют собой CDR тяжелой цепи из LAG-3 mAb 1 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 и

(2) домен CDR_L1, домен CDR_L2 и домен CDR_L3 представляют собой CDR легкой цепи из LAG-3 mAb 1 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15 или

(B) (1) домен CDR_H1, домен CDR_H2 и домен CDR_H3 представляют собой CDR тяжелой цепи из hLAG-3 mAb 1 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 и

(2) домен CDR_L1, домен CDR_L2 и домен CDR_L3 представляют собой CDR легкой цепи из hLAG-3 mAb 1 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15; или

(C) (1) домен CDR_H1, домен CDR_H2 и домен CDR_H3 представляют собой CDR тяжелой цепи из LAG-3 mAb 2 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33; и

(2) домен CDR_L1, домен CDR_L2 и домен CDR_L3 представляют собой CDR легкой цепи из LAG-3 mAb 2 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и

SEQ ID NO: 38; или

(D) (1) домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} представляют собой CDR тяжелой цепи из LAG-3 mAb 3 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43; и

(2) домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} представляют собой CDR легкой цепи из LAG-3 mAb 3 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48; или

(E) (1) домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} представляют собой CDR тяжелой цепи из LAG-3 mAb 4 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 53; и

(2) домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} представляют собой CDR легкой цепи из LAG-3 mAb 4 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 58; или

(F) (1) домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} представляют собой CDR тяжелой цепи из LAG-3 mAb 5 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63; и

(2) домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} представляют собой CDR легкой цепи из LAG-3 mAb 5 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 68; или

(G) (1) домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} представляют собой CDR тяжелой цепи из LAG-3 mAb 6 VH1 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73; и

(2) домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} представляют собой CDR легкой цепи из LAG-3 mAb 6 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78; или

(H) (1) домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} представляют собой CDR тяжелой цепи из LAG-3 hAb 6 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73; и

(2) домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} представляют собой CDR легкой цепи из hLAG-3 hAb 6 и соответственно имеют аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78.

Настоящее изобретение дополнительно относится к вариантам осуществления таких связывающих LAG-3 молекул, где переменный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 49 или SEQ ID NO: 59.

Настоящее изобретение дополнительно относится к вариантам осуществления таких связывающих LAG-3 молекул, где переменный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 64.

Настоящее изобретение дополнительно относится к вариантам осуществления таких связывающих LAG-3 молекул, где переменный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 79 или SEQ ID NO: 80.

Настоящее изобретение дополнительно относится к вариантам осуществления таких связывающих LAG-3 молекул, где переменный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 85.

Настоящее изобретение дополнительно относится к вариантам осуществления всех таких связывающих LAG-3 молекул, где молекула представляет собой антитело и особенно где молекула представляет собой химерное антитело или гуманизованное антитело.

Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту осуществления, где связывающая LAG-3 молекула представляет собой биспецифическую связывающую молекулу, способную одновременно связываться с LAG-3 человека и со вторым эпитопом, и, в частности, относится к варианту осуществления, где второй эпитоп представляет собой эпитоп молекулы, участвующей в регуляцию иммунной контрольной точки, присутствующей на поверхности иммунной клетки (особенно где второй эпитоп представляет собой эпитоп B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, галектина-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC I или II класса, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 или VISTA, и, наиболее конкретно, где второй эпитоп представляет собой эпитоп CD137, OX40, PD-1, TIGIT или TIM-3).

Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту осуществления таких связывающих LAG-3 молекул, где молекула представляет собой диатело и особенно где диатело представляет собой ковалентно связанный комплекс, который содержит два или три, или четыре, или пять или более пяти полипептидных цепей. Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту осуществления таких связывающих LAG-3 молекул антител, где молекула представляет собой трехвалентную связывающую молекулу, причем трехвалентная связывающая молекула представляет собой ковалентно связанный

комплекс, который содержит три, четыре, пять или более полипептидных цепей. Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту осуществления таких связывающих LAG-3 молекул, где молекула включает Fc-участок. Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту осуществления таких связывающих LAG-3 молекул, где молекула содержит альбумин-связывающий домен и особенно деиммунизированный альбумин-связывающий домен.

Настоящее изобретение дополнительно относится к вариантам осуществления всех таких связывающих LAG-3 молекул, где молекула включает Fc-участок (кристаллизующийся фрагмент), и где Fc-участок представляет собой вариантный Fc-участок, который содержит одну или несколько аминокислотных модификаций, которые уменьшают аффинность вариантного Fc-участка в отношении FcγR и/или увеличивают период полужизни в сыворотке, и, более конкретнее, где модификации содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из:

- (1) L234A;
- (2) L235A;
- (3) L234A и L235A;
- (4) M252Y, M252Y и S254T;
- (5) M252Y и T256E;
- (6) M252Y, S254T и T256E или
- (7) K288B и H435K;

причем указанная нумерация соответствует EU системе нумерации по Kabat.

Настоящее изобретение дополнительно относится к вариантам осуществления, где любые описанные выше связывающие LAG-3 молекулы применяются для стимуляции Т-клеточного иммунного ответа. Настоящее изобретение дополнительно относится к вариантам осуществления, где любая из описанных выше связывающих LAG-3 молекул применяется при лечении заболевания или состояния, ассоциированного с подавленной иммунной системой, особенно злокачественной опухоли или инфекции.

Настоящее изобретение, в частности, относится к такому применению при лечении, или диагностике, или прогнозировании развития злокачественной опухоли, причем злокачественная опухоль характеризуется присутствием клетки злокачественной опухоли, выбранной из группы, состоящей из клетки: опухоли надпочечника, ассоциированной со СПИДом злокачественной опухоли, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, злокачественной опухоли мочевого пузыря, злокачественной опухоли костей, злокачественной опухоли головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, злокачественной опухоли молочной железы, опухолей каротидного тельца, цервикальной злокачественной опухоли, хондросаркомы, хордомы, хромофобной почечно-клеточной карциномы, светло-клеточной карциномы, злокачественной опухоли толстой кишки, колоректальной злокачественной опухоли, кожной доброкачественной фиброзной гистиоцитомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, опухоли Юинга, внескелетной слизеподобной хондросаркомы, несовершенного костного фиброгенеза, фиброзной дисплазии кости, злокачественной опухоли желчного пузыря или желчевыводящих путей, злокачественной опухоли желудочно-кишечного тракта, гестационной трофобластической болезни, эмбрионально-клеточной опухоли, злокачественной опухоли головы и шеи, гепатоклеточной карциномы, опухоли островков поджелудочной железы, саркомы Капоши, злокачественной опухоли почки, лейкоза, липомы/доброкачественной липоматозной опухоли, липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли, злокачественной опухоли печени, лимфомы, злокачественной опухоли легкого, гранулобластомы, меланомы, менингиомы, множественных эндокринных неоплазий, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринных опухолей, злокачественной опухоли яичника, злокачественной опухоли поджелудочной железы, папиллярной карциномы щитовидной железы, опухоли паразитовидных желез, детской злокачественной опухоли, опухоли оболочки периферического нерва, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, злокачественной опухоли предстательной железы, увеальной меланомы заднего отдела глаза, редкого нарушения со стороны кроветворной системы, почечной метастатической злокачественной опухоли, рабдоидной опухоли, рабдомиосаркомы, саркомы, злокачественной опухоли кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточной злокачественной опухоли, злокачественной опухоли желудка, синовиальной саркомы, злокачественной опухоли яичка, тимусной карциномы, тимомы, метастатической злокачественной опухоли щитовидной железы и злокачественной опухоли матки.

Настоящее изобретение, в частности, относится к такому применению при лечении, или диагностике, или прогнозировании развития злокачественной опухоли, причем злокачественная опухоль представляет собой колоректальную злокачественную опухоль, гепатоклеточную карциному, глиому, злокачественную опухоль почки, злокачественную опухоль молочной железы, множественную миелому, злокачественную опухоль мочевого пузыря, нейробластому; саркому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточную злокачественную опухоль легкого, злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль поджелудочной железы, злокачественную опухоль прямой кишки, острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелогенный лейкоз (CMML), острый В-лимфобластный лейкоз (B-ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточный лейкоз (HCL), новообразование из бластных плазматических дендритных клеток (BPDCN), неходжкинские лимфомы (NHL), включая мантийноклеточную

лимфому (MCL) и мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), ходжкинскую лимфому, системный мастоцитоз или лимфому Беркитта.

Настоящее изобретение дополнительно относится к вариантам осуществления, в которых любая из вышеописанных связывающих LAG-3 молекул помечена детектируемой меткой и применяется в детекции LAG-3.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлено схематическое изображение типичного ковалентно связанного диатела с двумя эпитопсвязывающими сайтами, состоящей из двух полипептидных цепей, каждая из которых имеет способствующий образованию гетеродимера домен с E-спиралью или K-спиралью. Цистеиновый остаток может присутствовать в линкере и/или в способствующем образованию гетеродимера домене, как показано на фиг. 3B. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны одинаковой штриховкой или заливкой.

На фиг. 2 представлено схематическое изображение типичной ковалентно связанной молекулы диатела с двумя эпитопсвязывающими сайтами, состоящей из двух полипептидных цепей, каждая из которых имеет домен CH2 и CH3, так чтобы ассоциированные цепи образовывали весь Fc-участок или его часть. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны одинаковой штриховкой или заливкой.

На фиг. 3A-3C представлены схематически изображения, на которых показаны типичные четырехвалентные диатела с четырьмя эпитопсвязывающими сайтами, состоящие из двух пар полипептидных цепей (т.е. всего четырех полипептидных цепей). Один полипептид каждой пары обладает доменом CH2 и CH3, так чтобы связанные цепи образовывали весь Fc-участок или его часть. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны одинаковой штриховкой или заливкой. Две пары полипептидных цепей могут быть одинаковыми. В соответствии с такими вариантами осуществления, если домены VL и VH распознают различные эпитопы (как показано на фиг. 3A-3C), полученная в результате молекула обладает четырьмя эпитоп-связывающими сайтами и является биспецифической и двухвалентной по отношению к каждому связываемому эпитопу. В соответствии с такими вариантами осуществления, если домены VL и VH распознают один и тот же эпитоп (например, на обеих цепях задействованы одинаковые CDR домена VL и одинаковые CDR домена VH), полученная в результате молекула обладает четырьмя эпитопсвязывающими сайтами и является моноспецифической и четырехвалентной по отношению к одному эпитопу. Альтернативно, две пары полипептидов могут различаться. В соответствии с такими вариантами осуществления, если домены VL и VH каждой пары полипептидов распознают различные эпитопы (как показано на фиг. 3C), полученная в результате молекула обладает четырьмя эпитопсвязывающими сайтами и является тетраспецифической и одновалентной по отношению к каждому связываемому эпитопу. На фиг. 3A показано Fc-диатело, которое содержит пептидный способствующий образованию гетеродимера домен, содержащий цистеиновый остаток. На фиг. 3B показано содержащее Fc-участок диатело, которое содержит Fc-участок и способствующие образованию гетеродимера домены с E-спиралью и K-спиралью, содержащие цистеиновый остаток и линкер (с необязательным цистеиновым остатком). На фиг. 3C показано содержащее Fc-участок диатело, которое содержит домены CH1 и CL антитела.

На фиг. 4A и 4B представлены схематические изображения типичной ковалентно связанной молекулы диатела, имеющей два эпитоп-связывающих сайта, состоящих из трех полипептидных цепей. Две полипептидные цепи имеют домен CH2 и CH3, так чтобы связанные цепи образовывали весь Fc-участок или его часть. Полипептидные цепи, содержащие домен VL и VH, дополнительно содержат способствующий образованию гетеродимера домен. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны одинаковой штриховкой или заливкой.

На фиг. 5 представлены схематические изображения типичной ковалентно связанной молекулы диатела, имеющей четыре эпитопсвязывающих сайта, состоящих из пяти полипептидных цепей. Две полипептидные цепи имеют домен CH2 и CH3, так чтобы связанные цепи образовывали Fc-участок, который представляет собой весь Fc-участок или его часть. Полипептидные цепи, содержащие соединенные домены VL и VH, дополнительно содержат способствующий образованию гетеродимера домен. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны одинаковой штриховкой или заливкой.

На фиг. 6A-6F представлены схематические изображения типичных Fc-участков, содержащих трехвалентные связывающие молекулы, имеющие три эпитопсвязывающих сайта. На фиг. 6A и 6B соответственно схематично проиллюстрированы домены трехвалентных связывающих молекул, содержащих два связывающих домена по типу диател и связывающий домен по типу Fab, имеющих различные ориентации доменов, в которых связывающие домены по типу диатела являются N-концевыми или C-концевыми к Fc-участку. Молекулы на фиг. 6A и 6B содержат четыре цепи. На фиг. 6C и 6D соответственно схематично проиллюстрированы домены трехвалентных связывающих молекул, содержащих два N-концевых к Fc-участку связывающих домена по типу диатела и связывающий домен Fab-типа, в котором легкая цепь и тяжелая цепь соединены с помощью полипептидного линкерного спейсера, или связывающий домен scFv-типа. Для трехвалентных связывающих молекул на фиг. 6E и 6F соответственно схематически проиллюстрированы домены трехвалентных связывающих молекул, содержащих два C-

концевых к Fc-участку связывающих домена по типу диатела и присоединенный связывающий домен Fab-типа или связывающий домен scFv-типа, в которых находятся связывающие домены по типу диатела. Трехвалентные связывающие молекулы на фиг. 6С-6F содержат три цепи. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны одинаковой штриховкой или заливкой.

На фиг. 7А-7С показаны характеристики связывания LAG-3 mAb 1 и LAG-3 mAb 6 с LAG-3 яванского макака. Кривые связывания Вiasoge для hLAG-3 mAb 6 (1.1) (фиг. 7А), hLAG-3 mAb 1 (1.4) (фиг. 7В) и LAG-3 mAb А (фиг. 7С), демонстрирующие, что hLAG-3 mAb 6 (1.1) характеризуется лучшим связыванием с LAG-3 яванского макака (RU - единицы ответа).

На фиг. 8А-8D показано, что LAG-3 mAb 1 и LAG-3 mAb 6 связывают эпитоп, отличный от того, который связывается эталонным антителом LAG 3 mAb А. Профили связывания меченых LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 6 и LAG-3 mAb А в отсутствие конкурентного антитела (фиг. 8А), в присутствии избыточного LAG-3 mAb 1 (фиг. 8В), избыточного LAG-3 mAb 6 (фиг. 8С) или LAG-3 mAb А (фиг. 8D) (RU - единицы ответа).

На фиг. 9А-9В показано, что выделенные антитела ингибируют связывание растворимого LAG-3 человека (shLAG-3) с МНС II класса, по результатам определения в анализе ИФА. На фиг. 9А показаны кривые ингибирования для LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4 и LAG-3 mAb 5. На фиг. 9В показаны кривые ингибирования для LAG-3 mAb А, гуманизированного hLAG-3 1 (1.4) и hLAG-3 6 (1.1) (RLU - относительные единицы люминесценции).

На фиг. 10А-10С показано, что выделенные антитела ингибируют связывание shLAG-3 с поверхностью клеток Дауди, экспрессирующих МНС II класса. На фиг. 10А показаны кривые ингибирования для LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 и эталонного антитела LAG-3 mAb А. На фиг. 10В показаны кривые ингибирования для LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 6 и LAG-3 mAb А. На фиг. 10С показаны кривые ингибирования LAG-3 mAb 1 и гуманизированного hLAG-3 1 (1.4), hLAG-3 1 (1.2), hLAG-3 1 (2.2), hLAG-3 1 (1.1). Каждая цифра представляет собой отдельный эксперимент; MFI - средняя интенсивность флуоресценции.

На фиг. 11А-11С показано, что экспрессия LAG-3 повышается в простимулированных CD4⁺ Т-клетках. Проточный цитометрический анализ экспрессии LAG-3 на непростимулированных CD4⁺ Т-клетках (фиг. 11А) и простимулированных CD3/CD28 гранулами CD4⁺ Т-клетках от двух различных доноров (фиг. 11В и 11С) соответственно на 11-е и 14-е сутки. Все клетки были совместно окрашены антителом к CD4.

На фиг. 12 (секции А-F) показано, что выделенные антитела к LAG-3 связываются с простимулированными, но не с непростимулированными Т-клетками. Проточный цитометрический анализ простимулированных CD3/CD28 CD4⁺ Т-клеток (секции А-С) и непростимулированных CD4⁺ Т-клеток (секции D-F), помеченных с помощью LAG-3 mAb 1 (секции А и D), LAG-3 mAb 2 (секции В и E) или LAG-3 mAb 3 (секции С и F). Все клетки были совместно окрашены антителом к CD4.

На фиг. 13 (секции А-D) показано, что выделенные антитела к LAG-3 связываются с простимулированными, но не с непростимулированными Т-клетками.

Проточный цитометрический анализ простимулированных CD3/CD28 CD4⁺ Т-клеток (секции А-В) и непростимулированных CD4⁺ Т-клеток (секции С-D), помеченных с помощью LAG-3 mAb 4 (секции А и С) или LAG-3 mAb 5 (секции В и D). Все клетки были совместно окрашены антителом к CD4.

На фиг. 14 (секции А-D) показано, что экспрессия LAG-3 и PD-1 повышается на мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), простимулированных энтеротоксином типа В (SEB) *Staphylococcus aureus*, которые были получены от типичного донора D:34765. Проточный цитометрический анализ SEB-простимулированных PBMC от типичного донора спустя 48 ч после первичной стимуляции (секции А-В), помеченных антителами к LAG-3/к CD3 (секция А) или антителами к PD-1/к CD3 (секция В), и на пятые сутки после SEB-стимуляции (секции С-D) клетки, обработанные только SEB (секция С) или изотипическим контрольным антителом (секция D) во время вторичной стимуляции, помеченные антителами к LAG-3/к PD-1.

На фиг. 15 (секции А-D) показано, что экспрессия LAG-3 и PD-1 повышается на SEB-простимулированных PBMC от другого типичного донора D:53724. Проточный цитометрический анализ SEB-простимулированных PBMC от типичного донора через 48 ч после первичной стимуляции (секции А-В), помеченных антителами к LAG-3/к CD3 (секция А) или антителами к PD-1/к CD3 (секция В), и на пятые сутки после SEB-стимуляции (секции С-D) клетки, обработанные только SEB (секция С) или изотипическим контрольным антителом (секция D), помеченные антителами к LAG-3/к PD-1.

На фиг. 16А-16В показано, что LAG-3 mAb 1 способно стимулировать выработку цитокинов до уровней, сравнимых с обработкой антителами к PD-1. Профили секреции IFN γ (фиг. 16А) и TNF α (фиг. 16В) у SEB-простимулированных PBMC, обработанных антителами к LAG-3 или к PD-1.

На фиг. 17 показано, что LAG-3 mAb 1 способно стимулировать выработку цитокинов до уровней, сравнимых с обработкой антителами к PD-1, и что обработка посредством LAG-3 mAb 1 в комбинации с антителами к PD-1 обеспечивала наибольшее усиление высвобождения цитокинов. Профили секреции IFN γ из SEB-простимулированных PBMC, обработанных антителами к LAG-3 и к PD-1 в отдельности и в

комбинации.

На фиг. 18А-18В показано связывание антител к LAG-3: hLAG-3 mAb 6 (1.1) и LAG-3 mAb А, с эндогенным LAG-3, экспрессируемым SEB-протимулированными РВМС яванского макака от двух доноров (фиг. 18А и 18В). Антитело к PD-1, PD-1 mAb А, было включено в качестве положительного контроля для SEB-стимуляции.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к связывающим LAG-3 молекулы, которые содержат связывающий LAG-3 домен выбранных антител к LAG-3: LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6, которые способны связываться как с LAG-3 яванского макака, так и с LAG-3 человека. Настоящее изобретение, в частности, относится к связывающим LAG-3 молекулам, которые являются гуманизированными или химерными версиями таких антител или которые содержат связывающие LAG-3 фрагменты таких антител к LAG-3 (особенно к иммуноконъюгатам, диаталам, BiTE, биспецифическим антителам и т.д.). Настоящее изобретение, в частности, относится к таким связывающим LAG-3 молекулам, которые дополнительно способны связываться с эпитопом молекулы, участвующей в регуляции иммунной контрольной точки, которая присутствует на поверхности иммунной клетки. Настоящее изобретение также относится к способам применения таких связывающих LAG-3 молекул для детекции LAG-3 или для стимуляции иммунного ответа. Настоящее изобретение также относится к способам комбинированной терапии, при которых связывающую LAG молекулу, которая содержит один или несколько связывающих LAG-3 доменов таких выбранных антител к LAG-3, вводят в комбинации с одной или несколькими дополнительными молекулами, которые эффективны в стимуляции иммунного ответа, тем самым дополнительно усиливая, стимулируя или повышая такой иммунный ответ у субъекта.

I. Антитела и их связывающие домены

Антитела по настоящему изобретению представляют собой молекулы иммуноглобулина, способные иммуноспецифически связываться с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т.д., с помощью по меньшей мере одного эпитопраспознающего сайта, расположенного в вариабельном домене молекулы иммуноглобулина.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "антитело" обозначает молекулу иммуноглобулина, способную иммуноспецифически связываться с полипептидом или белком или небелковой молекулой в связи с наличием на такой молекуле конкретного домена, или фрагмента, или конформации ("эпитопа"). Эпитоп-содержащая молекула может обладать иммуногенной активностью, такой, что вызывает ответ с выработкой антител у животного; такие молекулы называют "антигенами". Эпитоп-содержащие молекулы не обязательно являются иммуногенными.

Связывающие домены по настоящему изобретению связываются с эпитопами "иммуноспецифическим" образом. В контексте настоящего документа говорят, что антитело, диатело или другая эпитоп-связывающая молекула "иммуноспецифически" связывается (или характеризуется "специфическим" связыванием) с участком другой молекулы (т.е. эпитопом), если она вступает в реакцию или ассоциируется чаще, быстрее, дольше и/или с большей аффинностью с таким эпитопом, относительно альтернативных эпитопов. Например, антитело, которое специфически связывается с эпитопом LAG-3, является антителом, которое связывает такой эпитоп LAG-3 с большей аффинностью, авидностью, легче и/или дольше, чем оно связывается с другими эпитопами LAG-3 или с отличным от LAG-3 эпитопом. Также при прочтении этого определения будет понятно, что, например, антитело (или фрагмент, или эпитоп), которое иммуноспецифически связывается с первой мишенью, может специфически или предпочтительно связываться или не связываться со второй мишенью. Таким образом, "иммуноспецифическое связывание" не обязательно указывает (хотя и может включать) на исключительное связывание. Как правило, но не обязательно, отсылка к связыванию означает "специфическое" связывание. Говорят, что две молекулы способны связываться друг с другом "физиоспецифическим" образом, если такое связывание характеризуется специфичностью, с которой рецепторы связываются с их соответствующими лигандами. Способность антитела иммуноспецифически связываться с эпитопом может быть определена, например, с помощью иммуноанализа.

Естественные антитела (такие как антитела IgG) состоят из двух легких цепей в комплексе с двумя тяжелыми цепями. Каждая легкая цепь содержит вариабельный домен (VL) и константный домен (CL). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельный домен (VH), три константных домена (CH1, CH2 и CH3) и "шарнирный" домен ("H"), расположенный между доменами CH1 и CH2. Таким образом, основной структурной единицей естественных иммуноглобулинов (например, IgG) является тетрамер, имеющий две легкие цепи и две тяжелые цепи, обычно экспрессируемые в виде гликопротеина с массой приблизительно 150000 Да. Аминоконцевая ("N-концевая") часть каждой цепи включает в себя вариабельный домен, содержащий приблизительно 100-110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена. Карбоксиконцевая ("C-концевая") часть каждой цепи определяет константный участок, причем легкие цепи имеют один константный домен, а тяжелые цепи обычно имеют три константных домена и шарнирный домен. Таким образом, структура легких цепей молекулы IgG представляет собой n-VL-CL-с, а структура тяжелых цепей IgG представляет собой n-VH-CH1-H-CH2-CH3-с (где n и с

представляют собой соответственно N-конец и C-конец полипептида). Способность антитела связывать эпитоп антигена зависит от наличия и аминокислотной последовательности доменов VL и VH антитела. В результате взаимодействия легкой цепи антитела и тяжелой цепи антитела и, в частности, взаимодействия его доменов VL и VH образуется один из двух эпитоп-связывающих сайтов естественного антитела. Естественные антитела способны связываться только с одним видом эпитопа (т.е. они являются моноспецифическими), при этом они могут связывать несколько копий такого вида (т.е. характеризуются бивалентностью или мультивалентностью). Вариабельные домены молекулы IgG состоят из определяющих комплементарность участков (CDR), которые содержат остатки, вступающие в контакт с эпитопом, и не относящиеся к CDR сегменты, называемые каркасными сегментами (FR), которые обычно поддерживают структуру и определяют позиционирование петель CDR с тем, чтобы сделать такой контакт возможным (хотя некоторые каркасные остатки также могут вступать в контакт с антигеном). Таким образом, домены VL и VH имеют структуру n-FR1-CDRL-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-C. Полипептиды, которые представляют собой (или могут выступать в их роли) первый, второй и третий CDR легкой цепи антитела, в настоящем документе соответственно обозначены доменом CDR_{L1}, доменом CDR_{L2} и доменом CDR_{L3}. Аналогичным образом, полипептиды, которые представляют собой (или могут выступать в их роли) первый, второй и третий CDR тяжелой цепи антитела, в настоящем документе соответственно обозначены доменом CDR_{H1}, доменом CDR_{H2} и доменом CDR_{H3}. Таким образом, термины домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2}, домен CDR_{L3}, домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} относятся к полипептидам, которые при включении в белок приводит к тому, что белок становится способным связываться со специфическим эпитопом независимо от того, является ли белок антителом, имеющим легкую и тяжелую цепи, или диателом, или одноцепочечной связывающей молекулой (например, scFv, BiTe и т. д.) или является другим типом белка. Следовательно, применяемый в контексте настоящего документа термин "эпитопсвязывающий домен" обозначает такую часть эпитопсвязывающей молекулы, которая отвечает за способность такой молекулы иммуноспецифически связывать эпитоп. Эпитопсвязывающий фрагмент может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 доменов CDR такого антитела и, хотя он и способен иммуноспецифически связываться с таким эпитопом, может характеризоваться иммуноспецифичностью, аффинностью или селективностью в отношении такого эпитопа, которые отличаются от таковых, у такого антитела. Предпочтительно тем не менее, эпитопсвязывающий фрагмент будет содержать все 6 доменов CDR такого антитела. Эпитопсвязывающий фрагмент антитела может представлять собой отдельную полипептидную цепь (например, scFv) или может содержать две или более полипептидных цепей, каждая из которых имеет аминоконец и карбоксиконец (например, диатело, Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент и т.д.).

Применяемый в контексте настоящего документа термин "антитело" охватывает моноклональные антитела, мультиспецифические антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, синтетические антитела, химерные антитела, поликлональные антитела, камелизированные антитела, одноцепочечные Fvs (scFv), одноцепочечные антитела, иммунологически активные фрагменты антитела (например, фрагменты антитела, способные связываться с эпитопом, например, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fv-фрагменты, фрагменты, содержащие домен V_L и/или V_H, или которые содержат 1, 2 или 3 определяющих комплементарность участков (CDR) такого домена VL (т. е. CDR_{L1}, CDR_{L2} и/или CDR_{L3}) или домена VH (т. е. CDR_{H1}, CDR_{H2} и/или CDR_{H3})), которые специфически связывают антиген и т.д., бифункциональные или мультифункциональные антитела, связанные дисульфидным мостиком биспецифические Fvs (sdFv), интраантитела и диатела и эпитопсвязывающие фрагменты любых из перечисленных выше. Так, в частности, термин "антитело" подразумевают как охватывающий молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные фрагменты молекул иммуноглобулина, т. е. молекул, которые содержат эпитоп-связывающий сайт. Молекулы иммуноглобулина могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂) или подкласса (см., например, патентные публикации США №№ 20040185045, 20050037000, 20050064514, 20050215767, 20070004909, 20070036799, 20070077246 и 20070244303). Последние несколько десятилетий наблюдается оживление интереса в терапевтическом потенциале антител, а антитела становятся одним из лидирующих классов получаемых биотехнологическими методами лекарственных средств (Chan, C.E. et al. (2009) "The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases", Singapore Med. J. 50(7):663-666). Более 200 лекарственных средств на основе антител были одобрены для применения или находятся на стадии разработки.

К антителам к LAG-3 по настоящему изобретению относятся гуманизированные, химерные или каннизированные варианты антител LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6.

Термин "химерное антитело" обозначает антитело, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична антителу от одного вида (например, мыши) или класса или подкласса антитела, в то время как оставшаяся часть идентична или гомологична антителу другого вида (например, человека) или класса или подкласса антитела, при условии, что они характеризуются необходимой биологической активностью. К представляющим интерес химерным антителам по настоящему описанию относятся "примитивизированные" антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности вариабельного домена, полученные от отличного от человека примата (например, маргышковых, человекообраз-

ных обезьян и т.д.), и последовательности константного участка человека.

Применяемый в контексте настоящего описания термин "моноклональное антитело" обозначает антитело популяции практически однородных антител, т.е. отдельные антитела, входящие в состав популяции, являются идентичными, за исключением возможных антител, обладающих встречающимися в природе мутациями, которые могут присутствовать в незначительном количестве, а применяемый в контексте настоящего документа термин "поликлональное антитело" обозначает антитело, полученное из популяции гетерогенных антител. Термин "моноклональное" указывает на характерных признаков антитела как являющегося популяцией практически однородных антител, и его не следует истолковывать как обозначающее получение антитела каким-либо конкретным способом (например, с помощью гибридомы, фагового отбора, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных и т.д.). Термин включает целые иммуноглобулины, а также фрагменты и т.д., описанные выше под определением "антитела". Способы получения моноклональных антител известны из уровня техники. Одним способом, который можно использовать, является способ Kohler, G. et al. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity", *Nature* 256:495-497, или его модификация. Как правило, моноклональные антитела разрабатывают на мышах, крысах или кроликах. Антитела получают путем иммунизации животного иммуногенным количеством клеток, клеточных экстрактов или белковых препаратов, которые содержат необходимый эпитоп. Иммуноген может представлять собой без ограничения первичные клетки, культивируемые клеточные линии, злокачественные опухолевые клетки, белки, пептиды, нуклеиновые кислоты или ткань.

Применяемые для иммунизации клетки можно культивировать в течение некоторого периода времени (например, по меньшей мере 24 ч) перед их применением в качестве иммуногена. Клетки можно применять в качестве иммуногенов сами по себе или в комбинации с неденатурирующим адъювантом, таким как Ribl (см., например, Jennings, V.M. (1995) "Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production", *ILAR J.* 37(3): 119-125). Обычно клетки следует поддерживать интактными и предпочтительно жизнеспособными при применении в качестве иммуногенов. Интактные клетки могут обеспечивать для иммунизированных животных лучшую детекцию антигенов, чем разрушенные клетки. Применение денатурирующих или агрессивных адъювантов, например, адъюванта Фрейнда, может разрушить клетки и, следовательно, не рекомендуется. Иммуноген можно вводить многократно с периодическими интервалами, такими как два раза в неделю или раз в неделю, или можно вводить таким образом, чтобы сохранялась его жизнеспособность у животного (например, в рекомбинантной ткани). Альтернативно, существующие моноклональные антитела и любые другие эквивалентные антитела, которые являются иммуноспецифическими для необходимого патогенного эпитопа, можно секвенировать и получить рекомбинантно любыми способами, известными из уровня техники. В соответствии с одним вариантом осуществления такое антитело секвенируют, а полинуклеотидную последовательность затем клонируют в вектор для экспрессии или размножения. Последовательность, кодирующую представляющее интерес антитело, можно сохранять в векторе в клетке-хозяине, а затем клетку-хозяина можно размножить и заморозить для последующего применения. Полинуклеотидную последовательность таких антител можно применять для генетической манипуляции с целью создания моноспецифических или мультиспецифических (например, биспецифических, триспецифических и тетраспецифических) молекул по настоящему изобретению, а также антитела с оптимизированной аффинностью, химерного антитела, гуманизованного антитела и/или канинизированного антитела для улучшения аффинности или других характеристик антитела.

Термин "scFv" относится к одноцепочечным фрагментам переменных доменов. Молекулы scFv получают путем связывания переменного домена легкой и/или тяжелой цепи с помощью короткого соединяющего пептида. В работе Bird et al. (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins", *Science* 242:423-426) описан пример соединяющих пептидов, которые соединяют мостиком примерно 3,5 нм между карбоксильным концом одного переменного домена и аминоконцом другого переменного домена. Были разработаны и применяются линкеры с другими последовательностями (Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", *Science* 242:423-426). В свою очередь, линкеры можно модифицировать для дополнительных функций, таких как присоединение лекарственных средств или прикрепление к твердым подложкам. Одноцепочечные варианты можно получить либо рекомбинантно, либо синтетически. Для синтетического получения scFv можно применять автоматизированный синтезатор. Для рекомбинантного получения scFv подходящую плазмиду, содержащую полинуклеотид, который кодирует scFv, можно ввести в подходящую клетку-хозяина, либо эукариотическую, такую как дрожжевые клетки, клетки растения, насекомого или млекопитающих, либо прокариотическую, такую как *E. coli*. Полинуклеотиды, кодирующие представляющий интерес scFv, можно получить обычными манипуляциями, такими как лигирование полинуклеотидов. Полученный в результате scFv можно выделить с помощью стандартных методик очистки белка, известных из уровня техники.

Настоящее изобретение, в частности, относится к гуманизированным вариантам антител к LAG-3 по настоящему изобретению и к мультиспецифическим связывающим молекулам, содержащим их. Термин "гуманизованное" антитело обозначает химерную молекулу, обычно полученную с помощью рекомбинантных методик, имеющую эпитопсвязывающий сайт иммуноглобулина от не относящихся к че-

ловеку вида и остальную иммуноглобулиновую структуру молекулы, которая основана на структуре и/или последовательности иммуноглобулина человека. Эпитопсвязывающий сайт может содержать либо полные вариабельные домены, слитые на константных доменах, либо только CDR, привитые на соответствующие каркасные участки в вариабельных доменах. Эпитоп-связывающие сайты могут быть дикого типа или модифицированы одной или несколькими аминокислотными заменами. Это устраняет константный участок в качестве иммуногена у людей, но возможность иммунного ответа на чужеродный вариабельный участок сохраняется (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). В другом подходе основное внимание уделяется не только обеспечению наличия константных участков человеческого происхождения, но и модификации вариабельных участков, а также изменению их формы на как можно более близкую к человеческой форме. Известно, что вариабельные участки как тяжелых, так и легких цепей содержат три CDR, которые варьируют в зависимости от рассматриваемых антигенов и определяют связывающую способность, фланкированные четырьмя каркасными участками (FR), которые относительно консервативны у заданного вида и которые предположительно обеспечивают каркас для CDR. При получении отличных от человеческих антител к конкретному антигену вариабельные участки можно "переформировать" или "гуманизировать" путем прививки CDR, полученных из отличного от человеческого антитела, на FR, присутствующие в подлежащем модификации человеческом антителе. Применение такого подхода к различным антителам рассмотрено в работе Sato, K. et al. (1993) "Reshaping A Human Antibody To Inhibit The Interleukin 6-Dependent Tumor Cell Growth", Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity", Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation", Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity", Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo", Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p 185her 2 Antibody For Human Cancer Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; и Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen", J. Immunol. 148:1149-1154. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гуманизированные антитела сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное мышинное антитело, которое содержит все шесть CDR из мышинных антител). В соответствии с другими вариантами осуществления гуманизированные антитела имеют один или несколько CDR (один, два, три, четыре, пять или шесть), которые изменены по их аминокислотной последовательности(ям) относительно исходного антитела, которые также называют одним или несколькими CDR, "которые являются производными от" одного или нескольких CDR из исходного антитела (т.е. являются производными от таких CDR, которые получены благодаря сведениям об аминокислотных последовательностях таких CDR и т.д.). Полинуклеотидную последовательность, которая кодирует вариабельный домен антитела, можно применять для создания таких производных и улучшения аффинности или других характеристик таких антител. Общий принцип гуманизации антитела предусматривает сохранение основной последовательности эпитопсвязывающей части антитела при замене оставшейся нечеловеческой части антитела на последовательности человеческого антитела. Существует четыре общих стадии гуманизации моноклонального антитела. Эти стадии следующие:

- (1) определение нуклеотидной и прогнозируемой аминокислотной последовательности вариабельных доменов легких и тяжелых цепей исходного антитела,
- (2) конструирование гуманизированного антитела или канинизированного антитела, т. е. принятие решения о том, какой каркасный участок антитела применять в процессе гуманизации или канинизации,
- (3) фактические методологии/методики гуманизации или канинизации и
- (4) трансфекция и экспрессия гуманизированного антитела. См., например, патенты США №№ 4816567, 5807715, 5866692 и 6331415.

