

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043673**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.09

(21) Номер заявки
201991673

(22) Дата подачи заявки
2018.02.09

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
C07C 259/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) МЕЧЕННЫЕ РАДИОАКТИВНЫМ ИЗОТОПОМ АНТИТЕЛА К LAG3 ДЛЯ ИММУНО-ПЭТ-ВИЗУАЛИЗАЦИИ

(31) 62/457,287

(32) 2017.02.10

(33) US

(43) 2020.01.17

(86) PCT/US2018/017525

(87) WO 2018/148476 2018.08.16

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Келли Маркус, Ма Дангше, Олсон
Уильям, Таваре Ричард, Терстон
Гэвин (US)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Глухарёва А.О.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Лебедев В.В., Костюшенкова М.Ю.,
Гизатуллин Ш.Ф., Парамонова К.В.
(RU)**

(56) WO-A2-2017015560

SIERRO SOPHIE ET AL.: "The CD4-like molecule LAG-3, biology and therapeutic applications", EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TAR, INFORMA HEALTHCARE, GB, vol. 15, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 91-101, XP009178261, ISSN: 1744-7631, DOI: 10.1517/14712598.2011.540563, page 92, right-hand column - pages 93, 95

LINH T. NGUYEN ET AL.: "Clinical blockade of PD1 and LAG3 - potential mechanisms of action", NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY, vol. 15, no. 1, 23 December 2014 (2014-12-23), pages 45-56, XP055216541, ISSN: 1474-1733, DOI: 10.1038/nri3790, page 52-page 54

LARS R PERK ET AL.: "p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging", EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 37, no. 2, 18 September 2009 (2009-09-18), pages 250-259, XP019778696, ISSN: 1619-7089, page 251, right-hand column; figure 1

MARIA J W D VOSJAN ET AL.: "Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine", NATURE PROTOCOLS, vol. 5, no. 4, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 739-743, XP055304936, GB ISSN: 1754-2189, DOI: 10.1038/nprot.2010.13, page 740, left-hand column; figure 1

US-A1-2010111856

(57) В настоящем изобретении предусмотрены меченные радиоактивным изотопом антитела к LAG3 и их применение в иммуно-ПЭТ-визуализации. Предусмотрены способы обнаружения присутствия белков LAG3 в организме пациента или в образце.

B1

043673

043673 B1

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее раскрытие относится к меченным радиоактивным изотопом антителам к LAG3 и их применению в иммуно-ПЭТ-визуализации.

Перечень последовательностей

Официальная копия перечня последовательностей подана одновременно с настоящим описанием изобретения в электронном виде посредством EFS-Web в виде отформатированного согласно ASCII перечня последовательностей с названием файла "10329WO01_SEQ_LIST_ST25.txt", датой создания 9 февраля 2018 года и размером, составляющим приблизительно 254 КБ. Перечень последовательностей, содержащийся в этом отформатированном согласно ASCII документе, является частью настоящего описания изобретения и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Молекулы, костимулирующие и соингибирующие Т-клетки (собирательно называемые косигнальными молекулами), играют решающую роль в регуляции активации Т-клеток, дифференцировке субпопуляций, эффекторной функции и выживаемости (Chen et al 2013, Nature Rev. Immunol. 13: 227-242). После распознавания соответствующих комплексов пептида с МНС на антигенпрезентирующих клетках рецептором Т-клеток (TCR), косигнальные рецепторы совместно локализируются с рецепторами Т-клеток в иммунном синапсе, где они синергизируются с передачей сигналов TCR для стимуляции или ингибирования Т-клеточной активации и функции (Flies et al 2011, Yale J. Biol. Med. 84:409-421). Окончательный иммунный ответ регулируется балансом между костимулирующими и соингибирующими сигналами ("иммунные контрольные точки") (Pardoll 2012, Nature Reviews Cancer 12: 252-264). Ген 3 активации лимфоцитов (LAG3) функционирует как одна из таких "иммунных контрольных точек", опосредуя толерантность периферических Т-клеток.

LAG3 (также называемый CD223) представляет собой рецептор -трансмембранный белок из 503 аминокислот, экспрессируемый на активированных CD4 и CD8 Т-клетках, $\gamma\delta$ Т-клетках, Т-клетках - натуральных киллерах, В-клетках, натуральных киллерах, плазматоидных дендритных клетках и регуляторных Т-клетках. LAG3 является представителем суперсемейства иммуноглобулинов (Ig). Основной функцией LAG3 является ослабление иммунного ответа. Связывание LAG3 с молекулами МНС класса II приводит к доставке отрицательного сигнала в клетки, экспрессирующие LAG3, и отрицательно регулирует антигензависимые ответы CD4 и CD8 Т-клеток. LAG3 отрицательно регулирует способность Т-клеток пролиферировать, продуцировать цитокины и лизировать клетки-мишени, что называется "истощением" Т-клеток. Также сообщается, что LAG3 играет роль в усилении функции Т-регуляторных (Treg) клеток (Pardoll 2012, Nature Reviews Cancer 12: 252-264).

Иммуно-позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) представляет собой диагностический инструмент для визуализации, в котором используют моноклональные антитела, меченные позитронными излучателями, объединяя целевые свойства антитела с чувствительностью камер позитронно-эмиссионной томографии. См., например, The Oncologist, 12: 1379 (2007); Journal of Nuclear Medicine, 52(8):1171 (2011). Иммуно-ПЭТ обеспечивает визуализацию и количественную оценку накопления антигенов и антител *in vivo* и, в связи с этим, может служить важным инструментом для диагностики и дополняющей терапии. Например, иммуно-ПЭТ может помочь в выборе потенциальных пациентов-кандидатов для конкретной терапии, а также в мониторинге лечения.

Поскольку LAG3 стал мишенью для противоопухолевой иммунотерапии и инфекционной иммунотерапии, существует потребность в диагностических инструментах для терапии, направленной против LAG3, включая в себя, среди прочего, диагностические инструменты, которые позволяют обнаруживать подходящих пациентов-кандидатов для указанной терапии.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

В настоящее раскрытие включены меченные радиоактивным изотопом конъюгаты антител к LAG3 для применения в иммуно-ПЭТ-визуализации.

Согласно одному аспекту конъюгат содержит антитело к LAG3 или его антигенсвязывающий фрагмент, хелатирующий фрагмент и позитронный излучатель.

В настоящем документе также предусмотрены способы синтеза указанных конъюгатов и синтетические промежуточные соединения, применимые для этого.

В настоящем документе также предусмотрены способы визуализации ткани, которая экспрессирует LAG3, причем способы предусматривают введение в ткань меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3, описанного в настоящем документе; и визуализацию экспрессии LAG3 путем визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

В настоящем документе также предусмотрены способы визуализации ткани, содержащей экспрессирующие LAG3 клетки, например, экспрессирующие LAG3 внутриопухолевые лимфоциты, причем способы предусматривают введение меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3, описанного в настоящем документе, в ткань и визуализацию экспрессии LAG3 с помощью ПЭТ-визуализации.

В настоящем документе также предусмотрены способы обнаружения LAG3 в ткани, причем способы предусматривают введение в ткань меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3,

описанного в настоящем документе; и визуализацию экспрессии LAG3 с помощью ПЭТ-визуализации. Согласно одному варианту осуществления ткань присутствует у человека. Согласно определенным вариантам осуществления субъект представляет собой млекопитающее, не являющееся человеком. Согласно определенным вариантам осуществления субъект характеризуется наличием заболевания или нарушения, такого как рак, воспалительное заболевание или инфекция.

В настоящем документе также предусмотрены способы идентификации пациента, подходящего для противоопухолевой терапии, содержащей ингибитор LAG3, причем способы предусматривают выбор пациента с солидной опухолью, введение меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела, описанного в настоящем документе, и визуализацию введенного меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ-визуализации, причем присутствие меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли идентифицирует пациента как подходящего для противоопухолевой терапии, содержащей ингибитор LAG3.

В настоящем документе также предусмотрены способы лечения опухоли, причем способы предусматривают выбор субъекта с солидной опухолью; определение того, что солидная опухоль является LAG3-положительной; и введение противоопухолевой терапии нуждающемуся в этом субъекту. Согласно определенным вариантам осуществления противоопухолевая терапия содержит ингибитор LAG3. Согласно определенным вариантам осуществления противоопухолевая терапия содержит ингибитор ветки сигнального каскада PD-1/PD-L1 (например, антитело к PD-1 или антитело к PD-L1). Согласно определенным вариантам осуществления противоопухолевая терапия содержит ингибитор LAG3 и/или ингибитор ветки сигнального каскада PD-1/PD-L1. Согласно определенным вариантам осуществления субъекту вводят меченный радиоактивным изотопом конъюгат антитела к LAG3, описанный в настоящем документе, и локализацию меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела визуализируют с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ, PET), чтобы определить, является ли опухоль LAG3-положительной. Согласно определенным вариантам осуществления субъекту дополнительно вводят меченный радиоактивным изотопом конъюгат антитела к PD-1, и локализацию меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела визуализируют с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), чтобы определить, является ли опухоль PD-1-положительной.

В настоящем документе также предусмотрены способы мониторинга эффективности противоопухолевой терапии у субъекта, причем способы предусматривают выбор субъекта с солидной опухолью, причем субъекта лечат с помощью противоопухолевой терапии; введение меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3, описанного в настоящем документе, субъекту; визуализацию локализации введенного меченного радиоактивным изотопом конъюгата в опухоли с помощью ПЭТ-визуализации; и определение роста опухоли, причем уменьшение от исходного уровня поглощения конъюгата или меченного радиоактивным изотопом сигнала указывает на эффективность противоопухолевой терапии. Согласно определенным вариантам осуществления противоопухолевая терапия содержит ингибитор LAG3 (например, антитело к LAG3). Согласно определенным вариантам осуществления противоопухолевая терапия содержит ингибитор ветки сигнального каскада PD-1/PD-L1. Согласно определенным вариантам осуществления противоопухолевая терапия содержит ингибитор PD-1 (например, REGN2810, BGB-A317, ниволумаб, пидилизумаб и пембролизумаб), ингибитор PD-L1 (например, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, MDX-1105 и REGN3504, а также те, которые раскрыты в патентной публикации № US 2015-0203580), ингибитор CTLA-4 (например, ипилимумаб), ингибитор TIM3, ингибитор BTLA, ингибитор TIGIT, ингибитор CD47, ингибитор GITR, антагонист другого T-клеточного соингибитора или лиганда (например, антитело к CD-28, 2B4, LY108, LANA, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонист фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) (например, "белок-ловушка для VEGF", такой как афлиберцепт или другой ингибирующий VEGF слитый белок, как указано в патенте США № 7087411, или антитело к VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент (например, бевацизумаб или ранибизумаб) или низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)), ингибитор Ang2 (например, несвакумаб), ингибитор трансформирующего фактора роста бета (TGFP), ингибитор рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, эрлотиниб, цетуксимаб), ингибитор CD20 (например, антитело к CD20, такое как ритуксимаб), антитело к опухолеспецифическому антигену (например, к CA9, CA125, ассоциированному с меланомой антигену 3 (MAGE3), карциноэмбриональному антигену (CEA), виментину, опухолевой пируваткиназе M2-типа, простатическому специфическому антигену (PSA), муцину-1, MART-1 и CA19-9), вакцина (например, вакцина из бацилл Кальметта-Герена, противораковая вакцина), адъювант для увеличения презентации антигена (например, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), биспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело CD3×CD20 или биспецифическое антитело PSMA×CD3), цитотоксин, химиотерапевтическое средство (например, дакарбазин, темозоломид, циклофосфамид, доцетаксел, доксорубицин, даунорубицин, цисплатин, карбоплатин, гемцитабин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел и винкристин), циклофосфамид, лучевая терапия, ингибитор IL-6R (например, сарилумаб), ингибитор IL-4R (например, дупилумаб), ингибитор IL-10, цитокин, такой как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, и конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC) (например, анти-CD19-DM4 ADC и анти-DS6-DM4 ADC).

В настоящем документе также предусмотрены способы прогнозирования ответа пациента на противоопухолевую терапию, причем способы предусматривают выбор пациента с солидной опухолью; и определение, является ли опухоль LAG3-положительной, причем, если опухоль является LAG3-положительной, это прогнозирует положительный ответ пациента на противоопухолевую терапию. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль определяют как положительную путем введения меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3 согласно настоящему раскрытию и определения локализации меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ-визуализации, причем присутствие меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является LAG3-положительной. Согласно некоторым вариантам осуществления противоопухолевая терапия выбрана из следующего: ингибитор PD-1 (например, REGN2810, BGB-A317, ниволумаб, пидилизумаб и пембролизумаб), ингибитор PD-L1 (например, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, MDX-1105 и REGN3504), ингибитор CTLA-4 (например, ипилимумаб), ингибитор TIM3, ингибитор BTLA, ингибитор TIGIT, ингибитор CD47, ингибитор GITR, антагонист другого T-клеточного соингибитора или лиганда (например, антитело к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонист фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) [например, "белок-ловушка для VEGF", такой как афлиберцепт или другой ингибирующий VEGF слитый белок, как указано в патенте США № 7087411, или антитело к VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент (например, бевацизумаб или ранибизумаб) или низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)], ингибитор Ang2 (например, несвакумаб), ингибитор трансформирующего фактора роста бета (TGF β), ингибитор рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, эрлотиниб, цетуксимаб), ингибитор CD20 (например, антитело к CD20, такое как ритуксимаб), антитело к опухолеспецифическому антигену [например, к CA9, CA125, ассоциированному с меланомой антигену 3 (MAGE3), карциноэмбриональному антигену (CEA), виментину, опухолевой пируваткиназе M2-типа, простатическому специфическому антигену (PSA), муцину-1, MART-1 и CA19-9], вакцина (например, вакцина из бацилл Кальметта-Герена, противораковая вакцина), адъювант для увеличения презентации антигена (например, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), биспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело CD3 \times CD20 или биспецифическое антитело PSMA \times CD3), цитотоксин, химиотерапевтическое средство (например, дакарбазин, темозоломид, циклофосфамид, доцетаксел, доксорубицин, даунорубицин, цисплатин, карбоплатин, гемцитабин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел и винкристин), циклофосфамид, лучевая терапия, ингибитор IL-6R (например, сарилумаб), ингибитор IL-4R (например, дупилумаб), ингибитор IL-10, цитокин, такой как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, и конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC) (например, анти-CD19-DM4 ADC и анти-DS6-DM4 ADC).

В настоящем документе также предусмотрены способы прогнозирования ответа пациента на противоопухолевую терапию, содержащую ингибитор LAG3, причем способы предусматривают выбор пациента с солидной опухолью; и определение, является ли опухоль LAG3-положительной, при этом, если опухоль является LAG3-положительной, это указывает на положительный ответ пациента на противоопухолевую терапию, содержащую ингибитор LAG3. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль определяют положительной путем введения меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3 согласно настоящему изобретению и определения локализации конъюгата меченного радиоактивным изотопом антитела в опухоли с помощью ПЭТ-визуализации, причем присутствие меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является LAG3-положительной.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показан спектр в УФ/видимой части спектра модифицированного DFO антитела к LAG3 (mAb1-DFO).