Эпитопсвязывающий сайт молекул по настоящему изобретению может содержать полный вариабельный домен, слитый с константным доменом, или только определяющие комплементарность участки (CDR) такого вариабельного участка, привитые к соответствующим каркасным участкам. Эпитопсвязывающие сайты могут быть дикого типа или модифицированы одной или несколькими аминокислотными заменами. Это устраняет константный участок в качестве иммуногена у людей, но возможность иммунного ответа на чужеродный вариабельный домен сохраняется (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). В другом подходе основное внимание уделяется не только обеспечению наличия константных участков человеческого происхождения, но и модификации вариабельных доменов, а также изменению их формы на как можно более близкую к человеческой форме. Известно, что вариабельные домены как тяжелых, так и легких цепей содержат три определяющий комплементарность уча-

стка (CDR), которые варьируют в зависимости от рассматриваемых антигенов и определяют связывающую способность, фланкированные четырьмя каркасными участками (FR), которые относительно консервативны у заданного вида и которые предположительно обеспечивают каркас для CDR. При получении отличных от человеческих антител к конкретному антигену переменные домены можно "переформировать" или "гуманизировать" путем прививки CDR, полученных из отличного от человеческого антитела, на FR, присутствующие в подлежащем модификации человеческом антителе. Применение такого подхода к различным антителам рассмотрено в работе Sato, K. et al. (1993) *Cancer Res* 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity", *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation", *Protein Engineering* 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity", *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo", *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p 185her 2 Antibody For Human Cancer Therapy", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:4285-4289; и Co, M.S. et al (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen", *J. Immunol.* 148:1149-1154. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гуманизированные антитела сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное мышинное антитело, которое содержит все шесть CDR из мышинных антител). В соответствии с другими вариантами осуществления гуманизированные антитела имеют один или несколько CDR (один, два, три, четыре, пять или шесть), которые различаются по последовательности относительно исходного антитела.

Был описан ряд "гуманизированных" молекул антител, содержащих эпитопсвязывающий сайт, полученный из отличного от человеческого иммуноглобулина, включая химерные антитела, имеющие переменный домен грызуна или модифицированный переменный домен грызуна и ассоциированный с ним определяющие комплементарность участки (CDR), слитые с константными доменами человека (см., например, Winter et al. (1991) "Man-made Antibodies", *Nature* 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. (1987) "Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1 A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen", *J. Immunol.* 138:4534-4538, и Brown et al. (1987) "Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody", *Cancer Res.* 47:3577-3583). В других источниках описаны CDR грызунов, привитые в поддерживающий каркасный участок (FR) человека перед слиянием с соответствующим константным доменом человеческого антитела (см., например, Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity", *Science* 239:1534-1536; и Jones et al. (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse", *Nature* 321:522-525). В другом источнике описаны CDR грызунов, поддерживаемые рекомбинантно венчурными каркасными участками грызунов. См., например, публикацию европейского патента № 519596. Такие "гуманизированные" молекулы сконструированы для минимизации нежелательного иммунологического ответа на молекулы антител грызунов к антителу человека, что ограничивает продолжительность и эффективность терапевтических применений таких фрагментов у принимающих такой препарат людей. Другие способы гуманизации антител, которые также можно использовать, раскрыты в работе Daugherty et al. (1991) "Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins", *Nucl. Acids Res.* 19:2471-2476, и в патентах США №№ 6180377, 6054297, 5997867 и 5866692.

II. Рецепторы Fc γ (Fc γ R)

Домены CH2 и CH3 двух тяжелых цепей взаимодействуют с образованием Fc-участка, который является доменом, который распознается клеточными рецепторами Fc, в том числе без ограничения гамма-рецепторами Fc (Fc γ R). Применяемый в контексте настоящего документа термин "Fc-участок" применяют для обозначения C-концевого участка тяжелой цепи IgG. Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 иллюстративного IgG1 человека представляет собой (SEQ ID NO: 1):

```

231      240      250      260      270      280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
          290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
          340      350      360      370      380
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
          390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
          440      447
ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

которая пронумерована согласно EU системе нумерации по Kabat, где X является лизином (K) или отсутствует.

Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 иллюстративного IgG2 человека представляет собой (SEQ ID NO: 2):

```

231      240      250      260      270      280
APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD
          290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA
          340      350      360      370      380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE
          390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
          440      447
ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

которая пронумерована согласно EU системе нумерации по Kabat, где X является лизином (K) или отсутствует.

Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 иллюстративного IgG3 человека представляет собой (SEQ ID NO: 3):

```

231      240      250      260      270      280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD
          290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
          340      350      360      370      380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
          390      400      410      420      430
WESSGQPENN YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVME
          440      447
ALHNRFTQKS LSLSPGX

```

которая пронумерована согласно EU системе нумерации по Kabat, где X является лизином (K) или отсутствует.

Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 иллюстративного IgG4 человека представляет собой (SEQ ID NO: 4):

```

231      240      250      260      270      280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
          290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
          340      350      360      370      380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
          390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME
          440      447
ALHNHYTQKS LSLSLGX

```

которая пронумерована согласно EU системе нумерации по Kabat, где X является лизином (K) или отсутствует.

По всему настоящему описанию нумерация остатков в константном участке тяжелой цепи IgG соответствует EU системе нумерации по Kabat et al., SEQUENCES OF Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NIH, MD (1991) ("Kabat"), явным образом включенной в настоящий документ посредством ссылок. "EU система нумерации по Kabat" относится к нумерации EU антитела IgG1 человека. Аминокислоты из переменных доменов зрелых тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов обозначены по положению аминокислоты в цепи, а CDR указан согласно определению по Kabat (будет понятно, что CDR_{H1}, согласно определению по Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) "Canonical structures for the

hypervariable regions of immunoglobulins", J. Mol. Biol. 196:901-917) начинается на пять остатков раньше). Kabat описал многочисленные аминокислотные последовательности для антител, определил аминокислотную консенсусную последовательность для каждой подгруппы и присвоил каждой аминокислоте номер остатка. Схема нумерации по Kabat можно расширить на антитела, не включенные в его сборник, путем выравнивания рассматриваемого антитела с одной из консенсусных последовательностей по Kabat с учетом консервативных аминокислот. Этот способ присвоения номеров остатков стал стандартным в настоящей области техники и позволяет легко выявить аминокислоты в эквивалентных положениях у разных антител, в том числе у химерных или гуманизированных вариантов. Например, аминокислота в положении 50 легкой цепи антитела человека занимает эквивалентное положение аминокислоте в положении 50 легкой цепи антитела мыши.

По ряду различных положений в пределах константных участках антитела наблюдались полиморфизмы (например, по положениям Fc, в том числе без ограничения положениям 270, 272, 312, 315, 356 и 358, пронумерованным согласно EU системе нумерации по Kabat), и, следовательно, могут иметь место небольшие различия между представленной последовательностью и последовательностями, известными из уровня техники. Были хорошо охарактеризованы полиморфные формы иммуноглобулинов человека. В настоящее время известны 18 Gm аллотипов: G1m (1, 2, 3, 17) или G1m (a, X, f, z), G2m (23) или G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) или G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., "The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation", Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). В частности, предполагается, что антитела по настоящему изобретению могут включать любой аллотип, изоаллотип или гаплотип любого гена иммуноглобулина и не ограничены аллотипом, изоаллотипом или гаплотипом последовательностей, представленных в настоящем документе. Кроме того, в некоторых системах экспрессии C-концевой аминокислотный остаток (выделен жирным выше) домена CH3 может быть удален посттрансляционно. Соответственно, C-концевой остаток домена CH3 является необязательным аминокислотным остатком в связывающих LAG-3 молекулах по настоящему изобретению. В частности, настоящее изобретение относится к связывающим LAG-3 молекулам без C-концевого остатка домена CH3. Также, в частности, настоящее изобретение относится к таким конструкциям, которые содержат C-концевой остаток лизина домена CH3.

Активирующие и ингибирующие сигналы трансдуцируются при лигировании Fc-участка с клеточным рецептором Fc (FcγR). Способность такого лигирования приводить к диаметрально противоположным функциям проистекает из структурных различий среди различных изоформ рецепторов. Различные ответы обуславливают два различных домена в цитоплазматических сигнальных доменах рецептора, называемые иммунорецепторными тирозиновыми активирующими мотивами (ITAM) и иммунорецепторными тирозиновыми ингибирующими мотивами (ITIMs). Привлечение различных цитоплазматических ферментов в такие структуры обуславливает результат FcγR-опосредованных клеточных ответов. К ITAM-содержащим комплексам FcγR относятся FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIA, тогда как к ITIM-содержащим комплексам относится только FcγRIIB. Человеческие нейтрофилы экспрессируют ген FcγRIIA. Группировка FcγRIIA посредством иммунных комплексов или сшивания со специфическими антителами способствует агрегации ITAM с рецептор-ассоциированными киназами, которые облегчают фосфорилирование ITAM. Фосфорилирование ITAM выполняет роль сайта докинга для Syk-киназы, активация которой приводит в результате к активации последующих субстратов (например, PI₃K). Клеточная активация приводит к высвобождению провоспалительных медиаторов. Ген FcγRIIB экспрессируется на В-лимфоцитах; его внеклеточный домен на 96% идентичен FcγRIIA и связывает комплексы IgG неразличимым образом. Наличие ITIM в цитоплазматическом домене FcγRIIB определяет этот ингибирующий подкласс FcγR.

Недавно была установлена молекулярная основа такого ингибирования. При совместном лигировании с активирующим FcγR, ITIM в FcγRIIB становится фосфорилированным и притягивает домен SH2 инозитолполифосфат-5'-фосфатазы (SHIP), который гидролизует фосфоинозитоловые мессенджеры, высвобождаемые в результате активации ITAM-содержащей FcγR-зависимой тирозинкиназы, в результате предотвращается приток внутриклеточного Ca⁺⁺. Таким образом, перекрестное сшивание FcγRIIB ослабляет активирующий ответ на лигирование FcγR и ингибирует клеточную ответную реакцию. Следовательно, активация В-клеток, пролиферация В-клеток и секреция антител прекращаются.

III. Биспецифические антитела, мультиспецифические диатела и диатела DART®

Функциональность антител может быть повышена путем создания мультиспецифических молекул на основе антител, которые могут одновременно связывать два отдельных и разных антигена (или различные эпитопы одного и того же антигена), и/или путем создания молекулы на основе антител, имеющей более высокую валентность (т. е. более двух сайтов связывания) для одного эпитопа и/или антигена.

Для получения молекул, обладающих большими функциональными возможностями, чем природные антитела, был разработан широкий спектр форматов рекомбинантных биспецифических антител (см., например, РСТ публикации WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), большинство из которых предусматривают при-

менение линкерных пептидов либо для слияния дополнительного эпитоп-связывающего фрагмента (например, scFv, VL, VH и т.д.) с остовом антитела или в остовах антитела (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM), либо для слияния множества эпитопсвязывающих фрагментов (например, двух Fab-фрагментов или scFvs). Альтернативные форматы предусматривают применение линкерных пептидов для слияния эпитоп-связывающего фрагмента (например, scFv, VL, VH и т.д.) с доменом димеризации, таким как домен СН2-СН3, или альтернативными полипептидами (WO 2005/070966, WO 2006/107786А WO 2006/107617А, WO 2007/046893). Как правило, такие подходы предусматривают компромиссы и баланс преимуществ и недостатков. Например, в РСТ публикациях WO 2013/174873, WO 2011/133886 и WO 2010/136172 раскрыто, что применение линкеров может вызывать проблемы в терапевтических планах, и предложено триспецифическое антитело, в котором домены CL и CH1 переключены из их соответствующих природных положений, а домены VL и VH сделаны разнообразными (WO 2008/027236, WO 2010/108127) для обеспечения им возможности связываться с более чем одним антигеном. Таким образом, в раскрытых в этих документах молекулах специфичность связывания принесена в жертву способности связывать дополнительные виды антигенов. В РСТ публикациях WO 2013/163427 и WO 2013/119903 раскрыта модификация домена СН2 для включения аддукта слитого белка, содержащего связывающий домен. В документе отмечается, что домен СН2, вероятно, играет лишь минимальную роль в опосредовании эффекторной функции. В РСТ публикациях WO 2010/028797, WO 2010028796 и WO 2010/028795 раскрыты рекомбинантные антитела, Fc-участки которых были заменены дополнительными доменами VL и VH с образованием трехвалентных связывающих молекул. В РСТ публикациях WO 2003/025018 и WO2003012069 раскрыты рекомбинантные диатела, отдельные цепи которых содержат домены scFv. В РСТ публикации WO 2013/006544 раскрыты мультиспецифические молекулы Fab, которые синтезируются в виде единой полипептидной цепи, а затем подвергаются протеолизу с образованием на выходе гетеродимерных структур. Таким образом, у раскрытых в этих документах молекул полную или частичную способность опосредовать эффекторную функцию принесена в жертву способности связывать дополнительные виды антигенов. В РСТ публикациях WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 и WO 1991/003493 раскрыто добавление дополнительных связывающих доменов или функциональных групп к антителу или части антитела (например, добавление диатела к легкой цепи антитела, или добавление дополнительных доменов VL и VH к легким и тяжелым цепям антитела, или добавление гетерологичного слитого белка, или связывание нескольких доменов Fab друг с другом в цепь). Таким образом, у раскрытых в этих документах молекул нативная структура антитела принесена в жертву способности связывать дополнительные виды антигенов.

Кроме того, в уровне техники отмечалась возможность получения диател, которые отличаются от таких природных антител способностью связывать два или более различных видов эпитопов (т. е. характеризуются биспецифичностью или мультиспецифичностью в дополнение к двухвалентности или многовалентности) (см., например, Holliger et al. (1993) "Diabodies: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388/WO 02/02781 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20): 19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange", Protein Engineering 14(2): 1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P. A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy", Cancer Res. 69(12):4941-4944).

Конструкция диатела основана на производном антитела, известном как одноцепочечный фрагмент варибельного домена (scFv). Такие молекулы получают путем связывания варибельных доменов легкой и/или тяжелой цепи с помощью короткого соединяющего пептида. В свою очередь, линкеры можно модифицировать для дополнительных функций, таких как присоединение лекарственных средств или прикрепление к твердым подложкам. Одноцепочечные варианты можно получить либо рекомбинантно, либо синтетически. Для синтетического получения scFv можно применять автоматизированный синтезатор. Для рекомбинантного получения scFv подходящую плазмиду, содержащую полинуклеотид, который кодирует scFv, можно ввести в подходящую клетку-хозяина, либо эукариотическую, такую как дрожжевые клетки, клетки растения, насекомого или млекопитающих, либо прокариотическую, такую как *E. coli*. Полинуклеотиды, кодирующие представляющий интерес scFv, можно получить обычными манипуляциями, такими как лигирование полинуклеотидов. Полученный в результате scFv можно выделить с помощью стандартных методов очистки белка, известных из уровня техники.

Создание немоноспецифических диател дает значительное преимущество перед антителами, включая без ограничения способность совместно лигировать и совместно локализовать клетки, которые экс-

прессии различных эпитопов. Таким образом, биспецифические диатела имеют широкий спектр применений, в том числе в терапии и иммунодиагностике. Биспецифичность обеспечивает большую гибкость в конструировании и разработке диатела для различных задач, в обеспечении повышенной avidности к мультимерным антигенам, в перекрестном сшивании различных антигенов и в направленном нацеливании на конкретные типы клеток, исходя из наличие обоих целевых антигенов. Благодаря их повышенной валентности, низким скоростям диссоциации и быстрому выведению из кровотока (для диател небольших размеров, на уровне или ниже ~50 кДа), для известных из уровня техник молекул диател также было продемонстрировано особое применение в области визуализации опухоли (Fitzgerald et al. (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichiapastoris", Protein Eng. 10:1221).

Биспецифичность диател привела к их применению для совместного лигирования различных клеток, например, перекрестного сшивания цитотоксических Т-клеток с опухолевыми клетками (Staerz et al. (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By TCells", Nature 314:628-631, и Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", Protein Eng. 9:299-305; Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies", Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). Альтернативно, или дополнительно, биспецифические диатела можно применять для совместного лигирования рецепторов на поверхности различных клеток или на одной клетке. Совместное лигирование различных клеток и/или рецепторов полезно для модулирования эффекторных функций и/или передачи сигналов у иммунной клетки. Мультиспецифические молекулы (например, биспецифические диатела), содержащие эпитоп-связывающие сайты, могут быть направлены на поверхностную детерминанту любой иммунной клетки, такую как B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA (CD272), CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70 (CD27L), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD94 (KLRD1), CD137 (4-1BB), CD137L (4-1BBL), CD226, CTLA-4 (CD152), галектин-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS (CD278), ICOSL (CD275), рецептор активации киллеров (KIR), LAG-3 (CD223), LIGHT (TNFSF14, CD258), MHC I или II класса, NKG2a, NKG2d, OX40 (CD134), OX40L (CD134L), PD1H, PD-1 (CD279), PD-L1 (B7-H1, CD274), PD-L2 (B7-CD, CD273), PVR (NECL5, CD155), SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 (HAVCR2) и/или VISTA (PD-1H), которые экспрессируются на Т-лимфоцитах, натуральных киллерах (NK), антигенпрезентирующих клетках или других мононуклеарных клетках. Так, в частности, эпитопсвязывающие сайты, направленные на рецептор клеточной поверхности, который участвует в регуляции иммунной контрольной точки (или ее лиганда), полезны для создания биспецифических или мультиспецифических связывающих молекул, которые антагонизируют или блокируют передачу ингибирующего сигнала молекулами иммунной контрольной точки и тем самым стимулируют, повышают или усиливают иммунные ответы у субъекта. К молекулам, участвующим в регуляции иммунных контрольных точек, относятся без ограничения B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, галектин-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC I или II класса, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 и/или VISTA.

Тем не менее, вышеупомянутые преимущества обходятся высокой ценой. Для образование таких немоноспецифических диател необходима успешная сборка двух или более разных и различных полипептидов (т.е. для такого образования необходимо, чтобы диатела образовывались посредством гетеродимеризации полипептидных цепей различных видов). Этот факт сильно отличает их от моноспецифических диател, которые образуются посредством гомодимеризации идентичных полипептидных цепей. Поскольку должны быть представлены по меньшей мере два разнородных полипептида (т. е. полипептиды двух видов) для образования немоноспецифического диатела, а также поскольку гомодимеризация таких полипептидов приводит к получению неактивных молекул (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588), получение таких полипептидов необходимо осуществлять таким образом, чтобы предотвратить ковалентное связывание между полипептидами одного вида (т.е. предотвратить гомодимеризацию) (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588). Таким образом, в уровне техники было раскрыто нековалентное связывание таких полипептидов (см., например, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Lu D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20): 19665-19672).

Тем не менее, из уровня техники известно, что биспецифические диатела, состоящие из нековалентно связанных полипептидов, являются нестабильными и легко диссоциируют на нефункциональные мономеры (см., например, Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Anti-

tumor Activity", *J. Biol. Chem.* 280(20): 19665-19672).

Ввиду этой проблемы, в области техники удалось разработать стабильные, ковалентно связанные гетеродимерные немоноспецифические диатела, называемые диателами DART® (Dual Affinity Re-Targeting Reagents - целенаправленные реагенты с двойной аффинностью); см., например, патентные публикации США №№ 2013-0295121, 2010-0174053 и 2009-0060910; публикации европейских патентов №№ EP 2714079, EP 2601216, EP 2376109, EP 2158221 и PCT публикации WO 2012/162068, WO 2012/018687, WO 2010/080538, WO 2008/157379, WO 2006/113665 и Sloan, D.D. et al. (2015) "Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells", *PLoS Pathog.* 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233; Al Hussaini, M. et al. (2015) "Targeting CD123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform", *Blood* 127(1): 122-131; Chichili, G.R. et al. (2015) "A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates", *Sci. Transl. Med.* 7(289):289ra82; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma", *Blood* 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold", *Arthritis Rheum.* 62(7): 1933-1943; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion", *J. Mol. Biol.* 399(3):436-449; Marvin, J.S. et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies", *Acta Pharmacol. Sin.* 26:649-658; Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27; Holliger, P. et al. (1993) "Diabodies: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 90:6444-6448. Такие диатела содержат два или более ковалентно связанных в комплекс полипептида и предусматривают включение способами инженерии одного или нескольких цистеиновых остатков в каждом из используемых видов полипептида, которые обеспечивают образование дисульфидных связей и тем самым ковалентно связывают две полипептидные цепи. Например, было показано, что добавление цистеинового остатка к С-концу таких конструкций позволяет образовать дисульфидную связь между полипептидными цепями, стабилизируя полученный в результате гетеродимер без вмешательства в характеристики связывания двухвалентной молекулы. Каждый из двух полипептидов простейшего биспецифического диатела DART® содержит три домена. Первый полипептид содержит (в направлении от N-конца к С-концу):

- (i) первый домен, который содержит участок связывания переменного домена легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1),
- (ii) второй домен, который содержит участок связывания переменного домена тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), и
- (iii) третий домен, который содержит цистеиновый остаток (или цистеин-содержащий домен) и способствующий образованию гетеродимера домен, который способствует гетеродимеризации со вторым полипептидом диатела и ковалентно связывает первый и второй полипептид диатела друг с другом.

Второй полипептид содержит (в направлении от N-конца к С-концу):

- (i) первый домен, который содержит участок связывания переменного домена легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2),
- (ii) второй домен, который содержит участок связывания переменного домена тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), и
- (iii) третий домен, который содержит цистеиновый остаток (или цистеинсодержащий домен) и комплементарный способствующий образованию гетеродимера домен, который образует комплекс со способствующим образованию гетеродимера доменом первой полипептидной цепи для того, чтобы способствовать гетеродимеризации с первой полипептидной цепью.

Цистеиновый остаток (или цистеин-содержащий домен) третьего домена второй полипептидной цепи способствует образованию ковалентной связи второй полипептидной цепи с первой полипептидной цепью диатела. Такие молекулы являются стабильными, высокоактивными и обладают способностью одновременно связывать два или более антигенов. В соответствии с одним вариантом осуществления третьи домены каждого из первого и второго полипептидов содержат цистеиновый остаток, который предназначен для связывания полипептидов друг с другом посредством дисульфидной связи. На фиг. 1 представлено схематическое изображение такого диатела, в котором используются способствующие образованию гетеродимера домены с E-спиралью/К-спиралью и цистеинсодержащий линкер для ковалентного связывания. На фиг. 2 и 3А-3С показано, что один или оба полипептида могут дополнительно обладать последовательностью домена СН2-СН3, так чтобы комплексообразование между двумя полипептидами диатела формировало Fc-участок, который способен связываться с рецептором Fc у клеток (таких как В-лимфоциты, дендритные клетки, натуральные киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и тучные клетки). Как более подробно представлено ниже, домены СН2 и/или СН3 таких полипептидных цепей не обязательно должны быть идентичными по последовательности, и преимущественно

но они модифицированы таким образом, чтобы это содействовало комплексообразованию между двумя полипептидными цепями.

Было описано множество вариантов таких молекул (см., например, патентные публикации США №№ 2015/0175697, 2014/0255407, 2014/0099318, 2013/0295121, 2010/0174053 и 2009/0060910; публикации европейских патентов №№ EP 2714079, EP 2601216, EP 2376109, EP 2158221 и PCT публикации WO 2012/162068, WO 2012/018687, WO 2010/080538). Такие содержащие Fc-участок диатела DART® могут содержать две пары полипептидных цепей. Первая полипептидная цепь содержит (в направлении от N-конца к C-концу):

(i) первый домен, который содержит участок связывания переменного домена легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1),

(ii) второй домен, который содержит участок связывания переменного домена тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2),

(iii) третий домен, который содержит цистеиновый остаток (или цистеинсодержащий домен) и способствует гетеродимеризации со вторым полипептидом диатела и ковалентно связывает первый и второй полипептид диатела друг с другом, и

(iv) домен CH2-CH3.

Второй полипептид содержит (в направлении от N-конца к C-концу):

(i) первый домен, который содержит участок связывания переменного домена легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2),

(ii) второй домен, который содержит участок связывания переменного домена тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), и

(iii) третий домен, который содержит цистеиновый остаток (или цистеинсодержащий домен) и способствующий образованию гетеродимера домен, который способствует гетеродимеризации с первой полипептидной цепью.

В этом случае два первых полипептида образуют комплекс друг с другом с образованием Fc-участка. На фиг. 3A-3C представлены схематические изображения трех вариантов таких диател с использованием различных способствующих образованию гетеродимера доменов.

Другие содержащие Fc-участок диатела DART® могут содержать три полипептидные цепи. Первый полипептид таких диател DART® содержит три домена:

(i) VL1-содержащий домен,

(ii) VL2-содержащий домен и

(iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3.

Второй полипептид таких диател DART® содержит:

(i) VL2-содержащий домен,

(ii) VH1-содержащий домен и

(iii) домен, который способствует гетеродимеризации и ковалентному связыванию первой полипептидной цепи диатела. Третий полипептид таких диател DART® содержит последовательность CH2-CH3.

Таким образом, первая и вторая полипептидные цепи таких диател DART® ассоциируются друг с другом с образованием сайт связывания VL1/VH1, который способен связываться с эпитопом, а также сайта связывания VL2/VH2, который способен связываться со вторым эпитопом. Такие более сложные молекулы DART® также имеют цистеинсодержащие домены, функция которых заключается в образовании ковалентно связанного комплекса. Таким образом, первый и второй полипептиды связаны друг с другом посредством дисульфидной связи с участием цистеиновых остатков в их соответствующих третьих доменах. Следует отметить, что первая и третья полипептидные цепи объединяются в комплекс друг с другом с образованием Fc-участка, который стабилизирован дисульфидной связью. На фиг. 4A-4B представлены схематические изображения таких диател, содержащих три полипептидные цепи.

Еще одни содержащие Fc-участки диатела DART® могут содержать пять полипептидных цепей, которые могут содержать участки связывания из переменных доменов легкой и тяжелой цепей от трех или менее различных иммуноглобулинов (называемые VL1/VH1, VL2/VH2 и VL3/VH3). Например, первая полипептидная цепь таких диател может содержать:

(i) VH1-содержащий домен,

(ii) CH1-содержащий домен и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3.

Вторая и пятая полипептидные цепи таких диател могут содержать:

(i) VL1-содержащий домен и

(ii) CL-содержащий домен.

Третья полипептидная цепь таких диател может содержать:

(i) VH1-содержащий домен,

(ii) CH1-содержащий домен,

(iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3,

(iv) VL2-содержащий домен,

(v) VH3-содержащий домен и

(vi) способствующий образованию гетеродимера домен, где способствующие образованию гетеродимера домены способствуют димеризации третьей цепи с четвертой цепью.

Четвертый полипептид таких диател может включать:

- (i) VL3-содержащий домен,
- (ii) VH2-содержащий домен и
- (iii) домен, который способствует гетеродимеризации и ковалентному связыванию третьей полипептидной цепи диатела.

В этом случае первый и третий полипептиды образуют комплекс друг с другом с образованием Fc-участка. Такие более сложные молекулы DART® также имеют цистеин-содержащие домены, функция которых заключается в образовании ковалентно связанного комплекса, так чтобы каждая полипептидная цепь была связана по меньшей мере с одной присоединяемой полипептидной цепью посредством дисульфидной связи с участием цистеиновых остатков. Предпочтительно такие домены расположены в порядке от N-конца к C-концу. На фиг. 5 представлены схематические изображения таких диател, содержащих пять полипептидных цепей.

Из уровня техники известны альтернативные конструкции для задач, где требуется четырехвалентная молекула, но не требуется Fc, включая без ограничения четырехвалентные тандемные антитела, также называемые "TandAb" (см., например, патентные публикации США №№ 2005-0079170, 2007-0031436, 2010-0099853, 2011-020667 2013-0189263; публикации европейских патентов №№ EP 1078004, EP 2371866, EP 2361936 и EP 1293514; PCT публикации WO 1999/057150, WO 2003/025018 и WO 2013/013700), которые образованы в результате гомодимеризации двух идентичных цепей, каждая из которых обладает доменом VH1, VL2, VH2 и VL2.

Недавно были описаны трехвалентные структуры, включающие два связывающих домена по типу диатела и один домен отличного от диатела типа и Fc-участок (см., например, PCT заявку PCT/US15/33076 под названием "Триспецифические связывающие молекулы и способы их применения (Tri-Specific Binding Molecules and Methods of Use Thereof)", поданную 29 мая 2015 г.; и PCT/US 15/33081 под названием "Триспецифические связывающие молекулы, которые специфически связываются со множеством антигенов злокачественных опухолей, и способы их применения (Tri-Specific Binding Molecules That Specifically Bind to Multiple Cancer Antigens and Methods of Use Thereof)", поданную 29 мая 2015 г.). Такие трехвалентные молекулы можно использовать для создания моноспецифических, биспецифических или триспецифических молекул. На фиг. 6A-6F представлены схематические изображения таких трехвалентных молекул, содержащих 3 или 4 полипептидные цепи.

IV. Связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению

К предпочтительным связывающим LAG-3 молекулам по настоящему изобретению относятся антитела, диатела, ViTE и т.д., и они способны связываться со сплошной или дискретной (например, конформационной) частью (эпитопом) LAG-3 человека. Связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению будут предпочтительно также характеризоваться способностью связываться с молекулами LAG-3 одного или нескольких отличных от человека видов, в частности, приматов (и особенно таких приматов, как яванский макак). Типичный полипептид LAG-3 человека (последовательность в NCBI NP_002277.4, включая сигнальную последовательность из 22 аминокислотных остатков (показанную подчеркнутую) и зрелый белок из 503 аминокислотных остатков) имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 5):

```
MWEAQFLGLL FLQPLWVAPV KPLQPGAEVP VVWAQEGAPA QLPCSPTIPL
QDLSLLRRAG VTWQHQPDSG PPAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRRRYT
VLSVGGGLR SGRLPLQPRV QLDERGRQRG DFSLWLRPAR RADAGEYRAA
VHLRDRALSC RLRRLRGQAS MTASPPGSLR ASDWVILNCS FSRPDRPASV
HWFNRGQGR VPVRESPHH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG CILTYRDGFN
VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP
PGGGPDLVLT GDNGDFTLRL EDVSAQAGT YTCIIHLQE QLNATVTLAI
ITVTPKSFSG PGSGLKLLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA
QEAQLLSQPW QCQLYQGERL LGAAYFTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL
LLFLILGVLS LLLLVTGAFG FHLWRRQWRP RRFSALEQGI HPPQAQSKIE
ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL
```

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению характеризуются любым (одним или несколькими) из следующих критериев:

- (1) специфически связывает LAG-3 человека в качестве эндогенно экспрессируемого на поверхности простимулированных Т-клеток человека;
- (2) специфически связывает LAG-3 человека с равновесной константой связывания (K_D) 40 нМ или менее;
- (3) специфически связывает LAG-3 человека с равновесной константой связывания (K_D) 0,5 нМ или

менее;

(4) специфически связывает LAG-3 отличного от человека примата (например, LAG-3 яванского макака);

(5) специфически связывает LAG-3 отличного от человека примата с равновесной константой связывания (K_D) 50 нМ или менее;

(6) специфически связывает LAG-3 отличного от человека примата с равновесной константой связывания (K_D) 5 нМ или менее;

(7) ингибирует (т.е. блокирует или препятствует ему) связывание LAG-3 с МНС II класса;

(8) стимулирует иммунный ответ;

(9) стимулирует антигенспецифический Т-клеточный ответ в качестве отдельного средства;

(10) проявляет синергизм с антителом к PD-1, стимулируя антигенспецифический Т-клеточный ответ;

(11) связывает такой же эпитоп LAG-3, что и антитело к LAG-3: LAG-3 mAb 1 или LAG-3 mAb 6, и/или

(12) не конкурирует с антителом к LAG-3 257F (BMS 986016, Medarex/BMS) за связывание с LAG-3 (например, по результатам измерений с помощью анализа Biacore).

Применяемый в контексте настоящего документа термин "антигенспецифический Т-клеточный ответ" относится к ответам, производимым Т-клетками, которые являются результатом стимуляции Т-клетки антигеном, в отношении которого Т-клетка является специфической. К неограничивающим примерам ответов, производимых Т-клеткой при антигенспецифической стимуляции, относятся пролиферация и выработка цитокинов (например, выработку TNF- α , IFN- γ). Способность молекулы стимулировать антигенспецифический Т-клеточный ответ можно определить, например, с помощью описанного в настоящем документе анализа РВМС, простимулированных антигеном энтеротоксина типа В ("SEB") *Staphylococcus aureus*.

Предпочтительные связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению имеют домены VH и/или VL мышиных моноклональных антител к LAG-3: "LAG-3 mAb 1", "LAG-3 mAb 2", "LAG-3 mAb 3", "LAG-3 mAb 4", "LAG-3 mAb 5" и/или "LAG-3 mAb 6", и более предпочтительно имеют 1, 2 или все 3 CDR_H из домена VH и/или 1, 2 или все 3 CDR_L из домена VL таких моноклональных антител к LAG-3. К таким предпочтительным связывающим LAG-3 молекулам относятся биспецифические (или мультиспецифические) антитела, химерные или гуманизированные антитела, BiTe, диатела и т. д. и такие связывающие молекулы, которые имеют вариантыные Fc-участки.

Настоящее изобретение, в частности, относится к связывающим LAG-3 молекулам, содержащим связывающий LAG-3 домен, который имеет:

(A) (1) три CDR_H из домена VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 1 или VL4 hLAG-3 mAb 1;

(2) три CDR_L из домена VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 1;

(3) три CDR_H из домена VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 1 и три CDR_L из домена VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 1;

(4) домен VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 1;

(5) домен VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 1;

(6) домены VH и VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 1;

(B) (1) три CDR_H из домена VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 2;

(2) три CDR_L из домена VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 2;

(3) три CDR_H из домена VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 2 и три CDR_L из домена VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 2;

(4) домен VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 2;

(5) домен VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 2;

(6) домены VH и VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 2;

(C) (1) три CDR_H из домена VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 3;

(2) три CDR_L из домена VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 3;

(3) три CDR_H из домена VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 3 и три CDR_L из домена VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 3;

(4) домен VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 3;

(5) домен VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 3;

(6) домены VH и VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 3;

(D) (1) три CDR_H из домена VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 4;

(2) три CDR_L из домена VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 4;

(3) три CDR_H из домена VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 4 и три CDR_L из домена VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 4;

(4) домен VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 4;

(5) домен VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 4;

(6) домены VH и VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 4;

(E) (1) три CDR_H из домена VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 5;

- (2) три CDR_L из домена VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 5;
 (3) три CDR_H из домена VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 5 и три CDR_L из домена VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 5;
 (4) домен VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 5;
 (5) домен VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 5;
 (6) домены VH и VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 5;
 (F) (1) три CDR_H из домена VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 6;
 (2) три CDR_L из домена VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 6;
 (3) три CDR_H из домена VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 6 и три CDR_L из домена VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 6;
 (4) домен VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 6;
 (5) домен VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 6;
 (6) домены VH и VL антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 6,
 (G) (1) три CDR_L из домена VL антитела к LAG-3, VL4 hLAG-3 mAb 1;
 (2) три CDR_H из домена VH антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 1 и три CDR из домена VL антитела к LAG-3, VL4 hLAG-3 mAb 1; или

который связывается или конкурирует за связывание с эпитопом, который иммуноспецифически связывает LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6.

A. Антитело к LAG, LAG-3 mAb 1

1. Мышиное антитело к антителу человека LAG-3 mAb 1

Аминокислотная последовательность домена VH LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 6) показана ниже (остатки CDR_H показаны подчеркнутыми).

QIQLVQSGPE LKKPGETVVKI SCKASGYTFR NYGMNWVKQA PGKVLKWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFAF SLGTSASTAY LQINILKNEE TATYFCARES
LYDYYSMDYW GQGTSVTVSS
 CDR_H1 из LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:8): NYGMN
 CDR_H2 из LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:9): WINTYTGESTYADDFEG
 CDR_H3 из LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:10): ESLYDYYSMDY

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует домен VH из LAG-3 mAb 1, представляет собой SEQ ID NO: 7 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_H, показаны подчеркнутыми):

cgatccagtg tgggtcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac
 agtcaagatc tcttcaagg cttctgggta taccttcaga aactatggaa
tgaactgggt gaagcaggct ccaggaagg ttttaagt gatgggttg
ataaacacct acactggaga gtcaacatat gctgatgact tcgagggacg
 gtttccttc tcttgggaa cctctgccag cactgcctat ttgcagatca
 acatcctcaa aatgaggac acggctacat attctgtgc aagagaatcc
ctctatgatt actattctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac
 cgtctctca

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 11) (остатки CDR_L показаны подчеркнутыми):

DVVVTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSL LHSDGKTYLNW LLQRPGQSPE
 RLIIYLVSELD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGHFP
YTFGGGTKLE IK
 CDR_L1 of LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:13): KSSQSLHSDGKTYLN
 CDR_L2 of LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:14): LVSELD
 CDR_L3 of LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:15): WQGHFPYT

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует домен VL из LAG-3 mAb 1, представляет собой SEQ ID NO: 12 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_L, показаны подчеркнутыми):

gatggttggtg tgaccagac tccactcact ttgtcgggta ccattggaca
 accagcctcc atctcttga agtcaagtca gagcctctta catagtgatg
gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccagag
 cgctaactct atctgggtgc tgaactggac tctggagtc ctgacaggtt
 cactggcagt gcatcagga cagatttcac actgaaaatc agcagagtg
 aggctgagga tttggagtt tattattgct ggcaaggtag acattttccg
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa

2. Гуманизация антитела к LAG-3 LAG-3 mAb 1 для образования "hLAG-3 mAb 1"

Вышеописанное мышиное антитело к LAG-3, LAG-3 mAb 1, было гуманизировано для демонстрации возможности гуманизации антитела к LAG-3 с целью уменьшения его антигенности при введении принимающему такой препарат человеку. Гуманизация давала на выходе два гуманизированных домена VH, обозначенных в настоящем документе как "VL-1 hLAG-3 mAb 1" и "VH-2 hLAG-3 mAb 1", и четыре

гуманизированных домена VL, обозначенных в настоящем документе как "VL-1 hLAG-3 mAb 1", "VL-2 hLAG-3 mAb 1", "VL-3 hLAG-3 mAb 1" и "VL-4 hLAG-3 mAb 1." Любой из гуманизированных доменов VL может формировать пару с гуманизированными доменами VH. Соответственно любое антитело, содержащее один из гуманизированных доменов VL, соединенный в паре с гуманизированным доменом VH, в общем называют "hLAG-3 mAb 1", а конкретные комбинации гуманизированных доменов VH/VL называют с указанием конкретных доменов VH/VL, например, гуманизированное антитело, содержащее VL-1 hLAG-3 mAb 1 и VL-2 hLAG-3 mAb 1, в частности, называют "hLAG-3 mAb 1 (1.2)".

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из VL-1 hLAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 16) (остатки CDR_H показаны подчеркнутыми):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES
LYDYYSMDYW GQGTIVTVSS

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует VL-1 hLAG-3 mAb 1, представляет собой SEQ ID NO: 17 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_H, показаны подчеркнутыми):

caggtgcaac tggttcaatc cggcgccgag gtgaaaaagc ctggcgcctc
cgtgaaagtg tccgtgaagg catctgggta tacgttcaca aattatggta
tgaactgggt gcgacaggca ccagggcagg gactggaatg gatggggtgg
atcaatactt atacaggcga gactacttat gctgacgatt tcgagggcag
atctgtcttc tccatggaca ccagcgctag taccgcttat ctccagatta
gttctctcaa ggcggaggac acagctgttt attattgtgc ccgcgagagt
ttgtatgact actatagcat ggattactgg ggacaaggta caaccgtgac
agtgagttcc

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из VH-2 hLAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 18) (остатки CDR_H показаны подчеркнутыми):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYFCARES
LYDYYSMDYW GQGTIVTVSS

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует VH-2 hLAG-3 mAb 1, представляет собой SEQ ID NO: 19 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_H, показаны подчеркнутыми):

caggtgcaac tggttcaatc cggcgccgag gtgaaaaagc ctggcgcctc
cgtgaaagtg tccgtgaagg catctgggta tacgttcaca aattatggta
tgaactgggt gcgacaggca ccagggcagg gactggaatg gatggggtgg
atcaatactt atacaggcga gactacttat gctgacgatt tcgagggcag
atctgtcttc tccatggaca ccagcgctag taccgcttat ctccagatta
gttctctcaa ggcggaggac acagctgttt atttctgtgc ccgcgagagt
ttgtatgact actatagcat ggattactgg ggacaaggta caaccgtgac
agtgagttcc

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из VL-1 hLAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 20) (остатки CDR_L показаны подчеркнутыми):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPF
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IK

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует VL-1 hLAG-3 mAb 1, представляет собой SEQ ID NO: 21 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_L, показаны подчеркнутыми):

gatatcgta tgactcagac accactgtca ctgagtgga ccccgaggtca
gcccgctagt atttctgta aatcatcca gtccctcctg catagcgatg
gaaagaccta ttgactgg ctctgcaga aaccaggcca aagtcagag
agattgatct acctcgtttc agaactcgac agtgaggatgc ccgatcgctt
ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg
aggccgagga cgtcgggggt tactactgtt ggcagggtac ccacttcct
tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из VL-2 hLAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 22) (остатки CDR_L показаны подчеркнутыми):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPF
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IK

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует VL-2 hLAG-3 mAb 1, представляет собой SEQ ID NO: 23 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_L, показаны подчеркнутыми):

gatatcgta tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccaggta
 gcccgctagt atttctgta aatcatccca gtcctcctg catagcgatg
gaaagaccta tttgaactgg cttctgcaga gaccaggcca aagtcagag
 agattgatct acctggttc agaactcgac agtggagtgc ccgatcgctt
 ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg
 aggccgagga cgtcggggtt tactactggt ggcagggtac ccacttcct
tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из VL-3 hLAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 24) (остатки CDR_L показаны подчеркнутыми):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQPPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQTHFP
YTFGGGTKVE IK

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует VL-3 hLAG-3 mAb 1, представляет собой SEQ ID NO: 25 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_L, показаны подчеркнутыми):

gatatcgta tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccaggta
 gcccgctagt atttctgta aatcatccca gtcctcctg catagcgatg
gaaagaccta tttgaactgg cttctgcaga aaccaggcca accgccagag
 agattgatct acctggttc agaactcgac agtggagtgc ccgatcgctt
 ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg
 aggccgagga cgtcggggtt tactactggt ggcagggtac ccacttcct
tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из VL-4 hLAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 26) (остатки CDR_L показаны подчеркнутыми):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQTHFP
YTFGGGTKVE IK

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует VL-4 hLAG-3 mAb 1, представляет собой SEQ ID NO: 27 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_L, показаны подчеркнутыми):

gatatcgta tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccaggta
 gcccgctagt atttctgta aatcatccca gtcctcctg catagcgatg
caaagaccta tttgaactgg cttctgcaga aaccaggcca accgccagag
 agattgatct acctggttc agaactcgac agtggagtgc ccgatcgctt
 ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg
 aggccgagga cgtcggggtt tactactggt ggcagggtac ccacttcct
tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa

CDR_{L1} из домена VL, VL-4 hLAG-3 mAb 1, содержит аминокислотную замену глицина на аланин и имеет аминокислотную последовательность: KSSQSLHSDAKTYLN (SEQ ID NO: 28), замененный аланин показан подчеркнутым). Предполагается, что аналогичная замена может быть включена в любой из описанных выше доменов CDR_{L1} LAG-3 mAb 1.

В. Антитело к LAG, LAG-3 mAb 2

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO: 29) (остатки CDR_H показаны подчеркнутыми):

EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFT DYNIHWLRQS HGESLEWIGY
IYPYSGDIGY NQKFKNRATL TVDNSSSTAY MDLRLTSED SAVFYCARWH
RNYFGPWFAY WQGTPVTVS A

CDR_{H1} из LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO:31): DYNIH
 CDR_{H2} VH из LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO:32): YIYPYSGDIGYNQKFKN
 CDR_{H3} VH из LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO:33): WHRNYFGPWFA

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует домен VH из LAG-3 mAb 2, представляет собой SEQ ID NO: 30 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_H, показаны подчеркнутыми):

gaggtccagc ttcagcagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
 agtgaagatt tctgcaaga cttctggata cacatttact gactacaaca
tacactgggtt gaggcagagc catggagaga gccttgagtg gattggatat
atztatcctt acagtgggtga tattggatac aaccagaagt tcaagaacag
 ggccacattg actgtagaca attcctccag cacagcctac atggatctcc
 gcagcctgac atctgaagac tctgcagtct tttactgtgc aagatggcac
aggaactact ttggcccctg gtttgcttac tggggccaag ggactccggt
 cactgtctct gca

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO: 34) (остатки CDR_L показаны подчеркнутыми):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGESYMNWY QQKPGQPPKL
 LIYVVSNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSSEDP
LTFGAGTKLEL K
 CDR_{L1} из LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO:36): KASQSVDYDGESYMN
 CDR_{L2} из LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO:37): VVSNLES
 CDR_{L3} из LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO:38): QQSSEDPL

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует домен VL из LAG-3 mAb 2, представляет собой SEQ ID NO: 35 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_L, показаны подчеркнутыми):

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
 gagggccacc atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg
aaagttatat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc
 ctcatctatg ttgatccaa tctagaatct gggatcccag ccaggtttag
 tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg
 aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtagtga ggatccgctc
 acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa

C. Антитело к LAG, LAG-3 mAb 3

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO: 39) (остатки CDR_H показаны подчеркнутыми):

EVRLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYNIHWVRQS HGQSLEWIGY
IYPYNGDTGY NQKFKTKATL TVDNSSNTAY MELRSLASED SAVYYCTRWS
RNYFGPWFAY WGQGLVTVS A
 CDR_{H1} из LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO:41): DYNIH
 CDR_{H2} из LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO:42): IYPYNGDTGYNQKFKT
 CDR_{H3} из LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO:43): WSRNYFGPWFAY

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует домен VH из LAG-3 mAb 3, представляет собой SEQ ID NO: 40 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_H, показаны подчеркнутыми):

gaggctccggc ttcagcagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
 agtgaagata tctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca
ttcactgggt gaggcagagc catggacaga gccttgagt gattggatat
atttatcctt ataatgggta tactggctac aaccagaagt tcaagaccaa
 ggccacattg actgtagaca attcctcaa cacagcctac atggaactcc
 gcagcctggc atctgaagac tctgcagtct attactgtac aagatgagc
aggaactact ttggccctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt
 cactgtctct gca

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO: 44) (остатки CDR_L показаны подчеркнутыми):

DIVLTQSPST LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGDSYMNWY QQKPGQPPKL
 LIYAAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSSEDP
LTFGAGTKLEL K
 CDR_{L1} из LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO:46): KASQSVDYDGDSYMN
 CDR_{L2} из LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO:47): AASNLES
 CDR_{L3} из LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO:48): QQSSEDPL

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует домен VL из LAG-3 mAb 3, представляет собой SEQ ID NO: 45 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_L, показаны подчеркнутыми):

gacattgtgc tgaccaatc tccaacttct ttggctgtgt ctctagggca
 gagggccacc atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg
atagttatat gaactggtat caacagaaac caggacagcc acccaaactc
 ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct gggatcccag ccaggtttag
 tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg
 aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtagtga ggatccgctc
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa

D. Антитело к LAG, LAG-3 mAb 4

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO: 49) (остатки CDR_H показаны подчеркнутыми):

EVQLHQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFT DYNIHWVKQS HGKSLEWIGY
IYPYNGDAGY NQNFKTKATL TVDNSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCARWN
MNYFGPWFAY WGQGLTVTS A

CDR_H1 из LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO:51): DYNIH

CDR_H2 из LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO:52): YIYPYNGDAGYNQNFKT

CDR_H3 из LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO:53): WNNYFGPWFAY

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует домен VH из LAG-4 mAb 4, представляет собой SEQ ID NO: 50 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_H, показаны подчеркнутыми):

gagggtccagc ttcaccagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
 agtgaagata tctgcaaga cttctggata cactttcact gactacaaca
tacactgggt gaagcagagc catgaaaga gccttgagt gattggatat
atttaccctt acaatggtga tgctggctac aaccagaact tcaagacc
 ggccacattg actgtagaca attcctccag cacagcctac atggagctcc
 gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatggaac
atgaactact ttggccctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt
 cactgtctct gcg

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO: 54) (остатки CDR_L показаны подчеркнутыми):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKKASQSVD YDGVTYINWY QQKPGQPPKL
 LIFAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQSNEDPL
TFGAGTKLEL K

CDR_L1 из LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO:56): KASQSVDYDGVTYIN

CDR_L2 из LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO:7570): AASNLES

CDR_L3 из LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO:58): QSNEDPLT

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует домен VL из LAG-3 mAb 4, представляет собой SEQ ID NO: 55 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_L, показаны подчеркнутыми):

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
 gagggccacc atctctgca aggccagcca aagtgtgat tatgatggtg
ttacttatat caactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaacctc
 ctcatctttg ctgcatccaa tctagaatct gggatcccag ccaggtttag
 tggcagtggt tctgggacag acttcacct caacatccat cctgtggagg
 aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaata ggatccgctc
acgttcgggtg ctgggacca gctggagctg aaa

Е. Антитело к LAG, LAG-3 mAb 5

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO: 59) (остатки CDR_H показаны подчеркнутыми):

EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYNIHWVKQS PGKSLEWIGY
IYPYSGDFGY NQKFKSKATL TVDNSSSTAY MDLRLTSED SAVFYCARWH
RNYFGPWFAY WGQGLTVTS A

CDR_H1 из LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO:61): DYNIH

CDR_H2 из LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO:62): YIYPYSGDFGYNQKFKS

CDR_H3 из LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO:63): WHRNYFGPWFAY

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует домен VH из LAG-3 mAb 5, представляет собой SEQ ID NO: 60 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_H, показаны подчеркнутыми):

gagggtccagc ttcagcagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
 agtgaagatt tctgcaaa cttctggata cacatttact gactacaaca
tacactgggt gaagcagagc cctgaaaga gccttgaatg gattggatat
atttaccctt acagtgtga ttttgatac aaccagaagt tcaagagc
 ggccacattg actgtagaca attcctccag cacagcctac atggatctcc
 gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct ttactgtgc aagatggcac
aggaactact ttggccctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt
 cactgtctct gca

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO: 64) (остатки CDR_L показаны подчеркнутыми):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKKASQSVD YDGESYMNWY QQKPGQPPKL

LIYVVS**NLES** GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YC**QOSSE**DPL
 TFGAGTKLEL K

CDR_{L1} из LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO:66): KASQSVDYDGESYMN

CDR_{L2} из LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO:67): VVS**NLES**

CDR_{L3} из LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO:68): **QOSSE**DPLT

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует домен VL из LAG-3 mAb 5, представляет собой SEQ ID NO: 65 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_L, показаны подчеркнутыми):

gacattgtgc tgaccacaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
 gaggggccacc atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggg
aaagttatat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaactc
 ctcatattatg ttgtttccaa tctagaatct gggatcccag ccaggtttag
 tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg
 aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtagtga ggatccgctc
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa

F. Антитело к LAG, LAG-3 mAb 6

1. Мышиное антитело к антителу человека LAG-3 mAb 6

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO: 69) (остатки CDR_H показаны подчеркнутыми):

EVLL**QQSGPE** LVKPGASVKI PCKASGYTFT DYNMDWVKQS HGESLEWIGD
INPDNGVTIY NQKFEGKATL TVDKSSSTAY MELRSLTSED TAVIYCARE**A**
DYFYFDYWQO GTTLTVSS

CDR_{H1} из LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:71): **DYNMD**

CDR_{H2} из LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:72): **DINPDNGVTIYNQKFE**G

CDR_{H3} из LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:72): **EADYFYFDY**

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует домен VH из LAG-3 mAb 6, представляет собой SEQ ID NO: 70 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_H, показаны подчеркнутыми):

gaggtcctgc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc
 agtgaagata cctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca
tggactgggt gaagcagagc catggagaga gccttgagtg gattggagat
attaatcctg acaatgggtgt tactatctac aaccagaagt ttgagggcaa
 ggccacactg actgtagaca agtccctccag tacagcctac atggagctcc
 gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagagagggc
gattacttct actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc
 ctca

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO: 74) (остатки CDR_L показаны подчеркнутыми):

DIVMTQSHRF MSTSVGDRVS ITCK**ASQDVS** **SVVA**WYQKP GQSPKLLIFS
ASYRYTGVDP RFTGSGSGTD FTFTISSVQA ADLAVIY**COO** **HYSTPWT**FGG
 GTKLEIK

CDR_{L1} из LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:76): **KASQDVSSVVA**

CDR_{L2} из LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:77): **SASYRYT**

CDR_{L3} из LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:78): **QOHYSTPWT**

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует домен VL из LAG-3 mAb 6, представляет собой SEQ ID NO: 75 (нуклеотиды, кодирующие CDR_L, показаны подчеркнутыми):

gacattgtga tgaccagtc tcacagattc atgtccacat cagttggaga
 cagggtcagc atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt tctgtttag
cttggtatca acagaaacca ggacaatctc ctaaattact gattttttcg
gcatcctacc ggtacactgg agtccctgat cgcttcaactg gcagtgatc
 tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct gcagacctgg
 cagtttatta ctgtcagcaa cattatagta ctccgtggac gttcggtgga
 ggaccaagc tggaaatcaa a

2. Гуманизация антитела к LAG-3 LAG-3 mAb 6 для образования "hLAG-3 mAb 6"

Вышеописанное мышиное антитело к LAG-3, LAG-3mAb 6, было гуманизировано для демонстрации возможности гуманизации антитела к LAG-3 с целью уменьшения его антигенности при введении принимающему такой препарат человеку. Гуманизация дала на выходе два гуманизированных домена VH, обозначенных в настоящем документе как "VL-1 hLAG-3 mAb 6" и "VH-2 hLAG-3 mAb 6", и два гуманизированных домена VL, обозначенных в настоящем документе как "VL-1 hLAG-3 mAb 6" и "VL-2 hLAG-3 mAb 6". Любой из гуманизированных доменов VL может формировать пару с любым из гуманизированных доменов VH. Соответственно любое антитело, содержащее один из гуманизированных до-

менов VL, соединенный в паре с гуманизированным доменом VH, в общем называют "hLAG-3 mAb 6", а конкретные комбинации гуманизированных доменов VH/VL называют с указанием конкретных доменов VH/VL, например, гуманизированное антитело, содержащее VL-1 hLAG-3 mAb 6 и VL-2 hLAG-3 mAb 6, в частности, называют "hLAG-3 mAb 6 (1.2)".

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из VL-1 hLAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO: 79) (остатки CDR_H показаны подчеркнутыми):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYNMDWVRQA PGQGLEWMDG
INPDNGVTIY NQKFEGRVTM TTDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCAREEA
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует VL-1 hLAG-3 mAb 6, представляет собой SEQ ID NO: 80 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_H, показаны подчеркнутыми):

caggtccagc tgggtcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcaag
 cgtgaaggtg tctctgcaagg ccagcgggcta caccttcacc gactacaaca
tggactgggt ccgacaggcc ccaggacagg gcctggaatg gatggggac
atcaaccccg acaacggcgt gaccatctac aaccagaaat tcgagggcag
 agtgaccatg accaccgaca ccagcaccag caccgcctac atggaactgc
 ggtccctgcg gagcgacgac accgccgtgt actactgccc cagaggagcc
gactacttot acttcgacta ctggggccag ggcaccacc tgaccgtgtc ctcc

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из VH-2 hLAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO: 81) (остатки CDR_H показаны подчеркнутыми):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYNMDWVRQA PGKGLEWVSD
INPDNGVTIY NQKFEGRFTI SRDNAKNSLY LQMNLSRAED TAVYYCAREEA
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует VH-2 hLAG-3 mAb 6, представляет собой SEQ ID NO: 82 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_H, показаны подчеркнутыми):

gaggtccagc tgggtggaatc tggcgccgga ctggtcaagc ctggcgccag
 cctgagactg agctgcccgt ccagcggcct caccttcagc gactacaaca
tggactgggt ccgacaggcc cctggcaagg gcctggaatg ggtgtccgac
atcaaccccg acaacggcgt gaccatctac aaccagaagt tcgagggcag
 gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac ctgcagatga
 acagcctgcg gcccaggac accgccgtgt actactgccc cagaggagcc
gactacttot acttcgacta ctggggccag ggcaccacc tgaccgtgtc ctcc

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из VL-1 hLAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO: 83) (остатки CDR_L показаны подчеркнутыми):

DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKPK GKAPKLLIYS
ASYRYTGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG
 GTKLEIK

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует VL-1 hLAG-3 mAb 6, представляет собой SEQ ID NO: 84 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_L, показаны подчеркнутыми):

gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcga gcgtgggcca
 cagagtgacc atcacctgtc gggccagcca ggatgtgtcc agcgtggtgg
cttggtatca gcagaagccc ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc
gccagctacc ggtacacagg cgtgccagc agattcagcg gcagcggctc
 cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc gaggacttcg
 ccacctacta ctgccagcag cactacagca cccctggac cttcggcgga
 ggcaccaagc tggaaatcaa g

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из VL-2 hLAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO: 85) (остатки CDR_L показаны подчеркнутыми):

DIVMTQSPSS LSASVGRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKPK GKAPKLLIYS
ASYRYTGVPD RFGSGSGTD FTFTISSLQP EDIAVYYCQQ HYSTPWTFGG
 GTKLEIK

Иллюстративный полинуклеотид, который кодирует VL-2 hLAG-3 mAb 6, представляет собой SEQ ID NO: 86 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR_L, показаны подчеркнутыми):

gacatcgtga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca
 cagagtgacc atcacctgtc gggcccagcca ggatgtgtcc agcgtggtgg
cttggtatca gcagaagccc ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc
ccagctacc ggtacacagg cgtgcccgat agattcagcg gcagcggctc
 cggcaccgac ttcaccttca ccatcagcag cctgcagccc gaggacatcg
 ccgtttacta ctgccagcag cactacagca ccccctggac cttcggcgga
 ggcaccaagc tggaatcaa g

CDR_{L1} из домена VL, VL-1 и VL-2 hLAG-3 mAb 2, содержит аминокислотную замену лизина на аргинин и имеет аминокислотную последовательность EQSDVSSVVA (SEQ ID NO: 87), замененный аргинин показан подчеркнутым). Предполагается, что аналогичная замена может быть включена в любую из описанных выше областей LAG-3 mAb 6 CDR_{L1}.

Предусмотрены незначительные изменения в аминокислотной последовательности представленных в настоящем документе доменов VH и/или VL. Например, С-концевой аминокислотный остаток любого из описанных в настоящем документе доменов VH и/или VL может быть заменен для облегчения субклонирования.

V. Антитела к LAG-3, LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 и/или LAG-3 mAb 6, и их производные, имеющие сконструированный Fc-участок

В традиционной иммунной функции взаимодействие комплексов антитело-антиген с клетками иммунной системы приводит в результате к широкому спектру ответов, начиная от эффекторных функций, таких как антителозависимая цитотоксичность, дегрануляция тучных клеток и фагоцитоз, до иммуномодулирующих сигналов, таких как регуляция пролиферации лимфоцитов и секреции антител. Все эти взаимодействия инициируются при связывании Fc-участка антител или иммунных комплексов со специализированными рецепторами клеточной поверхности на гематопоэтических клетках. Разнообразие клеточных ответов, запускаемых антителами и иммунными комплексами, обусловлено структурной гетерогенностью трех рецепторов Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) и FcγRIII (CD16) являются активирующими (т.е. усиливающими иммунную систему) рецепторами; FcγRIIB (CD32B) является ингибирующим (т.е. ослабляющим иммунную систему) рецептором. Кроме того, взаимодействие с неонатальным рецептором Fc (FcRn) опосредует рециркуляцию молекул IgG из эндосомы на клеточную поверхность и высвобождение в кровь. Выше представлена аминокислотная последовательность иллюстративного IgG1 (SEQ ID NO: 1), IgG2 (SEQ ID NO: 2), IgG3 (SEQ ID NO: 3) и IgG4 (SEQ ID NO: 4)

Модификация Fc-участка обычно приводит к изменению фенотипа, например, изменению периода полужизни в сыворотке, изменению стабильности, изменению восприимчивости к клеточным ферментам или изменению эффекторной функции. Может быть необходима модификация антитела или другой связывающей молекулы по настоящему изобретению в отношении эффекторной функции, например, с тем чтобы повысить эффективность такой молекулы при лечении злокачественной опухоли. В некоторых случаях необходимо уменьшение или исключение эффекторной функции, например, в случае антител, механизм действия которых предусматривает блокировку или антагонизм, но не уничтожение клеток, несущих целевой антиген. Повышенная эффекторная функция, как правило, необходима в отношении нежелательных клеток, таких как опухолевые и чужеродные клетки, где FcγR экспрессируются на низких уровнях, например опухолеспецифические В-клетки с низкими уровнями FcγRIIB (например, при неходжкинской лимфоме, CLL и лимфоме Беркитта). В соответствии с указанными вариантами осуществления молекулы по настоящему изобретению, которым придали или изменили эффекторную функциональную активность, полезны для лечения и/или предупреждения заболевания, нарушения или инфекции, при которых необходима повышенная эффективность эффекторной функциональной активности.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению содержат Fc-участок, который имеет одну или несколько модификаций (например, замены, делеции или вставки) относительно последовательности аминокислот Fc-участка дикого типа (например, SEQ ID NO: 1), которые уменьшают аффинность и авидность Fc-участка и, следовательно, молекулы по настоящему изобретению к одному или нескольким рецепторам FcγR. В соответствии с другими вариантами осуществления, молекулы по настоящему изобретению содержат Fc-участок, который имеет одну или несколько модификаций относительно аминокислот Fc-участка дикого типа, которые увеличивают аффинность и авидность Fc-участка и, следовательно, молекулы по настоящему изобретению к одному или нескольким рецепторам FcγR. В соответствии с другими вариантами осуществления, молекулы содержат вариантный Fc-участок, причем указанный вариант придает или опосредует повышенную активность, а именно антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC), и/или повышенное связывание с FcγRIIA относительно молекулы, не содержащей Fc-участок или содержащей Fc-участок дикого типа. В соответствии с альтернативными вариантами осуществления молекулы содержат вариантный Fc-участок, причем указанный вариант придает или опосредует пониженную ADCC-активность (или другую эффекторную функцию) и/или повышенное связывание с

Fc γ RIIB относительно молекулы, не содержащей Fc-участок или содержащей Fc-участок дикого типа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к связывающим LAG-3 молекулам, содержащим вариантный Fc-участок, причем у такого вариантного Fc-участка не наблюдаются подпадающего детекции связывания с любым Fc γ R относительно сравниваемой молекулы, содержащей Fc-участок дикого типа. В соответствии с другими вариантами осуществления настоящее изобретение относится к связывающим LAG-3 молекулам, содержащим вариантный Fc-участок, причем такой вариантный Fc-участок связывает лишь один Fc γ R, предпочтительно один из Fc γ RIIA, Fc γ RIIB или Fc γ RIIA. Любую такую повышенную аффинность и/или avidность предпочтительно оценивают путем измерения *in vitro* степени подпадающего детекции связывания с Fc γ R или Fc γ R-связанной активности в клетках, которые экспрессируют низкие уровни Fc γ R, если активность связывания исходной молекулы (без модифицированного Fc-участка) нельзя детектировать в клетках, или в клетках, которые экспрессируют целевые антигены отличного от Fc γ R рецептора с плотностью от 30000 до 20000 молекул/клетка, с плотностью от 20000 до 10000 молекул/клетка, с плотностью от 10000 до 5000 молекул/клетка, с плотностью от 5000 до 1000 молекул/клетка, с плотностью от 1000 до 200 молекул/клетка или с плотностью 200 молекул/клетка или менее (но по меньшей мере 10, 50, 100 или 150 молекул/клетка).

Связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению могут содержать вариантный Fc-участок, имеющий измененные аффинности в отношении активирующего и/или ингибирующего рецептора Fc γ . В соответствии с одним вариантом осуществления связывающая LAG-3 молекула содержит вариантный Fc-участок, который обладает повышенной аффинностью в отношении Fc γ RIIB и пониженной аффинностью в отношении Fc γ RIIA и/или Fc γ RIIA относительно сравниваемой молекулы с Fc-участком дикого типа. В соответствии с другим вариантом осуществления, связывающая LAG-3 молекула по настоящему изобретению содержит вариантный Fc-участок, который обладает пониженной аффинностью в отношении Fc γ RIIB и повышенной аффинностью в отношении Fc γ RIIA и/или Fc γ RIIA относительно сравниваемой молекулы с Fc-участком дикого типа. В соответствии с еще одним вариантом осуществления связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению содержат вариантный Fc-участок, который обладает пониженной аффинностью в отношении Fc γ RIIB и пониженной аффинностью в отношении Fc γ RIIA и/или Fc γ RIIA относительно сравниваемой молекулы с Fc-участком дикого типа. В соответствии с еще одним вариантом осуществления связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению содержат вариантный Fc-участок, который обладает неизменной аффинностью в отношении Fc γ RIIB и пониженной (или повышенной) аффинностью в отношении Fc γ RIIA и/или Fc γ RIIA относительно сравниваемой молекулы с Fc-участком дикого типа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению содержат вариантный Fc-участок, обладающий измененной аффинностью в отношении Fc γ RIIA и/или Fc γ RIIA с тем, чтобы иммуноглобулин имел усиленную эффекторную функцию. К неограничивающим примерам эффекторных клеточных функций относятся антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность, антителозависимый фагоцитоз, фагоцитоз, опсонизация, опсонифагоцитоз, клеточное связывание, розеткообразование, связывание с C1q и комплементзависимая клеточноопосредованная цитотоксичность.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления, изменение аффинности или эффекторной функции является по меньшей мере 2-кратным, предпочтительно по меньшей мере 4-кратным, по меньшей мере 5-кратным, по меньшей мере 6-кратным, по меньшей мере 7-кратным, по меньшей мере 8-кратным, по меньшей мере 9-кратным, по меньшей мере 10-кратным, по меньшей мере 50-кратным или по меньшей мере 100-кратным относительно сравниваемой молекулы, содержащей Fc-участок дикого типа. В соответствии с другими вариантами осуществления настоящего изобретения, вариантный Fc-участок иммуноспецифически связывает один или несколько FcR с аффинностью, которая по меньшей мере на 65%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 125%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 175%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 225% или по меньшей мере на 250% больше, чем у молекулы, содержащей Fc-участок дикого типа. Такие измерения можно осуществлять с помощью *in vivo* или *in vitro* анализа, и в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления, *in vitro* анализами, такими как анализы ИФА или на основе поверхностного плазмонного резонанса.

В соответствии с различными вариантами осуществления, связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению содержат вариантный Fc-участок, причем указанный вариант оказывает агонистическое действие по меньшей мере на одну активность рецептора Fc γ R или антагонистическое действие по меньшей мере на одну активность рецептора Fc γ R. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления молекулы содержат вариант, который оказывает антагонистическое действие на одну или несколько активностей Fc γ RIIB, например, опосредуемой В-клеточным рецептором передачу сигнала, активацию В-клеток, пролиферацию В-клеток, выработку антител, приток внутриклеточного кальция у В-клеток, прогрессирование клеточного цикла, Fc γ RIIB-опосредуемое ингибирование передачи сигнала

FcεRI, фосфорилирование FcγRIIB, SHIP-рекрутинг, SHIP-фосфорилирование и ассоциацию с Shc, или активность одной или нескольких последующих молекул (например, MAP-киназы, JNK, p38 или Akt) в пути сигнальной трансдукции с участием FcγRIIB. В соответствии с другим вариантом осуществления связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению содержат вариант, который оказывает агонистическое действие на одну или несколько активностей FcεRI, например активацию тучных клеток, мобилизацию кальция, дегрануляцию, выработку цитокинов или высвобождение серотонина.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулы содержат Fc-участок, содержащий участки от двух или более изоформ IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4). В контексте настоящего документа говорят, что Fc-участок относится к определенному изоформе IgG, если его аминокислотная последовательность является наиболее гомологичной такому изоформе относительно других изоформ IgG. Различные изоформы IgG характеризуются различными физическими и функциональными свойствами, включая период полужизни в сыворотке, связывание комплемента, аффинности связывания FcγR и активности эффекторных функций (например, ADCC, CDC и т.д.), из-за различий в аминокислотных последовательностях их шарнира и/или Fc-участков, например, как описано у Flesch и Neppert (1999) *J. Clin. Lab. Anal.* 14:141-156; Chappel et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 33:25124-25131; Chappel et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:9036-9040; или Brüggemann et al. (1987) *J. Exp. Med.* 166:1351-1361. Такой тип вариантного Fc-участка можно использовать отдельно или в комбинации с аминокислотной модификацией для воздействия на Fc-опосредованную эффекторную функцию и/или активность связывания. В комбинации аминокислотная модификация и шарнир/Fc-участок IgG могут проявлять сходную функциональность (например, повышенную аффинность в отношении FcγRIIA) и могут действовать аддитивно или, что более предпочтительно синергически, модифицируя эффекторную функциональность молекулы по настоящему изобретению относительно молекулы по настоящему изобретению, содержащей Fc-участок дикого типа. В соответствии с другими вариантами осуществления аминокислотная модификация и Fc-участок IgG могут проявлять противоположную функциональность (например, соответственно повышенную и пониженную аффинность в отношении FcγRIIA) и могут действовать, селективно ослабляя или уменьшая специфическую функциональность молекуле по настоящему изобретению относительно молекулы, не содержащей Fc-участок или содержащей Fc-участок дикого типа того же изоформы.

В соответствии с предпочтительным конкретным вариантом осуществления связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению содержат вариантный Fc-участок, причем указанный вариантный Fc-участок содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию относительно Fc-участка дикого типа, так чтобы указанная молекула имела измененную аффинность в отношении FcR, при условии, что указанный вариантный Fc-участок не имеет замены в положениях, которые непосредственно контактируют с FcγR, по результатам кристаллографического и структурного анализа взаимодействий Fc-FcR, таких как описанные у Sonderrmann et al. (2000) *Nature* 406:267-73. Примерами положений в Fc-участке, которые непосредственно контактируют с FcγR, являются аминокислотные остатки 234-239 (шарнирный участок), аминокислотные остатки 265-269 (петля В/С), аминокислотные остатки 297-299 (петля С7Е) и аминокислотные остатки 327-332 (петля F/G). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулы по настоящему изобретению содержат вариантные Fc-участки, которые содержат модификацию по меньшей мере одного остатка, которая не создает непосредственного контакта с FcγR, по результатам кристаллографического и структурного анализа, например, не находится в сайте связывания Fc-FcγR.

Вариантные Fc-участки хорошо известны из уровня техники, и в соответствии с настоящим изобретением, можно применять любой известный вариантный Fc-участок для придания или модификации эффекторной функции, проявляемой молекулой по настоящему изобретению, содержащей Fc-участок (или его часть), согласно результатам функционального анализа, например, в НК-зависимом или макрофаг-зависимом анализе. Например, варианты Fc-участка, выявленные как изменяющие эффекторную функцию, раскрыты в РСТ публикациях WO 04/063351, WO 06/088494, WO 07/024249, WO 06/113665, WO 07/021841, WO 07/106707 и WO 2008/140603, и в настоящих молекулах можно применять любой подходящий раскрытый в них вариант.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению содержат вариантный Fc-участок, имеющий одну или несколько аминокислотных модификаций в одном или нескольких участках, при этом модификация(ии) изменяет (относительно Fc-участка дикого типа) соотношение аффинностей вариантного Fc-участка к активирующему FcγR (такому как FcγRIIA или FcγRIIA) относительно ингибирующего FcγR (такого как FcγRIIB):

$$\text{Соотношение аффинностей} = \frac{\text{Изменение у дикого типа к вариантному аффинности к FcγR}_{\text{Активирующий}}}{\text{Изменение у дикого типа к вариантному аффинности к FcγR}_{\text{Ингибирующий}}}$$

Особенно предпочтительными являются связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению, которые имеют вариантный Fc-участок (относительно Fc-участка дикого типа), при этом такой вариантный Fc-участок имеет соотношение аффинностей, превышающее 1. Такие молекулы особенно по-

лезны при осуществлении терапевтического или профилактического лечения заболевания, нарушения или инфекции или ослаблении их симптома, когда необходима повышенная эффективность эффекторной клеточной функции (например, ADCC), опосредованной Fc γ R, например, в случае злокачественной опухоли или инфекционного заболевания. Для сравнения, вариантный Fc-участок, имеющий соотношение аффинностей менее 1, опосредует пониженную эффективность эффекторной клеточной функции. В табл. 1 приведены иллюстративные одиночные, двойные, тройные, четверные и пятикратные мутации по значениям их соотношения аффинностей, которые либо превышают 1, либо нет.