На фиг. 2 изображена эксклюзионная ВЭЖХ модифицированного DFO антитела к LAG3.

На фиг. 3 изображена эксклюзионная ВЭЖХ с обнаружением радиоактивной метки (radio-SEC-HPLC) конъюгата изотипического контроля с DFO после введения радиоактивной метки ^{89}Zr для исследования 1.

На фиг. 4 изображена эксклюзионная ВЭЖХ с обнаружением радиоактивной метки в отношении конъюгата антитела к LAG3 с DFO после введения радиоактивной метки ^{89}Zr для исследования 1.

На фиг. 5 изображена эксклюзионная ВЭЖХ с обнаружением радиоактивной метки в отношении конъюгата антитела к LAG3 с DFO после введения радиоактивной метки ^{89}Zr для исследования 2.

На фиг. 6 изображена хроматограмма эксклюзионной ВЭЖХ при 280 нм УФ (UV280-SEC-HPLC) и запись иммуно-ТСХ с обнаружением радиоактивной метки (radio-iTLC) в отношении конъюгата изотипического контроля с DFO после введения радиоактивной метки ^{89}Zr для исследования 1.

На фиг. 7 изображена хроматограмма эксклюзионной ВЭЖХ при 280 нм УФ и запись иммуно-ТСХ с обнаружением радиоактивной метки в отношении конъюгата антитела к LAG3 с DFO после введения радиоактивной метки ^{89}Zr для исследования 1.

На фиг. 8 изображена хроматограмма эксклюзионной ВЭЖХ при 280 нм УФ и запись иммуно-ТСХ

с обнаружением радиоактивной метки в отношении конъюгата антитела к LAG3 с DFO после введения радиоактивной метки ^{89}Zr для исследования 2.

На фиг. 9 представлены репрезентативные изображения ^{89}Zr -DFO-mAb1, введенного с помощью инъекции в дозе белка, составляющей 5 мг/кг (Ms01) или 0,03 мг/кг (Ms14), демонстрирующие специфическое нацеливание ^{89}Zr -DFO-mAb1 на опухоли Raji/hPBMС с использованием дозы 0,03 мг/кг ^{89}Zr -DFO-mAb1 и блокирование в дозе 5 мг/кг ^{89}Zr -DFO-mAb1. Специфическое поглощение в селезенке и лимфатических узлах наблюдается при более низкой дозе, составляющей 0,03 мг/кг ^{89}Zr -DFO-mAb1.

На фиг. 10 показана экспрессия LAG3 в образцах тканей из ксенотрансплантатов PBMС/Raji (полученных через 27 дней и 15 дней после имплантации опухоли) и в клинических образцах меланомы.

На фиг. 11 представлены данные, демонстрирующие, что REGN2810 (Ab к PD-1 человека) и mAb1 к LAG3 человека, соответственно, увеличивают LAG-3+ Т-клетки и PD-1+ Т-клетки в микроокружении опухоли.

На фиг. 12 показаны характеристики образцов меланомы, исследуемых в примере 7.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

I. Определения

Если не определено иначе в настоящем документе, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в настоящей области техники, к которой относится раскрытый объект настоящего изобретения.

Термин "LAG3" относится к белку гена 3 активации лимфоцитов, рецептору иммунной контрольной точки или соингибитору Т-клеток, также известному как CD223. Аминокислотная последовательность полноразмерного LAG3 представлена в GenBank как идентификационный номер NP_002277.4, а также в настоящем документе называется SEQ ID NO: 582. Термин "LAG3" также включает в себя варианты белка LAG3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 574, 575 или 576. Термин "LAG3" включает в себя рекомбинантный LAG3 или его фрагмент. Термин также охватывает LAG3 или его фрагмент, связанный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека, или сигнальной последовательностью, такой как сигнальная последовательность ROR1. Например, термин включает в себя последовательность, примером которых является SEQ ID NO: 575, содержащая Fc мыши (mIgG2a) на С-конце, связанную с аминокислотными остатками 29-450 полноразмерного эктодомена LAG3. Варианты белков, представленные в качестве примера SEQ ID NO: 574, содержат гистидиновую метку на С-конце, связанную с аминокислотными остатками 29-450 полноразмерного эктодомена LAG3. Если не указано, что он относится к виду, не относящемуся к человеку, термин "LAG3" означает LAG3 человека.

LAG3 является представителем суперсемейства иммуноглобулинов (Ig). LAG3 является трансмембранным белком типа 1 с четырьмя внеклеточными Ig-подобными доменами от D1 до D4 и экспрессируется на внутриопухолевых лимфоцитах, включая в себя активированные Т-клетки, клетки - натуральные киллеры, В-клетки, плазматоидные дендритные клетки и регуляторные Т-клетки. Рецептор LAG3 связывается с молекулами MHC II класса, присутствующими на антигенпрезентирующих клетках (APC).

Термин "B7-1" относится к антигену активации Т-лимфоцитов, также известному как стимулирующий фактор CD80. B7-1 представляет собой мембранный рецептор из 288 аминокислот с внеклеточным N-концевым доменом, который содержит IgV-подобные (aa 37-138) и IgC-подобные (aa 154-232) области, трансмембранным доменом (aa 243-263) и С-концевой внутриклеточной областью (aa 263-288). Аминокислотная последовательность полноразмерного B7-1 представлена в GenBank под регистрационным номером NP_005182.1.

Используемый в настоящем документе термин "Т-клеточный соингибитор" относится к лиганду и/или рецептору, который модулирует иммунный ответ посредством Т-клеточной активации или супрессии. Термин "Т-клеточный соингибитор", также известный как Т-клеточная косигнальная молекула, включает в себя без ограничения белок гена 3 активации лимфоцитов (LAG-3, также известный как CD223), белок 1 программируемой смерти (PD-1), антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), аттенуатор В и Т-лимфоцитов (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, Т-клеточный иммуноглобулин и муцин-3 (TIM3), Т-клеточный иммунорецептор с доменами иммуноглобулина и ITIM (TIGIT; также известный как VSIG9), ассоциированный с лейкоцитами иммуноглобулиноподобный рецептор 1 (LAIR1; также известный как CD305), индуцируемый Т-клеточный костимулятор (ICOS; также известный как CD278), B7-1 (CD80) и CD160.

Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулина, состоящим из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (т.е. "полные молекулы антитела"), а также к их мультимерам (например, IgM) или их антигенсвязывающим фрагментам. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи ("HCVR" или "V_H") и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи ("LCVR" или "V_L") и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гиперварибельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от

аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно определенным вариантам осуществления FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут являться идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут быть естественным образом или искусственно модифицированы. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определить на основании параллельного сравнительного анализа двух или более CDR.

Кроме того, возможна замена одного или нескольких остатков CDR или пропуск одной или нескольких CDR. В научной литературе описаны антитела, которые для связывания могут обойтись без одной или двух CDR. Padlan с соавт. (1995 FASEB J. 9: 133-139) проанализировали области контакта между антителами и их антигенами, основываясь на опубликованных кристаллических структурах, и пришли к выводу, что только приблизительно одна пятая - одна третья остатков CDR действительно контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил много антител, в которых одна или две CDR не характеризуются наличием аминокислот, контактирующих с антигеном (см. также Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320: 415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, можно идентифицировать на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не требуются) из областей CDR согласно Kabat, лежащих вне CDR согласно Chothia, путем молекулярного моделирования и/или опытным путем. Если CDR или его остаток(остатки) опущен(ы), ее(их), как правило, заменяют аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности антитела человека или консенсусе таких последовательностей. Положения для замены в пределах CDR и аминокислоты для замены также можно выбрать эмпирически. Эмпирические замены могут представлять собой консервативные или неконсервативные замены.

Раскрытые в настоящем документе моноклональные антитела к LAG3 могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или в областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко установить путем сравнения раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Согласно настоящему раскрытию предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получают из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, причем одна или несколько аминокислот в пределах одной или нескольких каркасных областях и/или областях CDR мутированы до соответствующего(их) остатка(ов) последовательностей зародышевой линии, из которых получено антитело, или до соответствующего(их) остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии человека, или до консервативной аминокислотной замены соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности называются в настоящем документе обобщенно "мутации зародышевой линии"). Специалист в настоящей области техники, начиная с описанных в настоящем документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинации. Согласно определенным вариантам осуществления все остатки каркасной области и/или CDR в доменах V_H и/или V_L мутируют обратно в остатки, обнаруженные в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. Согласно другим вариантам осуществления только определенные остатки мутируют обратно до исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам осуществления один или несколько остатков каркасной области и/или CDR мутируют до соответствующего(их) остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело изначально). Кроме того, антитела согласно настоящему раскрытию могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, например, в которых определенные отдельные остатки мутированы до соответствующего остатка конкретной последовательности зародышевой линии, тогда как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или подвергают мутации до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко проверить в отношении одного или нескольких требуемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (если таковые могут иметь место), пониженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, предусмотрены в пределах настоящего раскрытия.

Согласно настоящему раскрытию также предусмотрены моноклональные антитела к LAG3, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытые в настоящем документе, с одной или несколькими консервативными заменами. Например, согласно на-

стоящему раскрытию предусмотрены антитела к LAG3 с аминокислотными последовательностями HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе.

Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "антитело человека" включает в себя антитела, содержащие переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. mAb человека согласно настоящему раскрытию могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "антитело человека" не включает в себя mAb, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши), были привиты на последовательности FR человека.

Используемый в настоящем документе термин "мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы" относится к биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим антигенсвязывающим молекулам и их антигенсвязывающим фрагментам. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы могут являться специфическими в отношении разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении эпитопов более чем одного целевого полипептида. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула может представлять собой один многофункциональный полипептид или она может являться мультимерным комплексом из двух или более полипептидов, которые ковалентно или нековалентно ассоциированы друг с другом. Термин "мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы" включает в себя антитела согласно настоящему раскрытию, которые могут быть связаны или коэкспрессированы с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или несколькими другими молекулярными объектами, такими как белок или его фрагмент, для получения биспецифической или мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы со второй специфичностью связывания. Согласно настоящему раскрытию термин "мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы" также включает в себя биспецифические, триспецифические или мультиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Согласно определенным вариантам осуществления антитело согласно настоящему раскрытию функционально связано с другим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом для получения биспецифического антитела со второй специфичностью связывания. Биспецифические и мультиспецифические антитела согласно настоящему раскрытию описаны в другом месте в настоящем документе.

Термин "специфически связывает" или "специфически связывается с" или тому подобное означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание может характеризоваться равновесной константой диссоциации, равной по меньшей мере приблизительно 1×10^{-8} М или меньше (например, меньшее значение K_D обозначает более плотное связывание). Способы определения того, являются ли две молекулы специфически связывающимися, хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобное. Как описано в настоящем документе, антитела, которые специфически связываются с LAG3, были идентифицированы с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™. Кроме того, мультиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом в LAG3 и одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифические антитела, которые связываются с двумя различными областями LAG3, тем не менее считаются антителами, которые "специфически связываются", согласно используемому в настоящем документе термину.

Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобное включают в себя любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с LAG3.

Используемый в настоящем документе термин "выделенное антитело" обозначает антитело, которое по существу не содержит других антител (Ab), характеризующихся отличающимися антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывает LAG3 или его фрагмент, по существу не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от LAG3).

Используемый в настоящем документе термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать биомолекулярные взаимодействия в режиме реального времени путем обнаружения изменений концентраций белка в пределах матрицы биосенсора,

например, с использованием системы BIACORE™. (Pharmacia Biosensor AB, Упсала, Швеция и Писка-тауэй, Нью-Джерси).

Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "K_D", относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с различными участками на антигене и могут характеризоваться различными биологическими эффектами. Термин "эпитоп" также относится к сайту на антигене, на который отвечают В и/или Т-клетки. Это также относится к области антигена, которая связана антителом. Эпитопы можно определить как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, являются подклассом структурных эпитопов и содержат те остатки, которые непосредственно вносят вклад в аффинность взаимодействия. Эпитопы также могут являться конформационными, т.е. состоять из нелинейных аминокислот. Согласно определенным вариантам осуществления эпитопы могут включать в себя детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахара, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и, согласно определенным вариантам осуществления, могут характеризоваться специфическими трехмерными структурными характеристиками и/или специфическими характеристиками заряда.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда он относится к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) существует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере приблизительно в 90% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно в 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью любого известного алгоритма измерения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP.

Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "по существу сходный" означает, что две пептидные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за внесение пропусков по умолчанию, характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, содержащим боковую цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность). В целом, консервативная аминокислотная замена существенно не изменит функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процентное отношение или степень сходства можно скорректировать в сторону увеличения, чтобы отрегулировать консервативный характер замены. Средства для осуществления этой регуляции хорошо известны специалистам в настоящей области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают в себя следующее: 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативной заменой является любое изменение, характеризующееся положительным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45, включенной в настоящий документ посредством ссылки. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, характеризующееся неотрицательным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250. Сходство последовательностей для полипептидов, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет сходные последовательности с использованием показателей сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая в себя консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с использованием FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендуемыми параметрами; программа в GCG версии 6.1. FASTA (напри-

мер, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентное отношение идентичности последовательности областей наилучшего перекрытия между последовательностью-запросом и последовательностями поиска (Pearson (2000) выше). Другой предпочтительный алгоритм при сравнении последовательности согласно настоящему раскрытию с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из разных организмов, представляет собой компьютерную программу BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. Смотри, например, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

Под фразой "терапевтически эффективное количество" подразумевается количество, которое обеспечивает требуемый эффект, для которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет определяться специалистом в настоящей области техники с использованием известных техник (см., например, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

Используемый в настоящем документе термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, нуждающемуся в улучшении, профилактике и/или лечении заболевания или нарушения, такого как хроническая вирусная инфекция, рак или аутоиммунное заболевание.

II. Меченные радиоактивным изотопом иммуокопьюгаты антител к LAG3 для иммуно-ПЭТ-визуализации

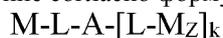
В настоящем документе предусмотрены меченные радиоактивным изотопом антигенсвязывающие белки, которые связывают LAG3. Согласно некоторым вариантам осуществления меченные радиоактивным изотопом антигенсвязывающие белки содержат антигенсвязывающий белок, ковалентно связанный с позитронным излучателем. Согласно некоторым вариантам осуществления меченные радиоактивным изотопом антигенсвязывающие белки содержат антигенсвязывающий белок, ковалентно связанный с одним или несколькими хелатирующими фрагментами, которые представляют собой химические фрагменты, которые способны хелатировать позитронный излучатель.

Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотрены антигенсвязывающие белки, которые связывают LAG3, например, антитела, причем указанные антигенсвязывающие белки, которые связывают LAG3, ковалентно связаны с одним или несколькими фрагментами со следующей структурой:



где L представляет собой хелатирующий фрагмент; M представляет собой позитронный излучатель; и z независимо в каждом случае равен 0 или 1; и причем по меньшей мере один из z равен 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления меченный радиоактивным изотопом антигенсвязывающий белок представляет собой соединение согласно формуле (I):



(I)

A представляет собой белок, который связывает LAG3; L представляет собой хелатирующий фрагмент; M представляет собой позитронный излучатель; z равен 0 или 1; и k представляет собой целое число, составляющее 0-30. Согласно некоторым вариантам осуществления k равен 1.

Согласно определенным вариантам осуществления меченный радиоактивным изотопом антигенсвязывающий белок представляет собой соединение согласно формуле (II):



(II)

где A представляет собой белок, который связывает LAG3; L представляет собой хелатирующий фрагмент; M представляет собой позитронный излучатель; и k представляет собой целое число, составляющее от 1-30.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предусмотрены композиции, содержащие конъюгат, характеризующийся следующей структурой:



где A представляет собой белок, который связывает LAG3; L представляет собой хелатирующий фрагмент; и k представляет собой целое число, составляющее от 1-30; причем конъюгат хелатирован с позитронным излучателем в количестве, достаточном для обеспечения специфической активности, подходящей для клинической ПЭТ-визуализации.

Подходящие связывающие белки, хелатирующие фрагменты и позитронные излучатели представлены ниже.

A. Связывающие LAG3 белки

Подходящий связывающий LAG3 белок представляет собой белки, которые специфически связываются с LAG3, включая в себя те, которые описаны международной патентной публикации PCT/US 16/56156, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки. Иллюстративные антитела к LAG3 согласно настоящему раскрытию перечислены в табл. 1 в PCT/US 16/56156, также представленной ниже.

Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M14985N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1M14987N	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M14811N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M14885N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M14926N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M14927N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M14931N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M18336N	114	116	118	120	122	124	126	128
H2M18337N	130	132	134	136	138	140	142	144
H4H15477P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4H15483P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4H15484P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4H15491P	194	196	198	200	202	204	206	208
H4H17823P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4H17826P2	226	228	230	232	234	236	238	240
H4H17828P2	242	244	246	248	250	252	254	256
H4sH15460P	258	260	262	264	266	268	270	272
H4sH15462P	274	276	278	280	282	284	286	288
H4sH15463P	290	292	294	296	298	300	302	304
H4sH15464P	306	308	310	312	314	316	318	320
H4sH15466P	322	324	326	328	330	332	334	336
H4sH15467P	338	340	342	344	346	348	350	352
H4sH15470P	354	356	358	360	362	364	366	368
H4sH15475P	370	372	374	376	378	380	382	384
H4sH15479P	386	388	390	392	394	396	398	400
H4sH15480P	402	404	406	408	410	412	414	416
H4sH15482P	418	420	422	424	426	428	430	432
H4sH15488P	434	436	438	440	442	444	446	448
H4sH15496P2	450	452	454	456	522	524	526	528
H4sH15498P2	458	460	462	464	522	524	526	528
H4sH15505P2	466	468	470	472	522	524	526	528
H4sH15518P2	474	476	478	480	522	524	526	528
H4sH15523P2	482	484	486	488	522	524	526	528
H4sH15530P2	490	492	494	496	522	524	526	528
H4sH15555P2	498	500	502	504	530	532	534	536
H4sH15558P2	506	508	510	512	530	532	534	536
H4sH15567P2	514	516	518	520	530	532	534	536
H4H14813N	538	540	542	544	546	548	550	552
H4H17819P	554	556	558	560	562	564	566	568

В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотной последовательности переменных областей

тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител к LAG3.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении них.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении них.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в пределах любого из иллюстративных антител к LAG3, перечисленных в табл. 1. Согласно определенным вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546 и 554/562. Согласно определенным вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из одной из SEQ ID NO: 386/394 (например, H4sH15479P), 418/426 (например, H4sH15482P) или 538/546 (например, H4sH14813N). Согласно другим определенным вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из одной из SEQ ID NO: 458/464 (например, H4sH15498P2), 162/170 (например, H4H15483P) и 579/578 (например, H4H15482P).

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в пределах любого из иллюстративных антител к LAG3, перечисленных в табл. 1. Согласно определенным вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 392/400 (например, H4sH15479P), 424/432 (например, H4sH15482P) и 544/552 (например, H4sH14813N).

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в пределах любого из иллюстративных антител к LAG3, перечисленных в табл. 1. Согласно определенным вариантам осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 388-390-392-396-398-400 (например, H4sH15479P), 420-422-424-428-430-432 (например, H4sH15482P) и 540-542-544-548-550-552 (например, H4sH14813N).

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в пределах пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено любым из иллюстративных антител к LAG3, перечисленных в табл. 1. Например, согласно некоторым вариантам осуществления связывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в пределах пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 386/394 (например, H4sH15479P), 418/426 (например, H4sH15482P) и 538/546 (например, H4sH14813N). Способы и техники идентификации CDR в пределах аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR хорошо известны в настоящей области техники и их можно использовать для идентификации CDR в пределах заданных аминокислотных последовательностей HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем документе. Иллюстративные соглашения, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают в себя, например, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на изменчивости последовательности, определение согласно Chothia основано на расположении областей структурной петли, а определение AbM является компромиссом между подходами Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al, J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Общедоступные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR в пределах антитела.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие белки представляют собой антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют за специфическое связывание с LAG3 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащими области CDR из HCVR и области CDR из LCVR, причем каждая из HCVR и LCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1.

Дополнительные иллюстративные антитела к LAG3, применимые в настоящем документе, включают в себя LAG525 (и другие антитела к LAG3, раскрытые в патентном документе US 20100233183), релатлимаб (и другие антитела к LAG3, раскрытые в патентном документе US 20110150892), GSK2831781 (и другие антитела к LAG3, раскрытые в патентном документе US 20140286935), MGD013 (и другие антитела к LAG3, раскрытые в международной патентной публикации WO2015200119) и антитела к LAG3, раскрытые в патентных документах US 20160222116, US 20170022273, US 20170097333, US 20170137517, US 20170267759, US 20170290914, US 20170334995, международных патентных публикациях WO 2016126858, WO 2016200782, WO 2017087589, WO 2017087901, WO 2017106129, WO 2017149143, WO 2017198741, WO 2017219995 и WO 2017220569.

Также в настоящем документе предусмотрены выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют связывание LAG3 с МНС класса II. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который блокирует связывание LAG3, может связываться с тем же эпитопом на LAG3, что и МНС класса II, или может связываться с другим эпитопом на LAG3, чем МНС класса II. Согласно определенным вариантам осуществления антитела со-

гласно настоящему раскрытию, которые блокируют связывание LAG3 с МНС класса II, содержат CDR HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1; и CDR LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1.

Согласно альтернативным вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые не блокируют связывание LAG3 с МНС класса II.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие белки представляют собой антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с LAG3 из организма человека или других видов. Согласно определенным вариантам осуществления антитела могут связываться с LAG3 человека и/или LAG3 яванского макака.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие белки представляют собой антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые перекрестно конкурируют за связывание с LAG3 с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащими области CDR из HCVR и области CDR из LCVR, причем каждая из HCVR и LCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1.

Согласно одному варианту осуществления, связывающий белок представляет собой выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые обладают одной или несколькими следующими характеристиками: (a) блокирует связывание LAG3 с МНС класса II; (b) специфически связывается с LAG3 человек и/или LAG3 яванского макака; (c) блокирует LAG3 -индуцированное нарушение Т-клеточной активации и восстанавливает Т-клеточную передачу сигнала; и (d) подавляет рост опухоли и увеличивает выживаемость у субъекта с раком.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может специфически связываться с LAG3 агонистическим образом, т.е. может усиливать или стимулировать связывание и/или активность LAG3; согласно другим вариантам осуществления антитело может специфически связываться с LAG3 антагонистическим образом, т.е. оно может блокировать связывание LAG3 с его лигандом.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может специфически связываться с LAG3 нейтральным образом, т.е. связываться, но не блокировать, не усиливать или не стимулировать связывание и/или активность LAG3.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты являются биспецифическими, содержащими первую специфичность связывания с LAG3 и вторую специфичность связывания для второго целевого эпитопа. Второй целевой эпитоп может представлять собой другой эпитоп на LAG3 или на другом белке. Согласно определенным вариантам осуществления второй целевой эпитоп может находиться на другой клетке, включая в себя другую Т-клетку, В-клетку, опухолевую клетку или инфицированную вирусом клетку.

Согласно определенным вариантам осуществления предусмотрено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком гена 3 активации лимфоцитов человека (LAG3), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуется свойством, выбранным из группы, состоящей из следующего: (a) связывает мономерный LAG3 человека с равновесной константой диссоциации связывания (K_D), составляющей меньше чем приблизительно 10 нМ, как измерено в анализе плазмонного поверхностного резонанса при 25°C (с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в международной патентной публикации PCT/US16/56156, или по существу сходного анализа); (b) связывает мономерный LAG3 человека с K_D , составляющей меньше чем приблизительно 8 нМ, как измерено в анализе плазмонного поверхностного резонанса при 37°C; (c) связывает димерный LAG3 человека с K_D , составляющей меньше чем приблизительно 1,1 нМ, как измерено в анализе плазмонного поверхностного резонанса при 25°C; (d) связывает димерный LAG3 человека с K_D , составляющей меньше чем приблизительно 1 нМ, как измерено в анализе плазмонного поверхностного резонанса при 37°C; (e) связывается с экспрессирующей hLAG3 клеткой со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 8 нМ, как измерено в анализе проточной цитометрии; (f) связывается с экспрессирующей mfLAG3 клеткой со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 2,3 нМ, как измерено в анализе проточной цитометрии; (g) блокирует связывание hLAG3 с МНС класса II человека со значением IC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 32 нМ, как определено с помощью анализа клеточной адгезии; (h) блокирует связывание hLAG3 с МНС класса II мыши со значением IC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 30 нМ, как определено с помощью анализа клеточной адгезии; (i) блокирует связывание hLAG3 с МНС класса II на больше чем 90%, как определено с помощью анализа клеточной адгезии; (j) устраняет LAG3-опосредованное ингибирование Т-клеточной активности со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 9 нМ, как определено в анализе репортерного гена люциферазы; и (k) связывается с активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 1,2 нМ, как определено в флуоресцентном анализе.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты свя-

зывают LAG3 со значением диссоциативного периода полужизни ($t_{1/2}$), составляющим больше чем приблизительно 1,6 мин, как измерено с помощью плазмонного поверхностного резонанса при 25°C или 37°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в международной патентной публикации PCT/US16/56156, или по существу сходного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты связывают LAG3 со значением $t_{1/2}$, составляющим больше чем приблизительно 5 мин, больше чем приблизительно 10 мин, больше чем приблизительно 30 мин, больше чем приблизительно 50 мин, больше чем приблизительно 60 мин, больше чем приблизительно 70 мин, больше чем приблизительно 80 мин, больше чем приблизительно 90 мин, больше чем приблизительно 100 мин, больше чем приблизительно 200 мин, больше чем приблизительно 300 мин, больше чем приблизительно 400 мин, больше чем приблизительно 500 мин, больше чем приблизительно 600 мин, больше чем приблизительно 700 мин, больше чем приблизительно 800 мин, больше чем приблизительно 900 мин, больше чем приблизительно 1000 мин, или больше чем приблизительно 1100 мин, как измерено с помощью плазмонного поверхностного резонанса при 25°C или 37°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в международной патентной публикации PCT/US16/56156 (например, формат захвата mAb или захвата антигена), или по существу сходного анализа.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с экспрессирующей LAG3 человека клеткой со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 8 нМ, как измерено с помощью анализа проточной цитометрии, как определено в примере 5 в международной патентной публикации PCT/US16/56156, или по существу сходного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с экспрессирующей hLAG3 клеткой со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 5 нМ, меньше чем приблизительно 2 нМ, меньше чем приблизительно 1 нМ, или меньше чем приблизительно 0,5 нМ, как измерено с помощью анализа проточной цитометрии, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 5 в международной патентной публикации PCT/US 16/56156, или по существу сходного анализа.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с экспрессирующей LAG3 яванского макака клеткой со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 2,5 нМ, как измерено с помощью анализа проточной цитометрии, как определено в примере 5 в международной патентной публикации PCT/US 16/56156, или по существу сходного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с экспрессирующей mfLAG3 клеткой со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 2 нМ, или меньше чем приблизительно 1 нМ, как измерено с помощью анализа проточной цитометрии, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 5 в международной патентной публикации PCT/US 16/56156, или по существу сходного анализа.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют связывание LAG3 с MHC класса II (например, человек HLA-DR2) со значением IC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 32 нМ, как определено с использованием анализа клеточной адгезии, например, как показано в примере 7 в международной патентной публикации PCT/US16/56156, или по существу сходного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют связывание LAG3 с MHC класса II человека со значением IC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 25 нМ, меньше чем приблизительно 20 нМ, меньше чем приблизительно 10 нМ или меньше чем приблизительно 5 нМ, как измерено с помощью анализа клеточной адгезии, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 7 в международной патентной публикации PCT/US16/56156, или по существу сходного анализа.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют связывание LAG3 с MHC класса II со значением IC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 30 нМ, как определено с использованием анализа клеточной адгезии, например, как показано в примере 7 в международной патентной публикации PCT/US 16/56156, или по существу сходного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют связывание LAG3 мыши с MHC класса II человека со значением IC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 25 нМ, меньше чем приблизительно 20 нМ, меньше чем приблизительно 10 нМ или меньше чем приблизительно 5 нМ, как измерено с помощью анализа клеточной адгезии, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 7 в международной патентной публикации PCT/US 16/56156, или по существу сходного анализа.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют связывание LAG3 с MHC класса II человека или мыши на больше чем 90%, как измерено с помощью анализа клеточной адгезии, как определено в примере 7 в международной патентной публикации PCT/US 16/56156, или по существу сходного анализа.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют LAG-индуцированную T-клеточную отрицательную регуляцию со значением EC_{50} , состав-