Таблица 1. Иллюстративные одиночные или множественные мутации, приведенные с помощью соотношения аффинностей

| Одиночная | Двойная | Тройная | Четверная | Пятерная |
|--------------------------------------|---------------|----------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Соотношение аффинностей >1 | | | | |
| F243L | F243L и R292P | F243L, P247L и N421K | L234F, F243L, R292P и Y300L | L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L |
| D270E | F243L и Y300L | F243L, R292P и Y300L | L235I, F243L, R292P и Y300L | L235P, F243L, R292P, Y300L и P396L |
| R292G | F243L и P396L | F243L, R292P и V305I | L235Q, F243L, R292P и Y300L | F243L, R292P, V305I, Y300L и P396L |
| R292P | D270E и P396L | F243L, R292P и P396L | F243L, P247L, D270E и N421K | |
| | R292P и Y300L | F243L, Y300L и P396L | F243L, R255L, D270E и P396L | |
| | R292P и V305I | P247L, D270E и N421K | F243L, D270E, G316D и R416G | |
| | R292P и P396L | R255L, D270E и P396L | F243L, D270E, K392T и P396L | |
| | Y300L и P396L | D270E, G316D и R416G | F243L, D270E, P396L и Q419H | |
| | P396L и Q419H | D270E, K392T и P396L | F243L, R292P, Y300L, и P396L | |
| | | D270E, P396L и Q419H | F243L, R292P, V305I и P396L | |
| | | V284M, R292L и K370N | P247L, D270E, Y300L и N421K | |
| | | R292P, Y300L и P396L | R255L, D270E, R292G и P396L | |
| | | | R255L, D270E, Y300L и P396L | |
| | | | D270E, G316D, P396L и R416G | |
| Соотношение аффинностей <1 | | | | |
| Y300L | F243L и P396L | F243L, R292P и V305I | | |
| P396L | P247L и N421K | | | |
| | R255L и P396L | | | |
| | R292P и V305I | | | |
| | K392T и P396L | | | |
| | P396L и Q419H | | | |

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, в вариантных Fc-участках любые аминокислотные модификации (например, замены) приходятся на любые из положений 235, 240, 241, 243, 244, 247, 262, 263, 269, 298, 328 или 330 и предпочтительно на один или несколько из следующих остатков: A240, I240, L241, L243, N244, N298, I328 или V330. В соответствии с другим конкретным вариантом

осуществления в вариантных Fc-участках любые аминокислотные модификации (например, замены) приходятся на любые из положений 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439 и предпочтительно на один или несколько из следующих остатков: H280, Q280, Y280, G290, S290, T290, Y290, N294, K295, P296, D298, N298, P298, V298, I300 или L300.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления в вариантных Fc-участках, которые связывают Fc γ R с измененной аффинностью, любые аминокислотные модификации (например, замены) приходятся на любые из положений 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439. Предпочтительно вариантный Fc-участок имеет любой из следующих остатков: A256, N268, Q272, D286, Q286, S286, A290, S290, A298, M301, A312, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, N326, S326, K330, T339, A333, A334, E334, H334, L334, M334, Q334, V334, K335, Q335, A359, A360 или A430.

В соответствии с другим вариантом осуществления в вариантных Fc-участках, которые связывают Fc γ R (посредством его Fc-участка) с уменьшенной аффинностью, любые аминокислотные модификации (например, замены) приходятся на любые из положений 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 или 439.

В соответствии с другим вариантом осуществления в вариантных Fc-участках, которые связывают Fc γ R (посредством его Fc-участка) с увеличенной аффинностью, любые аминокислотные модификации (например, замены) приходятся на любые из положений 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 или 430. В соответствии с другим вариантом осуществления в вариантных Fc-участках, которые связывают Fc γ RIIA с увеличенной аффинностью, находятся любые из следующих остатков: A255, A256, A258, A267, A268, N268, A272, Q272, A276, A280, A283, A285, A286, D286, Q286, S286, A290, S290, M301, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, S326, K330, A331, Q335, A337 или A430.

Предпочтительные варианты включают одну или несколько модификаций в любых положениях: 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 271, 273, 275, 281, 284, 291, 296, 297, 298, 299, 302, 304, 305, 313, 323, 325, 326, 328, 330 или 332.

Особенно предпочтительные варианты включают одну или несколько модификаций, выбранных из групп A-AI:

| | |
|----|---|
| A | 228E, 228K, 228Y или 228G; |
| B | 230A, 230E, 230Y или 230G; |
| C | 231E, 231K, 231Y, 231P или 231G; |
| D | 232E, 232K, 232Y, 232G; |
| E | 233D; |
| F | 234I или 234F; |
| G | 235D, 235Q, 235P, 235I или 235V; |
| H | 239D, 239E, 239N или 239Q; |
| I | 240A, 240I, 240M или 240T; |
| J | 243R, 243, 243Y, 243L, 243Q, 243W, 243H или 243I; |
| K | 244H; |
| L | 245A; |
| M | 247G, 247V или 247L; |
| N | 262A, 262E, 262I, 262T, 262E или 262F; |
| O | 263A, 263I, 263M или 263T; |
| P | 264F, 264E, 264R, 264I, 264A, 264T или 264W; |
| Q | 265F, 265Y, 265H, 265I, 265L, 265T, 265V, 265N или 265Q; |
| R | 266A, 266I, 266M или 266T; |
| S | 271D, 271E, 271N, 271Q, 271K, 271R, 271S, 271T, 271H, 271A, 271V, 271L, 271I, 271F, 271M, 271Y, 271W или 271G; |
| T | 273I; |
| U | 275L или 275W; |
| V | 281D, 281K, 281Y или 281P; |
| W | 284E, 284N, 284T, 284L, 284Y или 284M; |
| X | 291D, 291E, 291Q, 291T, 291H, 291I или 291G; |
| Y | 299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W или 299Y; |
| Z | 302I; |
| AA | 304D, 304N, 304T, 304H или 304L |
| AB | 305I; |
| AC | 313F; |
| AD | 323I; |
| AE | 325A, 325D, 325E, 325G, 325H, 325I, 325L, 325K, 325R, 325S, 325F, 325M, 325T, 325V, 325Y, 325W или 325P; |
| AF | 328D, 328Q, 328K, 328R, 328S, 328T, 328V, 328I, 328Y, 328W, 328P, 328G, 328A, 328E, 328F, 328H, 328M или 328N; |
| AG | 330L, 330Y, 330I или 330V; |
| AH | 332A, 332D, 332E, 332H, 332N, 332Q, 332T, 332K, 332R, 332S, 332V, 332L, 332F, 332M, 332W, 332P, 332G или 332Y; и |
| AI | 336E, 336K или 336Y |

Еще более особенные варианты включают одну или несколько модификаций, выбранных из групп 1-105:

041483

| Группа | Вариант | Группа | Вариант |
|--------|---------------------------------------|--------|---|
| 1 | A330L / I332E | 54 | S239D / D265L / N297D / I332E |
| 2 | D265F / N297E / I332E | 55 | S239D / D265T / N297D / I332E |
| 3 | D265Y / N297D / I332E | 56 | S239D / D265V / N297D / I332E |
| 4 | D265Y / N297D / T299L / I332E | 57 | S239D / D265Y / N297D / I332E |
| 5 | F241E / F243Q / V262T / V264F | 58 | S239D / I332D |
| 6 | F241E / F243Q / V262T / V264E / I332E | 59 | S239D / I332E |
| 7 | F241E / F243R / V262E / V264R | 60 | S239D / I332E / A330I |
| 8 | F241E / F243R / V262E / V264R / I332E | 61 | S239D / I332N |
| 9 | F241E / F243Y / V262T / V264R | 62 | S239D / I332Q |
| 10 | F241E / F243Y / V262T / V264R / I332E | 63 | S239D / N297D / I332E |
| 11 | F241L / F243L / V262I / V264I | 64 | S239D / N297D / I332E / A330Y |
| 12 | F241L / V262I | 65 | S239D / N297D / I332E / A330Y / F241S / F243H / V262T / V264T |
| 13 | F241R / F243Q / V262T / V264R | 66 | S239D / N297D / I332E / K326E |
| 14 | F241R / F243Q / V262T / V264R / I332E | 67 | S239D / N297D / I332E / L235D |
| 15 | F241W / F243W / V262A / V264A | 68 | S239D / S298A / I332E |

| | | | |
|----|---|-----|---------------------------------------|
| 16 | F241Y / F243Y / V262T / V264T | 69 | S239D / V264I / A330L / I332E |
| 17 | F241Y / F243Y / V262T / V264T / N297D / I332E | 70 | S239D / V264I / I332E |
| 18 | F243L / V262I / V264W | 71 | S239D / V264I / S298A / I332E |
| 19 | P243L / V264I | 72 | S239E / D265N |
| 20 | L328D / I332E | 73 | S239E / D265Q |
| 21 | L328E / I332E | 74 | S239E / I332D |
| 22 | L328H / I332E | 75 | S239E / I332E |
| 23 | L328I / I332E | 76 | S239E / I332N |
| 24 | L328M / I332E | 77 | S239E / I332Q |
| 25 | L328N / I332E | 78 | S239E / N297D / I332E |
| 26 | L328Q / I332E | 79 | S239E / V264I / A330Y / I332 E |
| 27 | L328T / I332E | 80 | S239E / V264I / I332 E |
| 28 | L328V / I332E | 81 | S239E / V264I / S298A / A330Y / I332E |
| 29 | N297D / A330Y / I332E | 82 | S239N / A330L / I332E |
| 30 | N297D / I332E | 83 | S239N / A330Y / I332E |
| 31 | N297D / I332E / S239D / A330L | 84 | S239N / I332D |
| 32 | N297D / S298A / A330Y / I332E | 85 | S239N / I332E |
| 33 | N297D / T299L / I332E | 86 | S239N / I332N |
| 34 | N297D / T299F / I332E / N297D / T299H / I332E | 87 | S239N / I332Q |
| 35 | N297D / T299I / I332E | 88 | S239N / S298A / I332E |
| 36 | N297D / T299L / I332E | 89 | S239Q / I332D |
| 37 | N297D / T299V / I332E | 90 | S239Q / I332E |
| 38 | N297E / I332E | 91 | S239Q / I332N |
| 39 | N297S / I332E | 92 | S239Q / I332Q |
| 40 | P230A / E233D / I332E | 93 | S239Q / V264I / I332E |
| 41 | P244H / P245A / P247V | 94 | S298A / I332E |
| 42 | S239D / A330L / I332E | 95 | V264E / N297D / I332E |
| 43 | S239D / A330Y / I332E | 96 | V264I / A330L / I332E |
| 44 | S239D / A330Y / I332E / K326E | 97 | V264I / A330Y / I332E |
| 45 | S239D / A330Y / I332E / K326T | 98 | V264I / I332E |
| 46 | S239D / A330Y / I332E / L234I | 99 | V264I / S298A / I332E |
| 47 | S239D / A330Y / I332E / L235D | 100 | Y296D / N297D / I332E |
| 48 | S239D / A330Y / I332E / V240I | 101 | Y296E / N297D / I332 E |
| 49 | S239D / A330Y / I332E / V264T | 102 | Y296H / N297D / I332E |
| 50 | S239D / A330Y / I332E / V266I | 103 | Y296N / N297D / I332E |
| 51 | S239D / D265F / N297D / I332E | 104 | Y296Q / N297I / I332E |
| 52 | S239D / D265H / N297D / I332E | 105 | Y296T / N297D / I332E |
| 53 | S239D / D265I / N297D / I332E | | |

В соответствии с одним вариантом осуществления связывающая LAG-3 молекула по настоящему изобретению будет содержать вариантный Fc-участок, имеющий по меньшей мере одну модификацию в Fc-участке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вариантный Fc-участок содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L, причем указанная нумерация соответствует EU системе нумерации по Kabat.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, вариантный Fc-участок содержит:

(A) по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L;

(B) по меньшей мере две замены, выбранные из группы, состоящей из:

(1) F243L и P396L;

(2) F243L и R292P; и

(3) R292P и V305I;

(C) по меньшей мере три замены, выбранные из группы, состоящей из:

- (1) F243L, R292P и Y300L;
- (2) F243L, R292P и V305I;
- (3) F243L, R292P и P396L; и
- (4) R292P, V305I и P396L;

(D) по меньшей мере четыре замены, выбранные из группы, состоящей из:

- (1) F243L, R292P, Y300L и P396L; и
- (2) F243L, R292P, V305I и P396L или

(E) по меньшей мере пять замен, выбранных из группы, состоящей из:

- (1) F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L; и
- (2) L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L.

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления вариантный Fc-участок содержит замены из:

- (A) F243L, R292P и Y300L;
- (B) L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L; или
- (C) F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L.

В соответствии с одним вариантом осуществления связывающая LAG-3 молекула по настоящему изобретению содержит вариантный Fc-участок, который характеризуется пониженным (или практически отсутствующим) связыванием с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, которым характеризуется Fc-участок IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 1)). В соответствии с одним вариантом осуществления связывающая LAG-3 молекула по настоящему изобретению будет содержать вариантный Fc-участок, который характеризуется уменьшенным (или практически отсутствующим) связыванием с FcγR (например, FcγRIIA) и уменьшенной (или практически отсутствующей) ADCC-эффекторной функцией. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вариантный Fc-участок содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из L234A, L235A, D265A, N297Q и N297G. В соответствии с конкретным вариантом осуществления вариантный Fc-участок содержит замену из L234A, L235A, L234A и L235A, D265A, N297Q или N297G.

В соответствии с другим вариантом осуществления связывающая LAG-3 молекула по настоящему изобретению содержит Fc-участок, который изначально характеризуется пониженным (или практически отсутствующим) связыванием с FcγRIIA (CD16a) и/или уменьшенной эффекторной функцией (относительно связывания, которым характеризуется Fc-участок IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 1)). В соответствии с конкретным вариантом осуществления связывающая LAG-3 молекула по настоящему изобретению содержит Fc-участок IgG2 (SEQ ID NO: 2) или Fc-участок IgG4 (SEQ ID NO: 4). При использовании Fc-участка IgG4 настоящее изобретение также относится к внесению стабилизирующей мутации, такой как замена S228P в шарнирном участке IgG4 (см., например, SEQ ID NO:117: ESKYGPPCPSP, (Lu et al. (2008) "The Effect Of A Point Mutation On The Stability Of Igg4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation", J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969) для уменьшения случаев обмена цепями. В Fc-участок IgG4 могут быть введены и другие стабилизирующие мутации, известные из уровня техники (Peters, P et al. (2012) "Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability", J. Biol. Chem., 287:24525-24533; патентная PCT публикация WO 2008/145142).

В соответствии с другими вариантами осуществления настоящее изобретение относится к применению любого известного из уровня техники варианта Fc, такого как раскрытые в работе Jefferis, B.J. et al. (2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcγRIIA: Current Models", Immunol. Lett. 82:57-65; Presta, L.G. et al. (2002) "Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function", Biochem. Soc. Trans. 30:487-90; Idusogie, E.E. et al. (2001) "Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement", J. Immunol. 166:2571-75; Shields, R.L. et al. (2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For FcγRI, FcγRII, FcγRIII, And FcγRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The FcγRI", J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Idusogie, E.E. et al. (2000) "Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc", J. Immunol. 164:4178-84; Reddy, M.P. et al. (2000) "Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4", J. Immunol. 164:1925-1933; Xu, D. et al. (2000) "In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies", Cell. Immunol. 200:16-26; Armour, K.L. et al. (1999) "Recombinant human IgG Molecules Lacking FcγRI Binding And Monocyte Triggering Activities", Eur. J. Immunol. 29:2613-24; Jefferis, R. et al. (1996) "Modulation Of FcγRI And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions", Immunol. Lett. 54:101-04; Lund, J. et al. (1996) "Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human FcγRI And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains", J. Immunol. 157:4963-4969; Hutchins et al. (1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11980-84; Jefferis, R. et al. (1995) "Recognition Sites On Human IgG For FcγRI: The Role Of Glycosylation", Immunol. Lett. 44:111-17; Lund J. et al. (1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modu-

late Recognition By Fc Gamma Receptors", *FASEB J.* 9:115-19; Alegre, M.L. et al. (1994) "A Non-Activating "Humanized", Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo" *Transplantation* 57:1537-1543; Lund et al. (1992) "Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma R11", *Mol. Immunol.* 29:53-59; Lund et al. (1991) "Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG", *J. Immunol.* 147:2657-2662; Duncan, A.R. et al. (1988) "Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG", *Nature* 332:563-564; патенты США №№ 5624821, 5885573, 6194551, 7276586 и 7317091; и PCT публикации WO 00/42072 и WO 99/58572.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулы по настоящему изобретению дополнительно содержат один или несколько сайтов гликозилирования, так чтобы один или несколько углеводных фрагментов были ковалентно присоединены к молекуле. Предпочтительно молекулы по настоящему изобретению с одним или несколькими сайтами гликозилирования и/или одной или несколькими модификациями в Fc-участке придают или имеют повышенную антителоопосредованную эффекторную функцию, например, повышенную ADCC-активность по сравнению с немодифицированным антителом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к молекулам, содержащим одну или несколько модификаций аминокислот, которые известны как непосредственно или опосредовано взаимодействующие с углеводным фрагментом Fc-участка, включая без ограничения аминокислоты в положениях 241, 243, 244, 245, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299 или 301. Аминокислоты, которые непосредственно или опосредовано взаимодействуют с углеводным фрагментом Fc-участка, известны из уровня техники, см., например, Jefferis et al., 1995 *Immunology Letters*, 44: 111-7, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном ее объеме.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к молекулам, которые были модифицированы внесением одного или нескольких сайтов гликозилирования в один или несколько сайтов молекул, предпочтительно без изменения функциональности молекул, например, активности связывания с целевым антигеном или FcγR. Сайты гликозилирования могут быть внесены в вариабельный и/или константный участок молекул по настоящему изобретению. Применяемые в контексте настоящего документа "сайты гликозилирования" включают любую специфическую аминокислотную последовательность в антителе, к которой будет специфически или ковалентно присоединен олигосахарид (т. е. углеводы, содержащие два или более соединенных вместе простых Сахаров). Боковые олигосахаридные цепи обычно связаны с остовом антитела посредством либо N-, либо O-связей. N-связанное гликозилирование относится к присоединению олигосахаридного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка.

O-связанное гликозилирование относится к присоединению олигосахаридного фрагмента к гидроксикаминокислоте, например, серину, треонину. Молекулы по настоящему изобретению могут содержать один или несколько сайтов гликозилирования, включая сайты N-связанного и O-связанного гликозилирования. В соответствии с настоящим изобретением, можно применять любой известный из уровня техники сайт гликозилирования для N-связанного или O-связанного гликозилирования. Иллюстративным сайтом N-связанного гликозилирования, который является пригодным в соответствии со способами по настоящему изобретению, является аминокислотная последовательность: Asn-X-Thr/Ser, где X может быть любой аминокислотой, а Thr/Ser обозначает треонин или серин. Такой сайт или сайты можно внести в молекулу по настоящему изобретению с помощью способов, хорошо известных в области техники, к которой относится настоящее изобретение (см., например, *In VITRO MUTAGENESIS, Recombinant DNA: A Short COURSE*, J. D. Watson, et al., W.H. Freeman and Company, New York, 1983, chapter 8, pp. 106-116, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном ее объеме. Иллюстративный способ внесения сайта гликозилирования в молекулу по настоящему изобретению может предусматривать модификацию или мутацию аминокислотной последовательности молекулы так, чтобы получить необходимую последовательность Asn-X-Thr/Ser.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способам модификации углеводного содержимого молекулы по настоящему изобретению путем добавления или удаления сайта гликозилирования. Способы модификации углеводного содержимого антител (и молекул, содержащих домены антитела, например, Fc-участок) хорошо известны из уровня техники и охватываются настоящим изобретением, см., например, патент США № 6218149, EP 0359096 B1; публикацию US 2002/0028486, WO 03/035835; публикацию США № 2003/0115614; патент США № 6218149; патент США № 6472511; все из которых включены в настоящий документ в полном их объеме. В соответствии с другими вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способам модификации углеводного содержимого молекулы по настоящему изобретению путем удаления одного или нескольких эндогенных углеводных фрагментов молекулы. В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящее изобретение относится к сдвигу сайта гликозилирования Fc-участка антитела путем модификации положений, прилегающих к 297. В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящее изобретение относится к модификации положения 296 так, чтобы гликозилировалось положение 296, а не положение 297.

Эффекторную функцию также можно модифицировать с помощью таких методик, как введение одного или нескольких цистеиновых остатков в Fc-участок, тем самым обеспечивая возможность образования межцепочечной дисульфидной связи в этом участке, в результате чего образуется гомодимерное антитело, которое может характеризоваться улучшенной способностью к интернализации и/или повышенным комплементзависимым цитолизом клеток и ADCC (Caron, P.C. et al. (1992) "Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies", J. Exp. Med. 176:1191-1195; Shopes, B. (1992) "A Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity", J. Immunol. 148(9):2918-2922. Гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой активностью также можно получить с помощью гетеробифункциональных сшивающих линкеров, как описано в работе Wolff, E.A. et al. (1993) "Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice", Cancer Research 53:2560-2565. Альтернативно, может быть сконструировано антитело, которое имеет двойные Fc-участки и, таким образом, может иметь повышенные комплементзависимые литические и ADCC-характеристики (Stevenson, G.T. et al. (1989) "A Chimeric Antibody With Dual Fc Regions (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge", Anti-Cancer Drug Design 3:219-230).

Период полужизни в сыворотке молекул по настоящему изобретению, содержащих Fc-участки, может быть увеличен путем увеличения аффинности связывания Fc-участка с FcRn. Применяемый в контексте настоящего документа термин "период полужизни" означает фармакокинетическое свойство молекулы, которое представляет собой меру среднего времени жизни молекул после их введения. Период полужизни может быть выражен как время, необходимое для устранения пятидесяти процентов (50%) известного количества молекулы из организма субъекта (например, пациента-человека или другого млекопитающего) или его конкретной части, например, которое измерено в сыворотке, т. е. период полужизни в кровотоке, или в других тканях. Как правило, увеличение периода полужизни приводит в результате к увеличению среднего времени удержания (MRT) в кровотоке для вводимой молекулы.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению содержат вариантный Fc-участок, который содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию относительно Fc-участка дикого типа и которые характеризуются увеличенным периодом полужизни (относительно Fc-участка дикого типа).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению содержат вариантный Fc-участок, который содержит увеличивающую периодом полужизни аминокислотную замену по одному или нескольким положениям, выбранным из группы, состоящей из 238, 250, 252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435 и 436, которые пронумерованы согласно EU системе нумерации по Kabat. Многочисленные конкретные мутации, способные увеличивать период полужизни содержащей Fc-участок молекулы, известны из уровня техники и включают, например, M252Y, S254T, T256E и их комбинации. Например, см. мутации, описанные в патентах США №№ 6277375, 7083784, 7217797, 8088376, публикациях США №№ 2002/0147311, 2007/0148164 и международных публикациях WO 98/23289, WO 2009/058492 и WO 2010/033279, которые включены в настоящий документ посредством ссылки в полном их объеме. Содержащие Fc-участок молекулы с увеличенным периодом полужизни также включают молекулы с заменами по двум или более остаткам Fc-участка 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 и 436. В частности, две или более замен выбраны из: T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K и Y436I.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, вариантный Fc-участок содержит замены из:

- (A) 252Y, 254T и 256E;
- (B) M252Y и S254T;
- (C) M252Y и T256E;
- (D) 250Q и 428L;
- (E) T307Q и N434A;
- (F) A378V и N434A;
- (G) N434A и Y436I;
- (H) V308P и N434A; или
- (I) K288D и H435K.

Настоящее изобретение дополнительно относится к вариантным Fc-участкам, содержащим:

- (A) одну или несколько мутаций, которые изменяют эффекторную функцию и/или FcγR; и
- (B) одну или несколько мутаций, которые продлевают период полужизни в сыворотке.

VI. Биспецифические связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к биспецифическим связывающим молекулам, которые способны связываться с "первым эпитопом" и "вторым эпитопом", причем первый эпитоп представляет собой эпитоп LAG-3 человека, а второй эпитоп представляет собой такой же или отличный эпитоп LAG-3 или представляет собой эпитоп другой молекулы, которая присутствует на поверхности иммунной клетки (такой как Т-лимфоцит) и участвует в регуляции иммунной контрольной точки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления второй эпитоп предпочтительно не представляет собой эпитоп LAG-3. В соответствии с одним вариантом осуществления второй эпитоп

представляет собой эпитоп B7-H3, B7-H4, BTLA, CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, галектина-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC I или II класса, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 или VISTA. В соответствии с конкретным вариантом осуществления второй эпитоп представляет собой CD137, PD-1, OX40, TIGIT или TIM-3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие биспецифические молекулы содержат более двух эпитоп-связывающих сайтов. Такие биспецифические молекулы могут, например, связывать два или более различных эпитопов LAG-3 и по меньшей мере один эпитоп молекулы, которая не является LAG-3.

Настоящее изобретение относится к биспецифическим антителам, способным одновременно связываться с LAG-3 и вторым эпитопом (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, MHC I или II класса, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3 и т.д.). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биспецифическое антитело, способное одновременно связываться с PD-1 и вторым эпитопом, получают с помощью любого из способов, описанных в РСТ публикациях WO 1998/002463, WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 2006/107617, WO 2007/046893, WO 2007/146968, WO 2008/003103, WO 2008/003116, WO 2008/027236, WO 2008/024188, WO 2009/132876, WO 2009/018386, WO 2010/028797, WO2010028796, WO 2010/028795, WO 2010/108127, WO 2010/136172, WO 2011/086091, WO 2011/133886, WO 2012/009544, WO 2013/003652, WO 2013/070565, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2013/174873 и WO 2014/022540, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном ее объеме.

1. Биспецифические диатела, не имеющие Fc-участков

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к биспецифическим одновалентным диателам, которые содержат первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, и наиболее предпочтительно состоят из них, последовательности которых позволяют полипептидным цепям ковалентно связываться друг с другом с образованием ковалентно связанного диатела, которое способно одновременно связываться с первым эпитопом ("эпитопом 1") и вторым эпитопом ("эпитопом 2"), причем такие эпитопы не идентичны друг другу. Таким образом, такие биспецифические диатела содержат домены "VL1"/"VH1", которые способны связываться с первым эпитопом ($VL_{\text{эпитоп 1}}/VH_{\text{эпитоп 1}}$), и домены "VL2"/"VH2", которые способны связываться со вторым эпитопом ($VL_{\text{эпитоп 2}}/VH_{\text{эпитоп 2}}$). Обозначения "VL1" и "VH1" обозначают соответственно вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, которые связывают "первый" эпитоп такого биспецифического диатела. Аналогичным образом, обозначения "VL2" и "VH2" обозначают соответственно вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, которые связывают "второй" эпитоп такого биспецифического диатела. В соответствии с одним вариантом осуществления, эпитоп 1 таких молекул диатела является эпитопом LAG-3, а эпитоп 2 таких молекул диатела не является эпитопом LAG-3 (например, он представляет собой эпитоп из B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, MHC I или II класса, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3 и т.д.). Домен VL первой полипептидной цепи таких связывающих LAG-2 диател взаимодействует с доменом VH второй полипептидной цепи с образованием первого функционального эпитопсвязывающего сайта, который специфичен к первому антигену (т.е. либо LAG-3, либо антигену, который содержит второй эпитоп). Аналогичным образом, домен VL второй полипептидной цепи взаимодействует с доменом VH первой полипептидной цепи с образованием второго функционального эпитопсвязывающего сайта, который специфичен ко второму антигену (т.е. либо антигену, который содержит второй эпитоп, либо LAG-3). Таким образом, выбор доменов VL и VH первой и второй полипептидных цепей скоординирован таким образом, чтобы две полипептидные цепи диатела в совокупности содержали домены VL и VH, способные связываться как с эпитопом LAG-3, так и со вторым эпитопом (т.е. они в совокупности содержат домены $VL_{\text{LAG-3}}/VH_{\text{LAG-3}}$ и $VL_{\text{эпитоп 2}}/VH_{\text{эпитоп 2}}$). Не имеет значения, обозначена ли конкретная пара связывающих доменов (т.е. $VL_{\text{эпитоп 1}}/VH_{\text{эпитоп 1}}$ или $VL_{\text{эпитоп 2}}/VH_{\text{эпитоп 2}}$), эпитоп антигена с эпитопом 1 или эпитоп антигена с эпитопом 2), как первый относительно второго эпитоп диатела; такие обозначения имеют отношение только к наличию и ориентации доменов полипептидных цепей связывающих молекул по настоящему изобретению.

Первая полипептидная цепь по варианту осуществления таких биспецифических одновалентных диател содержит, в направлении от N-конца до C-конца, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться либо с первым эпитопом, либо с доменом VL моноклонального антитела, способного связываться со вторым эпитопом (т.е. либо $VL_{\text{LAG-3}}$, либо $VL_{\text{эпитоп 2}}$), первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться либо со вторым эпитопом (если такая первая полипептидная цепь содержит $VL_{\text{LAG-3}}$), либо с доменом VH моноклонального антитела, способного связываться с первым эпитопом (если такая первая полипептидная цепь содержит $VL_{\text{эпитоп 2}}$), второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), необязательно содержащий цистеиновый остаток способствующего образованию гетеродимера домена, и C-конец (фиг. 1).

Вторая полипептидная цепь по варианту осуществления биспецифических одновалентных диател содержит в направлении от N-конца до C-конца N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 или доменом VL моноклонального антитела, способного связываться со вторым эпитопом (т.е. либо $VL_{\text{LAG-3}}$, либо $VL_{\text{эпитоп 2}}$, и являющийся доменом VL, который не выбран для

включения в первую полипептидную цепь антитела), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться либо со вторым эпитопом (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL_{LAG-3}), либо с доменом VH моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL_{эпитоп 2}), второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), необязательно содержащий цистеиновый остаток способствующего образованию гетеродимера домена, и С-конец (фиг. 1).

Наиболее предпочтительно, длину промежуточного линкерного пептида (например, линкера 1), который разделяет такие домены VL и VH) выбирают такую, чтобы практически или полностью предупредить связывание доменов VL и VH полипептидной цепи друг с другом. Таким образом, домены VL и VH первой полипептидной цепи практически или полностью не способны связываться друг с другом. Аналогично, домены VL и VH второй полипептидной цепи практически или полностью не способны связываться друг с другом. Предпочтительный промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) имеет последовательность (SEQ ID NO:88): GGGSGGGG.

Длину и состав второго промежуточного линкерного пептида (линкер 2) выбирают на основе выбора способствующих образованию гетеродимера доменов. Обычно второй промежуточный линкерный пептид (линкер 2) будет содержать 3-20 аминокислотных остатков. Так, в частности, если способствующие образованию гетеродимера домены не содержат цистеиновый остаток, то используют цистеинсодержащий второй промежуточный линкерный пептид (линкер 2). Цистеинсодержащий второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2) будет содержать 1, 2, 3 или более 3 цистеиновых остатков. Предпочтительный цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) имеет последовательность (SEQ ID NO:89): GGC₃GGG.

Альтернативно, линкер 2 не содержит цистеин (например, GGG, GGGG (SEQ ID NO:90), LGGGSG (SEQ ID NO:91), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:92), ASTKG (SEQ ID NO:93), LEPKSS (SEQ ID NO:94), APSSS (SEQ ID NO:95)

и т.д.), и тогда, как описано ниже, применяют цистеинсодержащий, способствующий образованию гетеродимера домен. Необязательно, применяют как цистеинсодержащий линкер 2, так и цистеинсодержащий способствующий образованию гетеродимера домен.

Способствующие образованию гетеродимера домены могут представлять собой GVEPKSC (SEQ ID NO:96), или VEPKSC (SEQ ID NO:97), или AEPKSC (SEQ ID NO:98) на одной полипептидной цепи и GFNRGEC (SEQ ID NO:99) или FNRGEC (SEQ ID NO:100) на другой полипептидной цепи (US 2007/0004909).

Более предпочтительно тем не менее способствующие образованию гетеродимера домены таких диател образуются из одного, двух, трех или четырех tandemно повторяемых спиральных доменов с противоположным зарядом, которые содержат последовательность по меньшей мере из шести, по меньшей мере из семи или по меньшей мере из восьми аминокислотных остатков, так чтобы способствующий образованию гетеродимера домен обладал полным зарядом (Apostolovic, B. et al. (2008) "pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil", *Biomacromolecules* 9:3173-3180; Arndt K.M. et al. (2001) "Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain", *J. Molec. Biol.* 312:221-228; Arndt K.M. et al. (2002) "Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils", *Structure* 10:1235-1248; Boucher, C. et al. (2010) "Protein Detection By Western Blot Via Coiled-Coil Interactions", *Analytical Biochemistry* 399:138-140; Cachia, P. J. et al. (2004) "Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy", *J. Mol. Recognit.* 17:540-557; De Crescenzo, G.D. et al. (2003) "Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding", *Biochemistry* 42:1754-1763; Fernandez-Rodriguez, J. et al. (2012) "Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag", *Protein Science* 21:511-519; Ghosh, T.S. et al. (2009) "End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures", *Acta Crystallographica D* 65:1032-1041; Grigoryan, G. et al. (2008) "Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions", *Curr. Opin. Struc. Biol.* 18:477-483; Litowski, J.R. et al. (2002) "Designing Heterodimeric Two-Stranded α -Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And α -Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity", *J. Biol. Chem.* 277:37272-37279; Steinkruger, J.D. et al. (2012) "The d'-d-d' Vertical Triad is Less Discriminating Than the a'-a-a' Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif", *J. Amer. Chem. Soc.* 134(5):2626-2633; Straussman, R. et al. (2007) "Kinking the Coiled Coil - Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface", *J. Molec. Biol.* 366:1232-1242; Tripet, B. et al. (2002) "Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance", *J. Molec. Biol.* 323:345-362; Woolfson, D.N. (2005) "The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies", *Adv. Prot. Chem.* 70:79-112; Zeng, Y. et al. (2008) "A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism", *J. Gene Med.* 10:355-367).

Такие повторяющиеся спиральные домены могут быть точными повторами или могут иметь замены. Например, спиральный домен способствующего образованию гетеродимера домена первой полипептидной цепи может содержать последовательность из восьми аминокислотных остатков, выбранных для придания отрицательного заряда такому способствующему образованию гетеродимера домену, а спиральный домен способствующего образованию гетеродимера домена второй полипептидной цепи может содержать последовательность из восьми аминокислотных остатков, выбранных для придания положительного заряда такому способствующему образованию гетеродимера домену. Не имеет значения, какая спираль предусмотрена для первой или второй полипептидных цепей при условии, что, если в обеих полипептидных цепях представлены такие способствующие образованию гетеродимеров домены, то для другой полипептидной цепи используется спираль с противоположным зарядом. Положительно заряженная аминокислота может представлять собой лизин, аргинин, гистидин и т.д., и/или отрицательно заряженная аминокислота может представлять собой глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту и т.д. Положительно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой лизин, и/или отрицательно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой глутаминовую кислоту. Можно использовать только один способствующий образованию гетеродимера домен (поскольку такой домен будет ингибировать гомодимеризацию и тем самым способствовать гетеродимеризации), тем не менее, предпочтительно, чтобы способствующие образованию гетеродимера домены содержали как первая, так и вторая полипептидные цепи диател по настоящему изобретению.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления, один из способствующих образованию гетеродимера доменов будет содержать четыре тандемных спиральных домена с "Е-спиралями" (SEQ ID NO:101: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK), глутаматные остатки которых образуют будут формировать отрицательный заряд при pH 7, в то время как другой из способствующих образованию гетеродимера доменов будет содержать четыре тандемных спиральных домена с "К-спиралями" (SEQ ID NO:102: KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK), лизиновые остатки которых будут образовывать положительный заряд при pH 7. Наличие таких заряженных доменов способствует ассоциации между первым и вторым полипептидами и, следовательно, способствует образованию гетеродимера. Особенно предпочтительным является способствующий образованию гетеродимера домен, в котором один из четырех тандемных спиральных доменов с "Е-спиралью" с SEQ ID NO: 101 был модифицирован с включением цистеинового остатка: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:103).

Аналогично, особенно предпочтительным является способствующий образованию гетеродимера домен, в котором один из четырех тандемных спиральных доменов с "К-спиралью" с SEQ ID NO: 102 был модифицирован с включением цистеинового остатка: KVAACEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK (SEQ ID NO:104).