ляющим меньше чем 9 нМ, как измерено с помощью анализа репортерного гена люциферазы Т-клеток/АРС, как определено в примере 8 в международной патентной публикации PCT/US 16/56156, или по существу сходного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют LAG3-индуцированную Т-клеточную отрицательную регуляцию со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 5 нМ, меньше чем приблизительно 1 нМ, меньше чем приблизительно 0,5 нМ или меньше чем приблизительно 0,1 нМ, как измерено с помощью анализа репортерного гена люциферазы Т-клеток/АРС, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 8 в международной патентной публикации PCT/US16/56156, или по существу сходного анализа.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками яванского макака со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 1,2 нМ, как измерено с помощью флуоресцентного анализа, как определено в примере 9 в международной патентной публикации PCT/US 16/56156, или по существу сходного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками яванского макака со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 1,1 нМ, меньше чем приблизительно 1 нМ, меньше чем приблизительно 0,5 нМ, меньше чем приблизительно 0,2 нМ или меньше чем приблизительно 0,1 нМ, как измерено с помощью флуоресцентного анализа, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 9 в международной патентной публикации PCT/US 16/56156, или по существу сходного анализа.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с LAG3, причем антитело или его фрагмент проявляет одну или несколько следующих характеристик: (i) содержит HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 458, 466, 474, 482, 490, 498, 506, 514, 538 и 554, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (ii) содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 522, 530, 546 и 562, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iii) содержит домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 376, 392, 408, 424, 440, 456, 464, 472, 480, 488, 496, 504, 512, 520, 544 и 560, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 384, 400, 416, 432, 448, 528, 536, 552 и 568, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iv) содержит домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 372, 388, 404, 420, 436, 452, 460, 468, 476, 484, 492, 500, 508, 516, 540 и 556, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 374, 390, 406, 422, 438, 454, 462, 470, 478, 486, 494, 502, 510, 518, 542 и 558, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 380, 396, 412, 428, 444, 524, 532, 548 и 564, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 382, 398, 414, 430, 446, 526, 534, 550 и 566, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (v) связывает мономерный LAG3 человека с равновесной константой диссоциации связывания (K_D), составляющей меньше чем приблизительно 10 нМ, как измерено в анализе плазмонного поверхностного

резонанса при 25°C; (vi) связывает мономерный LAG3 человека с K_D , составляющей меньше чем приблизительно 8 нМ, как измерено в анализе плазмонного поверхностного резонанса при 37°C; (vii) связывает димерный LAG3 человека с K_D , составляющей меньше чем приблизительно 1,1 нМ, как измерено в анализе плазмонного поверхностного резонанса при 25°C; (viii) связывает димерный LAG3 человека с K_D , составляющей меньше чем приблизительно 1 нМ, как измерено в анализе плазмонного поверхностного резонанса при 37°C; (ix) связывается с экспрессирующей hLAG3 клеткой со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 8 нМ, как измерено в анализе проточной цитометрии; (x) связывается с экспрессирующей mfLAG3 клеткой со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 2,3 нМ, как измерено в анализе проточной цитометрии; (xi) блокирует связывание hLAG3 с МНС класса II человека со значением IC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 32 нМ, как определено с помощью анализа клеточной адгезии; (xii) блокирует связывание hLAG3 с МНС класса II мыши со значением IC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 30 нМ, как определено с помощью анализа клеточной адгезии; (xiii) блокирует связывание hLAG3 с МНС класса II на больше чем 90%, как определено с помощью анализа клеточной адгезии; (xiv) устраняет LAG3-опосредованное ингибирование Т-клеточной активности со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 9 нМ, как определено в анализе репортерного гена люциферазы; (xv) связывается с активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 1,2 нМ, как определено в флуоресцентном анализе; и (xvi) подавляет рост опухоли и увеличивает выживаемость у субъекта с раком.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые блокируют связывание LAG3 с МНС класса II, причем антитело или его фрагмент проявляет одну или несколько следующих характеристик: (i) содержит HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 458, 466, 474, 482, 490, 498, 506, 514, 538 и 554, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (ii) содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 522, 530, 546 и 562, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iii) содержит домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 376, 392, 408, 424, 440, 456, 464, 472, 480, 488, 496, 504, 512, 520, 544 и 560, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 384, 400, 416, 432, 448, 528, 536, 552 и 568, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iv) содержит домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 372, 388, 404, 420, 436, 452, 460, 468, 476, 484, 492, 500, 508, 516, 540 и 556, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 374, 390, 406, 422, 438, 454, 462, 470, 478, 486, 494, 502, 510, 518, 542 и 558, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 380, 396, 412, 428, 444, 524, 532, 548 и 564, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 382, 398, 414, 430, 446, 526, 534, 550 и 566, или по существу сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (v) связывает мономерный LAG3 человека с равновесной константой диссоциации связывания (K_D), составляющей меньше чем приблизительно 10 нМ, как измерено в анализе плазмонного поверхностного резонанса при 25°C; (vi) связывает мономерный LAG3 человека с

K_D , составляющей меньше чем приблизительно 8 нМ, как измерено в анализе плазмонного поверхностного резонанса при 37°C; (vii) связывает димерный LAG3 человека с K_D , составляющей меньше чем приблизительно 1,1 нМ, как измерено в анализе плазмонного поверхностного резонанса при 25°C; (viii) связывает димерный LAG3 человека с K_D , составляющей меньше чем приблизительно 1 нМ, как измерено в анализе плазмонного поверхностного резонанса при 37°C; (ix) связывается с экспрессирующей hLAG3 клеткой со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 8 нМ, как измерено в анализе проточной цитометрии; (x) связывается с экспрессирующей mfLAG3 клеткой со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 2,3 нМ, как измерено в анализе проточной цитометрии; (xi) блокирует связывание hLAG3 с МНС класса II человека со значением IC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 32 нМ, как определено с помощью анализа клеточной адгезии; (xii) блокирует связывание hLAG3 с МНС класса II мыши со значением IC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 30 нМ, как определено с помощью анализа клеточной адгезии; (xiii) блокирует связывание hLAG3 с МНС класса II на больше чем 90%, как определено с помощью анализа клеточной адгезии; (xiv) устраняет LAG3-опосредованное ингибирование Т-клеточной активности со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 9 нМ, как определено в анализе репортерного гена люциферазы; (xv) связывается с активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками со значением EC_{50} , составляющим меньше чем приблизительно 1,2 нМ, как определено в флуоресцентном анализе; и (xvi) подавляет рост опухоли и увеличивает выживаемость у субъекта с раком.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела могут функционировать, блокируя или ингибируя активность связывания МНС класса II, ассоциированную с LAG3, путем связывания с любой другой областью или фрагментом полноразмерного белка, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID NO: 582.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела представляют собой биспецифические антитела. Биспецифические антитела могут связывать один эпитоп в одном домене, а также могут связывать второй эпитоп в другом домене LAG3. Согласно определенным вариантам осуществления биспецифические антитела связывают два разных эпитопа в одном и том же домене. Согласно одному варианту осуществления мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первую антигенсвязывающую специфичность, причем первая специфичность связывания содержит внеклеточный домен или его фрагмент LAG3; и вторую антигенсвязывающую специфичность по отношению к другому эпитопу LAG3.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела к LAG3 или их антигенсвязывающие фрагменты связывают эпитоп в пределах любой одной или нескольких областей, приведенных в качестве примера в LAG3, либо в естественной форме, как показано в качестве примера в SEQ ID NO: 582, либо полученный рекомбинантным способом, как показано в качестве примера в SEQ ID NO: 574-576, или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела связываются с внеклеточной областью, содержащей одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 29-450 LAG3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела связываются с внеклеточной областью, содержащей одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 1-533 LAG3 яванского макака, как показано в качестве примера в SEQ ID NO: 576.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела к LAG3 и их антигенсвязывающие фрагменты взаимодействуют с одним или несколькими эпитопами, обнаруженными во внеклеточной области LAG3 (SEQ ID NO: 588). Эпитоп(ы) может(могут) состоять из одной или нескольких смежных последовательностей из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных в пределах внеклеточной области LAG3. Альтернативно эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в пределах внеклеточной области LAG3. Эпитоп LAG3, с которым взаимодействует иллюстративное антитело H4sH15482P, определяется аминокислотной последовательностью LRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY (SEQ ID NO: 589), которая соответствует аминокислотам с 28 по 71 из SEQ ID NO: 588. Соответственно, также предусмотрены антитела к LAG3, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в пределах области, состоящей из аминокислот с 28 по 71 из SEQ ID NO: 588 (т.е. последовательность LRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY [SEQ ID NO: 589]).

Согласно настоящему раскрытию предусмотрены антитела к LAG3, которые связываются с тем же эпитопом или частью эпитопа, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе в табл. 1, или антитело, характеризующееся последовательностями CDR любого из иллюстративных антител, описанных в табл. 1. Аналогично, также предусмотрены антитела к LAG3, которые конкурируют за связывание с LAG3 или фрагментом LAG3 с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе в табл. 1, или антителом, характеризующимся последовательностями CDR любого из иллюстративных антител, описанных в табл. 1. Например, настоящее раскрытие предусматривает антитела к LAG3, которые конкурируют за связывание с LAG3 с одним или несколькими антителами, представленными в настоящем документе (например, H4sH15482P,

H4sH15479P, H4sH14813N, H4H14813N, H4H15479P, H4H15482P, H4H15483P, H4sH15498P, H4H15498P, H4H17828P2, H4H17819P и H4H17823P).

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, специфически связываются с LAG3 и модулируют взаимодействие LAG3 с МНС класса II. Антитела к LAG3 могут связываться с LAG3 с высокой аффинностью или с низкой аффинностью. Согласно определенным вариантам осуществления антитела представляют собой блокирующие антитела, причем антитела связываются с LAG3 и блокируют взаимодействие LAG3 с МНС класса II. Согласно некоторым вариантам осуществления блокирующие антитела согласно настоящему раскрытию блокируют связывание LAG3 с МНС класса II и/или стимулируют или усиливают Т-клеточную активацию. Согласно некоторым вариантам осуществления блокирующие антитела являются применимыми для стимуляции или усиления иммунного ответа и/или для лечения субъекта, страдающего от рака или хронической вирусной инфекции. Антитела при введении нуждающемуся в этом субъекту могут снижать хроническую инфекцию у субъекта, вызванную вирусом, как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гепатита В (HBV), вирус гепатита С (HCV), вирус папилломы человека (HPV), вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). Их можно использовать для ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта. Их можно использовать отдельно или в качестве вспомогательной терапии с другими терапевтическими компонентами или способами, известными в настоящей области техники для лечения рака или вирусной инфекции. Согласно определенным вариантам осуществления антитела к LAG3, которые связываются с LAG3 с низкой аффинностью, используют в качестве мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, причем первая специфичность связывания связывается с LAG3 с низкой аффинностью, а вторая специфичность связывания связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из другого эпитопа LAG3 и другого соингибитора Т-клеток.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела связываются с LAG3 и выводят истощенные Т-клетки из подавленного состояния. Согласно определенным вариантам осуществления антитела связываются с LAG3 и ингибируют регуляторную активность Т-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела могут являться применимыми для стимуляции или усиления иммунного ответа и/или для лечения субъекта, страдающего от рака, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции или паразитарной инфекции. Антитела при введении нуждающемуся в этом субъекту могут снижать хроническую инфекцию такого вируса, как ВИЧ, LCMV или HBV, у субъекта. Их можно использовать для ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта. Их можно использовать отдельно или в качестве вспомогательной терапии с другими терапевтическими компонентами или способами, известными в настоящей области техники, для лечения рака или вирусной инфекции.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему раскрытию представляют собой агонистические антитела, причем антитела связываются с LAG3 и усиливают взаимодействие LAG3 и МНС класса II. Согласно некоторым вариантам осуществления активирующие антитела усиливают связывание LAG3 с МНС класса II и/или ингибируют или подавляют активацию Т-клеток. Активирующие антитела согласно настоящему раскрытию могут являться применимыми для ингибирования иммунного ответа у субъекта и/или для лечения аутоиммунного заболевания.

Определенные антитела к LAG3 способны связываться и нейтрализовать активность LAG3, как определено в анализах *in vitro* или *in vivo*. Способность антител связываться и нейтрализовать активность LAG3 можно измерить с использованием любого стандартного способа, известного специалистам в настоящей области техники, включая в себя анализы связывания или анализы активности, как описано в настоящем документе.

Неограничивающие примерные анализы *in vitro* для измерения активности связывания проиллюстрированы в примерах, приведенных в PCT/US 16/56156: в примере 3 аффинности связывания и кинетические константы антител человека к LAG3 в отношении LAG3 человека определяли с помощью плазмонного поверхностного резонанса и измерения проводили на приборе Biacore 4000 или T200; в примере 4 анализы блокирования использовали для определения перекрестной конкуренции между антителами к LAG3; в примерах 5 и 6 описано связывание антител с клетками, избыточно экспрессирующими LAG3; в примере 7 анализы связывания использовали для определения способности антител к LAG3 блокировать способность LAG3 связываться с МНС класса II *in vitro*; в примере 8 для определения способности антител к LAG3 противодействовать передаче сигналов LAG3 в Т-клетках использовали анализ репортерного гена люциферазы; и в примере 9 использовали флуоресцентный анализ для определения способности антител к LAG3 связываться с активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками обезьяны.

Если конкретно не указано иное, используемый в настоящем документе термин "антитело" следует понимать как включающий в себя молекулы антитела, содержащие две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина (т.е. "полные молекулы антитела"), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобное включают в себя любой встречающийся в природе, полученный ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающие фрагмент" антитела или "фрагмент антите-

ла" относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с LAG3. Фрагмент антитела может включать в себя фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fv, фрагмент dAb, фрагмент, содержащий CDR, или выделенную CDR. Согласно определенным вариантам осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептиду или его фрагменту мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Согласно таким вариантам осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" включает в себя, например, молекулу МНС класса II, которая специфически связывается с LAG3. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получить, например, из полных молекул антитела с использованием любых подходящих стандартных техник, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные техники генной инженерии, предусматривающие манипуляции с ДНК и экспрессию ДНК, кодирующую вариabельные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая в себя, например, фаговые библиотеки антител), или же ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и воздействовать на нее химически или с использованием техник молекулярной биологии, например, для расположения одного или нескольких вариabельных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя следующее: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные распознающие звенья, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариabельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3) или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как доменспецифические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленными доменами, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетраатела, миниантитела, наноантитела (например моновалентные наноантитела, бивалентные наноантитела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и вариabельные домены IgNAR акулы, также предусмотренны используемым в настоящем документе выражением "антигенсвязывающий фрагмент".

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один вариabельный домен. Вариabельный домен может характеризоваться любым размером или аминокислотным составом и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая является смежной или расположена в одной рамке считывания с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих домен V_H, ассоциированный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, вариabельная область может являться димерной и может содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L.

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариabельный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариabельных и константных доменов, которые можно обнаружить в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему раскрытию, включают в себя следующее: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; и (xiv) V_L-C_L. В любой конфигурации вариabельных и константных доменов, включая в себя любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, вариabельные и константные домены могут быть либо напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны с помощью полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, что дает в результате гибкое или полугибкое соединение между смежными вариabельными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему раскрытию может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций вариabельных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, с помощью дисульфидной(ых) связи(ей)).

Как и в случае с полными молекулами антитела, антигенсвязывающие фрагменты могут являться моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере два различных вариabельных домена, причем каждый вариabельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с различным эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифических антител, включая в себя иллюстративные форматы биспецифических антител, раскрытые в настоящем документе, можно адаптировать для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему раскрытию с использованием стандартных техник, доступных в настоящей области техники.

Антитела к LAG3 и фрагменты антител согласно настоящему раскрытию охватывают белки с ами-

нокислотными последовательностями, которые могут отличаться от аминокислотных последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связываться с LAG3. Такие вариантные антитела и фрагменты антител содержат одну или несколько вставок, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая является по существу эквивалентной активности описанных антител. Аналогично, кодирующие антитело последовательности ДНК согласно настоящему раскрытию охватывают последовательности, которые содержат одну или несколько вставок, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые являются по существу биоэквивалентом по отношению к антителу или фрагменту антитела согласно настоящему раскрытию.

Два антигенсвязывающих белка, или антитела, считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, скорость и степень абсорбции которых не показывают значительного различия при введении в одной и той же молярной дозе в аналогичных условиях эксперимента, либо в виде одной дозы, либо в виде нескольких доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все же их можно считать биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены на этикетке, не имеют существенного значения для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при постоянном применении, и считаются с медицинской точки зрения незначительными для конкретного исследуемого лекарственного средства.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если отсутствуют клинически значимые различия в их безопасности, чистоте и активности.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может переключаться один или несколько раз между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска нежелательных эффектов, включая в себя клинически значимое изменение иммуногенности или пониженную эффективность, по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если оба они действуют посредством общего механизма или механизмов действия для условия или условий использования, в той степени, в которой такие механизмы являются известными.

Биоэквивалентность можно продемонстрировать с помощью способов *in vivo* и *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают в себя, например, (а) анализ *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию времени; (б) анализ *in vitro*, который был скоррелирован с данными о биодоступности *in vivo* у человека и является обоснованно прогностическим в отношении этих данных; (с) анализ *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют как функцию времени; и (д) хорошо контролируемое клиническое испытание, которое устанавливает безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител согласно настоящему раскрытию можно сконструировать, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно удалить или заменить другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать в себя варианты антител, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего раскрытия антитела к LAG3 содержат Fc-домен, содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, согласно настоящему раскрытию предусмотрены антитела к LAG3, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-домена, причем мутация(и) увеличивает(ют) аффинность Fc-домена по отношению к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких Fc-модификаций включают в себя, например, следующее: модификация в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификация в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификация в положении 250 и/или 428; или модификация в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. Согласно одному варианту осуществления модификация содержит следующее: модификация 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификация 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например,

V308F); модификация 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификация 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификация 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификация 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). Согласно еще одному варианту осуществления модификация содержит модификацию 265A (например, D265A) и/или модификацию 297A (например, N297A).

Например, согласно настоящему раскрытию предусмотрены антитела к LAG3, содержащие Fc-домен, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Согласно одному варианту осуществления настоящее раскрытие относится к антителам к LAG3, содержащим Fc-домен, содержащий мутацию S108P в шарнирной области IgG4 для стимуляции стабилизации димера. Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена и других мутаций в пределах варибельных доменов антитела, раскрытых в данном документе, рассматриваются в объеме настоящего раскрытия.

Согласно настоящему раскрытию предусмотрены антитела к LAG3, содержащие химерную константную (C_H) область тяжелой цепи, причем химерная область C_H содержит сегменты, происходящие из областей C_H больше одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела согласно настоящему раскрытию могут содержать химерную область C_H , содержащую часть домена C_{H2} или весь домен C_{H2} , происходящий из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, комбинированные с частью домена или всем доменом C_{H3} , происходящим из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему раскрытию содержат химерную область C_H , характеризующуюся химерной шарнирной областью. Например, химерный шарнир может содержать "верхнюю шарнирную" аминокислотную последовательность (аминокислотные остатки в положениях от 216 до 227 согласно нумерации EU), происходящую из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, комбинированную с "нижней шарнирной" последовательностью (аминокислотные остатки в положениях от 228 до 236 согласно нумерации EU), происходящей из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Согласно определенным вариантам осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, происходящие из верхнего шарнира IgG1 человека или IgG4 человека, и аминокислотные остатки, происходящие из нижнего шарнира IgG2 человека. Антитело, содержащее химерную область C_H , как описано в настоящем документе, может согласно определенным вариантам осуществления проявлять модифицированные эффекторные функции Fc, не оказывая неблагоприятного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, патентную публикацию США № 20140243504, полное раскрытие которой включено в настоящее описание посредством ссылки). Согласно определенным вариантам осуществления область Fc-область содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 569, 570, 571, 572 и 573.

В. Позитронные излучатели и хелатирующие фрагменты

Подходящие позитронные излучатели включают в себя без ограничения те, которые образуют стабильные комплексы с хелатирующим фрагментом и характеризуются физическими периодами полужизни, подходящими для целей иммуно-ПЭТ-визуализации. Иллюстративные позитронные излучатели включают в себя без ограничения ^{89}Zr , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{44}Sc и ^{86}Y . Подходящие позитронные излучатели также включают в себя те, которые непосредственно связываются со связывающим LAG3 белком, включая в себя без ограничения ^{76}Br и ^{124}I , и те, которые вводят через простетическую группу, например, ^{18}F .

Описанные в настоящем документе хелатирующие фрагменты представляют собой химические фрагменты, которые ковалентно связаны со связывающим LAG3 белком, например, антителом к LAG3, и содержат часть, способную хелатировать позитронный эмиттер, т.е. способную реагировать с позитронным излучателем с образованием координированного хелатного комплекса. Подходящие фрагменты включают в себя те, которые обеспечивают эффективную загрузку конкретного металла и образуют комплексы металл-хелатор, которые являются достаточно стабильными *in vivo* для диагностических целей, например, для иммуно-ПЭТ-визуализации. Иллюстративные хелатирующие фрагменты включают в себя те, которые минимизируют диссоциацию позитронного излучателя и накопление в минеральной кости, белках плазмы и/или депонирование в костном мозге до такой степени, которая является подходящей для диагностических целей.

Примеры хелатирующих фрагментов включают в себя без ограничения те, которые образуют стабильные комплексы с позитронными излучателями ^{89}Zr , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{44}Sc и/или ^{86}Y . Иллюстративные хелатирующие фрагменты включают в себя без ограничения те, которые описаны в Nature Protocols, 5(4): 739, 2010; Bioconjugate Chem., 26(12): 2579 (2015); Chem Commun (Camb), 51(12): 2301 (2015); Mol. Pharmaceutics, 12: 2142 (2015); Mol. Imaging Biol., 18: 344 (2015); Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 37:250 (2010); Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging (2016). doi:10.1007/s00259-016-3499-x; Bioconjugate Chem., 26(12): 2579 (2015); международной патентной публикации WO 2015/140212A1 и патенте США № US 5639879, полностью включенных посредством ссылки.

Иллюстративные хелатирующие фрагменты также включают в себя без ограничения те, которые

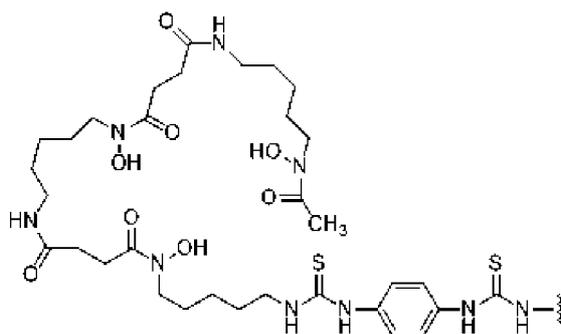
содержат следующее: десферриоксамин (DFO), 1,4,7,10-тетрауксусная кислота (DOTA), диэтилентриаминапентауксусная кислота (DTPA), этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетра(метиленфосфоновая) кислота (DOTP), 1R,4R,7R,10R)- α' - α'' -тетраметил-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота (DOTMA), 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусная кислота (TETA), H₄octapa, H₆phospa, H₂dedpa, H₅decapa, H₂azapa, HOPO, DO2A, 1,4,7,10-тетраакис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан (DOTAM), 1,4,7-триазациклононан-N,N',N''-триуксусная кислота (NOTA), 1,4,7,10-тетраакис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан (DOTAM), 1,4,8,11-тетразабицикло[6.6.2]гексадекан-4,11-диуксусная кислота (CB-TE2A), 1,4,7,10-тетраазациклододекан (Cyclen), 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан (Cyclam), октадентатные хелаторы, например, DFO*, которые могут быть конъюгированы с антителом через DFO*-pPhe-NCS (см. Vugt et al., Eur J Nucl Med Mol Imaging (2017) 44:286-295), гексадентатные хелаторы, хелаторы на основе фосфонатов, макроциклические хелаторы, хелаторы, содержащие макроциклические терефталамидные лиганды, бифункциональные хелаторы, хелаторы - производные фузаринина С и фузаринина С, триацетилфузаринин С (ТАФС), ферриоксамин Е (FOXЕ), ферриоксамин В (FOXВ), феррихром А (FCHA) и тому подобное. Согласно некоторым вариантам осуществления хелатирующие фрагменты ковалентно связаны со связывающим LAG3 белком, например антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, через линкерный фрагмент, который ковалентно прикрепляет хелатирующую часть хелатирующего фрагмента к связывающему белку. Согласно некоторым вариантам осуществления эти линкерные фрагменты образуются в результате реакции между реакционноспособным фрагментом белка, связывающего LAG3, например цистеина или лизина антитела, и реакционноспособным фрагментом, который прикреплен к хелатору, включая в себя, например, п-изотиоцианатобензильную группу и реакционноспособные фрагменты, представленные в способах конъюгации ниже. Кроме того, такие линкерные фрагменты необязательно содержат химические группы, используемые для регулирования полярности, растворимости, стерических взаимодействий, жесткости и/или длины между хелатирующей частью и белком, связывающим LAG3.

С. Получение меченных радиоактивным изотопом конъюгатов антител к LAG3

Меченные радиоактивным изотопом конъюгаты белка к LAG3 можно получить путем (1) проведения реакции белка, связывающего LAG3, например антитела, с молекулой, содержащей хелатор позитронного излучателя и фрагмент, реакционноспособный в отношении требуемого сайта конъюгации белка, связывающего LAG3, и (2) загрузки требуемого позитронного излучателя.

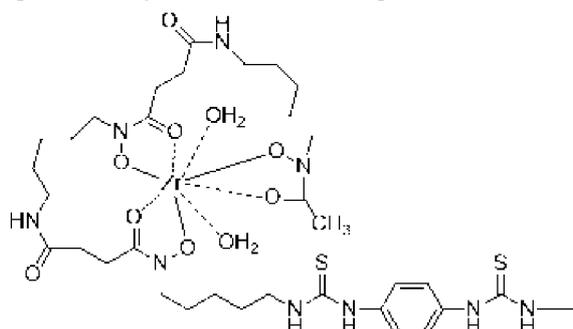
Подходящие сайты конъюгации включают в себя без ограничения лизин и цистеин, которые могут являться, например, нативными или сконструированными, и могут, например, присутствовать в тяжелой или легкой цепи антитела. Цистеиновые сайты конъюгации включают в себя без ограничения сайты, полученные путем мутации, вставки или восстановления дисульфидных связей антител. Способы получения модифицированных цистеином антител включают в себя без ограничения способы, раскрытые в международной патентной публикации WO 2011/056983. Сайт-специфические способы конъюгации также можно использовать для направления реакции конъюгирования на конкретные сайты антитела, достижения требуемой стехиометрии и/или достижения требуемых соотношений хелатора к антителу. Такие способы конъюгирования известны специалистам в настоящей области техники и включают в себя без ограничения конструирование путем введения цистеина и ферментативные и химико-ферментативные способы, включая в себя без ограничения конъюгацию с глутамином, конъюгацию Q295 и конъюгацию, опосредованную трансглутаминазой, а также те, которые описаны в J. Clin. Immunol., 36: 100 (2016), полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки. Подходящие фрагменты, реакционноспособные в отношении требуемого сайта конъюгации, как правило, обеспечивают эффективное и легкое соединение связывающего LAG3 белка, например антитела, и хелатора позитронного излучателя. Фрагменты, реакционноспособные в отношении сайтов лизина и цистеина, включают в себя электрофильные группы, которые известны специалистам в настоящей области техники. Согласно определенным аспектам, когда требуемым сайтом конъюгации является лизин, реакционноспособный фрагмент представляет собой изотиоцианат, например, п-изотиоцианатобензильную группу или реакционноспособный сложный эфир. Согласно определенным аспектам, когда требуемым сайтом конъюгации является цистеин, реакционноспособный фрагмент представляет собой малеимид.

Когда хелатор представляет собой десферриоксамин (DFO), подходящие реакционноспособные фрагменты включают в себя без ограничения изотиоцианатобензильную группу, сложный эфир п-гидроксисукцинимид, 2,3,5,6-сложный эфир тетрафторфенола, п-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат и те, которые описаны в BioMed Research International, Vol 2014, ID статьи 203601, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки. Согласно определенным вариантам осуществления белок, связывающий LAG3, представляет собой антитело, а молекула, содержащая хелатор позитронного излучателя и фрагмент, реакционноспособный в отношении сайта конъюгации, представляет собой п-изотиоцианатобензил-десферриоксамин (p-SCN-Bn-DFO):

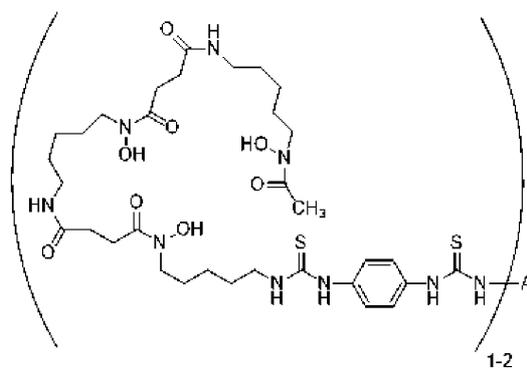


Согласно некоторым вариантам осуществления М представляет собой ^{89}Zr . Согласно некоторым вариантам осуществления к представляет собой целое число от 1 до 2. Согласно некоторым вариантам осуществления к равен 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления -L-M представляет собой



Согласно настоящему раскрытию также предусмотрены способы синтеза меченных радиоактивным изотопом конъюгатов антитела, предусматривающие приведение в контакт соединения согласно формуле (III):

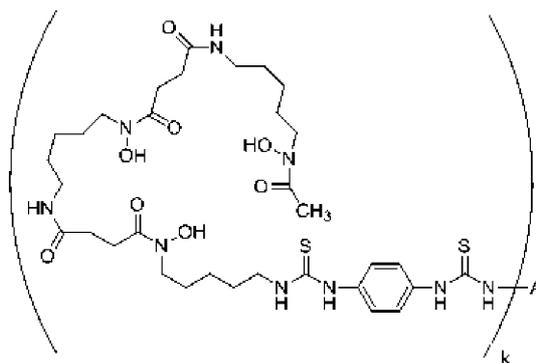


(III)

с ^{89}Zr , где А представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают LAG3. Согласно определенным вариантам осуществления соединение согласно формуле (III) синтезируют путем приведения в контакт антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связывают LAG3, с p-SCN-Bn-DFO.