В WO 2012/018687 раскрыто, что для улучшения фармакокинетических свойств in vivo диател диатело можно модифицировать с включением полипептидной части связывающегося в сыворотке белка на одном или нескольких концах диатела. Наиболее предпочтительно такая полипептидная часть связывающегося в сыворотке белка будет встроена в С-конец диатела. Альбумин является самым распространенным белком в плазме и имеет период полужизни у людей, составляющий 19 дней. Альбумин имеет несколько сайтов связывания малых молекул, которые позволяют ему нековалентно связываться с другими белками и тем самым продлевать их период полужизни в сыворотке. Альбуминсвязывающий домен 3 (ABD3) белка G из штамма G148 Streptococcus состоит из 46 аминокислотных остатков, образующих стабильный трехспиральный пучок, и имеет широкую альбуминсвязывающую специфичность (Johansson, M.U. et al. (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules", J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120. Таким образом, особо предпочтительная полипептидная часть связывающегося в сыворотке белка для улучшения фармакокинетических свойств in vivo диатела представляет собой альбуминсвязывающий домен (ABD) из стрептококкового белка G и более предпочтительно альбуминсвязывающий домен 3 (ABD3) белка G из штамма G148 Streptococcus (SEQ ID NO: 105): LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP.

Как раскрыто в WO 2012/162068 (включенной в настоящий документ посредством ссылки), "деиммунизированные" варианты SEQ ID NO: 105 обладают способностью ослаблять или исключать связывание с МНС II класса. Исходя из результатов комбинационной мутации, следующие комбинации замен считают предпочтительными заменами для образования такого деиммунизированного ABD: 66D/70S +71A; 66S/70S +71A; 66S/70S +79A; 64A/65A/71A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. Вариантные ABD, имеющие модификации L64A, I65A и D79A или модификации N66S, T70S и D79A. Вариантный деиммунизированный ABD, имеющий аминокислотную последовательность:

LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLID₆₆NAK₇₀ A₇₁EGVKALIDE ILAALP (SEQ

ID NO:106),

или аминокислотную последовательность:

LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKN₆₄A₆₅NNAKT VEGVKALI₇₉E ILAALP (SEQ

ID NO:107),

или аминокислотную последовательность:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI_{S66}NAKS₇₀ VEGVKALIA_{79E} ILAALP (SEQ

ID NO:108),

особенно предпочтительны, поскольку такие деиммунизированные ABD характеризуются связыванием практически равным дикому типу, при этом обеспечивая ослабленное связывание с МНС II класса. Таким образом, первая полипептидная цепь такого диатела, имеющего ABD, содержит третий линкер (линкер 3), предпочтительно расположенный на С-конце относительно домена с Е-спиралью (или К-спиралью) такой полипептидной цепи с тем, чтобы находиться между доменом с Е-спиралью (или К-спиралью) и ABD (который предпочтительно является деиммунизированным ABD). Предпочтительной последовательностью для такого линкера 3 является SEQ ID NO:90: GGGG.

2. Биспецифические содержащие Fc-участок диатела

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к биспецифическим диателам, содержащим Fc-участок, способный одновременно связываться с LAG-3 и вторым эпитопом (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, МНС I или II класса, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3 и т.д.). Добавление домена CH2-CH3 IgG в одну или обе из полипептидных цепей диатела, так чтобы образование комплекса между цепями диатела приводило в результате к образованию Fc-участка, увеличивает биологический период полужизни и/или изменяет валентность диатела. Включение домена CH2-CH3 IgG в оба полипептида диатела будет обеспечивать образование двухцепочечного биспецифического диатела, содержащего Fc-участок (фиг. 2).

Альтернативно, включение домена CH2-CH3 IgG только в один полипептид диатела обеспечивать образование более сложного четырехцепочечного биспецифического диатела, содержащего Fc-участок (фиг. 3А-3С). На фиг. 3С показано типичное четырехцепочечное диатело, имеющее константный домен легкой цепи (CL) и константный домен тяжелой цепи CH1, тем не менее, в качестве альтернативы можно использовать фрагменты таких доменов, а также другие полипептиды (см., например, фиг. 3А и 3В, патентные публикации США №№ 2013-0295121, 2010-0174053 и 2009-0060910; публикации европейских патентов EP 2714079, EP 2601216, EP 2376109, EP 2158221 и PCT публикации WO 2012/162068, WO 2012/018687, WO 2010/080538). Таким образом, например, вместо домена CH1 можно использовать пептид с аминокислотной последовательностью GVEPKSC (SEQ ID NO:96) VEPKSC (SEQ ID NO:97) или AEPKSC (SEQ ID NO:98), полученный из шарнирного домена IgG человека, а вместо домена CL можно использовать 6 С-концевых аминокислот легкой каппа-цепи человека, GFNRGEC (SEQ ID NO:99) или FNRGEC (SEQ ID NO:100).

Типичное четырехцепочечное диатело, содержащее пептид, показано на фиг. 3А. В качестве альтернативы или в дополнение, можно использовать пептид, содержащий тандемные спиральные домены с противоположным зарядом, такие как спиральные домены с "Е-спиралью"

(SEQ ID NO:101: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK или SEQ ID

NO:103: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK);

и домены с "К-спиралью"

ID NO:102: KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE или SEQ ID NO:104: KVAACKE-

(SEQ KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE).

Типичное четырехцепочечное диатело, содержащее домен, который содержит спираль, показан на фиг. 3В.

Содержащие Fc-участок молекулы диател по настоящему изобретению обычно включают дополнительный промежуточные линкерные пептиды (линкеры). Как правило, дополнительные линкеры будут содержать 3-20 аминокислотных остатков. Дополнительные или альтернативные линкеры, которые можно использовать в содержащих Fc-участок молекулах диател по настоящему изобретению, включают

GGGG (SEQ ID NO:90), LGGGSG (SEQ ID NO:91), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:92),

ASTKG (SEQ ID NO:93), DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:109), LEPKSS (SEQ ID NO:94),

APSSS (SEQ ID NO:95) и APSSSPME (SEQ ID NO:110), LEPKSADKTHTCPPC (SEQ

ID NO:111), GGC и GGG.

Для облегчения клонирования можно применять SEQ ID NO: 94 вместо GGG или GGC.

Кроме того, после аминокислотной последовательности GGG или SEQ ID NO: 94 может сразу же следовать SEQ ID NO: 109 для образования альтернативных линкеров: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:112); и LEPKSSDKTHTCPPCP; (SEQ ID NO:113).

Содержащая Fc-участок молекула диатела по настоящему изобретению может включать шарнирный участок IgG в дополнение к линкеру или вместо него. Иллюстративные шарнирные участки включают вариант шарнира EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:114) из IgG1, ERKCCVECPSP (SEQ ID NO:115) из IgG2, ESKYGPPCPSP (SEQ ID NO:116) из IgG4 и ESKYGPPCPSP (SEQ ID NO:117) из IgG4, содержащий стабилизирующую замену для уменьшения обмена цепями.

Как приведено на фиг. 3А-3С, диатела по настоящему изобретению могут содержать четыре различных цепи. Первая и третья полипептидные цепи такого диатела содержат три домена:

(i) VL1-содержащий домен,

- (ii) VL2-содержащий домен,
- (iii) способствующий образованию гетеродимера домен и
- (iv) домен, содержащий последовательность СН2-СН3.

Вторая и четвертая полипептидные цепи содержат:

- (i) VL2-содержащий домен,
- (ii) VH1-содержащий домен и

(iii) способствующий образованию гетеродимера домен, причем способствующие образованию гетеродимера домены способствуют димеризацию первой/третьей полипептидных цепей со второй/четвертой полипептидными цепями.

Домены VL и/или VH третьей и четвертой полипептидных цепей и домены VL и/или VH первой и второй полипептидных цепей могут быть одинаковыми или различаться для обеспечения четырехвалентного связывания, которое является либо моноспецифическим, либо биспецифическим, либо тетраспецифическим. Обозначения "VL3" и "VH3" обозначают соответственно переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, которые связывают "третий" эпитоп такого диатела ("эпитоп 3"). Аналогичным образом, обозначения "VL4" и "VH4" обозначают соответственно переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, которые связывают "четвертый" эпитоп такого диатела ("эпитоп 4"). Общая структура полипептидных цепей типичных содержащих Fc-участок четырехцепочечных диател по настоящему изобретению представлена в табл. 2.

Таблица 2

| | | |
|--------------------|----------|---|
| Биспецифическое | 2-я цепь | NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH |
| | 1-я цепь | NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
| | 1-я цепь | NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
| | 2-я цепь | NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH |
| Тетраспецифическое | 2-я цепь | NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH |
| | 1-я цепь | NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
| | 3-я цепь | NH ₂ -VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH |
| | 4-я цепь | NH ₂ -VL4-VH3-HPD-COOH |

HPD=способствующий образованию гетеродимера домен

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, диатела по настоящему изобретению являются биспецифическими, четырехвалентными (т.е. обладают четырьмя эпитопсвязывающими сайтами), Fc-содержащими диателами (фиг. 3А-3С), которые состоят из четырех полных полипептидных цепей. Биспецифические, четырехвалентные, Fc-содержащие диатела по настоящему изобретению содержат два эпитоп-связывающих сайта, иммуноспецифических к LAG-3 (которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом LAG-3 или с различными эпитопами LAG-3), и два эпитоп-связывающих сайта, специфичных ко второму эпитопу (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, MHC I или II класса, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3 и т.д.).

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления биспецифические содержащие Fc-участок диатела могут содержать три полипептидные цепи. Первый полипептид такого диатела содержит три домена:

- (i) VL1-содержащий домен,
- (ii) VL2-содержащий домен и
- (iii) домен, содержащий последовательность СН2-СН3.

Второй полипептид таких диател содержит:

- (i) VL2-содержащий домен,
- (ii) VH1-содержащий домен и

(iii) домен, который способствует гетеродимеризации и ковалентному связыванию первой полипептидной цепи диатела.

Третий полипептид таких диател содержит последовательность СН2-СН3. Таким образом, первая и вторая полипептидные цепи таких диател объединяются вместе с образованием сайта связывания VL1/VH1, который способен связываться с первым эпитопом, а также сайта связывания VL2/VH2, который способен связываться со вторым эпитопом. Первый и второй полипептиды связаны друг с другом посредством дисульфидной связи с участием цистеиновых остатков в их соответствующих третьих доменах. Следует отметить, что первая и третья полипептидные цепи объединяются в комплекс друг с другом с образованием Fc-участка, который стабилизирован дисульфидной связью. Такие диатела имеют повышенную активность. На фиг 4А и 4В показаны структуры таких диател. Такие содержащие Fc-участок биспецифические диатела могут иметь любую из двух ориентации (табл. 3):

| | | |
|----------------------|----------|---|
| Первая ориентация | 3-я цепь | NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH |
| | 1-я цепь | NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH ₂ -CH ₃ -COOH |
| | 2-я цепь | NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH |
| Вторая ориентация | 3-я цепь | NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH |
| | 1-я цепь | NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -VL1-VH2-HPD-COOH |
| | 2-я цепь | NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH |

HPD=способствующий образованию гетеродимера домен

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, диатела по настоящему изобретению являются биспецифическими, двухвалентными (т.е. имеют два эпитопсвязывающих сайта), Fc-содержащими диателами (фиг. 4А-4В), которые состоят из трех полных полипептидных цепей. Биспецифические, двухвалентные Fc-содержащие диатела по настоящему изобретению содержат один эпитопсвязывающий сайт, иммуноспецифический к LAG-3 и один эпитопсвязывающий сайт, специфичный ко второму эпитопу (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC I или II класса, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т.д.).

В соответствии со следующим вариантом осуществления биспецифические содержащие Fc-участок диатела могут содержать все пять полипептидных цепей. В соответствии с конкретным вариантом осуществления, две из указанных пяти полипептидных цепей имеют одинаковую аминокислотную последовательность. Первая полипептидная цепь таких диател включает:

- (i) VH1-содержащий домен,
- (ii) CH1-содержащий домен и
- (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3.

Первая полипептидная цепь может представлять собой тяжелую цепь антитела, которая содержит VH1 и константный участок тяжелой цепи. Вторая и пятая полипептидные цепи таких диател содержат:

- (i) VL1-содержащий домен и
- (ii) CL-содержащий домен.

Вторая и/или пятая полипептидные цепи таких диател могут представлять собой легкие цепи антитела, которые содержат VL1, комплементарный VH1 первой/третьей полипептидной цепи. Первую, вторую и/или пятую полипептидные цепи можно выделить из естественных антител. Альтернативно, их можно сконструировать рекомбинантными способами. Третья полипептидная цепь таких диател содержит:

- (i) VH1-содержащий домен,
- (ii) CH1-содержащий домен,
- (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3,
- (iv) VL2-содержащий домен,
- (v) VH3-содержащий домен и
- (vi) способствующий образованию гетеродимера домен, где способствующие образованию гетеродимера домены способствуют димеризации третьей цепи с четвертой цепью.

Четвертый полипептид таких диател содержит:

- (i) VL3-содержащий домен,
- (ii) VH2-содержащий домен и

(iii) домен, который способствует гетеродимеризации и ковалентному связыванию третьей полипептидной цепи диатела.

Таким образом, первая и вторая, а также третья и пятая полипептидные цепи таких диател объединяются вместе с образованием двух связывающих сайтов VL1/VH1, способных связывать первый эпитоп. Третья и четвертая полипептидные цепи таких диател объединяются вместе с образованием сайта связывания VL2/VH2, который способен связываться со вторым эпитопом, а также сайта связывания VL3/VH3, который способен связываться с третьим эпитопом. Первый и третий полипептиды связаны друг с другом посредством дисульфидной связи с участием цистеиновых остатков в их соответствующих константных участках. Следует отметить, что первая и третья полипептидные цепи объединяются в комплекс друг с другом с образованием Fc-участка. Такие диатела имеют повышенную активность. На фиг. 5 показана структура таких диател. Следует понимать, что домены VL1/VH1, VL2/VH2 и VL3/VH3 могут быть одинаковыми или различаться для обеспечения связывания, которое является моноспецифическим, биспецифическим или триспецифическим. Тем не менее, как представлено в настоящем документе, такие домены предпочтительно выбраны так, чтобы связывать LAG-3 и второй эпитоп (или второй и третий эпитоп (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC I или II класса, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т.д.). Второй и третий эпитопы могут быть различными эпитопами одной и той же молекулы антигена или могут быть эпитопами различных молекул антигена. Такие

аспекты настоящего изобретения более подробно рассмотрены ниже.

Таким образом, домены VL и VH полипептидных цепей выбраны таким образом, чтобы образовались сайты связывания VL/VH, специфичные к требуемым эпитопам. Сайты связывания VL/VH, образованные в результате связывания полипептидных цепей, могут быть одинаковыми или различаться для обеспечения четырехвалентного связывания, которое является моноспецифическим, биспецифическим, триспецифическим или тетраспецифическим. В частности, домены VL и VH могут быть выбраны таким образом, чтобы биспецифическое диатело могло содержать два сайта связывания к первому эпитопу и два сайта связывания ко второму эпитопу, или три сайта связывания к первому эпитопу и один сайт связывания ко второму эпитопу, или два сайта связывания к первому эпитопу, один сайт связывания ко второму эпитопу и один сайт связывания к третьему эпитопу (как показано на фиг. 5). Общая структура полипептидных цепей типичных содержащих Fc-участок пятицепочечных диател по настоящему изобретению представлена в табл. 4.

Таблица 4

| | | |
|-----------------------------|----------|---|
| Биспецифическое (2x2) | 2-я цепь | NH ₂ -VL1-CL-COOH |
| | 1-я цепь | NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH |
| | 3-я цепь | NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH2-HPD-COOH |
| | 5-я цепь | NH ₂ -VL1-CL-COOH |
| | 4-я цепь | NH ₂ -VL2-VH2-HPD-COOH |
| Биспецифическое (3x1) | 2-я цепь | NH ₂ -VL1-CL-COOH |
| | 1-я цепь | NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH |
| | 3-я цепь | NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH |
| | 5-я цепь | NH ₂ -VL1-CL-COOH |
| | 4-я цепь | NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH |
| Триспецифическое (2x1x1) | 2-я цепь | NH ₂ -VL1-CL-COOH |
| | 1-я цепь | NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH |
| | 3-я цепь | NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH3-HPD-COOH |
| | 5-я цепь | NH ₂ -VL1-CL-COOH |
| | 4-я цепь | NH ₂ -VL3-VH2-HPD-COOH |

HPD=способствующий образованию гетеродимера домен

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, диатела по настоящему изобретению являются биспецифическими четырехвалентными (т.е. обладают четырьмя эпитопсвязывающими сайтами) Fc-содержащими диателами, которые состоят из пяти полных полипептидных цепей, имеющих два сайта связывания к первому эпитопу и два сайта связывания ко второму эпитопу. В соответствии с одним вариантом осуществления, биспецифические четырехвалентные Fc-содержащие диатела по настоящему изобретению содержат два эпитопсвязывающих сайта, иммуноспецифических к LAG-3 (которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом LAG-3 или с различными эпитопами LAG-3), и два эпитопсвязывающих сайта, специфичных ко второму эпитопу (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC I или II класса, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т.д.). В соответствии с другим вариантом осуществления биспецифические четырехвалентные Fc-содержащие диатела по настоящему изобретению содержат три эпитопсвязывающих сайта, иммуноспецифических к LAG-3 (которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом LAG-3 или с различными эпитопами LAG-3), и один эпитопсвязывающий сайт, специфичный ко второму эпитопу (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC I или II класса, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т.д.). В соответствии с другим вариантом осуществления биспецифические четырехвалентные Fc-содержащие диатела по настоящему изобретению содержат один эпитопсвязывающий сайт, иммуноспецифический к LAG-3, и три эпитопсвязывающих сайта, специфичных ко второму эпитопу (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC I или II класса, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т.д.).

3. Биспецифические трехвалентные содержащие Fc-участки связывающие молекулы

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к биспецифическим трехвалентным содержащим Fc-участок связывающим молекулам и способным одновременно связываться с первым эпитопом, вторым эпитопом и третьим эпитопом, причем по меньшей мере один из таких эпитопов не идентичен другому из таких эпитопов. Таким образом, такие биспецифические диатела содержат домены "VL1"/"VH1", которые способны связываться с первым эпитопом, домены "VL2"/"VH2", которые способны связываться со вторым эпитопом, и домены "VL3"/"VH3", которые способны связываться с третьим эпитопом. В соответствии с одним вариантом осуществления, один или два из таких эпитопов являются эпитопом LAG-3, а другой (или другие) из таких эпитопов не является эпитопом LAG-3 (например, эпитопом B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC I или II класса, OX40, PD-L1, PD-L1, TCR, TIM-3 и т.д.). Такие биспецифические трехвалентные связывающие молекулы содержат три эпитопсвязывающих сайта, два из которых являются связывающими доме-

нами по типу диатела, которые обеспечивают сайт связывания А и сайт связывания В, и один из которых является связывающим доменом, не относящимся по типу диатела, который обеспечивает сайт связывания С (см., например, фиг. 6А-6F, и РСТ заявки №: РСТ/US 15/33081 и РСТ/US 15/33076).

Как правило, трехвалентные связывающие молекулы по настоящему изобретению будут содержать четыре различных полипептидных цепи (см. фиг. 6А-6В), тем не менее, молекулы могут содержать меньшее или большее количество полипептидных цепей, например, в результате слияния таких полипептидных цепей друг с другом (например, посредством пептидной связи), или в результате "разделения" таких полипептидных цепей с образованием дополнительных полипептидных цепей, или в результате связывания меньшего количества или дополнительных полипептидных цепей посредством дисульфидных связей. На фиг. 6В-6F приведена иллюстрация этого аспекта настоящего изобретения, на которой схематически изображены такие молекулы с тремя полипептидными цепями. Как представлено на фиг. 6А-6F, трехвалентные связывающие молекулы по настоящему изобретению могут иметь альтернативные ориентации, в которых связывающие домены по типу диатела являются N-концевыми (фиг. 6А, 6С и 6D) или С-концевыми (фиг. 6В, 6Е и 6F) по отношению к Fc-участку.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, первая полипептидная цепь таких трехвалентных связывающих молекул по настоящему изобретению содержит:

- (i) VL1-содержащий домен,
- (ii) VL2-содержащий домен,
- (iii) способствующий образованию гетеродимера домен и
- (iv) домен, содержащий последовательность СН2-СН3.

Домены VL1 и VL2 расположены на N-конце или С-конце относительно СН2-СН3-содержащего домена, как представлено в табл. 5 (фиг. 6А и 6В). Вторая полипептидная цепь таких вариантов осуществления содержит:

- (i) VL2-содержащий домен,
- (ii) VH1-содержащий домен и
- (iii) способствующий образованию гетеродимера домен.

Третья полипептидная цепь по таким вариантам осуществления содержит:

- (i) VH3-содержащий домен,
- (ii) СН1-содержащий домен и
- (iii) домен, содержащий последовательность СН2-СН3.

Третья полипептидная цепь может представлять собой тяжелую цепь антитела, которая содержит VH3 и константный участок тяжелой цепи. Четвертый полипептид по таким вариантам осуществления содержит:

- (i) VL3-содержащий домен и
- (ii) CL-содержащий домен.

Четвертая полипептидная цепь может представлять собой легкую цепь антитела, которая содержит VL3, комплементарный VH3 третьей полипептидной цепи. Третью или четвертую полипептидные цепи можно выделить из естественных антител. Альтернативно их можно сконструировать рекомбинантными, синтетическими или другими способами.

Вариабельные домены легкой цепи из первой и второй полипептидных цепей отделены от вариабельных доменов тяжелой цепи из таких полипептидных цепей промежуточным спейсерным линкером, который имеет слишком короткую длину, чтобы позволить их доменам VL1/VH2 (или их VL2/VH1) связаться вместе с образованием эпитоп-связывающего сайта, способного связываться с первым или вторым эпитопом. Предпочтительный промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) для такой цели имеет последовательность (SEQ ID NO:14): GGGSGGGG.

Другие домены трехвалентных связывающих молекул могут быть разделены одним или несколькими промежуточными спейсерными пептидами, необязательно содержащими цистеиновый остаток.

Иллюстративные линкеры, пригодные для создания трехвалентных связывающих молекул, приведены в настоящем описании, а также представлены в РСТ заявках РСТ/US 15/33081 и РСТ/US 15/33076. Таким образом, первая и вторая полипептидные цепи таких трехвалентных связывающих молекул объединяются вместе с образованием сайта связывания VL1/VH1, который способен связывать первый эпитоп, а также сайта связывания VL2/VH2, который способен связываться со вторым эпитопом. Третья и четвертая полипептидные цепи таких трехвалентных связывающих молекул объединяются вместе с образованием сайта связывания VL3/VH3, который способен связываться с третьим эпитопом.

Как описано далее, трехвалентные связывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать три полипептида. Трехвалентные связывающие молекулы, содержащие три полипептидные цепи, могут быть получены путем связывания доменов четвертого полипептида, N-концевого по отношению к VH3-содержащему домену третьего полипептида. Альтернативно, используют третью полипептидную цепь трехвалентной связывающей молекулы по настоящему изобретению, содержащую следующие три домена:

- (i) VL3-содержащий домен,
- (ii) VH3-содержащий домен и

(iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3, причем VL3 и VH3 отделены друг от друга промежуточным спейсерным пептидом, который имеет достаточную длину (по меньшей мере 9 или более аминокислотных остатков), чтобы позволить объединение таких доменов с образованием эпитоп-связывающего сайта.

Следует понимать, что домены VL1/VH1, VL2/VH2 и VL3/VH3 таких молекул диател могут быть одинаковыми или различаться для обеспечения связывания, которое является моноспецифическим, биспецифическим или триспецифическим. Тем не менее, как указано в настоящем документе, такие домены предпочтительно выбраны так, чтобы связывать LAG-3 и второй эпитоп (или второй и третий эпитоп) (предпочтительно, такие эпитопы представляли собой эпитопы B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 МНС I или II класса, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т. д.).

В частности, домены VL и VH могут быть выбраны таким образом, чтобы трехвалентная связывающая молекула содержала два сайта связывания к первому эпитопу и один сайт связывания ко второму эпитопу, или один сайт связывания к первому эпитопу и два сайта связывания ко второму эпитопу, или один сайт связывания к первому эпитопу, один сайт связывания ко второму эпитопу и один сайт связывания к третьему эпитопу. Общая структура полипептидных цепей типичных трехвалентных связывающих молекул по настоящему изобретению представлена на фиг. 6A-6F и в табл. 5:

Таблица 5

| | | |
|---------------------------------|----------|---|
| 1-я ориентация четырех цепей | 2-я цепь | NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH |
| | 1-я цепь | NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
| | 3-я цепь | NH ₂ -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH |
| | 4-я цепь | NH ₂ -VL3-CL-COOH |
| 2-я ориентация четырех цепей | 2-я цепь | NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH |
| | 1-я цепь | NH ₂ -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD COOH |
| | 3-я цепь | NH ₂ -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH |
| | 4-я цепь | NH ₂ -VL3-CL-COOH |
| 1-я ориентация трех цепей | 2-я цепь | NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH |
| | 1-я цепь | NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
| | 3-я цепь | NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH |
| 2-я ориентация трех цепей | 2-я цепь | NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH |
| | 1-я цепь | NH ₂ -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD COOH |
| | 3-я цепь | NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH |

HPD=способствующий образованию гетеродимера доменов

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к биспецифическим трехвалентным связывающим молекулам, которые содержат два эпитопсвязывающих сайта к LAG-3 и один эпитопсвязывающий сайт ко второму эпитопу, присутствующему на молекуле, отличной от LAG-3 (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, МНС I или II класса, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т.д.). Два эпитопсвязывающих сайта к LAG-3 могут связывать один и тот же эпитоп или различные эпитопы. Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к биспецифическим трехвалентным связывающим молекулам, которые содержат один эпитопсвязывающий сайт к LAG-3 и два эпитопсвязывающих сайта, которые связывают второй антиген, присутствующий на молекуле, отличной от LAG-3 (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, МНС I или II класса, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т.д.). Два эпитопсвязывающих сайта ко второму антигену могут связывать один и тот же эпитоп или различные эпитопы антигена (например, одинаковые или различные эпитопы LAG-3).

Как показано выше, такие биспецифические трехвалентные связывающие молекулы могут содержать три или четыре полипептидных цепи.

VII. Константные домены и Fc-участки

В настоящем документе представлены константные домены антитела, пригодные для создания связывающих LAG-3 молекул (например, антител, диател, трехвалентных связывающих молекул и т.д.) по настоящему изобретению.

Предпочтительным доменом CL является каппа-домен CL IgG человека. Аминокислотной последовательностью иллюстративного каппа-домена CL человека является (SEQ ID NO: 118):

```
RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC
```

Альтернативно, иллюстративным доменом CL является лямбда-домен CL IgG человека. Аминокислотной последовательностью иллюстративного каппа-домена CL человека является (SEQ ID NO: 119):

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA
 GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP
 TECS

Как представлено в настоящем документе, связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению могут содержать Fc-участок. Fc-участок таких молекул по настоящему изобретению может относиться к любому изотипу (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). Связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению могут дополнительно содержать домен CH1 и/или шарнирный участок. При наличии, домен CH1 и/или шарнирный участок могут относиться к любому изотипу (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), и предпочтительно относятся к тому же изотипу, что и требуемый Fc-участок.

Иллюстративным доменом CH1 является домен CH IgG1. Аминокислотной последовательностью иллюстративного домена CH1 IgG1 человека является (SEQ ID NO: 120):

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

Иллюстративным доменом CH1 является домен CH IgG2. Аминокислотной последовательностью иллюстративного домена CH1 IgG2 человека является (SEQ ID NO: 121):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

Иллюстративным доменом CH1 является домен CH1 IgG4. Аминокислотной последовательностью иллюстративного домена CH1 IgG4 человека является (SEQ ID NO: 122):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

Одним иллюстративным шарнирным участком является шарнирный участок IgG1 человека. Аминокислотной последовательностью иллюстративного шарнирного участка IgG1 человека является (SEQ ID NO:114): EPKSCDKTHTCPPCP.

Другой иллюстративный шарнирный участок представляет собой шарнирный участок IgG2 человека. Аминокислотной последовательностью иллюстративного шарнирного участка IgG2 человека является (SEQ ID NO:115): ERKCCVECPSCP.

Другой иллюстративный шарнирный участок представляет собой шарнирный участок IgG4 человека. Аминокислотной последовательностью иллюстративного шарнирного участка IgG4 человека является (SEQ ID NO:116): ESKYGPPCPSCP.

Как описано в настоящем документе, шарнирный участок IgG4 может содержать стабилизирующую мутацию, такую как замена S228P. Аминокислотной последовательностью иллюстративного стабилизированного шарнирного участка IgG4 является (SEQ ID NO:117): ESKYGPPCPSCP.

Fc-участок содержащих Fc-участок молекул (например, антител, диател и трехвалентных молекул) по настоящему изобретению может представлять собой либо полный Fc-участок (например, полный Fc-участок IgG), либо только фрагмент Fc-участка. Необязательно, Fc-участок содержащих Fc-участок молекул по настоящему изобретению не имеет C-концевой лизиновый аминокислотный остаток. Так, в частности, Fc-участок содержащих Fc-участок молекул по настоящему изобретению может быть сконструированным вариантным Fc-участком. Несмотря на то, что Fc-участок биспецифических содержащих Fc-участок молекул по настоящему изобретению может обладать способностью связываться с одним или несколькими рецепторами Fc (например, FcγR(s)), более предпочтительно такой вариантный Fc-участок будет иметь измененное связывание с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, которым характеризуется Fc-участок дикого типа) или будут иметь существенно уменьшенную или отсутствующую способность связываться с ингибирующим(-и) рецептором(-ами). Таким образом, Fc-участок содержащих Fc-участок молекул по настоящему изобретению может включать несколько или все домены CH2 и/или несколько или все домены CH3 полного Fc-участка, или может содержать последовательность вариантного CH2 и/или вариантного CH3 (который может включать, например, одну или несколько вставок и/или одну или несколько делеций по отношению к доменам CH2 или CH3 полного Fc-участка). Такие Fc-участки могут содержать не относящиеся к Fc полипептидные части, или могут содержать части неприродных полных Fc-участков, или могут содержать не встречающиеся в природе ориентации доменов CH2 и/или CH3 (такие как, например, два домена CH2, или два домена CH3, или в направлении от N-конца до C-конца, домен CH3 связанный с доменом CH2 и т.д.).

Из уровня техники известны модификации Fc-участка, которые были определены как изменяющие эффекторную функцию, в том числе модификации, которые увеличивают связывание с активирующими рецепторами (например, FcγRIIA (CD16A) и уменьшают связывание с ингибирующими рецепторами (например, FcγRIIB (CD32B) (см., например, Stavenhagen, J.B. et al. (2007) "Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγ Receptors", Cancer Res. 57(18):8882-8890). Иллюстративные варианты Fc-участков IgG1 человека с уменьшенным связыванием с CD32B и/или увеличенным связыванием с

CD16A содержат замены F243L, R292P, Y300L, V305I или P296L. Такие аминокислотные замены могут присутствовать в Fc-участке IgG1 человека в любой комбинации или подкомбинации. В соответствии с одним вариантом осуществления вариант Fc-участка IgG1 человека содержит замену F243L, R292P и Y300L. В соответствии с другим вариантом осуществления, вариант Fc-участка IgG1 человека содержит замены F243L, R292P, Y300L, V305I и P296L.

Так, в частности, предпочтительно, чтобы домены CH2-CH3 полипептидных цепей содержащих Fc-участок молекул по настоящему изобретению характеризовались сниженным (или практически отсутствующим) связыванием с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, которым характеризуется Fc-участок IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 1)). Выше описаны варианты Fc-участки и мутантные формы, способные опосредовать такое измененное связывание. В соответствии с конкретным вариантом осуществления содержащие Fc-участок молекулы по настоящему изобретению содержат Fc-участок IgG, который характеризуется уменьшенной ADCC-эффекторной функцией. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления домен CH2-CH3 первой и/или третьей полипептидных цепей таких молекул включают любую 1, 2 или 3 замены: L234A, L235A, N297Q и N297G. В соответствии с другим вариантом осуществления вариант Fc-участка IgG человека содержит замену N297Q, замену N297G, замены L234A и L235A замены или замену D265A, поскольку эти мутации устраняют связывание FcR. В соответствии с альтернативным вариантом используют домен CH2-CH3, который изначально характеризуется пониженным (или практически отсутствующим) связыванием с FcγRIIA (CD16a) и/или уменьшенной эффекторной функцией (относительно связывания, которым характеризуется Fc-участок IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 1)). В соответствии с конкретным вариантом осуществления, содержащие Fc-участок молекулы по настоящему изобретению содержат Fc-участок IgG2 (SEQ ID NO: 2) или Fc-участок IgG4 (SEQ ID NO: 4). В случае использования Fc-участка IgG4 настоящее изобретение также относится к внесению стабилизирующей мутации, такой как описанная выше замена S228P в шарнирном участке (см., например, SEQ ID NO: 117). Поскольку замены N297G, N297Q, L234A, L235A и D265A устраняют эффекторную функцию, в тех обстоятельствах, когда необходима эффекторная функция, эти замены предпочтительно не будут использоваться.

Предпочтительная последовательность IgG1 для доменов CH2 и CH3 связывающих LAG-3 молекул по настоящему изобретению будет иметь замены L234A/L235A (SEQ ID NO: 123):

```

APEAAAGGPSV FLFPKPKD LMSRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYF LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Так, в частности, предпочтительно, чтобы Fc-участки полипептидных цепей содержащих Fc-участок молекул по настоящему изобретению характеризовались повышенным период полужизни в сыворотке (относительно периода полужизни, которым характеризуется соответствующий Fc дикого типа). Выше описаны варианты Fc-участки и мутантные формы, характеризующиеся продолжительным периодом полужизни в сыворотке. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления, домен CH2-CH3 первой и/или третьей полипептидных цепей таких содержащих Fc-участок молекул включают любую 1, 2 или 3 замены: M252Y, S254T и T256E. Настоящее изобретение дополнительно относится к содержащим Fc-участок молекулам по настоящему изобретению, содержащим варианты Fc-участки, содержащие:

(A) одну или несколько мутаций, которые изменяют эффекторную функцию и/или FcγR; и

(B) одну или несколько мутаций, которые продлевают период полужизни в сыворотке.

Предпочтительная последовательность IgG1 для доменов CH2 и CH3 содержащих Fc-участок молекул по настоящему изобретению будут содержать замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (SEQ ID NO: 124):

```

APEAAAGGPSV FLFPKPKD LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYF LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Предпочтительная последовательность IgG4 для доменов CH2 и CH3 содержащих Fc-участок молекул по настоящему изобретению будут содержать замены M252Y/S254T/T256E (SEQ ID NO: 125):

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME
 ALHNNHYTQKS LSLSLGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Для диател и трехвалентных связывающих молекул (первая и третья полипептидные цепи которых не идентичны) желательнее уменьшить или предупредить гомодимеризацию между доменами CH2-CH3 двух первых полипептидных цепей или между доменами CH2-CH3 двух третьих полипептидных цепей. Домены CH2 и/или CH3 таких полипептидных цепей не обязательно должны быть идентичными по последовательности, и преимущественно они модифицированы таким образом, чтобы это содействовало комплексообразованию между двумя полипептидными цепями. Например, аминокислотная замена (предпочтительно замена на аминокислоту, содержащую объемную боковую группу, образующую "выступ", например, триптофан), может быть введена в домен CH2 или CH3 с тем, чтобы стерическое влияние препятствовало взаимодействию с аналогично мутированным доменом и принуждало мутированный домен образовывать пару с доменом, в который методом инженерии была встроена комплементарная или согласующаяся мутация, т.е. "впадина" (например, замена на глицин). Такие наборы мутаций могут быть встроены способами инженерии в любую пару полипептидов, содержащих домены CH2-CH3, которые образуют Fc-участок. Способы белковой инженерии для облегчения гетеродимеризации относительно гомодимеризации хорошо известны их уровни техники, в частности, в отношении инженерии иммуноглобулиноподобных молекул, и охватываются настоящим документом (см., например, Ridgway et al. (1996) " 'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization", Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library", J. Mol. Biol. 270: 26-35, и Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis", J. Immunol. Methods 296:95-101; каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном ее объеме). Предпочтительно, "выступ" встраивают способами инженерии в домены CH2-CH3 первой полипептидной цепи, а "впадину" встраивают способами инженерии в домены CH2-CH3 третьей полипептидной цепи диател, содержащих три полипептидные цепи. Таким образом, "выступ" будет способствовать предупреждению гомодимеризации первой полипептидной цепи через ее домены CH2 и/или CH3. Поскольку третья полипептидная цепь предпочтительно содержит замену "впадина", она будет гетеродимеризоваться с первой полипептидной цепью, а также гомодимеризоваться сама по себе. Эта стратегия может быть использована для диател и трехвалентных связывающих молекул, содержащих три, четыре или пять цепей, как подробно описано выше, где "выступ" встраивают способами инженерии в домены CH2-CH3 первой полипептидной цепи, а "впадину" встраивают способами инженерии в домены CH2-CH3 третьей полипептидной цепи.