В настоящем документе также предусмотрен продукт реакции между соединением согласно формуле (III) и ^{89}Zr .

В настоящем документе предусмотрены соединения согласно формуле (III):



где А представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают LAG3, и k представляет собой целое число, составляющее 1-30. Согласно некоторым вариантам осуществления k равен 1 или 2.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предусмотрены композиции, содержащие конъюгат, характеризующийся следующей структурой:



где А представляет собой белок, который связывает LAG3; L представляет собой хелатирующий фрагмент; и k представляет собой целое число, составляющее 1-30; причем конъюгат хелатирован с позитронным излучателем в количестве, достаточном для обеспечения специфической активности, подходящей для клинической ПЭТ-визуализации. Согласно некоторым вариантам осуществления количество хелатированного позитронного излучателя представляет собой количество, достаточное для обеспечения специфической активности, составляющей приблизительно 1-приблизительно 20 мКи на 1-50 мг белка, который связывает LAG3. Согласно некоторым вариантам осуществления количество хелатированного позитронного излучателя представляет собой количество, достаточное для обеспечения специфической активности, составляющей вплоть до 20 мКи, вплоть до 15 мКи или вплоть до 10 мКи на 1-50 мг белка, который связывает LAG3, например, в диапазоне, составляющем приблизительно 3-приблизительно 20 мКи, приблизительно 5-приблизительно 20 мКи, приблизительно 1-приблизительно 15 мКи, приблизительно 3-приблизительно 15 мКи, приблизительно 5-приблизительно 15 мКи, приблизительно 1-приблизительно 10 мКи или приблизительно 3 - приблизительно 10 мКи.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает мономерный LAG3 человека с равновесной константой диссоциации связывания (K_D), составляющей меньше чем приблизительно 2 нМ, как измерено в анализе плазмонного поверхностного резонанса при 37°C.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает мономерный LAG3 человека с K_D , составляющей меньше чем приблизительно 1,5 нМ в анализе плазмонного поверхностного резонанса при 25°C.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает димерный LAG3 человека с K_D , составляющей меньше чем приблизительно 90 пМ, как измерено в анализе плазмонного поверхностного резонанса при 37°C.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает димерный LAG3 человека с K_D , составляющей меньше чем приблизительно 20 пМ в анализе плазмонного поверхностного резонанса при 25°C.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с LAG3 человека с эталонным антителом, содержащим определяющие комплементарность области (CDR) HCVR, причем HCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1; и CDR LCVR, причем LCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как представлено в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления эталонное антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546 и 554/562.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливает связывание LAG3 с МНС класса II. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание LAG3 с МНС класса II. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не увеличивает или не

уменьшает связывание LAG3 с его лигандами.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющие комплементарности области (CDR) HCVR, причем HCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 458, 466, 474, 482, 490, 498, 506, 514, 538 и 554; и CDR LCVR, причем LCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 522, 530, 546 и 562. Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546 и 554/562. Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 386/394, 418/426, 538/546, 577/578, 579/578 и 580/581.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с LAG3 человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с LAG3 человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с LAG3 человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит (а) HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1; и (b) LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарности области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в пределах любой из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), перечисленных в табл. 1; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в пределах любой из последовательностей вариабельной области легкой цепи (LCVR), перечисленных в табл. 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 372, 388, 404, 420, 436, 452, 460, 468, 476, 484, 492, 500, 508, 516, 540 и 556;

(b) домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 374, 390, 406, 422, 438, 454, 462, 470, 478, 486, 494, 502, 510, 518, 542 и 558;

(c) домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 376, 392, 408, 424, 440, 456, 464, 472, 480, 488, 496, 504, 512, 520, 544 и 560;

(d) домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 380, 396, 412, 428, 444, 524, 532, 548, и 564;

(e) домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 382, 398, 414, 430, 446, 526, 534, 550 и 566; и

(f) домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 384, 400, 416, 432, 448, 528, 536, 552 и 568.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378,

386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546 и 554/562. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 386/394, 418/426 и 538/546.

Е. Масштабированное производство для получения конъюгатов антитела к LAG3 с хелатором

Согласно настоящему раскрытию предусмотрены увеличенные в масштабе производственные процессы для получения антител к LAG3, конъюгированных с хелатором. Конъюгаты антител к LAG3 с хелатором находятся в форме, подходящей для введения радиоактивной метки.

Надлежащие производственные процессы соблюдаются во всех аспектах производства, включая в себя поддержание стерильной среды, применение асептических процедур, ведение учета всех процессов и документирование качества, чистоты, силы и идентичности продукта, а также любых отклонений от них.

Согласно некоторым вариантам осуществления увеличенный в масштабе производственный процесс производства намного быстрее, чем производственный процесс для исследований и разработки. Согласно некоторым вариантам осуществления увеличенный в масштабе производственный процесс может занимать менее 12 ч, или менее 10 ч, или менее 8 ч, или менее 6 ч, или менее 4 ч, или менее или приблизительно 2 ч.

Согласно некоторым вариантам осуществления первая стадия предусматривает ультрафильтрацию и диализацию (UFDF), с использованием мембраны 30-50 кДа, антитела к LAG3 для удаления вспомогательных веществ, компонентов, препятствующих конъюгации, и солей, которые ингибируют процесс конъюгирования. Иллюстративные мембранные полимеры включают в себя полиэфирсульфон (PES), ацетат целлюлозы (CA) и регенерированную целлюлозу (RC). На этой стадии для антитела заменяют буфер на неинтерферирующий буферный раствор с низкой ионной силой. pH буфера может составлять от приблизительно 4,5 до приблизительно 6, или от приблизительно 5 до приблизительно 6, или от приблизительно 5,3 до приблизительно 5,7, или приблизительно 5,5. Рассматриваемые в настоящем документе буферные системы включают в себя любую буферную систему, в которой отсутствует первичный амин. Иллюстративные буферы включают в себя ацетатные, фосфатные или цитратные буферы. Буфер обеспечивает стабильность белка во время обработки перед конъюгированием. Объем процесса можно дополнительно уменьшить, чтобы сконцентрировать антитело, а затем его стерильно отфильтровать.

После UFDF перед конъюгированием концентрированное и отфильтрованное антитело можно перенести в карбонатную буферную систему без амина. Карбонатная буферная система может характеризоваться pH в диапазоне от приблизительно 8,5 до приблизительно 9,6, или от приблизительно 9,0 до приблизительно 9,6, или от приблизительно 9,2 до приблизительно 9,4, или от приблизительно 9,4 до приблизительно 9,6, или значением pH, составляющим приблизительно 9,4.

Хелатор, например, DFO, в растворителе добавляют до целевой концентрации в буферную систему, содержащую антитело, и дополнительный растворитель можно добавлять в раствор до требуемого процентного отношения. Хелатор можно добавлять в молярном избытке антитела, например, в отношении хелатора к антителу 3,5-5:1. Общий объем реакции может составлять вплоть до 5 л.

Температура реакции и время реакции являются обратно пропорциональными. Например, если температура реакции выше, время реакции меньше. Если температура реакции ниже, время реакции выше. Например, при температуре выше приблизительно 18°C реакция может занимать менее 2 ч; при температуре ниже 18°C реакция может занять более 2 ч.

Реакцию конъюгирования можно остановить путем гашения, например, путем добавления уксусной кислоты.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгирование антитела с дефероксамином проводят для получения конъюгатов DFO-mAb. Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгирование антитела с p-SCN-Bn-дефероксамином проводят для получения конъюгатов DFO-mAb.

Иллюстративные растворители для хелатора включают в себя DMSO и DMA. На последующих стадиях UFDF используют мембраны и мембрану выбирают на основе системы растворителей, используемой на стадии конъюгирования. Например, DMA растворяет мембраны PES, поэтому их нельзя использовать в одной системе.

Карбонатные буферы не являются предпочтительными в точки зрения стабильности конъюгата при длительном хранении. Таким образом, после образования конъюгатов антитела с хелатором можно провести замену буфера на буфер, выбранный специально для длительного хранения и стабильности. Иллюстративные буферы включают в себя цитратный, ацетатный, фосфатный, аргининовый и гистидиновый буферы. Следующую стадию UFDF можно выполнить для удаления остаточных солей и для обеспечения подходящей концентрации, содержания вспомогательных веществ и pH конъюгированного моноклонального антитела. Полученные конъюгаты антитела с хелатором можно стерильно фильтровать и хранить для последующего составления.

III. Способы применения меченных радиоактивным изотопом иммуноконъюгатов

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к диагностическим и терапевтическим способам применения меченных радиоактивным изотопом конъюгатов антител согласно настояще-

му раскрытию.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам обнаружения LAG3 в ткани, причем способы предусматривают введение в ткань меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3, предусмотренного в настоящем документе; и визуализацию экспрессии LAG3 путем визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Согласно определенным вариантам осуществления ткань содержит клетки или клеточные линии. Согласно определенным вариантам осуществления ткань присутствует у субъекта, причем субъект представляет собой млекопитающее. Согласно определенным вариантам осуществления субъект является субъектом-человеком. Согласно определенным вариантам осуществления субъект характеризуется наличием заболевания или нарушения, выбранного из группы, состоящей из рака, инфекционного заболевания и воспалительного заболевания. Согласно одному варианту осуществления субъект характеризуется наличием рака. Согласно одному варианту осуществления инфекционное заболевание представляет собой бактериальную инфекцию, вызываемую, например, риккетсиями, бациллами, клебсиеллами, менингококками и гонококками, протеем, пневмококками, синегнойной палочкой, стрептококками, стафилококками, сerratиями, *Borriella*, *Bacillus anthracis*, *Chlamydia*, *Clostridium*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Legionella*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepromatosis*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae* и *Yersinia pestis*. Согласно определенным вариантам осуществления инфекционное заболевание представляет собой вирусную инфекцию, вызванную, например, вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусом гепатита С (HCV), вирусом гепатита В (HBV), вирусом герпеса (например, VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II, CMV и вирус Эпштейна-Барр), вирусом папилломы человека (HPV), вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) и вирусом иммунодефицита обезьян (SIV). Согласно определенным вариантам осуществления инфекционное заболевание представляет собой паразитарную инфекцию, вызываемую, например, видами *Entamoeba*, *Enterobius vermicularis*, видами *Leishmania*, видами *Toxosara*, видами *Plasmodium*, видами *Schistosoma*, *Taenia solium*, *Toxoplasma gondii* и *Tyranosoma cruzi*. Согласно определенным вариантам осуществления инфекционное заболевание представляет собой грибковую инфекцию, вызываемую, например, *Aspergillus (fumigatus, niger и т.д.)*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis и т.д.)*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, род *Mucorales (mucor, absidia, rhizopus и т.д.)*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* и *Sporothrix schenckii*.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам визуализации ткани, которые экспрессируют LAG3, предусматривающим введение в ткань меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3 согласно настоящему раскрытию; и визуализацию экспрессии LAG3 путем визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Согласно одному варианту осуществления ткань содержится в опухоли. Согласно одному варианту осуществления ткань содержится в культуре опухолевых клеток или линии опухолевых клеток. Согласно одному варианту осуществления ткань содержится в опухолевом очаге у субъекта. Согласно одному варианту осуществления ткань представляет собой внутриопухолевые лимфоциты в ткани. Согласно одному варианту осуществления ткань содержит экспрессирующие LAG3 клетки.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам измерения ответа на терапию, где ответ на терапию измеряют путем измерения воспаления. Способы в соответствии с этим аспектом предусматривают введение меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела, представленного в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту и визуализацию экспрессии LAG3 путем визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET). Согласно определенным вариантам осуществления воспаление присутствует в опухоли у субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления увеличение экспрессии LAG3 коррелирует с увеличением воспаления в опухоли. Согласно определенным вариантам осуществления воспаление присутствует в инфицированной ткани у субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления уменьшение экспрессии LAG3 коррелирует с уменьшением воспаления в инфицированной ткани.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам измерения ответа на терапию, где ответ на терапию измеряют путем измерения воспаления. Способы в соответствии с этим аспектом предусматривают (i) введение меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела, представленного в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту и визуализацию экспрессии LAG3 путем визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET) и (ii) повторение стадии (i) один или больше раз после начала терапии. Согласно определенным вариантам осуществления воспаление присутствует в ткани у субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления увеличение экспрессии LAG3 коррелирует с увеличением воспаления в ткани. Согласно определенным вариантам осуществления уменьшение экспрессии LAG3 коррелирует с уменьшением воспаления в ткани. Согласно определенным вариантам осуществления экспрессию LAG3, визуализированную на стадии (i), сравнивают с экспрессией LAG3, визуализированной на стадии (ii).

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам определения того, подходит ли пациент для противоопухолевой терапии, содержащей ингибитор LAG3, причем способы предусматривают выбор пациента с солидной опухолью, введение меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела согласно настоящему раскрытию и определение локализации введенного меченного радиоак-

тивным изотопом конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ-визуализации, причем присутствие меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли идентифицирует пациента как подходящего для противоопухолевой терапии, содержащей ингибитор LAG3.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам идентификации кандидата для противоопухолевой терапии, содержащей ингибитор LAG3 и ингибитор ветки сигнального каскада PD-1/PD-L1, причем способы предусматривают выбор пациента с солидной опухолью, введение меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела согласно настоящему раскрытию и определение локализации введенного меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ-визуализации, причем присутствие меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли идентифицирует пациента как подходящего для противоопухолевой терапии, содержащей ингибитор LAG-3. Согласно некоторым вариантам осуществления пациенту дополнительно вводят меченный радиоактивным изотопом конъюгат антитела к PD-1 и локализацию введенного меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к PD-1 в опухоли определяют с помощью ПЭТ-визуализации, причем присутствие меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли идентифицирует пациента как подходящего для противоопухолевой терапии, содержащей ингибитор ветки сигнального каскада PD-1/PD-L1.

В настоящем документе также предусмотрены способы прогнозирования ответа пациента на противоопухолевую терапию, причем способы предусматривают выбор пациента с солидной опухолью; и определение, является ли опухоль LAG3-положительной, при этом, если опухоль является LAG3-положительной, это прогнозирует положительный ответ пациента на противоопухолевую терапию. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль определяют как положительную путем введения меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3 согласно настоящему раскрытию и определения локализации меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ-визуализации, причем присутствие меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является LAG3-положительной.

Согласно некоторым вариантам осуществления противоопухолевая терапия выбрана из следующего: ингибитор PD-1 (например, REGN2810, BGB-A317, ниволумаб, пидилизумаб и пембролизумаб), ингибитор PD-L1 (например, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, MDX-1105 и REGN3504, а также те, которые раскрыты в патентной публикации № US 2015-0203580), ингибитор CTLA-4 (например, ипилимумаб), ингибитор TIM3, ингибитор BTLA, ингибитор TIGIT, ингибитор CD47, ингибитор GITR, антагонист другого T-клеточного соингибитора или лиганда (например, антитело к CD-28, 2B4, LY108, LANA, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонист фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) [например, "белок-ловушка для VEGF", такой как афлиберцепт или другой ингибирующий VEGF слитый белок, как указано в патенте США № 7087411, или антитело к VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент (например, бевацизумаб или ранибизумаб) или низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)], ингибитор Ang2 (например, несвакумаб), ингибитор трансформирующего фактора роста бета (TGFP), ингибитор рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, эрлотиниб, цетуксимаб), ингибитор CD20 (например, антитело к CD20, такое как ритуксимаб), антитело к опухолеспецифическому антигену [например, CA9, CA125, ассоциированному с меланомой антигену 3 (MAGE3), карциноэмбриональному антигену (CEA), виментину, опухолевой пируваткиназе M2-типа, простатическому специфическому антигену (PSA), муцину-1, MART-1 и CA19-9], вакцина (например, вакцина из бацилл Кальметта-Герена, противораковая вакцина), адъювант для увеличения презентации антигена (например, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), биспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело CD3×CD20 или биспецифическое антитело PSMA×CD3), цитотоксин, химиотерапевтическое средство (например, дакарбазин, темозоломид, циклофосфамид, доцетаксел, доксорубицин, даунорубицин, цисплатин, карбоплатин, гемцитабин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел и винкристин), циклофосфамид, лучевая терапия, ингибитор IL-6R (например, сарилумаб), ингибитор IL-4R (например, дупилумаб), ингибитор IL-10, цитокин, такой как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, и конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC) (например, анти-CD19-DM4 ADC и анти-DS6-DM4 ADC).

Согласно некоторым вариантам осуществления противоопухолевая терапия выбрана из следующего: ниволумаб, ипилимумаб, пембролизумаб и их комбинации.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам прогнозирования ответа пациента на противоопухолевую терапию, содержащую ингибитор LAG3, причем способы предусматривают выбор пациента с солидной опухолью, определение, является ли опухоль LAG3-положительной, причем, если опухоль является LAG3-положительной, то прогнозируют положительный ответ пациента. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль определяют как положительную путем введения меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела согласно настоящему раскрытию и определения локализации меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ-визуализации, причем присутствие меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является LAG3-положительной.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам прогнозирования ответа па-

циента на противоопухолевую терапию, содержащую ингибитор LAG3 в комбинации с ингибитором ветки сигнального каскада PD-1/PD-L1, причем способы предусматривают выбор пациента с солидной опухолью, определение является ли опухоль LAG3-положительной и PD-1-положительной, причем прогнозируют положительный ответ пациента, если опухоль является LAG3-положительной и PD-1-положительной. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль определяют как LAG3-положительную путем введения меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3 и определения локализации меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ-визуализации, причем присутствие меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является LAG3-положительной. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль определяют как PD-1-положительную путем дополнительного введения меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к PD-1 и определения локализации меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к PD-1 в опухоли с помощью ПЭТ-визуализации, причем присутствие меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является PD-1-положительной.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам обнаружения LAG3 - положительной опухоли у субъекта. Способы согласно этому аспекту предусматривают выбор субъекта с солидной опухолью; введение меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела согласно настоящему раскрытию субъекту; и определение локализации меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела с помощью ПЭТ-визуализации, причем присутствие меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является LAG3-положительной.

Согласно некоторым аспектам нуждающемуся в этом субъекту вводят дозу, составляющую приблизительно 20 мг или меньше, дозу, составляющую приблизительно 15 мг или меньше, дозу, составляющую приблизительно 10 мг или меньше, например, дозу, составляющую 2 мг, или 5 мг, или 10 мг меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3.

Используемое в настоящем документе выражение "нуждающийся в этом субъект" относится к человеку или млекопитающему, не являющемуся человеком, которое проявляет один или несколько симптомов или признаков рака, и/или у которого диагностирован рак, включая в себя солидную опухоль, и которому необходимо его лечение. Согласно многим вариантам осуществления термин "субъект" можно взаимозаменяемо использовать с термином "пациент". Например, у субъекта-человека можно диагностировать первичную или метастатическую опухоль и/или один или несколько симптомов или признаков, включая в себя без ограничения необъяснимую потерю массы тела, общую слабость, постоянную усталость, потерю аппетита, лихорадку, ночную потливость, боль в костях, одышку, вздутый живот, боль/давление в груди, увеличение селезенки и повышение содержания связанного с раком биомаркера (например, CA125). Выражение включает в себя субъектов с первичными или развившимися опухолями. Согласно конкретным вариантам осуществления выражение включает в себя субъектов-людей, которые характеризуются наличием солидной опухоли и/или нуждаются в лечении солидной опухоли, например рака толстой кишки, рака молочной железы, рака легкого, рака предстательной железы, рака кожи, рака печени, рака костей, рака яичника, рака шейки матки, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи и рак головного мозга. Термин включает в себя субъектов с первичными или метастатическими опухолями (запущенные злокачественные новообразования). Согласно определенным вариантам осуществления выражение "нуждающийся в этом субъект" включает в себя пациентов с солидной опухолью, которая является устойчивой или является рефрактерной или недостаточно адекватно контролируется с помощью предшествующей терапии (например, путем лечения с помощью противоракового средства). Например, выражение включает в себя субъектов, которых лечили с помощью одной или нескольких линий предшествующей терапии, такой как лечение с помощью химиотерапии (например, карбоплатина или доцетаксел). Согласно определенным вариантам осуществления выражение "нуждающийся в этом субъект" включает в себя пациентов с солидной опухолью, которую лечили с помощью одной или нескольких линий предшествующей терапии, но которая впоследствии рецидивировала или метастазировала. Согласно определенным вариантам осуществления термин включает в себя субъектов, характеризующихся наличием воспалительного заболевания или нарушения, включая в себя без ограничения следующее: рак, ревматоидный артрит, атеросклероз, периодонтит, сенная лихорадка, заболевание сердца, ишемическая болезнь сердца, инфекционное заболевание, бронхит, дерматит, менингит, бронхиальная астма, туберкулез, язвенный колит, болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника, гепатит, синусит, псориаз, аллергия, фиброз, волчанка, васкулит, анкилозирующий спондилит, болезнь Грейвса, целиакия, фибромиалгия и отторжение трансплантата.

Согласно определенным вариантам осуществления способы согласно настоящему раскрытию используют в отношении субъекта с солидной опухолью. Термины "опухоль", "рак" и "злокачественное новообразование" используют в настоящем документе взаимозаменяемо. Используемый в настоящем документе термин "солидная опухоль" относится к аномальной массе ткани, которая, как правило, не содержит кист или жидких областей. Солидные опухоли могут быть доброкачественными (не рак) или злокачественными (рак). Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль является метастатической. Для целей настоящего раскрытия термин "солидная опухоль" означает злокачественные солидные

опухоли. Термин включает в себя различные типы солидных опухолей, названные в честь типов клеток, которые их формируют, а именно: саркомы, карциномы и лимфомы. Согласно определенным вариантам осуществления термин "солидная опухоль" включает в себя формы рака, включая в себя без ограничения следующее: рак толстой и прямой кишки, рак яичника, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак головного мозга, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак анального канала, рак матки, рак толстой кишки, рак печени, меланома, метастатическая меланома, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак эндометрия, рак костей, рак яичка, рак кожи, рак почки, рак желудка, рак пищевода, рак головы и шеи, рак слюнной железы и миелома.

Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в настоящем документе способы можно использовать у субъекта с раком, например, субъекта, характеризующего наличием следующего: рак крови, рак головного мозга, почечно-клеточный рак, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы, печеночно-клеточная карцинома, рак костей, рак толстой кишки, немелкоклеточный рак легких, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, рак толстой и прямой кишки, мезотелиома, В-клеточная лимфома и меланома. Согласно некоторым аспектам рак является метастатическим, например, метастатическая меланома.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам лечения опухоли у субъекта. Способы согласно этому аспекту предусматривают выбор субъекта с солидной опухолью; определение того, что опухоль является LAG3-положительной; и введение одной или нескольких доз ингибитора LAG3. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль определяют как LAG3-положительную путем введения субъекту меченого радиоактивным изотопом конъюгата антитела согласно настоящему раскрытию; и визуализации меченого радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ-визуализации, причем присутствие меченого радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является LAG3-положительной.

Согласно дополнительному аспекту способы лечения предусматривают введение одной или нескольких доз ингибитора LAG3 в комбинации со следующим: ингибитор CTLA-4 (например, ипилимумаб), ингибитор TIM3, ингибитор BTLA, ингибитор TIGIT, ингибитор CD47, ингибитор GITR, антагонист другого Т-клеточного соингибитора или лиганда (например, антитело к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонист фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) [например, "белок-ловушка для VEGF", такой как афлиберцепт или другой ингибирующий VEGF слитый белок, как указано в патенте США № 7087411, или антитело к VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент (например, бевацизумаб или ранибизумаб) или низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)], ингибитор Ang2 (например, несвакумаб), ингибитор трансформирующего фактора роста бета (TGFP), ингибитор рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, эрлотиниб, цетуксимаб), ингибитор CD20 (например, антитело к CD20, такое как ритуксимаб), антитело к опухолеспецифическому антигену [например, CA9, CA125, ассоциированному с меланомой антигену 3 (MAGE3), карциноэмбриональному антигену (CEA), виментину, опухолевой пируваткиназе M2-типа, простатическому специфическому антигену (PSA), муцину-1, MART-1 и CA19-9], вакцина (например, вакцина из бацилл Кальметта-Герена, противораковая вакцина), адъювант для увеличения презентации антигена (например, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), биспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело CD3×CD20 или биспецифическое антитело PSMA×CD3), цитотоксин, химиотерапевтическое средство (например, дакарбазин, темозоломид, циклофосфамид, доцетаксел, доксорубицин, даунорубицин, цисплатин, карбоплатин, гемцитабин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел и винкристин), циклофосфамид, лучевая терапия, ингибитор IL-6R (например, сарилумаб), ингибитор IL-4R (например, дупилумаб), ингибитор IL-10, цитокин, такой как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC) (например, анти-CD19-DM4 ADC и анти-DS6-DM4 ADC), противовоспалительное лекарственное средство (например, кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства), диетическая добавка, такая как антиоксиданты, или любая другая терапия для лечения рака. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор LAG3 можно использовать в комбинации с противораковыми вакцинами, включая в себя вакцины на основе дендритных клеток, онколитические вирусы, вакцины на основе опухолевых клеток и т.д., для усиления противоопухолевого ответа. Примеры противораковых вакцин, которые можно использовать в комбинации с ингибитором LAG3, включают в себя вакцину MAGE3 для лечения меланомы и рака мочевого пузыря, вакцину MUC1 для лечения рака молочной железы, EGFRv3 (например, Rindoperipimut) для лечения рака головного мозга (включая в себя мультиформную глиобластому) или ALVAC-CEA (для лечения CEA+ форм рака).

Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор LAG3 можно использовать в комбинации с лучевой терапией в способах для генерирования долговременных длительных противоопухолевых ответов и/или усиления выживаемости пациентов с раком. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор LAG3, например антитело к LAG3, можно вводить до, одновременно или после введения лучевой терапии пациенту с раком. Например, лучевую терапию можно вводить в одной или нескольких дозах в опухолевые очаги с последующим введением одной или нескольких доз антител к

LAG3. Согласно некоторым вариантам осуществления лучевую терапию можно вводить локально на опухолевый очаг для усиления локальной иммуногенности опухоли пациента (адьювантное облучение) и/или для уничтожения опухолевых клеток (аблятивное облучение) с последующим системным введением антитела к LAG3. Например, внутрочерепное излучение можно вводить пациенту с раком головного мозга (например, мультиформной глиобластомой) в комбинации с системным введением антитела к LAG3. Согласно определенным вариантам осуществления антитела к LAG3 можно вводить в комбинации с лучевой терапией и химиотерапевтическим средством (например, темозоломидом) или антагонистом VEGF (например, афлиберцептом).

Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор LAG3 можно вводить в комбинации с одним или несколькими противовирусными лекарственными средствами для лечения вирусной инфекции, вызванной, например, LCMV, ВИЧ, HPV, HBV или HCV. Примеры противовирусных лекарственных средств включают в себя без ограничения зидовудин, ламивудин, абакавир, рибавирин, лопинавир, эфавиренц, кобицистат, тенофовир, рилпивирин и кортикостероиды.

Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор LAG3 можно вводить в комбинации с одним или несколькими антибактериальными лекарственными средствами для лечения бактериальной инфекции, вызванной, например, риккетсиями, бациллами, клебсиеллами, менингококками и гонококками, протеем, пневмококками, синегнойной палочкой, стрептококками, стафилококками, серрациями, *Borriella*, *Bacillus anthracis*, *Chlamydia*, *Clostridium*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Legionella*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepromatosis*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae* и *Yersinia pestis*. Примеры антибактериальных лекарственных средств включают в себя без ограничения, пенициллины, тетрациклины, цефалоспорины, хинолоны, линкомицины, макролиды, кетолиды, сульфонамиды, гликопептиды, аминогликозиды и карбапенемы.

Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор LAG3 можно вводить в комбинации с одним или несколькими противогрибковыми лекарственными средствами для лечения грибковой инфекции, вызванной, например, *Aspergillus (fumigatus, niger и т.д.)*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis и т.д.)*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, род *Mucorales (mucor, absidia, rhizopus и т.д.)*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* и *Sporothrix schenckii*. Примеры противогрибковых лекарственных средств включают в себя без ограничения амфотерицин В, флуконазол, вориконазол, позаконазол, итраконазол, вориконазол, анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин и флуцитозин.

Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор LAG3 можно вводить в комбинации с одним или несколькими противопаразитарными лекарственными средствами для лечения паразитарной инфекции, вызванной, например, видами *Entamoeba*, *Enterobius vermicularis*, видами *Leishmania*, видами *Toxosara*, видами *Plasmodium*, видами *Schistosoma*, *Taenia solium*, *Toxoplasma gondii* и *Trypanosoma cruzi*. Примеры противопаразитарных лекарственных средств включают в себя без ограничения празиквантел, оксамнинин, метронидазол, тинидазол, нитазоксанид, дегидроэметин или хлорохин, дилоксанид фураат, йодохинолин, хлорохин, паромомицин, пирантел памоат, альбендазол, нифуртимокс и бензнидазол.

Дополнительный терапевтически активное средство(а)/компонент(ы) можно вводить до, одновременно или после введения ингибитора LAG3. Для целей настоящего изобретения такие схемы введения считаются введением ингибитора LAG3 "в комбинации со" вторым терапевтически активным компонентом.

Согласно некоторым аспектам, способы лечения предусматривают выбор субъекта с бактериальной инфекцией, вирусной инфекцией, грибковой инфекцией или паразитарной инфекцией; определение того, что пораженная ткань у субъекта является LAG3-положительной; и введение одной или нескольких доз терапевтического средства, соответствующего инфекции. Согласно определенным вариантам осуществления пораженную ткань определяют как LAG3-положительную путем введения субъекту настоящего изобретения меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3 согласно настоящему раскрытию; и визуализации меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела с помощью ПЭТ-визуализации, причем присутствие меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в ткани указывает на то, что ткань является LAG3-положительной. Согласно определенным вариантам осуществления стадии введения и визуализации выполняют один или несколько раз для мониторинга эффективности терапевтического средства в лечении инфекции.