Предпочтительный выступ создают путем модификации Fc-участка IgG с включением модификации T366W. Предпочтительную впадину создают путем модификации Fc-участка IgG с включением модификации T366S, L368A и Y407V. Для облегчения очистки гомодимера несущей впадину третьей полипептидной цепи из конечной биспецифической гетеродимерной содержащей Fc-участок молекулы сайт связывания белка А доменов CH2 и CH3 третьей полипептидной цепи предпочтительно мутируют путем замены аминокислоты в положении 435 (H435R). Таким образом, гомодимер несущей впадину третьей полипептидной цепи не будет связываться с белком А, тогда как биспецифический гетеродимер будет сохранять свою способность связывать белок А посредством сайта связывания белка А на первой полипептидной цепи. В соответствии с альтернативным вариантом осуществления, несущая впадину третья полипептидная цепь может включать аминокислотные замены в положениях 434 и 435 (N434A/N435K).

Предпочтительная аминокислотная последовательность IgG1 для доменов CH2 и CH3 первой полипептидной цепи содержащей Fc-участок молекулы по настоящему изобретению будет иметь "несущую выступ" последовательность (SEQ ID NO: 126):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQGG NVFSCSVME
 ALHNNHYTQKS LSLSPGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Предпочтительная аминокислотная последовательность IgG1 для доменов CH2 и CH3 второй полипептидной цепи содержащей Fc-участок молекулы по настоящему изобретению, имеющей две полипептидные цепи (или третьей полипептидной цепи содержащей Fc-участок молекулы, имеющей три, четыре, или пять полипептидных цепей), будет иметь "несущую впадину" последовательность (SEQ ID NO: 127):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
 ALHNRYTQKS LSLSPGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Как можно видеть, домены CH2-CH3 с SEQ ID NO: 126 и SEQ ID NO: 127 включают замену в положении 234 на аланин и 235 на аланин и таким образом образуют Fc-участок, которых характеризуется пониженным (или практически отсутствующим) связыванием с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, которым характеризуется Fc-участок дикого типа (SEQ ID NO: 1). Настоящее изобретение также относится к таким доменам CH2-CH3, которые содержат аланиновые остатки в положениях 234 и/или 235 и/или альтернативные и/или дополнительные замены, которые модифицируют эффекторную функцию и/или связывающую с FcR активность у Fc-участка. Настоящее изобретение также относится к таким доменам CH2-CH3, которые дополнительно содержат одну или несколько аминокислотных замен, удлиняющих период полужизни. В частности, настоящее изобретение относится к таким несущим впадину и таким несущим выступ доменам CH2-CH3, которые дополнительно содержат M252Y/S254T/T256E.

Предпочтительно, чтобы первая полипептидная цепь имела "несущую выступ" последовательность CH2-CH3, такую как последовательность SEQ ID NO: 126. Тем не менее, как будет понятно, в первой полипептидной цепи может быть использован "несущий впадину" домен CH2-CH3 (например, SEQ ID NO: 127), и в этом случае "несущий выступ" домен CH2-CH3 (например, SEQ ID NO: 126) будет использован во второй полипептидной цепи содержащей Fc-участок молекулы по настоящему изобретению, имеющей две полипептидные цепи (или в третьей полипептидной цепи содержащей Fc-участок молекулы, имеющей три, четыре или пять полипептидных цепей).

Как подробно описано выше, настоящее изобретение относится к содержащим Fc-участок молекулам (например, антителам и содержащим Fc-участок диателам), имеющим домены CH2 и CH3 дикого типа или имеющим домены CH2 и CH3, содержащие описанные выше комбинации замен. Иллюстративной аминокислотной последовательностью домена CH2-CH3 IgG1, охватывающей такие изменения, является (SEQ ID NO: 128):

APEX₁X₂GGPSV FLFPPKPKDT LX₃IX₄RX₅PEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPSREEMTK NQVSLX₆CX₇VK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
 YKTPPVLDL DGSFFLX₈SKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
 ALHX₉X₁₀YTQKS LSLSPGX₁₁

где:

(a) как X₁, так и X₂ представляют собой L (дикий тип) или представляют собой A (пониженное связывание с FcγR);

(b) X₃, X₄ и X₆ соответственно представляют собой M, S и T (дикий тип) или представляют собой Y, T и E (удлиненный период полужизни),

(c) X₆, X₇ и X₈ соответственно представляют собой T, L и Y (дикий тип) или представляют собой W, L и Y (выступ) или S, A и V (впадина);

(d) X₉ и X₁₀ соответственно представляют собой N и H (дикий тип) или представляют собой N и R (без связывания белка A) или A и K (без связывания белка A) и

(e) X₁₁ представляет собой K или отсутствует.

В соответствии с другими вариантами осуществления настоящее изобретение относится к связывающим LAG-3 молекулам, содержащим домены CH2 и/или CH3, которые были изменены способами инженерии для облегчения гетеродимеризации относительно гомодимеризации с помощью известных из уровня техники мутаций, таких как раскрытые в PCT публикациях WO 2007/110205, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/06867, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном их объеме.

VIII. Эталонные антитела

A. Эталонное антитело к LAG-3

Для оценки и характеристики новых связывающих LAG-3 молекул антител по настоящему изобретению использовали следующее эталонное антитело: 25F7 (BMS-986016, Medarex/BMS, обозначенное в настоящем документе как "LAG-3 mAb A").

1. 25F7 ("LAG-3 mAb A")

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH у 25F7 ("LAG-3 mAb A") (SEQ ID NO: 129) (остатки CDRH показаны подчеркнутыми):

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF DYYWNWIRQP PGKGLEWIGE
INHNGNTNSN PSLKSRVTL LDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAFGYS
DYEYNWFDPW GQGTLVTVSS

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL у 25F7 ("LAG-3 mAb A") (SEQ ID NO: 130) (остатки CDRL показаны подчеркнутыми):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS SYLAWYQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISSELP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ
 GTNLEIK

В. Эталонные антитела к PD-1

Для оценки и характеристики активности новых связывающих LAG-3 молекул по настоящему изобретению в комбинации с антителом к PD-1 можно применять эталонное антитело. Известны антитела, которые являются иммуноспецифическими к PD-1 (см., например, патенты Соединенных Штатов №№ 8008449, 8552154; патентные РСТ публикации WO 2012/135408, WO 2012/145549 и WO 2013/014668), и в их число входят: ниволумаб (также известный как 5C4, BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106, и представленный на рынке как OPDIVO® от Bristol-Myers Squibb), обозначенный в настоящем документе как "PD-1 mAb 1", пембролизумаб (ранее известный как ламбролизумаб, также известный как МК-3475, SCH-900475, и представленный на рынке как KEYTRUDA® от Merck), обозначенный в настоящем документе как "PD-1 mAb 2"; EH12.2H7 (Dana Farber), обозначенный в настоящем документе как "PD-1 mAb 3"; пидилизумаб (также известный как CT-011, CureTech), обозначенный в настоящем документе как "PD-1 mAb 4".

1. Ниволумаб ("PD-1 mAb 1")

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи PD-1 mAb 1 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 131) (остатки CDRH показаны подчеркнутыми):

QVQLVESGGG VVQGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV
IWYDGSKRY ADSVKRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND
DYWGQTLVT VSS

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи PD-1 mAb 1 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 132) (остатки CDRH показаны подчеркнутыми):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISSELP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
 GTKVEIK

2. Пембролизумаб ("PD-1 mAb 2")

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи PD-1 mAb 2 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 133) (остатки CDRH показаны подчеркнутыми):

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWGG
INPSNGGTNF NEKFKRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD
YRFDMGFDYW GQGTITVTVSS

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи PD-1 mAb 2 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 134) (остатки CDRH показаны подчеркнутыми):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL
 LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL
TFGGGTKVEIK

3. EH12.2H7 ("PD-1 mAb 3")

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи PD-1 mAb 3 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 135) (остатки CDRH показаны подчеркнутыми):

QVQLQQSGAE LAKPGASVQM SCKASGYSFT SSWIHWVKQR PGQGLEWIGY
IYPSTGFTEY NQKFKDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARRW
DSSGYHAMDY WGQTSVTVSS

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи PD-1 mAb 3 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 136) (остатки CDRH показаны подчеркнутыми):

DIVLTQSPAS LTVSLGQRAT ISCRASQSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL
 LIKFGSNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQHSWEIPY
TFGGGTKLEI K

4. Пидилизумаб ("PD-1 mAb 4")

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи PD-1 mAb 4 имеет ами-

нокислотную последовательность (SEQ ID NO: 137) (остатки CDRH показаны подчеркнутыми):

QVQLVQSGSE LKKPGASVKI SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLQWMGW
INTDSGESTY AEEFKGRFVF SLDTSVNTAY LQITSLTAED TGMVFCVRVG
YDALDYWGQG TLVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи PD-1 mAb 4 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 138) (остатки CDRH показаны подчеркнутыми):

EIVLTVQSPSS LSASVGDVRT ITCSARSSVS YMHWFQQKPG KAPKLWIYRT
SNLASGVPSR FSGSGSGTSY CLTINSLQPE DFATYYCQQR SSFPLTFGGG
 TKLEIK

IX. Способы получения

Антитело к полипептиду LAG-3 и другие LAG-3-агонисты, антагонисты и модуляторы можно создавать из полинуклеотидов и/или последовательностей антител LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6 с помощью известных из уровня техники способов, например, синтетически или рекомбинантно. Один из способов получения таких пептидных агонистов, антагонистов и модуляторов предусматривает химический синтез полипептида с последующей обработкой в окисляющих условиях, подходящих для получения нативной конформации, т. е. правильных соединений посредством дисульфидных связей. Это может быть выполнено с помощью методик, хорошо известных специалистам в настоящей области техники (см., например, Kelley, R. F. et al. (1990) In: GENETIC Engineering Principles and Methods, Setlow J.K. Ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pp 1-19; Stewart, J.M et al. (1984) Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; также см. патенты США №№ 4105603, 3972859, 3842067 и № 3862925).

Полипептиды по настоящему изобретению можно легко получить с помощью твердофазного пептидного синтеза (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis", Science 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century", Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10).

В соответствии с другой альтернативой, полностью человеческие антитела, имеющие один или несколько CDR из LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6, или которые конкурируют с LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6 за связывание с LAG-3 человека или его растворимой формой, можно получить с помощью коммерчески доступных мышей, которые были изменены способами инженерии так, чтобы они экспрессировали конкретные белки иммуноглобулина человека. Для получения гуманизированных или человеческих антител также можно применять трансгенных животных, которые предназначены для выработки более желательных (например, полностью человеческих антител) или более робастного иммунного ответа. Примерами такой методики являются XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc., Фримонт, Калифорния) и HuMAb-MOUSE® и TC MOUSE™ (оба от Medarex, Inc., Принстон, Нью-Джерси).

В альтернативном варианте антитела могут быть получены рекомбинантно и экспрессированы с помощью любого известного из уровня техники способа. Антитела могут быть получены рекомбинантно путем сначала выделения антител, полученных из животных-хозяев, получения последовательности генов и применения последовательности генов для рекомбинантной экспрессии антитела в клетках-хозяевах (например, клетках CHO). Другим способом, который может быть использован, является экспрессия последовательности антител в растениях (например, табаке) или в трансгенном молоке. Были раскрыты подходящие способы рекомбинантной экспрессии антител в растениях или молоке (см., например, Peeters et al. (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants", Vaccine 19:2756; Lonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice", Int. Rev. Immunol 13:65-93; и Pollock et al. (1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies", J. Immunol Methods 231:147-157). Из уровня техники известны подходящие способы получения производных антител, например, гуманизированных, одноцепочечных и т. д. В другом альтернативном варианте антитела можно получить рекомбинантно с помощью технологии фагового дисплея (см., например, патенты США №№ 5565332, 5580717, 5733743, 6265150 и Winter, G. et al. (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology", Annu. Rev. Immunol. 12:433-455).

Представляющие интерес антитела или белок могут быть подвергнуты секвенированию с расщеплением по Эдману, которое хорошо известно специалистам в настоящей области техники. Информацию о пептидах, полученную по результатам масс-спектрометрии или расщепления по Эдману, можно применять для разработки зондов или праймеров, которые применяют для клонирования представляющего интерес белка.

Альтернативным способом клонирования представляющего интерес белка является "пэннинг" с помощью очищенного LAG-3 или его частей для клеток, экспрессирующих представляющее интерес антитело или белок, которое имеет один или несколько CDR LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3,

LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, или LAG-3 mAb 6 или которое конкурирует с LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6 за связывание с LAG-3 человека. Процедуру "пэннинга" можно проводить путем получения библиотеки кДНК из тканей или клеток, которые экспрессируют LAG-3, сверхэкспрессии кДНК в клетках второго типа и скрининга трансфицированных клеток второго типа в отношении специфического связывания с LAG-3 в присутствии или отсутствии LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6. Подробное описание способов, применяемых при клонировании генов млекопитающих, кодирующих белки клеточной поверхности, с помощью "пэннинга", можно найти в уровне техники (см., например, Aruffo, A. et al. (1987) "Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:8573-8577, и Stephan, J. et al. (1999) "Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation", Endocrinol. 140:5841-5854).

Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотиды, могут быть введены в клетку-хозяина любым из ряда подходящих способов, включая электропорацию, трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ, бомбардировку микрочастицами, липофекцию и инфекцию (например, где вектор является инфекционным агентом, таким как вирус коровьей оспы). Выбор вводимых векторов или полинуклеотидов зачастую будет зависеть от особенностей клетки-хозяина.

Для выделения генов, кодирующих представляющее интерес антитело, полипептид или белок, можно применять любую клетку-хозяина, способную к сверхэкспрессии гетерологичных ДНК. Неограничивающие примеры подходящих клеток-хозяев млекопитающих включают без ограничения клетки COS, HeLa и CHO. Предпочтительно, клетки-хозяева экспрессируют кДНК на уровне приблизительно в 5 раз превышающем, более предпочтительно в 10 раз превышающем, еще более предпочтительно в 20 раз превышающем уровень соответствующего представляющего интерес эндогенного антитела или белка, при наличии, у клетки-хозяина. Скрининг клеток-хозяев в отношении специфического связывания с LAG-3 осуществляют иммуноанализом или FACS. Можно выявить клетку, сверхэкспрессирующую представляющее интерес антитело или белок.

Настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим аминокислотную последовательность антител по настоящему изобретению. Полипептиды по настоящему изобретению можно получить с помощью процедур, известных из уровня техники. Полипептиды можно получить с помощью протеолитического или другого расщепления антител, с помощью рекомбинантных способов (т. е. отдельными или слитыми полипептидами), как описано выше, или с помощью химического синтеза. Полипептиды антител, особенно более короткие полипептиды размером приблизительно до 50 аминокислот, обычно получают с помощью химического синтеза. Способы химического синтеза известны из уровня техники и являются коммерчески доступными. Например, антитело к полипептиду LAG-3 можно получить с помощью автоматического синтезатора полипептидов, использующего твердофазный способ.

Настоящее изобретение относится к вариантам антител LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6 и их полипептидным фрагментам, которые связываются с LAG-3, включая функционально эквивалентные антитела и слитые полипептиды, которые не оказывают значительного влияния на свойства таких молекул, а также варианты, которые обладают увеличенной или пониженной активностью. Модификация полипептидов является обычной практикой в настоящей области техники и не нуждается в подробном описании в настоящем документе. Примеры модифицированных полипептидов включают полипептиды с консервативными заменами аминокислотных остатков, одной или несколькими делециями или добавлениями аминокислот, которые не оказывают значительного пагубного влияния на функциональную активность, или с применением химических аналогов. К аминокислотным остаткам, которые могут быть консервативно заменены друг другом, относятся без ограничения глицин/аланин, серин/треонин, валин/изолейцин/лейцин, аспарагин/глутамин, аспарагиновая кислота/глутаминовая кислота, лизин/аргинин и фенилаланин/тирозин. К таким полипептидам также относятся гликозилированные и негликозилированные полипептиды, а также полипептиды с другими посттрансляционными модификациями, такими как, например, гликозилирование различными сахарами, ацетилирование и фосфорилирование. Предпочтительно аминокислотные замены будут консервативными, т. е. внесенная в результате замены аминокислота будет обладать такими же химическими свойствами, что и исходная аминокислота. Такие консервативные замены известны из уровня техники, и их примеры были приведены выше. Аминокислотные модификации могут варьировать от изменения или модификации одной или нескольких аминокислот до полной реорганизации участка, такого как вариабельный домен. Изменения в вариабельном домене могут изменять аффинность и/или специфичность связывания. Другие способы модификации предусматривают применение известных в настоящей области методик связывания, включая без ограничения ферментативные средства, окислительное замещение и хелатирование. Модификации можно применять, например, для прикрепления меток для иммуноанализа, такого как прикрепление радиоактивных фрагментов для радиоиммунологического анализа. Модифицированные полипептиды получают с помощью общепринятых в настоящей области техники процедур, и их можно подвергнуть скринингу с помощью известных в настоящей области техники стандартных ана-

лизов.

Настоящее изобретение относится к слитым белкам, содержащим один или несколько полипептидов или антител LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6 по настоящему изобретению. В соответствии с одним вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, который содержит легкую цепь, тяжелую цепь или как легкую, так и тяжелую цепь. В соответствии с другим вариантом осуществления, слитый полипептид содержит гетерологичный константный участок иммуноглобулина. В соответствии с другим вариантом осуществления, слитый полипептид содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи антитела, полученного из общедоступной депонированной гибридомы. В контексте настоящего изобретения слитый белок антитела содержит один или несколько полипептидных доменов, которые специфически связываются с LAG-3, и другую аминокислотную последовательность, к которой он не присоединен в нативной молекуле, например, гетерологичную последовательность или гомологичную последовательность из другого участка.

Х. Применения связывающих LAG-3 молекул по настоящему изобретению

Настоящее изобретение относится к композициям, включая фармацевтические композиции, содержащие связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению (например, антитела к LAG-3, биспецифические антитела к LAG-3 и т.д.), полипептиды, полученные из таких молекул, полинуклеотиды, содержащие последовательности, кодирующие такие молекулы или полипептиды, и другие средства, которые описаны в настоящем документе.

Как рассмотрено выше, LAG-3 играет важную роль в отрицательной регуляции пролиферации, функции и гомеостаза Т-клеток. Связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению обладают способностью ингибировать функцию LAG-3 и таким образом обращать опосредованное LAG-3 ингибирование иммунной системы. Таким образом, LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 и LAG-3 mAb 6, их гуманизированные производные и молекулы, содержащие их связывающие LAG-3 фрагменты (например, биспецифические антитела и т.д.) или которые конкурируют за связывание с такими антителами, можно применять для блокировки опосредованного LAG-3 ингибирования иммунной системы и тем самым для того, чтобы способствовать активации иммунной системы.

Биспецифические связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению, которые связываются с LAG-3 и другой молекулой, участвующей в регуляции иммунной контрольной точки, присутствующей на поверхности клетки (например, PD-1), усиливают иммунную систему путем блокировки опосредованного LAG-3 ингибирования иммунной системы и таких молекул иммунной контрольной точки. Таким образом, связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению пригодны для усиления иммунного ответа (например, Т-клеточного иммунного ответа) у субъекта. В частности, связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению можно применять для лечения любого заболевания или состояния, ассоциированного с нежелательно подавленной иммунной системой, в том числе злокачественной опухоли и заболеваний, которые ассоциированы с присутствием патогена (например, бактериальной, грибковой, вирусной инфекции или инфекции простейшими).

Злокачественные опухоли, которые можно лечить с помощью связывающих LAG-3 молекул по настоящему изобретению, включают виды злокачественных опухолей, характеризующихся присутствием клетки злокачественной опухоли, выбранной из группы, состоящей из клетки: опухоли надпочечника, ассоциированной со СПИДом злокачественной опухоли, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, злокачественной опухоли мочевого пузыря, злокачественной опухоли костей, злокачественной опухоли головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, злокачественной опухоли молочной железы, опухолей каротидного тельца, цервикальной злокачественной опухоли, хондросаркомы, хордомы, хромофобной почечно-клеточной карциномы, светло-клеточной карциномы, злокачественной опухоли толстой кишки, колоректальной злокачественной опухоли, кожной доброкачественной фиброзной гистиоцитомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, опухоли Юинга, внескелетной слизеподобной хондросаркомы, несовершенного костного фиброгенеза, фиброзной дисплазии кости, злокачественной опухоли желчного пузыря или желчевыводящих путей, злокачественной опухоли желудочно-кишечного тракта, гестационной трофобластической болезни, эмбрионально-клеточной опухоли, злокачественной опухоли головы и шеи, гепатоклеточной карциномы, опухоли островков поджелудочной железы, саркомы Капоши, злокачественной опухоли почки, лейкоза, липомы/доброкачественной липоматозной опухоли, липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли, злокачественной опухоли печени, лимфомы, злокачественной опухоли легкого, гранулобластомы, меланомы, менингиомы, множественных эндокринных неоплазий, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринных опухолей, злокачественной опухоли яичника, злокачественной опухоли поджелудочной железы, папиллярной карциномы щитовидной железы, опухоли парашитовидных желез, детской злокачественной опухоли, опухоли оболочки периферического нерва, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, злокачественной опухоли предстательной железы, увеальной меланомы заднего отдела глаза, редкого нарушения со стороны кровеносной системы, почечной метастатической злокачественной опухоли, рабдоидной опухоли, рабдомиосаркомы, саркомы, злокачественной опухоли кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточной злокачественной опухоли, злокачест-

венной опухоли желудка, синовиальной саркомы, злокачественной опухоли яичка, тимусной карциномы, тимомы, метастатической злокачественной опухоли щитовидной железы и злокачественной опухоли матки.

В частности, связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению можно применять для лечения колоректальной злокачественной опухоли, гепатоцеллюлярной карциномы, глиомы, злокачественной опухоли почки, злокачественной опухоли молочной железы, множественной миеломы, злокачественной опухоли мочевого пузыря, нейробластомы; саркомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточной злокачественной опухоли легкого, злокачественной опухоли яичника, злокачественной опухоли поджелудочной железы и злокачественной опухоли прямой кишки.

К ассоциированным с патогеном заболеваниям, которые можно лечить с помощью связывающих LAG-3 молекул по настоящему изобретению, относятся хронические вирусные, бактериальные, грибковые и паразитарные инфекции. К хроническим инфекциям, которые можно лечить с помощью связывающих LAG-3 молекул по настоящему изобретению, относятся вирус Эпштейна - Барра, вирус гепатита А (HAV), вирус гепатита В (HBV), вирус гепатита С (HCV), вирусы герпеса (например, HSV-1, HSV-2, HHV-6, CMV), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус везикулярного стоматита (VSV),

Bacilli, Citrobacter, Cholera, Diphtheria, Enterobacter,

Gonococci, Helicobacter pylori, Klebsiella, Legionella, Meningococci, микобактерия,

Pseudomonas, Pneumonococci, рикетсия, *Salmonella, Serratia, Staphylococci, Streptococci,*

Tetanus, Aspergillus (A. fumigatus, A. niger u m. ð), Blastomyces dermatitidis, Candida (C.

albicans, C. krusei, C. glabrata, C. Tropicalis и т. д.), *Cryptococcus neoformans,* род

Mucorales (mucor, absidia, rhizopus), Sporothrix schenkii, Paracoccidioides brasiliensis,

Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, Leptospirosis, Borrelia burgdorferi,

гельминтовый паразит (анкилостоматиды, ленточные черви, трематоды, плоские черви (например, *Schistosomia*), *Giardia lambia, trichinella, Dientamoeba Fragilis, Trypanosoma*

brucei, Trypanosoma cruzi и *Leishmania donovani*.

Связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению можно комбинировать с иммуногенным средством, таким как противоопухолевая вакцина. Такие вакцины могут содержать очищенные опухолевые антигены (включая рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), аутологичные или аллогенные опухолевые клетки. Был описан ряд стратегий опухолевой вакцины (см., например, Palena, C, et al. (2006) "Cancer vaccines: preclinical studies and novel strategies", Adv. Cancer Res. 95, 115-145; Mellman, I, et al. (2011) "Cancer immunotherapy comes of age", Nature 480, 480-489; Zhang, X. M. et al. (2008) "The Anti-Tumor Immune Response Induced By A Combination of MAGE-3/MAGE-n-Derived Peptides", Oncol. Rep. 20, 245-252; Disis, M. L. et al. (2002) "Generation of T-cell Immunity to the HER-2/neu Protein After Active Immunization with HER-2/neu Peptide-Based Vaccines", J. Clin. Oncol. 20:2624-2632; Vermeij, R. et al. (2012) "Potentiation of a p53-SLP Vaccine By Cyclophosphamide In Ovarian Cancer: A Single-Arm Phase II Study", Int. J. Cancer 131 :E670-E680). Связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению можно комбинировать с режимами химиотерапевтического лечения. В этих случаях может быть возможность уменьшить дозу вводимого химиотерапевтического реагента (Mokyr, M.B. et al. (1998) "Realization Of The Therapeutic Potential Of CTLA-4 Blockade In Low-Dose Chemotherapy-Treated Tumor-Bearing Mice", Cancer Research 58: 5301-5304).

Связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению можно комбинировать с другими иммуностимулирующими молекулами, такими как антитела, которые активируют иммунную ответную реакцию у хозяина для обеспечения повышенных уровней активации Т-клеток. В частности, было продемонстрировано, что антитела к PD-1, антитела к PD-L1 и/или антитела к CTLA-4 активируют иммунную систему (см., например, del Rio, M-L. et al. (2005) "Antibody-Mediated Signaling Through PD-1 Costimulates T Cells And Enhances CD28-Dependent Proliferation", Eur. J. Immunol 35:3545-3560; Barber, D. L. et al. (2006) "Restoring Function In Exhausted CD8 T Cells During Chronic Viral Infection", Nature 439, 682-687; Iwai, Y. et al. (2002) "Involvement of PD-L1 On Tumor Cells In The Escape From Host Immune System And Tumor Immunotherapy by PD-L1 blockade", Proc. Natl Acad. Sci. USA 99, 12293-12297; Leach, D. R., et al. (1996) "Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade", Science 271, 1734-1736). К дополнительным иммуностимулирующим молекулам, которые можно комбинировать со связывающими LAG-3 молекулами по настоящему изобретению, относятся антитела к молекулам на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию дендритных клеток (DC) и презентирование антигена, антитела к CD40, способные замещать Т-клеточную хелперную активность и активацию антител на костимулирующие молекулы Т-клеток, такие как PD-L1, CTLA-4, OX-40 4-1BB и ICOS (см., например, Ito et al. (2000) "Effective Priming Of Cytotoxic T Lymphocyte Precursors By Subcutaneous Administration Of Peptide Antigens In Liposomes Accompanied By Anti-CD40 And Anti-CTLA-4 Antibodies", Immunobiology 201:527-40; патент США № 5811097; Weinberg et al. (2000) "Engagement of the OX-40 Receptor In Vivo Enhances Antitumor Immunity", Immunol 164:2160-2169; Melero et al. (1997) "Monoclonal Antibodies Against The 4-

1BB T-Cell Activation Molecule Eradicate Established Tumors", *Nature Medicine* 3: 682-685; Hutloff et al. (1999) "ICOS is An Inducible T-Cell Co-Stimulator Structurally And Functionally Related to CD28", *Nature* 397: 263-266 и Moran, A.E. et al. (2013) "The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 As Targets For Cancer Immunotherapy", *Curr Opin Immunol.* 2013 Apr; 25(2): 10.1016/j.coi.2013.01.004), и/или стимулирующие химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие антиген-связывающий домен, направленный к антигену заболевания, слитый с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными доменами из различных рецепторов костимулирующего белка (например, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40 и т.д.), которые предназначены для стимуляции Т-клеток при связывании антигена (см., например, Tettamanti S. et al. (2013) "Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor", *Br. J. Haematol.* 161:389-401; Gill, S. et al. (2014) "Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells", *Blood* 123(15): 2343-2354; Mardiros, A. et al. (2013) "T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia", *Blood* 122:3138-3148; Pizzitola, I. et al. (2014) "Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo", *Leukemia* 28(8): 1596-1605).

Связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению можно комбинировать с ингибирующими химерными антигенными рецепторами (iCAR) для отведения целенаправленных иммунотерапевтических ответов. Антиген-связывающий домен iCAR, направленный к антигену заболевания, слит с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными доменами из различных ингибирующих рецепторов белка (например, CTLA-4, PD-1 и т. д.), которые предназначены для ограничения Т-клеточных ответов при связывании антигена (см., например, Fedorov V.D. (2013) "PD-1-and CTLA-4-Based Inhibitory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) Divert Off-Target Immunotherapy Responses", *Sci Tranl Med.* 5(215):215ral72).

В частности, антитело к LAG-3 по настоящему изобретению применяют в комбинации с антителом к CD137, антителом к OX40, антителом к PD-1, антителом к PD-L1, антителом к TIGIT, антителом к TIM-3 и/или вакциной против злокачественных опухолей.

Помимо их полезности в терапии связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению можно пометить детектируемой меткой и применять в детекции LAG-3 в образцах или в визуализации LAG-3 на клетках.

XI. Фармацевтические композиции

К композициям по настоящему изобретению относятся бестарные лекарственные композиции, пригодные для изготовления фармацевтических композиций (например, неочищенных или нестерильных композиций), и фармацевтические композиции (т.е. композиции, которые пригодны для введения субъекту или пациенту), которые можно применять при получении стандартных лекарственных форм. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество связывающих LAG-3 молекул по настоящему изобретению или комбинацию таких средств и фармацевтически приемлемого носителя. Предпочтительно, композиции по настоящему изобретению содержат профилактически или терапевтически эффективное количество связывающих LAG-3 молекул по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Настоящее изобретение, в частности, относится к таким фармацевтическим композициям, в которых связывающая LAG-3 молекула представляет собой антитело LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6; гуманизованное антитело LAG-3 mAb 1; LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6; связывающий LAG-3 фрагмент любого такого антитела; или в которых связывающая LAG-3 молекула представляет собой биспецифическое диатело к LAG-3 (например, LAG-3×PD-1 биспецифическое диатело). Особенно охватываются такие молекулы, которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 1; или которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 2; или которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 3, или которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 4, или которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 5, или которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 6.

Настоящее изобретение также относится к таким фармацевтическим композициям, которые дополнительно включают второе терапевтическое антитело (например, опухолеспецифическое моноклональное антитело), которое является биспецифическим к конкретному антигену злокачественной опухоли, и фармацевтически приемлемый носитель.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регуляторным органом федерального правительства или правительства штата или указанный в перечне в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения на животных, а конкретнее, на людях. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту (например, адьюванту Фрейнда (полному и неполному), вспомогательному средству или среде, с которыми вводят терапевтическое средство. Такими фармацевтическими носителями могут быть стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является предпочтительным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Со-

левые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, особенно для инъекционных растворов. В число подходящих фармацевтических вспомогательных средств входят крахмал, глюкоза, лактоза, сахароза, желатин, солод, рис, мука, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, вода, этанол и др. При необходимости, композиция может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих средств или средств для буферизации pH. Эти композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, композиций с замедленным высвобождением и др.

Как правило, ингредиенты композиций по настоящему изобретению поставляют либо отдельно, либо в смешанном друг с другом состоянии в единичной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытой емкости, такой как ампула или саше, с указанием количества активного средства. Если композицию необходимо вводить путем инфузии, она может быть дозирована при помощи инфузионного флакона, содержащего стерильную фармацевтическую воду или солевой раствор. Если композицию вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула стерильной воды для инъекций или солевого раствора, с тем чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают без ограничения соли, образованные анионами, такими как анионы, происходящие из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и соли, образованные катионами, такими как катионы, происходящие из гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция, железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической упаковке или набору, которые содержат одну или несколько емкостей, заполненных связывающей LAG-3 молекулой по настоящему изобретению (и более предпочтительно антителом LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6; гуманизированным антителом LAG-3 mAb 1; LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6; связывающим LAG-3 фрагментом любого такого антитела; или в которых связывающая LAG-3 молекула представляет собой биспецифическое диатело к LAG-3 (например, LAG-3×PD-1 биспецифическое диатело)). Особенно охватываются такие молекулы, которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 1; или которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 2; или которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 3, или которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 4, или которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 5, или которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 6, отдельно или с таким фармацевтически приемлемым носителем. Кроме того, в фармацевтическую упаковку или набор также могут быть включены один или несколько других профилактических или терапевтических средств, пригодных для лечения заболевания. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической упаковке или набору, содержащему одну или несколько емкостей, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций по настоящему изобретению. С такой емкостью(емкостями) необязательно может быть ассоциировано информационное уведомление в форме, предписанной правительственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, при этом в информационном уведомлении отражено одобрение таким органом производства, применения или продажи для приема человеком.

Настоящее изобретение относится к наборам, которые можно применять в описанных выше способах. Набор может содержать любую из связывающих LAG-3 молекул по настоящему изобретению. Набор может дополнительно содержать одно или несколько других профилактических и/или терапевтических средств, пригодных для лечения злокачественной опухоли, в одной или нескольких емкостях; и/или набор может дополнительно содержать одно или несколько цитотоксических антител, которые связывают один или несколько антигенов злокачественной опухоли, ассоциированных со злокачественной опухолью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, другое профилактическое или терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство. В соответствии с другими вариантами осуществления, профилактическое или терапевтическое средство представляет собой биологическое или гормональное терапевтическое средство.

XII. Способы введения

Композиции по настоящему изобретению могут быть предусмотрены для лечения, профилактики и облегчения одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием, нарушением или инфекцией, путем введения субъекту эффективного количества слитого белка или конъюгированной молекулы по настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей слитый белок или конъюгированную молекулу по настоящему изобретению. В соответствии с предпочтительным аспектом, такие композиции являются практически чистыми (т.е. практически не содержат веществ, которые ограничивают ее действие или вызывают нежелательные побочные эффекты). В соответствии с конкретным вариантом осуществления, субъектом является животное, предпочтительно млекопитающее, такое как отличное от примата млекопитающее (например, бычья, лошадиные, кошачьи, псовые, грызуны и т.д.) или примат (например, обезьяна, такая как яванский макак, человек и т.д.). В соответствии с пред-

почтительным вариантом осуществления, субъектом является человек.

Известны различные системы доставки, и их можно применять для введения композиций по настоящему изобретению, например, инкапсулирование в липосомах, микрочастицах, микрокапсулах, рекомбинантных клетках, способных экспрессировать антигено или слитый белок, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System", J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструирование нуклеиновой кислоты как части ретровирусного или другого вектора и т. д.

Способы введения молекулы по настоящему изобретению предусматривают без ограничения парентеральное введение (например, внутривенное, внутримышечное, внутривенное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и чрезслизистое (например, интраназальные и пероральные пути). В соответствии с конкретным вариантом осуществления, связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции можно вводить любым удобным путем, например, посредством инфузии или болюсной инъекции, посредством абсорбции через эпителиальные или слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.), и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или локальным. Кроме того, также можно использовать легочное введение, например, с применением ингалятора или небулайзера и состава с аэрозольным средством. См., например, патенты США №№ 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 и 4880078 и РСТ публикации WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном ее объеме.

Настоящее изобретение также относится к тому, что связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению упакованы в герметично закрытую емкость, такую как ампула или саше, на которой указано количество молекулы. В соответствии с одним вариантом осуществления, такие молекулы поставляют в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытой емкости, и их можно ресуспендировать, например, водой или солевым раствором до соответствующей концентрации для введения субъекту. Предпочтительно, связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению, поставляют в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметично закрытой емкости.

Лиофилизированные связывающие LAG-3 молекулы по настоящему изобретению следует хранить при температуре от 2 до 8°C в их исходной емкости, и молекулы следует вводить в пределах 12 ч, предпочтительно в пределах 6 ч, в пределах 5 ч, в пределах 3 ч или в пределах 1 ч после ресуспендирования. В соответствии с альтернативным вариантом осуществления такие молекулы поставляют в жидкой форме в герметично закрытой емкости с указанием количества и концентрации молекулы, слитого белка или конъюгированной молекулы. Предпочтительно, такие связывающие LAG-3 молекулы, если они представлены в жидкой форме, поставляют в герметично закрытой емкости.

Количество композиции по настоящему изобретению, которая будет эффективной при лечении, предупреждении или облегчении одного или нескольких симптомов, ассоциированных с нарушением, можно определить с помощью стандартных клинических методик. Точная доза, которая будет использована в составе, также будет зависеть от пути введения и от тяжести состояния и должна определяться на усмотрение практикующего клинициста и с учетом обстоятельств для каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых зависимостей доза-ответ, полученных из тест-систем *in vitro* или на модельных животных.

В контексте настоящего документа "эффективное количество" фармацевтической композиции в соответствии с одним вариантом осуществления представляет собой количество, достаточное для достижения полезных или необходимых результатов, включая без ограничения клинические результаты, такие как уменьшение симптомов, вызванных заболеванием, ослабление симптома инфекции (например, вирусной нагрузки, лихорадки, боли, сепсиса и т.д.) или симптома злокачественной опухоли (например, пролиферации клеток злокачественной опухоли, наличие опухоли, метастаз опухоли и т.д.), тем самым повышая качество жизни страдающих заболеванием, уменьшая дозу других лекарственных препаратов, необходимых для лечения заболевания, усиливая эффект другого лекарственного препарата, например, путем нацеливания и/или интернализации, задерживая прогрессирование заболевания и/или продлевая дожитие индивидуумов.

Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений. В контексте настоящего изобретения эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для уменьшения пролиферации (или эффекта) вирусного присутствия и для уменьшения и/или замедления развития вирусного заболевания, либо непосредственно, либо опосредованно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может быть или не быть достигнуто в сочетании с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, "эффективное количество" можно рассматривать в контексте введения одного или нескольких химиотерапевтических средств, и одно средство можно рассматривать как такое, которое дают в эффективном количестве, если в сочетании с одним или несколькими другими

средствами может быть достигнут или достигается необходимый результат. Несмотря на то, что индивидуальные потребности различаются, определение оптимальных диапазонов эффективных количеств каждого компонента входит в компетенцию специалистов в настоящей области техники.

Для связывающих LAG-3 молекул, охватываемых настоящим изобретением (например, антител, диател и т.д.), дозировку, вводимую пациенту, предпочтительно определяют, исходя из массы тела (кг) субъекта, принимающего такую молекулу. Для связывающих LAG молекул, охватываемых настоящим изобретением, дозировка, вводимая пациенту, обычно составляет по меньшей мере приблизительно 0,01 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 0,05 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 0,1 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 0,2 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 0,5 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 1 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 2 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 3 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 5 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 10 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 20 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 30 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 50 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 100 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 250 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 750 мкг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 1,5 мг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 3 мг/кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 5 мг/кг массы тела или по меньшей мере приблизительно 10 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 30 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 50 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 75 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 100 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 125 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 150 мг/кг или более массы тела. Рассчитанную дозу будут вводить, исходя из массы тела пациента на исходном уровне лечения. Значительное ($\geq 10\%$) изменение массы тела от исходного уровня или массы при установившемся плато должно приводить к перерасчету дозы.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вводимая пациенту дозировка связывающих LAG-3 биспецифических молекул (например, диател и трехвалентных связывающих молекул), охватываемых настоящим изобретением, обычно составляет по меньшей мере от приблизительно 0,3 нг/кг в сутки до приблизительно 0,9 нг/кг в сутки, по меньшей мере от приблизительно 1 нг/кг в сутки до приблизительно 3 нг/кг в сутки, по меньшей мере от приблизительно 3 нг/кг в сутки до приблизительно 9 нг/кг в сутки, по меньшей мере от приблизительно 10 нг/кг в сутки до приблизительно 30 нг/кг в сутки, по меньшей мере от приблизительно 30 нг/кг в сутки до приблизительно 90 нг/кг в сутки, по меньшей мере от приблизительно 100 нг/кг в сутки до приблизительно 300 нг/кг в сутки, по меньшей мере от приблизительно 300 нг/кг в сутки до приблизительно 600 нг/кг в сутки, по меньшей мере от приблизительно 600 нг/кг в сутки до приблизительно 900 нг/кг в сутки, по меньшей мере от приблизительно 900 нг/кг в сутки до приблизительно 1000 нг/кг в сутки, по меньшей мере от приблизительно 1000 нг/кг в сутки до приблизительно 1000 нг/кг в сутки, по меньшей мере от приблизительно 700 нг/кг в сутки до приблизительно 1000 нг/кг в сутки, по меньшей мере от приблизительно 800 нг/кг в сутки до приблизительно 1000 нг/кг в сутки, по меньшей мере от приблизительно 900 нг/кг в сутки до приблизительно 1000 нг/кг в сутки или составляет по меньшей мере приблизительно 1000 нг/кг в сутки. Рассчитанную дозу будут вводить, исходя из массы тела пациента на исходном уровне лечения. Значительное ($\geq 10\%$) изменение массы тела от исходного уровня или массы при установившемся плато должно приводить к перерасчету дозы.

В соответствии с другим вариантом осуществления введение пациенту осуществляют согласно режиму лечения, предусматривающему одну или несколько доз такого профилактически или терапевтически эффективного количества связывающей LAG-3 молекулы по настоящему изобретению, причем введение согласно режиму лечения осуществляют на протяжении 2, 3, 4, 5, 6 или 7 суток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления режим лечения предусматривает периодическое введение доз профилактически или терапевтически эффективного количества связывающих LAG-3 молекул по настоящему изобретению (например, введение дозы на 1-е, на 2-е, на 3-и и на 4-е сутки заданной недели) и не введение доз профилактически или терапевтически эффективного количества связывающей LAG-3 молекулы (и, в частности, антитела LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, LAG-3 mAb 6, гуманизированного антитела LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 или LAG-3 mAb 6, связывающего LAG-3 фрагмента любого такого антитела или в котором связывающая LAG-3 молекула представляет собой биспецифическое LAG-3 диатело (например, LAG-3 \times PD-1 биспецифическое Fc-диатело)). Особенно охватывается введение (на 5-е, на 6-е и на 7-е сутки той же недели) молекул, которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 1; или которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 2; или которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 3, или которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 4, или которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 5, или которые содержат 3 CDR_L и 3 CDR_H из LAG-3 mAb 6. Обычно имеет место 1, 2, 3, 4, 5 или более курсов лечения. Каждый курс может иметь такой же режим или другой режим лечения.

В соответствии с другим вариантом осуществления, вводимую дозу повышают на протяжении первой четверти, первой половины или первых двух третей или трех четвертей режима(ов) (например, на

протяжении первого, второго или третьего режима лечения из 4 курсов) до тех пор, пока достигают суточного профилактически или терапевтически эффективного количества связывающей LAG-3 молекулы. В табл. 6 приведены 5 примеров различных режимов приема доз, описанных выше для типичного курса лечения диателом.

Таблица 6

| Режим | Сутки | Дозировка диатела (нг диатела на кг массы субъекта в сутки) | | | | |
|-------|------------|--|-----|-----|-----|------|
| | | | | | | |
| 1 | 1, 2, 3, 4 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 5, 6, 7 | нет | нет | нет | нет | нет |
| 2 | 1, 2, 3, 4 | 300 | 500 | 700 | 900 | 1000 |
| | 5, 6, 7 | нет | нет | нет | нет | нет |
| 3 | 1, 2, 3, 4 | 300 | 500 | 700 | 900 | 1000 |
| | 5, 6, 7 | нет | нет | нет | нет | нет |
| 4 | 1, 2, 3, 4 | 300 | 500 | 700 | 900 | 1000 |
| | 5, 6, 7 | нет | нет | нет | нет | нет |

Дозировку и частоту введения связывающей LAG-3 молекулы по настоящему изобретению можно уменьшить или изменить путем усиления поглощения и проникновения в ткань молекулы посредством таких модификаций, как, например, липидизация.

Дозировку связывающей LAG-3 молекулы по настоящему изобретению, вводимую пациенту, можно рассчитать для применения в качестве монотерапии.

Альтернативно, молекулу можно применять в комбинации с другими терапевтическими композициями, и вводимая пациенту дозировка будет ниже, чем при применении указанных молекул в качестве монотерапии.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить локально в нуждающуюся в лечении область; это можно осуществить, например, путем без ограничения локальной инфузии, путем инъекции или посредством имплантата, причем указанный имплантат представляет собой пористый, непористый или желатинообразный материал, включая мембраны, такие как мембраны Sikalastic, или волокна. Предпочтительно, при введении молекулы по настоящему изобретению следует проявлять осторожность в случае применения материалов, в которые молекула не абсорбируется.

Композиции по настоящему изобретению можно доставлять в везикуле, в частности, в липосоме (см. Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 3 17-327).

Композиции по настоящему изобретению можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением или с замедленным высвобождением. Для получения составов с замедленным высвобождением, содержащих одну или несколько из связывающих LAG-3 молекул по настоящему изобретению, можно применять любую известную специалисту в настоящей области технику методике. См., например, патент США № 4526938; PCT публикацию WO 91/05548; PCT публикацию WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854 и Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном ее объеме. В соответствии с одним вариантом осуществления можно применять помпу в системе с контролируемым высвобождением (см. Langer, ранее; Sefton, (1987) "Implantable Pumps", CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al. (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis", Surgery 88:507-516; и Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery", N. Engl. J. Med. 321:574-579). В соответствии с другим вариантом осуществления для достижения контролируемого высвобождения молекул можно применять полимерные материалы (см., например, Medical Applications OF Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate", Science 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization", Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits", J. Neurosurg. 7(1): 105-112); патент США № 5679377, патент США № 5916597, патент США № 5912015, патент США № 5989463, патент США № 5128326, PCT публика-

цию WO 99/15154 и PCT публикацию WO 99/20253). В число примеров полимеров, применяемых в составах с замедленным высвобождением, входят без ограничения поли(2-гидроксиэтилметакрилат), поли(метилметакрилат), поли(акриловая кислота), сополимеры этилена и винилацетата, поли(метакриловая кислота), полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли(N-винилпирролидон), поливиниловый спирт, полиакриламид, поли(этиленгликоль), полилактиды (PLA), сополимеры лактида и гликолида (PLGA) и сложные полиортоэфир. Систему с контролируемым высвобождением можно разместить вблизи терапевтической мишени (например, легких), таким образом будет необходима лишь часть системной дозы (см., например, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, ранее, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Полимерные композиции, пригодные в качестве имплантатов с контролируемым высвобождением, можно применять в соответствии с Dunn et al. (см. U. S. 5945155). Этот конкретный способ основан на терапевтическом эффекте контролируемого *in situ* высвобождения биоактивного материала из полимерной системы. Имплантация обычно может происходить в любом месте организма пациента, нуждающегося в терапевтическом лечении. Можно применять неполимерную систему непрерывной доставки, при этом в качестве системы доставки лекарственного средства в организме субъекта применяют неполимерный имплантат. При имплантации в организм органический растворитель имплантата будет разрушаться, диспергироваться или вымываться из композиции в окружающую тканевую жидкость, а неполимерный материал будет постепенно коагулировать или осаждаться с образованием твердой микропористой матрицы (см. US 5888533).

Системы с контролируемым высвобождением рассмотрены в обзоре Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery", *Science* 249:1527-1533). Для получения составов с замедленным высвобождением, содержащих одно или несколько терапевтических средств по настоящему изобретению, можно применять любую известную специалисту в настоящей области техники методику. См., например, патент США № 4526938; международные публикации WO 91/05548 и WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; и Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном ее объеме.

Если композиция по настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую связывающую LAG-3 молекулу по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту можно вводить *in vivo* для стимуляции экспрессии кодируемой ею связывающей LAG-3 молекулы путем конструирования ее как части соответствующего вектора экспрессии нуклеиновой кислоты и введения его таким образом, чтобы он стал внутриклеточным, например, с помощью ретровирусного вектора (см. патент США № 4980286), или путем прямой инъекции, или с помощью бомбардировки микрочастицами (например, генной пушки; Biolistic, Dupont), или покрытия липидами или рецепторами клеточной поверхности или трансфицирующими средствами, или путем введения его в соединении с гомеобоскоподобным пептидом, о котором известно, что он попадает внутрь ядра (см., например, Joliot et al. (1991) "Antenapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:1864-1868) и т. д. В альтернативном варианте нуклеиновую кислоту можно ввести внутриклеточно и встроить в ДНК клетки-хозяина для экспрессии путем гомологичной рекомбинации.

Лечение субъекта терапевтически или профилактически эффективным количеством связывающей LAG-3 молекулы по настоящему изобретению может предусматривать однократное лечение или предпочтительно может предусматривать серию лечений. В предпочтительном примере субъекта лечат таким диателом один раз в неделю в течение приблизительно 1-10 недель, предпочтительно 2-8 недель, более предпочтительно приблизительно 3-7 недель и еще более предпочтительно в течение приблизительно 4, 5 или 6 недель. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить раз в сутки, два раза в сутки или три раза в сутки. В альтернативном варианте фармацевтические композиции можно вводить раз в неделю, два раза в неделю, раз в две недели, раз в месяц, раз в шесть недель, раз в два месяца, два раза в год или раз в год. Также будет понятно, что эффективная дозировка применяемых для лечения молекул может увеличиваться или уменьшаться в ходе курса конкретного лечения.

Примеры

Теперь, после описания в общих чертах настоящего изобретения, то же самое будет более понятным при обращении к приведенным далее примерам, которые представлены в качестве иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения, если не указано иное. Специалистам в настоящей области техники будет очевидно, что на практике могут быть реализованы многие модификации как в отношении материалов, так и в отношении способов без отступления от объема настоящего раскрытия.

Пример 1.

Характеристика моноклональных антител к LAG-3: LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 и LAG-3 mAb 6

Шесть мышинных моноклональных антител выделяли как способные иммуноспецифически связываться с LAG-3 как человека, так и яванского макака, и давали им обозначения "LAG-3 mAb 1", "LAG-3 mAb 2", "LAG-3 mAb 3", "LAG-3 mAb 4", "LAG-3 mAb 5" и "LAG-3 mAb 6". Было обнаружено, что CDR этих антител отличаются, и они приведены выше. LAG-3 mAb 1 подвергали гуманизации, что давало на выходе два гуманизированных домена VH, обозначенных в настоящем документе как "VL-1 hLAG-3 mAb 1" и "VH-2 hLAG-3 mAb 1", и четыре гуманизированных домена VL, обозначенных в настоящем документе как "VL-1 hLAG-3 mAb 1", "VL-2 hLAG-3 mAb 1", "VL-3 hLAG-3 mAb 1" и "VL-4 hLAG-3 mAb 1". LAG-3 mAb 6 также гуманизировали, что давало на выходе два гуманизированных домена VH, обозначенных в настоящем документе как "VL-1 hLAG-3 mAb 6" и "VH-2 hLAG-3 mAb 6", и два гуманизированных домена VL, обозначенных в настоящем документе как "VL-1 hLAG-3 mAb 6" и "VL-2 hLAG-3 mAb 6". Как указано выше, гуманизированные переменные домены тяжелых и легких цепей указанного антитела можно применять в любой комбинации, а конкретные комбинации гуманизированных переменных доменов указаны при помощи ссылки на конкретные домены VH/VL, например, гуманизированное антитело, содержащее VL-1 hLAG-3 mAb 1 и VL-2 hLAG-3 mAb 1, в частности, указано как "hLAG-3 mAb 1(1.2)".

Полноразмерные гуманизированные mAb были сконструированы следующим образом: C-конец гуманизированного домена VL сливали с N-концом каппа-участка легкой цепи человека с получением легкой цепи, и каждую легкую цепь спаривали с тяжелой цепью, содержащей гуманизированный домен VH того же антитела, слитый с N-концом либо константного участка IgG1 человека, содержащего замены L234A/L235A (AA), либо константного участка IgG4 человека, содержащего замену S228P.

Аминокислотная последовательность иллюстративного константного участка IgG1 человека, содержащего замены L234A/L235A (AA) (SEQ ID NO: 139):

```
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP
KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGX
```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

В SEQ ID NO: 139 аминокислотные остатки 1-98 соответствуют домену CH1 IgG1 (SEQ ID NO: 120), аминокислотные остатки 99-113 соответствуют шарнирному участку IgG1 (SEQ ID NO: 114), а аминокислотные остатки 114-329 соответствуют домену CH2-CH3 IgG1, содержащему замены L234A/L235A (подчеркнутые) (SEQ ID NO: 123).

Аминокислотная последовательность иллюстративного константного участка IgG4 человека, содержащего замену S228P (SEQ ID NO: 140):

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTP EVT CVVVDVSDQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGX
```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

В SEQ ID NO: 140 аминокислотные остатки 1-98 соответствуют домену CH1 IgG4 (SEQ ID NO: 122), аминокислотные остатки 99-110 соответствуют стабилизированному шарнирному участку IgG4, содержащему замены S228P (подчеркнутые) (SEQ ID NO: 117), а аминокислотные остатки 111-326 соответствуют домену CH2-CH3 IgG4 (SEQ ID NO: 4).

Кинетику связывания антител LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, LAG-3 mAb 6, нескольких гуманизированных и эталонного антитела LAG-3 mAb A исследовали с использованием анализа Biacore. Антитела к LAG-3 захватывали и инкубировали с His-меченым растворимым LAG-3 человека (shLAG-3-His), а кинетику связывания определяли с помощью анализа Biacore. Расчетные k_a , k_d и K_D представлены в табл. 7.

Таблица 7

| Антитело к LAG-3 | k_a ($\times 10^5$) | k_d ($\times 10^{-4}$) | KD (нМ) |
|------------------------------------|-------------------------|----------------------------|---------|
| LAG-3 mAb A | 8,7 | 5,4 | 0,6 |
| LAG-3 mAb 1 ^a | 20 | 0,26 | 0,013 |
| LAG-3 mAb 1 ^b | 31 | 0,27 | 0,01 |
| LAG-3 mAb 2 ^a | 11 | 21 | 1,9 |
| LAG-3 mAb 3 ^a | 7,7 | 34 | 4,4 |
| LAG-3 mAb 4 ^a | 12 | 9,3 | 0,8 |
| LAG-3 mAb 5 ^a | 14 | 13 | 0,9 |
| LAG-3 mAb 6 ^a | 42 | 0,84 | 0,02 |
| hLAG-3 mAb 1 (1,2) ^{d, e} | 23 | 0,13 | 0,01 |
| hLAG-3 mAb 1 (2,2) ^{d, e} | 8,2 | 2,6 | 0,3 |
| hLAG-3 mAb 1 (1,1) ^{d, e} | 17 | 0,74 | 0,04 |
| hLAG-3 mAb 1 (1,4) ^{c, e} | 16 | 0,59 | 0,04 |
| hLAG-3 mAb 1 (1,4) ^{c, f} | 17 | 0,86 | 0,05 |

a=захвачено на иммобилизованном Fab₂ козы к мышинному Fc

b=захвачено на иммобилизованном белке G

c=захвачено на иммобилизованном Fab₂ козы к человеческому Fc

d=захвачено на иммобилизованном белке A

e=человеческий IgG1 (AA)

f=IgG4 (S228P)

В дополнительных исследованиях исследовали кинетику связывания гуманизированных антител hLAG-3 mAb 1 (1.4) и hLAG-3 mAb 6 (1.1) и эталонного антитела LAG-3 mAb A к LAG-3 как человека, так и яванского макака с помощью анализа Вiasoge. В этих исследованиях растворимый слитый белок с растворимым LAG-3 (внеклеточным доменом LAG-3 человека или яванского макака, слитым с IgG2a мыши) захватывали на поверхности с Fab2 козы к Fc мыши и инкубировали с антителом к LAG-3, а кинетику связывания определяли с помощью анализа Вiasoge. Кривые связывания для LAG-3 mAb A, hLAG-3 mAb 1 (1.4) и hLAG-3 mAb 6 (1.1), связывающихся с LAG-3 яванского макака, показаны соответственно на фиг. 7А-7С, а расчетные k_a , k_d и K_D представлены в табл. 8. В отдельном исследовании изучали связывание биспецифического содержащего Fc-участок диатела, включающего hLAG-3 mAb 6 (1.1) к LAG-3 как человека, так и яванского макака, с помощью анализа Вiasoge. В этом исследовании содержащее hLAG-3 mAb 6 (1.1) диатело захватывали на поверхности с Fab₂ козы к Fc человека и инкубировали со слитым белком с растворимым LAG-3 (внеклеточным доменом LAG-3 яванского макака или человека, слитым с His-меткой), а кинетику связывания определяли с помощью анализа Вiasoge. Расчетные k_a , k_d и K_D представлены в табл. 8.

Таблица 8

| Антитело к LAG-3 | Человека | | | Яванского макака | | |
|---------------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------|----------------------------|-------------------------------|------------|
| | k_a ($\times 10^4$) | k_d ($\times 10^{-5}$) | KD (нМ) | k_a ($\times 10^4$) | k_d ($\times 10^{-5}$) | KD (нМ) |
| LAG-3 mAb A | 6,2 | 1,0 | 0,16 | 2,4 | 1100 | 458 |
| hLAG-3 mAb 1 (1,4) ^a | 3,4 | <1,0 | <0,29 | 1,9 | <1,0 | <0,53 |
| hLAG-3 mAb 6 (1,1) ^a | 9,9 | <1,0 | <0,1 | 8,2 | 30 | 3,7 |
| hLAG-3 mAb 6 (1,1) ^b | 480 | 16 | 0,033 | 59 | 78 | 0,13 |

a=иммобилизованный слитый белок из IgG2a мыши и LAG-3 яванского макака или человека

b=иммобилизованное содержащее Fc-участок антитело, включающее эпитопсвязывающий домен hLAG-3 mAb 6 (1.1)

Из результатов было видно, что LAG-3 mAb 1 и LAG-3 mAb 6 характеризовались лучшей кинетикой связывания, чем эталонное антитело LAG-3 mAb A. Кроме того, гуманизированное LAG-3 mAb 6 характеризовалось лучшей кинетикой перекрестного связывания с LAG-3 яванского макака.

Специфичность к эпитопу у LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 6 и эталонного антитела LAG-3 mAb A исследовали с помощью анализа Вiasoge. Для определения, связывались ли антитела с различными эпитопами LAG-3, shLAG-3-His захватывали антителом мыши к пента-His, иммобилизованным на чип-датчике CM5 в соответствии с процедурой, рекомендованной изготовителем. Вкратце, карбоксильные группы на поверхности чип-датчика активировали путем инъекции раствора, содержащего 0,2 М N-этил-N-(3-диэтиламинопропил)карбодимид и 0,05 М N-гидроксисукцинимид. Антитело к пента-His вводили инъекцией на активированную поверхность с CM5 в 10 мМ ацетате натрия, pH 5,0, со скоростью потока

5 мкл/мин с последующим введением 1 М этаноламина для дезактивации оставшихся аминогрупп. Эксперименты по связыванию проводили в HBS-EP буфере, который содержал 10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,005% поверхностно-активного вещества P20. Каждое антитело (LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 6 и LAG-2 mAb A) предварительно вводили инъекцией на захваченный hLAG3-His в течение 180 с при скорости потока 5 мкл/мин в концентрации 1 мкМ с последующим подвижным буфером и инъекцией конкурентного антитела в тех же условиях. Получаемый в результате связывания ответ конкурентного антитела сравнивали с его получаемым в результате связывания ответом на hLAG3-His, предварительно введенным инъекцией с буфером для выявления антител, конкурирующих за один и тот же эпитоп. Регенерацию поверхности с иммобилизованным антителом к пента-His проводили путем импульсной инъекции 10 mM глицина с pH 1,5. Нормативные кривые получали путем инъекции аналитов на обработанную поверхность без иммобилизованного белка. Кривые связывания строили при помощи программного обеспечения VIAevaluation v4.1 из данных сенсограммы в режиме реального времени.

Результаты этого эксперимента показаны на фиг. 8A-8D. Из результатов этого эксперимента видно, что биотинилированное антитело LAG3 mAb A было способно связываться с shLAG-3-His даже в присутствии избыточных количеств небитинилированных антител LAG-3 mAb 1 и LAG-3 mAb 6. В отличие от этого LAG-3 mAb 1 блокировало связывание LAG-3 mAb 6. Таким образом, из результатов видно, что LAG-3 mAb 1 и LAG-3 mAb 6 могли связываться с одним и тем же или перекрывающимися эпитопами LAG-3 и конкурировать друг с другом за связывание с LAG-3. Было обнаружено, что как LAG-3 mAb 1, так и LAG-3 mAb 6 связывались с эпитопом, который отличался от эпитопа, связываемого антителом LAG-3 mAb A.

Для дополнительной характеристики антител к LAG3 в двух разных анализах оценивали их способность блокировать связывание между LAG-3 и МНС II класса. В одном анализе исследовали способность антител блокировать связывание слитого белка из Fc и растворимого LAG3 человека с МНС II класса, иммобилизованным на поверхности. Для этого анализа каждый из LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4 и LAG-3 mAb 5 (в количестве 0-67 нМ, 2-кратные серийные разведения) смешивали со слитым белком из Fc и растворимого LAG-3 человека (в концентрации 5 мкг/мл) и отдельно инкубировали с иммобилизованным МНС II класса (1 мкг/мл). Количество LAG-3, связывающегося с иммобилизованным МНС II класса, оценивали с помощью конъюгированного с гамма-HRP вторичного антитела козы к Fc человека. В дополнительных экспериментах LAG-3 mAb A и гуманизированные антитела hLAG-3 mAb 1 (1.4) и hLAG-3 mAb 6 (1.1) (в количестве 0,0096-7,0 нМ, трехкратные серийные разведения) смешивали со слитым белком с растворимым LAG-3 человека (0,2 мкг/мл) и анализировали на связывание с иммобилизованным МНС II класса, как описано выше. Результаты этих экспериментов показаны на фиг. 9A и фиг 9B.

В другом анализе исследовали способность антител к LAG-3 по настоящему изобретению блокировать связывание слитого белка из Fc и растворимого LAG3 человека (shLAG-3-Fc) с нативным МНС II класса на клеточной поверхности. Для этого анализа каждое из LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 и эталонного антитела LAG-3 mAb A (в концентрации 0,1-26,7 нг/мл, 2-кратные серийные разведения) смешивали с биотинилированным слитым белком из Fc и растворимого LAG-3 человека (в концентрации 0,5 мкг/мл) и отдельно инкубировали с положительными по МНС II класса клетками Дауди. Количество LAG-3, связывающегося с поверхностью клеток Дауди, определяли с помощью конъюгированного с PE вторичного антитела к стрептавидину посредством FACS-анализа. В дополнительных отдельных экспериментах LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 6 и LAG-3 mAb A; или LAG-3 mAb 1 и гуманизированные антитела hLAG-3 mAb 1 (1.4), hLAG-3 mAb 1 (1.2), hLAG-3 mAb 1 (2.2) и hLAG-3 mAb 1 (1.1) анализировали, как описано выше. Результаты этих экспериментов показаны соответственно на фиг. 10A-10C.

Из результатов этих анализов ингибирования (фиг. 9A-9B и фиг. 10A-10C) видно, что все протестированные антитела к LAG-3 блокировали связывание слитого белка shLAG-3-Fc с МНС II класса.

Пример 2. Методология проточной цитометрии

В экспериментах по определению уровней экспрессии ингибиторов контрольных точек: PD-1 и LAG-3 на клетках в описанных ниже экспериментах использовали следующие соответствующим образом меченые флуоресцентной меткой коммерческие антитела: конъюгированное с фикоэритринцианином 7 (PE-Cy7) антитело к CD4 [клон SK3] или конъюгированное с флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) антитело к CD4 [клон RPA-T4], конъюгированное с фикоэритрином (PE) антитело к LAG-3 [клон 3DS223H], конъюгированное с фикоэритрином (PE) антитело к PD-1 [клон EH12.2H7] или конъюгированное с аллофикоцианином (APC) антитело (eBiosciences или BioLegend) и соответствующие изотипические контроли. Все антитела применяли в рекомендованных производителем концентрациях. Окрашивание клеток проводили в буфере для FACS (10% FCS в PBS) на льду в течение 30 мин в темноте для добавления первичных антител. После двух промывок клетки либо окрашивали соответствующим вторичным реагентом на льду в течение 30 мин в темноте, либо сразу анализировали на проточном цитометре. Для исключения мертвых клеток все образцы окрашивали красителем жизнеспособных клеток: 7-аминоактиномицин D (7-AAD) (BD Biosciences или BioLegend) или дигидрохлорид 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Life Technologies). Все образцы анализировали на проточном цитометре либо

FACS Calibur, либо Fortessa (BD Biosciences) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (TreeStar, Ашленд, Орегон).

Пример 3. Экспрессия LAG-3 и связывание антител с простимулированными Т-клетками

Изучали экспрессию LAG-3 и способность выделенных антител к LAG-3 специфически связывать LAG-3 на поверхности простимулированных CD3/CD28 Т-клеток. Т-клетки получали из мононуклеаров периферической крови (PBMC), вкратце, PBMC очищали с помощью способа центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare), в соответствии с инструкциями производителя, из цельной крови, полученной согласно информированному согласию от здоровых доноров (Biological Specialty Corporation), а затем Т-клетки очищали с помощью набора Dynabeads® Untouched Human T Cells Kit (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Для стимуляции выделенные Т-клетки культивировали в течение 10-14 суток в присутствии рекомбинантного IL-2 человека [30 ед./мл] (Peprotech) и активирующих гранул для Т-клеток человека Dynabeads® (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Экспрессию LAG-3 на свежесделенных непрестимулированных CD4⁺ Т-клетках и простимулированных CD4⁺ Т-клетках (взятых из культуры на 11-е или 14-е сутки) исследовали с помощью проточной цитометрии, как описано выше, с использованием конъюгированных с FITC антител к CD4 и конъюгированных с PE антител к LAG-3.

Результаты этих исследований показаны на фиг. 11A-11C. Экспрессию LAG-3 не наблюдали на непрестимулированных CD4⁺ Т-клетках (фиг. 11A). Однако у CD3/CD8-престимулированных CD4⁺ Т-клеток от двух различных доноров (D:58468 и D:43530) наблюдали резкое увеличение экспрессии LAG-3 (фиг. 11B и 11C).

Исследовали способность LAG-3 mAb 1 (фиг. 12, секции А и D), LAG-3 mAb 2 (фиг. 12, секции В и E), LAG-3 mAb 3 (фиг. 12, секции С и F), LAG-3 mAb 4 (фиг. 13, секции А и С) и LAG-3 mAb 5 (фиг. 13, секции В и D) специфически связываться с простимулированными CD4⁺ Т-клетками. Простимулированные Т-клетки (полученные, как описано выше, от донора D:58468), взятые из культуры на 14-е сутки, и свежие непрестимулированные клетки (полученные, как описано выше, от донора D:43530) подвергали проточной цитометрии с применением выделенных антител к LAG-3 и последующего соответствующим образом меченного флуоресцентной меткой вторичного реагента (конъюгированного с PC антитела к IgG мыши (H+L) (Jackson ImmunoResearch Labs)) и конъюгированного с FITC антитела к CD4. Как показано на фиг. 12, секциях А-F, и фиг. 13, секциях AD, каждое из исследованных антител к LAG-3 связывалось только с простимулированными, но не с непрестимулированными CD4⁺ Т-клетками.

Из результатов этих исследований видно, что уровень LAG-3 повышался на простимулированных Т-клетках, и что антитела к LAG-3 по настоящему изобретению специфически связывали только простимулированные Т-клетки.

Пример 4. Функциональная активность антител к LAG

Энтеротоксин типа В (SEB) *Staphylococcus aureus* представляет собой суперантиген микроорганизма, способный активировать большую часть Т-клеток (5-30%). SEB связывается с МНС II вне щелевидной детерминанты пептида и, следовательно, зависит от МНС II, но является нереструктурированным и TCR-опосредованным. SEB-стимуляция Т-клеток приводила к пролиферации олигоклональных Т-клеток и продуцированию цитокинов (хотя можно было наблюдать вариабельность среди доноров). Исследовали экспрессию антител к LAG-3 и антител к PD-1 в отдельности и в комбинации на PBMC, простимулированных посредством SEB.

PBMC, очищенные, как описано выше, культивировали в RPMI-среде+10% инактивированного теплом FBS+1% пенициллина/стрептомицина в объемных колбах Т-25 в течение 2-3 суток в отдельности или с SEB (Sigma-Aldrich) в концентрации 0,1 нг/мл (первичная стимуляция). В конце первого раунда SEB-стимуляции PBMC дважды промывали PBS и сразу же высевали в 96-луночные планшеты для культивирования тканей в концентрации $1-5 \times 10^5$ клеток/луночка в только среду, в среду с SEB в концентрации 0,1 нг/мл (вторичная стимуляция) и без антитела или в среду с SEB и с контрольным антителом IgG и культивировали в течение дополнительных 2-3 суток. Через 48 ч после первичной объемной SEB-стимуляции клетки изучали в отношении экспрессии PD-1 и LAG-3 с помощью проточной цитометрии с применением конъюгированных с PE антител к LAG-3 и конъюгированных с FITC антител к CD3; или конъюгированных с APC антител к PD-1 и конъюгированных с FITC антител к CD3. На 5-е сутки после вторичного культивирования в 96-луночном планшете с SEB-стимуляцией лунки, обработанные раствором без антитела или с контрольным антителом, изучали с помощью проточной цитометрии в отношении экспрессии PD-1 и LAG-3 с применением конъюгированного с PE антитела к LAG-3 и конъюгированного с APC антитела к PD-1.

Результаты проточной цитометрии от двух типичных доноров (D:34765 и D:53724) показаны на фиг. 14, секции А-D (D:34765) и фиг. 15, секции А-D (D:53724). Из этих результатов видно, что уровень LAG-3 и PD-1 повышался в течение 48 ч после SEB-стимуляции с дальнейшим усилением, наблюдаемым на 5-е сутки после культивирования с SEB-стимуляцией. В этих исследованиях у донора 1 после SEB-стимуляции было больше LAG-3/PD-1 двойных положительных клеток. Добавление контрольного антитела после SEB-стимуляции не изменяло экспрессию LAG-3 или PD-1 (ср. фиг. 14, секции С и D и фиг.

15, секции С и D).

Повышение уровня иммунных белков контрольных точек LAG-3 и PD-1 после SEB-стимуляции PBMC ограничивало высвобождение цитокинов при повторной стимуляции. Изучали способность LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 6, моноклонального антитела к PD-1, обозначенного как "PD-1 mAb 5", и эталонных антител PD-1 mAb 1 (включая Fc-вариант 235A/235A (AA)), PD-1 mAb 2, LAG-3 mAb A и коммерческого антитела к LAG3 17B4 (№ LS-C18692, LS Bio, обозначенного как "LAG-3 mAb B") усиливать высвобождение цитокинов посредством ингибирования контрольных точек.

PBMC стимулировали посредством SEB, как описано выше, за исключением вторичных стимуляций. Клетки высевали без антител, с изотипическим контрольным антителом или с антителами к LAG-3 и антителами к PD-1 в отдельности или в комбинации. В конце второй стимуляции надосадочные жидкости собирали для измерения секреции цитокинов с применением наборов для ИФА DuoSet на образцах от человека в отношении IFN γ , TNF α , IL-10 и IL-4 (R&D Systems) в соответствии с инструкциями производителя. На фиг. 16A-16B показаны профили секреции IFN γ (фиг. 16A) и TNF α (фиг. 16B) у PBMC, простимулированных посредством SEB, от типичного донора (D:38166), обработанного раствором без антител или с одним из следующих антител: изотипическим контролем, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, LAG-3 mAb A, LAG-3 mAb B, LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4 или LAG-3 mAb 6. Для этого исследования использовали антитела в концентрации 0,009, 0,039, 0,156, 0,625, 2,5, 10 и 40 мкг/мл. На фиг. 17 показаны профили секреции IFN γ у PBMC, простимулированных посредством SEB, от другого типичного донора (D:58108), обработанного следующим: раствором без антитела, изотипическим контрольным антителом; PD-1 mAb 2 и/или LAG-3 mAb A; PD-1 mAb 5 и/или LAG-3 mAb 1 или PD-1 mAb 5 и/или LAG-3 mAb 3. Для этого исследования применяли антитела в концентрации 10 мкг/мл.

Из результатов этих исследований видно, что антитела к PD-1 значительно усиливали функцию иммунной системы, о чем свидетельствовала увеличенная выработка IFN γ (фиг. 16A и 17) и TNF α (фиг. 16B) у PBMC, простимулированных посредством SEB, при повторной стимуляции. К удивлению также наблюдали, что LAG-3 mAb 1 также увеличивало выработку цитокинов у нескольких доноров до уровней, сравнимых с антителами к PD-1, в то время как эталонные mAb к LAG-3, LAG-3 mAb A и LAG-3 mAb B и несколько выделенных антител (LAG-3 mAb 3, LAG-4 и LAG-6) обеспечивали лишь небольшое усиление высвобождения цитокинов. Кроме того, комбинация антител к LAG-3 с антителом к PD-1 приводила к дополнительному усилению высвобождения цитокинов (фиг. 17) из PBMC, простимулированных посредством SEB, при повторной стимуляции. LAG-3 mAb 1 обеспечивало наибольшее усиление высвобождения цитокинов в сочетании с антителом к PD-1 по сравнению с LAG-3 mAb 3 и эталонным антителом LAG-3 mAb A.

Пример 5. Связывание с эндогенным LAG-3 яванского макака

С помощью FACS изучали способность гуманизированного антитела hLAG-3 mAb 6 (1.1) и эталонного антитела LAG-3 mAb A связывать эндогенный LAG-3, экспрессированный на PBMC яванского макака. Для этого исследования PBMC выделяли из цельной крови яванского макака-донора и культивировали отдельно или с SEB-стимуляцией (500 нг/мл), как фактически описано выше. Через 66 ч после SEB-стимуляции клетки (непротестимированные и простимулированные) окрашивали антителами hLAG-3 mAb 6 (1.1), LAG-3 mAb A или PD-1 mAb 1 (10-кратные серийные разведения). Антитела детектировали с помощью меченого APC вторичного антитела козы к Fc человека. Связывание отображено в виде графика на фиг. 18A-18B для двух яванских макаков-доноров.

Стимуляцию SEB подтверждали по усиленной экспрессии PD-1, которая была детектирована с помощью антитела к PD-1, PD-1 mAb 1. Из результатов этих исследований было видно, что hLAG-3 mAb 6 (1.1) связывалось с эндогенным LAG-3, экспрессируемым на поверхности простимулированных PBMC яванского макака.

Все упомянутые в настоящем описании публикации и патенты включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и отдельно указана как включенная посредством ссылки в полном ее объеме. Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано в связи с конкретными вариантами его осуществления, будет понятно, что его можно подвергнуть дополнительным модификациям, и настоящая заявка подразумевается как охватывающая любые варианты, применения или адаптации настоящего изобретения, согласно, в целом, принципам настоящего изобретения, и включающая такие отклонения от настоящего раскрытия, которые входят в общеизвестную или общепринятую практику в области техники, к которой относится настоящее изобретение, и которые могут быть применимы к основным признакам, изложенным выше в настоящем документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающая LAG-3 молекула, которая способна связываться как с LAG-3 человека, так и с LAG-3 яванского макака, причем указанная связывающая LAG-3 молекула содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем указанный переменный домен тяжелой цепи содержит домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен

CDR_{H3} и указанный вариабельный домен легкой цепи содержит домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3}, причем:

(A) (1) домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} соответственно содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73 и

(2) домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} соответственно содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78; или

(B) (1) домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} соответственно содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73; и

(2) домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} соответственно содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78.

2. Связывающая LAG-3 молекула по п.1, причем:

(1) домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} соответственно содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73 и

(2) домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} соответственно содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78.

3. Связывающая LAG-3 молекула по любому из пп.1, 2, причем указанная молекула представляет собой антитело.

4. Связывающая LAG-3 молекула по п.3, причем указанная молекула представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело.

5. Связывающая LAG-3 молекула по любому из пп.1-4, причем указанная молекула содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79 или SEQ ID NO: 81.

6. Связывающая LAG-3 молекула по любому из пп.1-5, причем указанная молекула содержит вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 85.

7. Связывающая LAG-3 молекула по любому из пп.5 или 6, причем указанная молекула содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79 и вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

8. Биспецифическая связывающая молекула, способная одновременно связываться с LAG-3 человека и со вторым эпитопом, причем второй эпитоп представляет собой эпитоп молекулы, участвующей в регуляции иммунной контрольной точки, присутствующей на поверхности иммунной клетки, причем указанная биспецифическая связывающая молекула содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем указанный вариабельный домен тяжелой цепи содержит домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} и указанный вариабельный домен легкой цепи содержит домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3}, причем:

(A) (1) домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} соответственно содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73 и

(2) домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} соответственно содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78; или

(B) (1) домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} соответственно содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73 и

(2) домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} соответственно содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78.

9. Биспецифическая связывающая молекула по п.8, причем:

(1) домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} соответственно содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73 и

(2) домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} соответственно содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78.

10. Биспецифическая связывающая молекула по любому из пп.8, 9, причем указанная молекула содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79 и вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

11. Биспецифическая связывающая молекула по любому из пп.8-10, причем указанный второй эпитоп представляет собой эпитоп B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, галектина-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC I или II класса, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 или VISTA.

12. Биспецифическая связывающая молекула по п.11, причем указанный второй эпитоп представляет собой эпитоп PD-1.

13. Биспецифическая связывающая молекула по любому из пп.8-12, причем указанная молекула представляет собой:

(а) диатело, причем указанное диатело представляет собой ковалентно связанный комплекс, который содержит две, или три, или четыре различных полипептидных цепи; или

(b) трехвалентную связывающую молекулу, причем указанная трехвалентная связывающая молекула представляет собой ковалентно связанный комплекс, который содержит три, четыре или пять полипептидных цепей.

14. Биспецифическая связывающая молекула по любому из пп.1-13, причем указанная молекула содержит Fc-участок.

15. Биспецифическая связывающая молекула по п.14, причем указанный Fc-участок представляет собой вариантный Fc-участок, который содержит одну или несколько аминокислотных модификаций, которые уменьшают аффинность указанного вариантного Fc-участка в отношении FcγR, причем указанные модификации, которые уменьшают аффинность вариантного Fc-участка в отношении FcγR, содержат замены:

(1) L234A, L235A или

(2) L234A и L235A,

причем указанная нумерация соответствует EU системе нумерации по Kabat.

16. Биспецифическая связывающая молекула по любому из пп.14, 15, причем указанный Fc-участок представляет собой вариантный Fc-участок, который содержит одну или несколько аминокислотных модификаций, которые увеличивают период полужизни в сыворотке указанного вариантного Fc-участка, причем указанные модификации, которые увеличивают период полужизни в сыворотке вариантного Fc-участка содержат замены:

(1) M252Y и S254T;

(2) M252Y и T256E;

(3) M252Y, S254T и T256E или

(4) K288D и H435K,

причем указанная нумерация соответствует EU системе нумерации по Kabat.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая связывающую LAG-3 молекулу по любому из пп.1-7 и фармацевтически приемлемый носитель или биспецифическую связывающую молекулу по любому из пп.8-16 и фармацевтически приемлемый носитель.

18. Применение биспецифической связывающей молекулы по п.8 для стимуляции T-клеточного иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта.

19. Применение биспецифической связывающей молекулы по п.8 при лечении злокачественной опухоли или инфекции у субъекта, имеющего подавленную иммунную систему.

20. Применение биспецифической связывающей молекулы по любому из пп.18, 19, причем:

(1) домен CDR_H1, домен CDR_H2 и домен CDR_H3 соответственно содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73 и

(2) домен CDR_L1, домен CDR_L2 и домен CDR_L3 соответственно содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78.

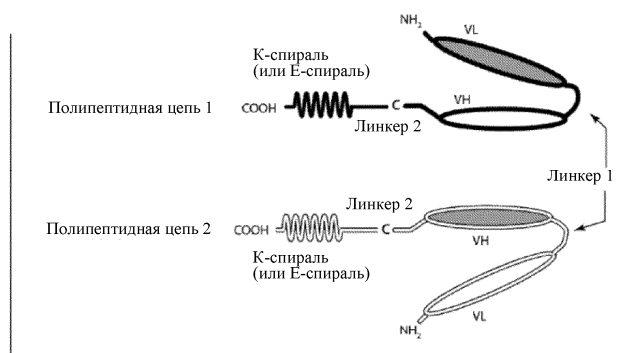
21. Применение биспецифической связывающей молекулы по любому из пп.18-20, причем указанная молекула содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79 и вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

22. Применение по любому из пп.19-21, для лечения злокачественной опухоли, выбранной из группы, состоящей из опухоли надпочечника, ассоциированной со СПИДом злокачественной опухоли, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, злокачественной опухоли мочевого пузыря, злокачественной опухоли костей, злокачественной опухоли головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, злокачественной опухоли молочной железы, опухолей каротидного тельца, цервикальной злокачественной опухоли, хондросаркомы, хордомы, хромофобной почечно-клеточной карциномы, светло-клеточной карциномы, злокачественной опухоли толстой кишки, колоректальной злокачественной опухоли, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, опухоли Юинга, внескелетной слизеподобной хондросаркомы, злокачественной опухоли желчного пузыря или желчевыводящих путей, злокачественной опухоли желудочно-кишечного тракта, гестационной трофобластической болезни, эмбрионально-клеточной опухоли, злокачественной опухоли головы и шеи, гепатоклеточной карциномы, опухоли островков поджелудочной железы, саркомы Капоши, злокачественной опухоли почки, лейкоза, липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли, злокачественной опухоли печени, лимфомы, злокачественной опухоли легкого, гранулобластомы, меланомы, менингиомы, множественных эндокринных неоплазий, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринных опухолей, злокачественной опухоли яичника, злокачественной опухоли поджелудочной железы, папиллярной карциномы щитовидной железы, опухоли парашитовидных желез, детской злокачественной опухоли, опухоли оболочки периферического нерва, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, злокачественной опухоли предстательной железы, увеальной меланомы заднего отдела глаза, почечной метастатической злокачественной опухоли, рабдоидной опухоли, рабдомиосаркомы, саркомы, злокачественной опухоли кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточной злокачественной опухоли, злокачественной опухоли желудка, синовиальной саркомы, злокачественной опухоли яичка,

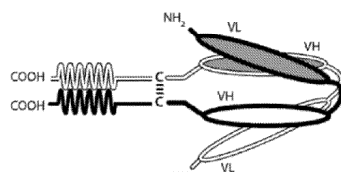
тимусной карциномы, тимомы, метастатической злокачественной опухоли щитовидной железы и злокачественной опухоли матки.

23. Применение по любому из пп.19-21 для лечения колоректальной злокачественной опухоли, гепатоклеточной карциномы, глиомы, злокачественной опухоли почки, злокачественной опухоли молочной железы, множественной миеломы, злокачественной опухоли мочевого пузыря, нейробластомы, саркомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточной злокачественной опухоли легкого, злокачественной опухоли яичника, злокачественной опухоли поджелудочной железы, злокачественной опухоли прямой кишки, острого миелоидного лейкоза (AML), хронического миелогенного лейкоза (CML), острого В-лимфобластного лейкоза (B-ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), волосатоклеточного лейкоза (HCL), новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток (BPDCN), неходжкинской лимфомы (NHL), включая мантийноклеточную лимфому (MCL) и мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), ходжкинской лимфомы, системного мастоцитоза или лимфомы Беркитта.

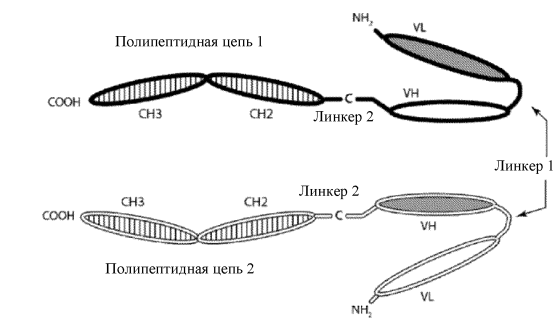
24. Применение биспецифической связывающей молекулы по п.8 в детекции LAG-3, причем биспецифическая связывающая молекула помечена детектируемой меткой.



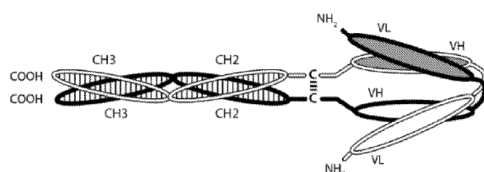
Собранное диатело



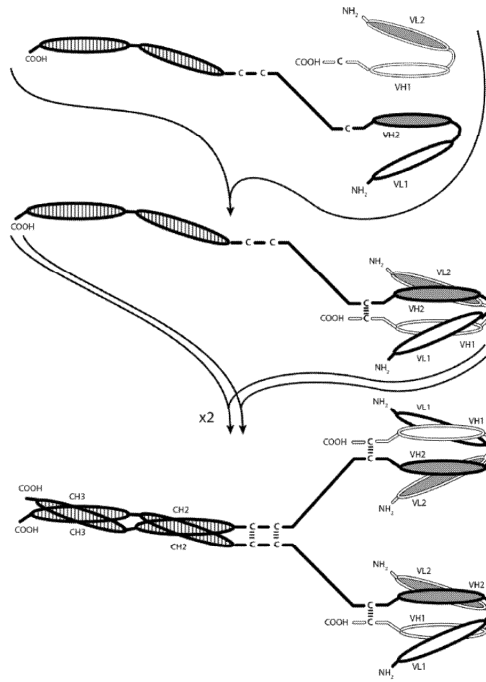
Фиг. 1



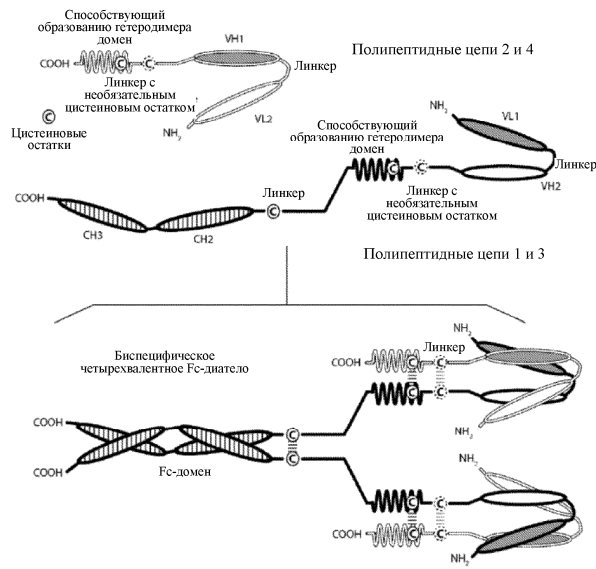
Собранное диатело



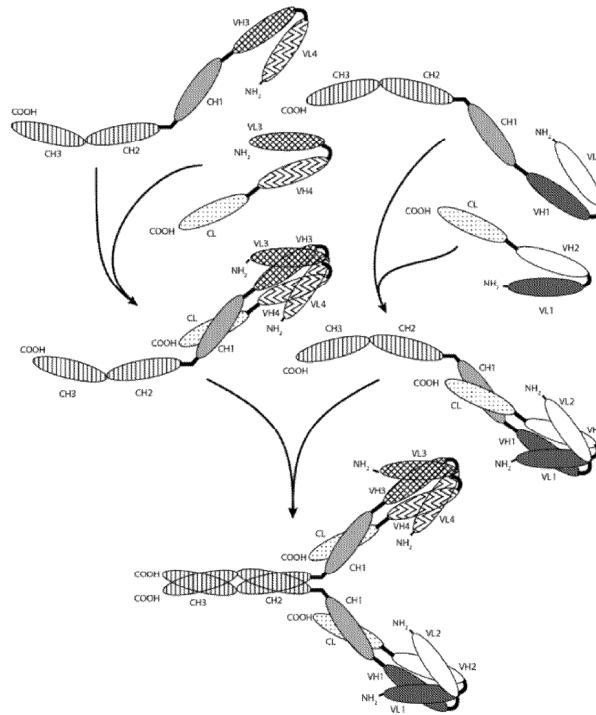
Фиг. 2



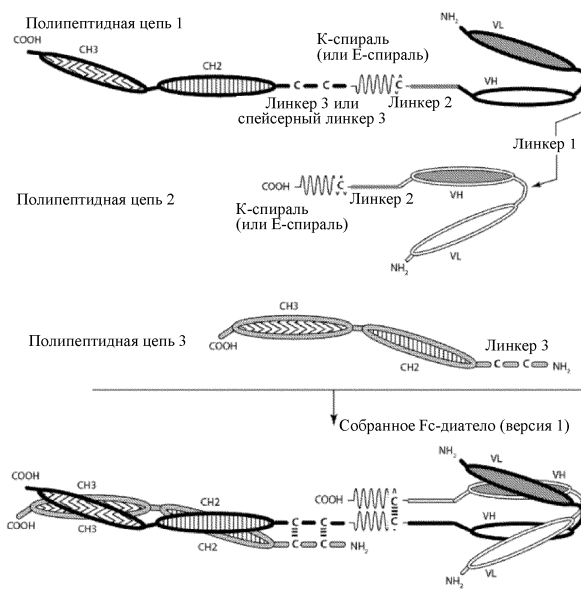
Фиг. 3А



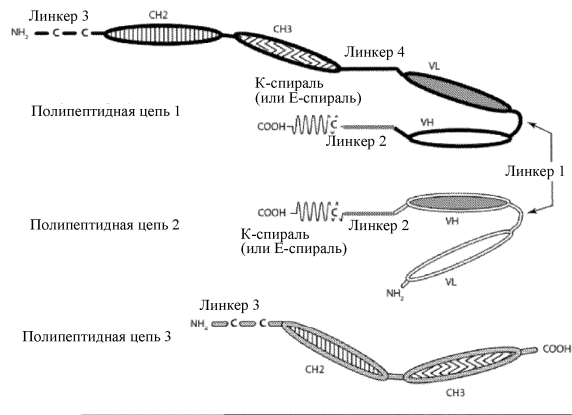
Фиг. 3В



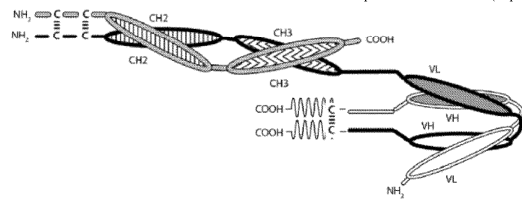
Фиг. 3С



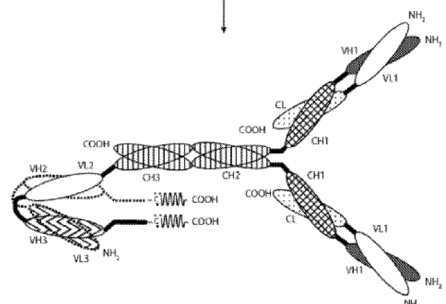
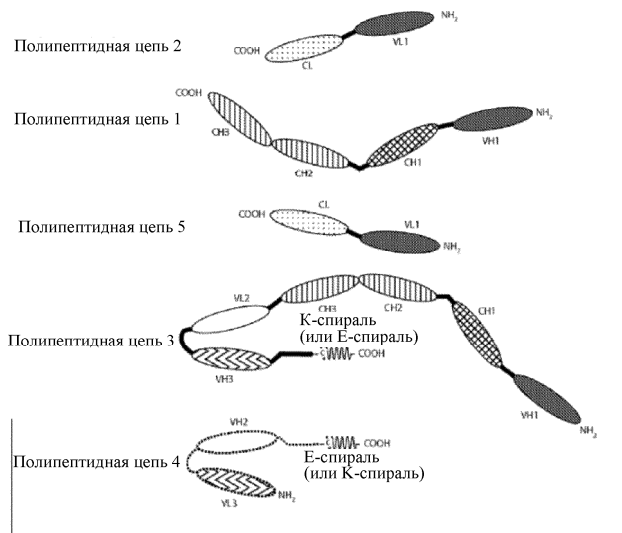
Фиг. 4А



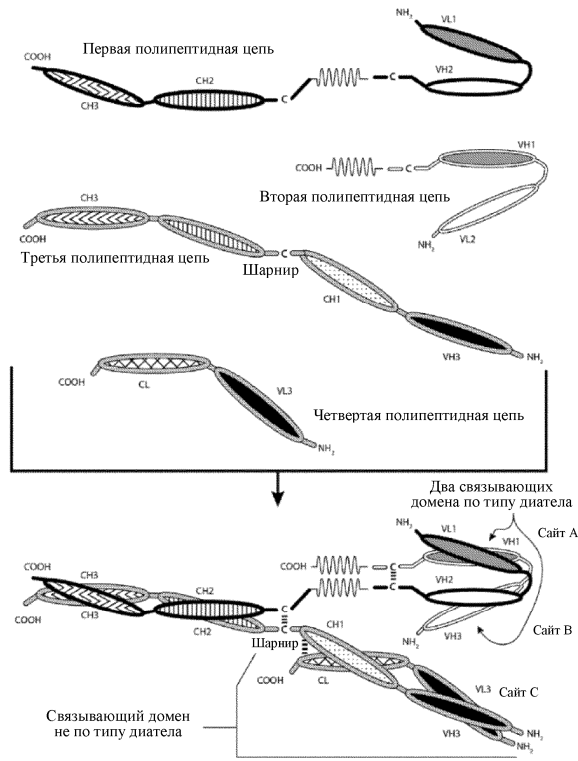
Собранное Fc-дигетло (версия 2)



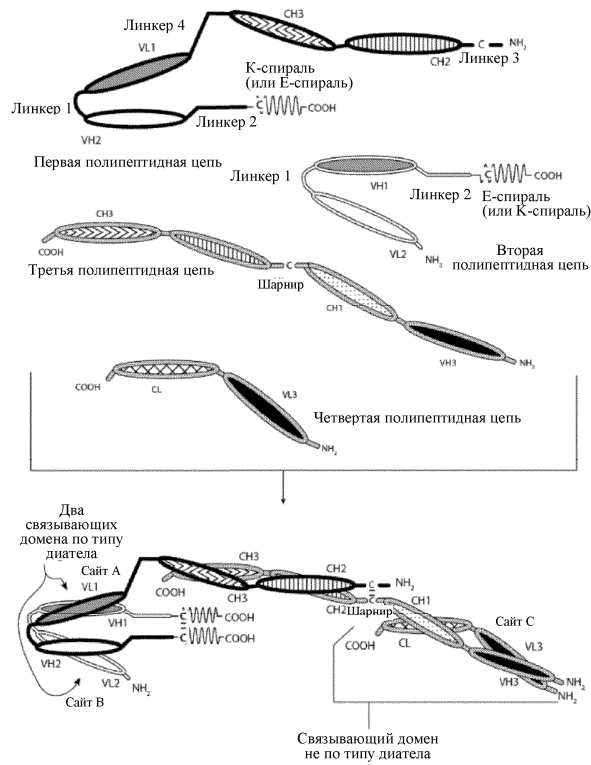
Фиг. 4В



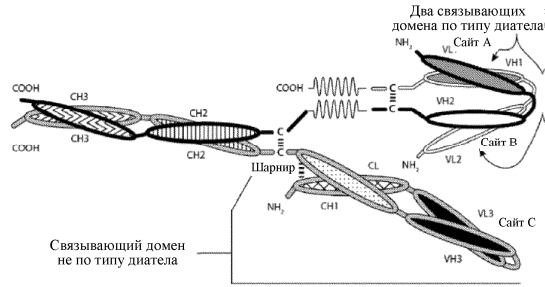
Фиг. 5



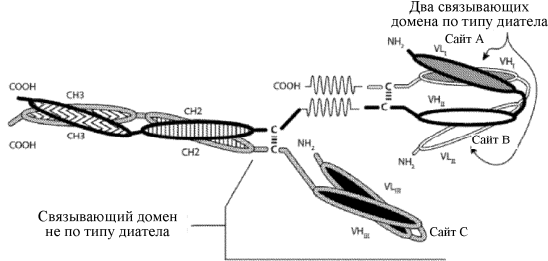
Фиг. 6А



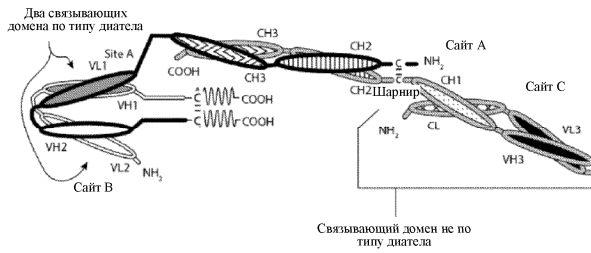
Фиг. 6В



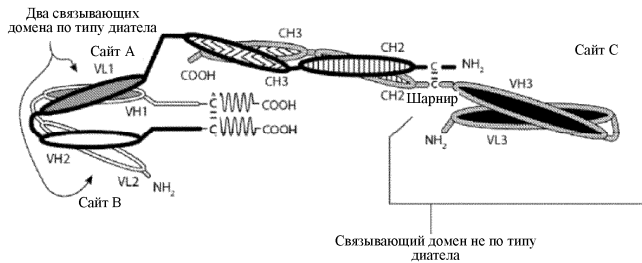
Фиг. 6С



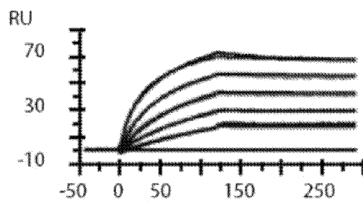
Фиг. 6D



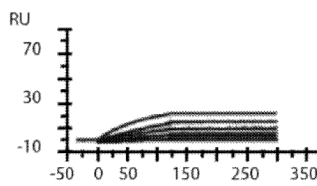
Фиг. 6E



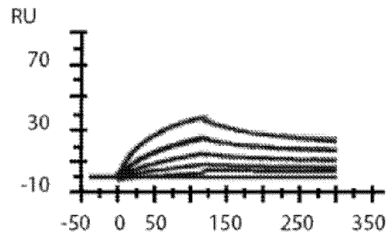
Фиг. 6F



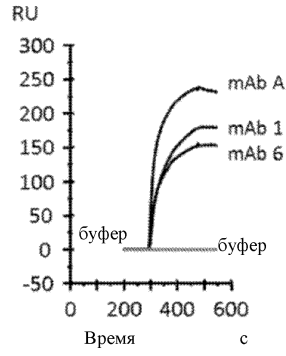
Фиг. 7A



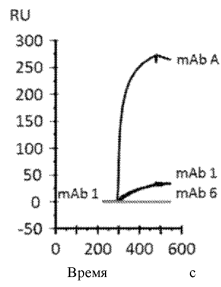
Фиг. 7B



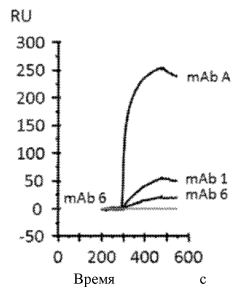
Фиг. 7С



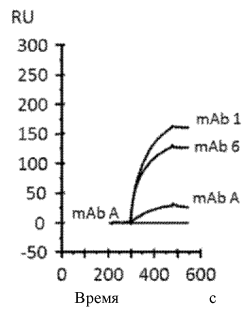
Фиг. 8А



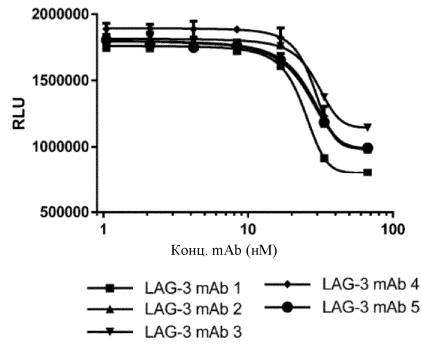
Фиг. 8В



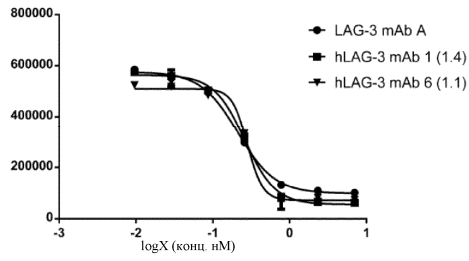
Фиг. 8С



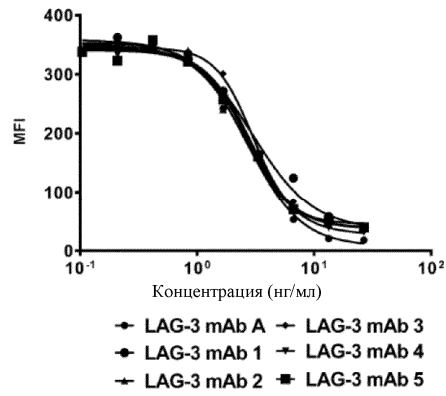
Фиг. 8D



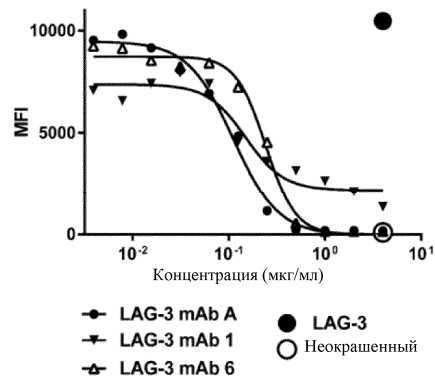
Фиг. 9А



Фиг. 9В

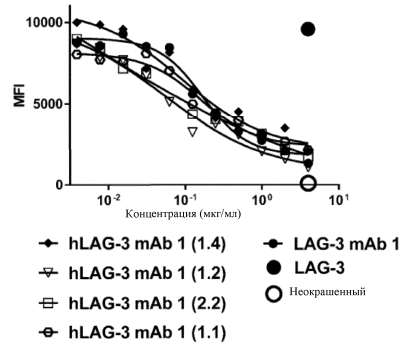


Фиг. 10А



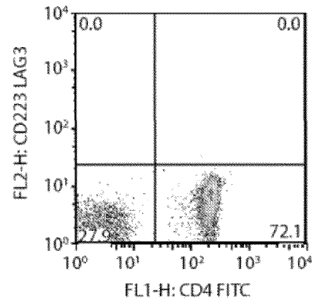
Фиг. 10В

041483



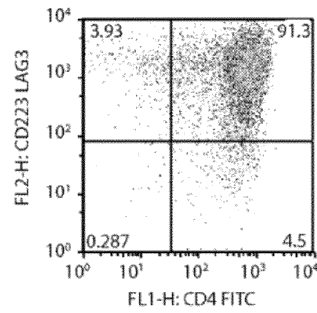
Фиг. 10С

Непростимулированный (D:58468)



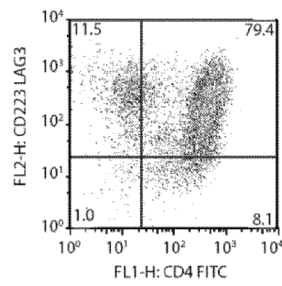
Фиг. 11А

Простимулированный (день 11, D:58468)

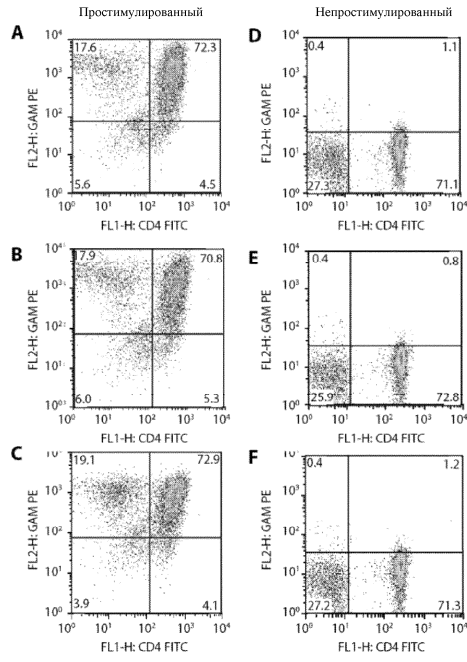


Фиг. 11В

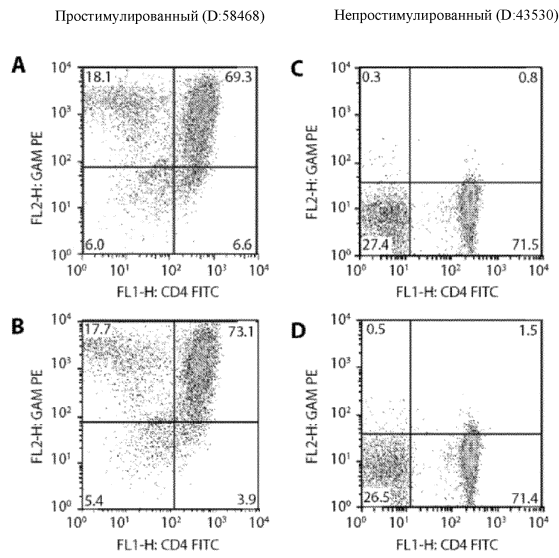
Простимулированный (день 14, D:43530)



Фиг. 11С

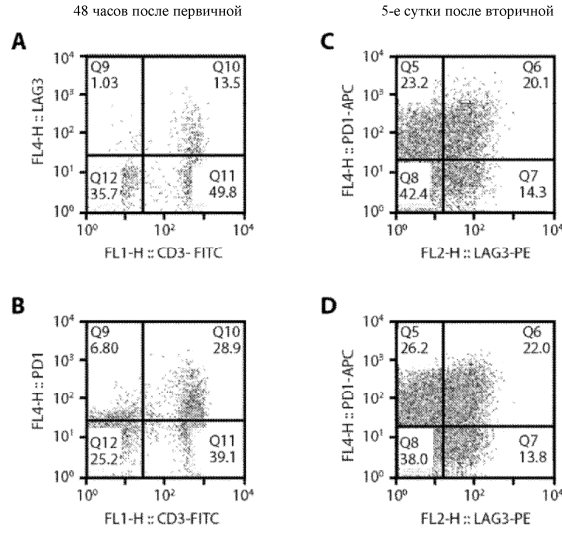


Фиг. 12



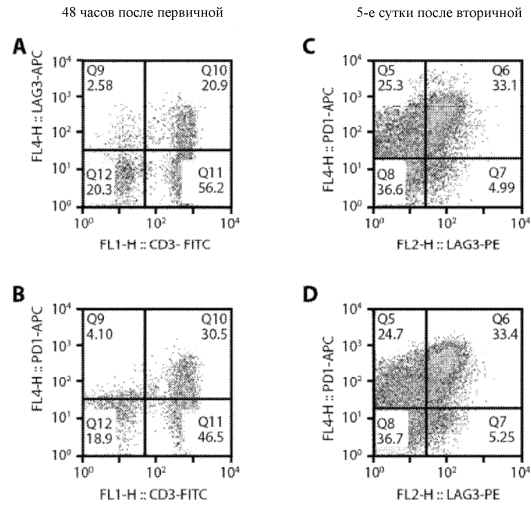
Фиг. 13

D:34765



Фиг. 14

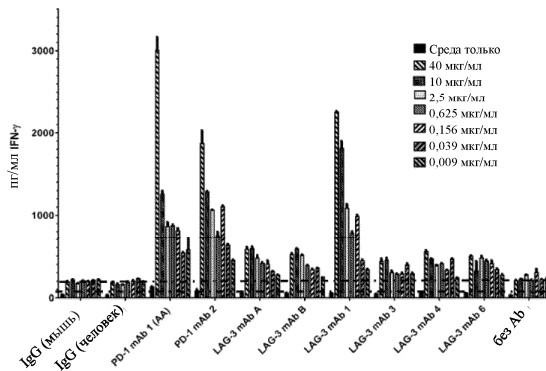
D:53724



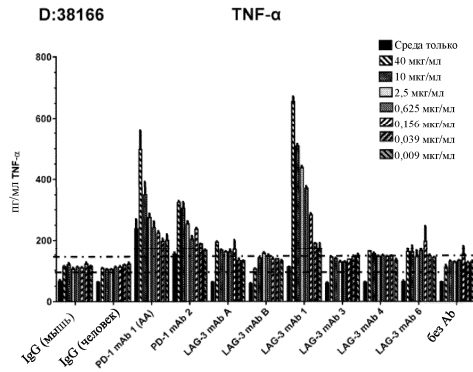
Фиг. 15

D:38166

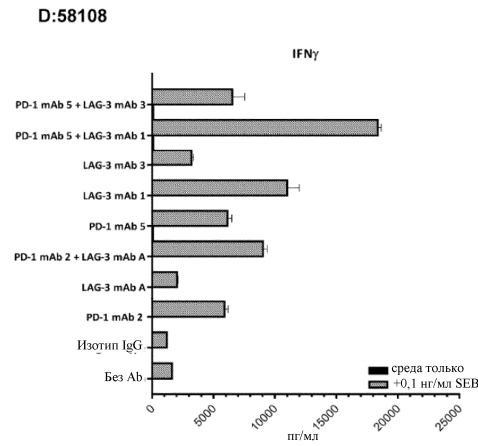
IFN- γ



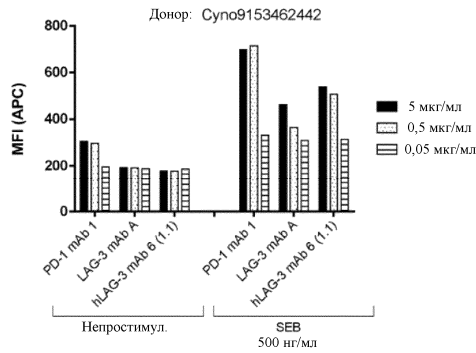
Фиг. 16А



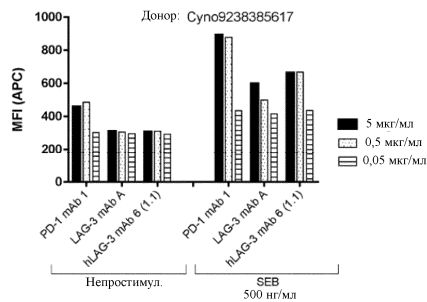
Фиг. 16В



Фиг. 17



Фиг. 18А



Фиг. 18В