Согласно некоторым аспектам способы лечения предусматривают выбор субъекта с солидной опухолью; определение того, что опухоль является LAG3-положительной и PD-1-положительной; и введение одной или нескольких доз ингибитора LAG3 и/или одной или нескольких доз ингибитора ветки сигнального каскада PD-1/PD-L1 (например, антитела к PD-1 или антитела к PD-L1). Согласно определенным вариантам осуществления опухоль определяют как LAG3-положительную путем введения субъекту меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3 согласно настоящему раскрытию; и визуализации меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ-визуализации, причем присутствие меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является LAG3-положительной. Согласно определенным вариантам осуществления опухоли определяют как PD-1-положительную путем введения субъекту меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к PD-1 согласно настоящему раскрытию; и визуализации меченно-

го радиоактивным изотопом конъюгата антитела к PD-1 в опухоли с помощью ПЭТ-визуализации, причем присутствие меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к PD-1 в опухоли указывает на то, что опухоль является PD-1-положительной.

Иллюстративные антитела к PD-1 включают в себя REGN2810, BGB-A317, ниволумаб, пидилизумаб и пембролизумаб.

Иллюстративные антитела к PD-L1 включают в себя атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, MDX-1105 и REGN3504, а также те, которые раскрыты в патентной публикации № US 2015-0203580.

Ингибитор ветки сигнального каскада PD-1/PD-L1 можно вводить до, одновременно или после введения ингибитора LAG3. Для целей настоящего раскрытия такие схемы введения считаются введением ингибитора LAG3 "в комбинации с" ингибитором ветки сигнального каскада PD-1/PD-L1.

Используемые в настоящем документе термины "лечить", "лечение" или тому подобное означают облегчение симптомов, устранение причины симптомов либо на временной, либо на постоянной основе, задержку или ингибирование роста опухоли, снижение массы опухолевых клеток или опухолевой нагрузки, стимулирование регрессии опухоли, стимулирование сокращения, некроза и/или исчезновения опухоли, предотвращение рецидива опухоли, предотвращение или ингибирование метастазирования, ингибирование роста метастатической опухоли и/или увеличение продолжительности выживаемости субъекта.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам мониторинга эффективности противоопухолевой терапии у субъекта, причем способы предусматривают выбор субъекта с солидной опухолью, причем субъект проходит лечение с помощью противоопухолевой терапии; введение субъекту меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3 согласно настоящему раскрытию; визуализацию локализации введенного меченного радиоактивным изотопом конъюгата в опухоли с помощью ПЭТ-визуализации; и определение роста опухоли, причем уменьшение от исходного уровня меченного радиоактивным изотопом сигнала указывает на эффективность противоопухолевой терапии. Согласно определенным вариантам осуществления противоопухолевая терапия содержит ингибитор LAG3. Согласно определенным вариантам осуществления противоопухолевая терапия дополнительно содержит ингибитор ветки сигнального каскада PD-1/PD-L1 (например, антитело к PD-1 или антитело к PD-L1).

Согласно определенным вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способам оценки изменений воспалительного состояния опухоли, причем способы предусматривают выбор субъекта с солидной опухолью, причем субъект проходит лечение с помощью противоопухолевой терапии; введение субъекту меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3, предусмотренного в настоящем документе; и визуализацию локализации введенного меченного радиоактивным изотопом конъюгата в опухоли с помощью ПЭТ-визуализации, причем увеличение от исходного уровня меченного радиоактивным изотопом сигнала указывает на увеличение воспаления и эффективность противоопухолевой терапии. Согласно определенным вариантам осуществления противоопухолевая терапия содержит ингибитор LAG3 и/или ингибитор ветки сигнального каскада PD-1/PD-L1 (например, антитело к PD-1 или антитело к PD-L1). Согласно определенным вариантам осуществления противоопухолевая терапия содержит следующее: ингибитор PD-1 (например, REGN2810, BGB-A317, ниволумаб, пидилизумаб и пембролизумаб), ингибитор PD-L1 (например, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, MDX-1105 и REGN3504), ингибитор CTLA-4 (например, ипилимумаб), ингибитор TIM3, ингибитор BTLA, ингибитор TIGIT, ингибитор CD47, ингибитор GITR, антагонист другого T-клеточного соингибитора или лиганда (например, антитело к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонист фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) [например, "белок-ловушка для VEGF", такой как афлиберцепт или другой ингибирующий VEGF слитый белок, как указано в патенте США № 7087411, или антитело к VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент (например, бевацизумаб или ранибизумаб) или низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)], ингибитор Ang2 (например, несвакумаб), ингибитор трансформирующего фактора роста бета (TGFP), ингибитор рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, эрлотиниб, цетуксимаб), ингибитор CD20 (например, антитело к CD20, такое как ритуксимаб), антитело к опухолеспецифическому антигену [например, CA9, CA125, ассоциированному с меланомой антигену 3 (MAGE3), карциноэмбриональному антигену (CEA), виментину, опухолевой пируваткиназе M2-типа, простатическому специфическому антигену (PSA), муцину-1, MART-1, и CA19-9], вакцина (например, вакцина из бацилл Кальметта-Герена, противораковая вакцина), адъювант для увеличения презентации антигена (например, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), биспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело CD3×CD20 или биспецифическое антитело PSMA×CD3), цитотоксин, химиотерапевтическое средство (например, дакарбазин, темозоломид, циклофосфамид, доцетаксел, доксорубин, даунорубин, цисплатин, карбоплатин, гемцитабин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел и винкристин), циклофосфамид, лучевая терапия, ингибитор IL-6R (например, сарилумаб), ингибитор IL-4R (например, дупилумаб), ингибитор IL-10, цитокин, такой как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, и конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC) (например, анти-CD19-DM4 ADC и анти-DS6-DM4 ADC).

Используемый в настоящем документе термин "исходный уровень" в отношении экспрессии LAG3 в опухоли означает числовое значение поглощения меченного радиоактивным изотопом конъюгата для субъекта до или во время введения дозы противоопухолевой терапии. Поглощение меченного радиоактивным изотопом конъюгата определяют с использованием способов, известных в настоящей области техники (см., например, Oosting et al 2015, J. Nucl. Med. 56: 63-69). Согласно определенным вариантам осуществления противоопухолевая терапия содержит ингибитор LAG3.

Согласно некоторым вариантам осуществления последовательное иммуно-ПЭТ-сканирование и биопсии опухоли выполняются до и после лечения с помощью стандартных средств иммунотерапии. Такие средства иммунотерапии можно выбрать из следующего: ниволумаб, ипилимумаб, пембролизумаб и их комбинации.

Для определения, существует ли эффективность в противоопухолевой терапии, поглощение меченного радиоактивным изотопом конъюгата определяют количественно на исходном уровне и в один или несколько моментов времени после введения ингибитора LAG3. Например, поглощение введенного меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела (например, меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела к LAG3) можно измерить в день 2, день 3, день 4, день 5, день 6, день 7, день 8, день 9, день 10, 11 день, 12 день, день 14, день 15, день 22, день 25, день 29, день 36, день 43, день 50, день 57, день 64, день 71, день 85; или в конце недели 1, недели 2, недели 3, недели 4, недели 5, недели 6, недели 7, недели 8, недели 9, недели 10, недели 11, недели 12, недели 13, недели 14, недели 15, недели 16, недели 17, недели 18, недели 19, недели 20, недели 21, недели 22, недели 23 или дольше после первоначального лечения с помощью ингибитора LAG3 (например, антитела к LAG3). Разницу между величиной поглощения в конкретный момент времени после начала лечения и величиной поглощения на исходном уровне используют для установления того, является противоопухолевая терапия эффективной (регрессия или прогрессирование опухоли).

Согласно определенным вариантам осуществления меченный радиоактивным изотопом конъюгат антитела вводят внутривенно или подкожно субъекту. Согласно определенным вариантам осуществления меченный радиоактивным изотопом конъюгат антитела вводят внутрь опухоли. При введении меченный радиоактивным изотопом конъюгат антитела локализуется в опухоли. Визуализацию локализованного меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела получают с помощью ПЭТ-визуализации и поглощение опухолью меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела измеряют с помощью способов, известных в настоящей области техники. Согласно определенным вариантам осуществления визуализацию проводят через 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней после введения меченного радиоактивным изотопом конъюгата. Согласно определенным вариантам осуществления визуализацию проводят в тот же день после введения меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела.

Согласно определенным вариантам осуществления предусмотрено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с LAG3. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к LAG3 содержит области CDR HCVR, причем HCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 458, 466, 474, 482, 490, 498, 506, 514, 538 и 554; и области CDR LCVR, причем LCVR характеризуется аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 522, 530, 546 и 562.

Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор LAG3 содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с LAG3. Согласно определенным вариантам осуществления антитело к LAG3 представляет собой BMS986016. Согласно другим определенным вариантам осуществления ингибитор LAG3 содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с LAG3. Согласно одному варианту осуществления антитело к LAG3 содержит HCVR согласно SEQ ID NO: 418 и LCVR согласно SEQ ID NO: 426.

IV. Примеры

Некоторые варианты осуществления согласно настоящему раскрытию проиллюстрированы следующими неограничивающими примерами.

Пример 1. Получение антител к LAG3 человека.

Антитела к LAG3 человека создавали с использованием фрагмента LAG3, который находится в диапазоне приблизительно от 29 до 450 аминокислот согласно регистрационному номеру GenBank Accession NP_002277.4 (SEQ ID NO: 582), генетически слитого с Fc-областью мыши. Иммуноген вводили непосредственно, с адьювантом для стимуляции иммунного ответа, мыши VELOCIMMUNE® (т.е. сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариabельные области тяжелой и каппа легкой цепи иммуноглобулина человека), как описано в патенте США № 8502018 B2, или в мыши VelocImmune® с гуманизированной универсальной легкой цепью (ULC), как описано в международной патентной публикации WO 2013022782. Иммунный ответ антител подвергали мониторингу с помощью LAG3-специфического иммуноанализа. Когда был достигнут требуемый иммунный ответ, спленоциты

собирали и сливали с клетками миеломы мыши, чтобы сохранить их жизнеспособность и сформировать линии гибридных клеток. Линии гибридных клеток подвергали скринингу и отбирали для идентификации линий клеток, которые продуцируют LAG3-специфические антитела. Используя эту технику и иммуноген, описанный выше, получили несколько химерных антител к LAG3 (т.е. антител, обладающих переменными доменами человека и константными доменами мыши). Полностью человеческие версии антител можно получить путем замены константной области мыши на константную область человека. Иллюстративные антитела, полученные таким образом от мышей VELOCIMMUNE®, обозначали H1M14985N, H1M14987N, H2M14811N, H2M14885N, H2M14926N, H2M14927N, H2M14931N, H2M18336N, H2M18337N и H4H14813N.

Антитела к LAG3 также выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток (от любой из иммунизированных мышей) без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США № 7582298, который специально полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Используя этот способ, получили несколько антител к LAG3 (т.е. антител, обладающих переменными доменами человека и константными доменами человека); иллюстративные антитела, полученные таким образом, обозначили следующим образом: H4H15477P, H4H15483P, H4H15484P, H4H15491P, H4H17823P, H4H17826P2, H4H17828P2, H4sH15460P, H4sH15462P, H4sH15463P, H4sH15464P, H4sH15466P, H4sH15467P, H4sH15470P, H4sH15475P, H4sH15479P, H4sH15480P, H4sH15482P, H4sH15488P, H4sH15496P2, H4sH15498P2, H4sH15505P2, H4sH15518P2, H4sH15523P2, H4sH15530P2, H4sH15555P2, H4sH15558P2, H4sH15567P2 и H4H17819P.

Иллюстративные антитела H4sH15496P2, H4sH15498P2, H4sH15505P2, H4sH15518P2, H4sH15523P2, H4sH15530P2, H4sH15555P2, H4sH15558P2 и H4sH15567P2 получали из В-клеток от мышей ULC VELOCIMMUNE®.

Биологические свойства иллюстративных антител, полученных в соответствии со способами этого примера, подробно описаны в примерах, изложенных ниже.

Пример 2. Конъюгирование антитела к LAG3 H4sH15482P с p-SCN-Bn-DFO.

Для модификации исходного антитела к LAG3 H4sH15482P (характеризующегося парой последовательностей HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 418/426; в дальнейшем в настоящем документе именуемого mAb1) и антитела -изотипического контроля, подходящего для исследований иммуно-ПЭТ с радиоактивной меткой, к антителам прикрепляли хелатор p-SCN-Bn-дефероксамин (DFO; Macrocylics, № пат.:B-705).

Для модификации mAb1 сначала заменяли буфер на PBS, pH 7,2, с гистидинового буфера путем диализа при 4°C в течение ночи (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette G2 10 кДа MWCO (номинальное отсечение по молекулярной массе); ThermoScientific), а затем снова заменяли буфер с использованием колонки PD-10 (GE Healthcare, кат. №: 17-0851-01) в буфер, состоящий из 50 mM карбонатного буфера, 150 mM NaCl, pH 9,0 (буфер для конъюгирования). Для определения концентрации после замен буферов образцы измеряли на спектрометре Nanodrop 2000 UV/VIS (УФ/видимая область спектра) (ThermoScientific), используя коэффициент экстинкции на основе последовательности MacVector, составляющий 223400 M⁻¹ см⁻¹ и молекулярную массу 145709 г/моль (см. табл. 2). В 15 мл полипропиленовую пробирку 1485,24 мкл mAb1 (70 мг) добавляли к 5374,8 мкл буфера для конъюгирования. 139 мкл раствора DFO в DMSO добавляли с шагом в одну четверть к раствору mAb1, каждый раз осторожно перемешивая пипеткой вверх-вниз. Конечный раствор представлял собой 10 мг/мл mAb1 в буфере для конъюгирования, 2% DMSO с 3-кратным мольным избытком DFO. Этот раствор оставляли для инкубации на водяной бане при 37°C без дополнительного перемешивания.

Через 30 мин при 37°C раствор быстро пропускали через обессоливающую колонку PD-10 (GE Healthcare, кат. №: 17-0851-01), предварительно уравновешенную буфером, содержащим 250 mM NaAcO при pH 5,4 (буфер для получения состава). Объем раствора уменьшали приблизительно на 50% с помощью концентратора с 10K MWCO (центрибежное фильтрующее устройство Amicon Ultra-15, EMD Millipore, № по кат.: UFC901024). Конечный раствор стерильно фильтровали через шприцевой фильтр (шприцевой фильтр Acrodisc 13 мм, Pall Corporation, № по кат.: 4602). Концентрацию и отношение DFO к антителам (DAR) впоследствии измеряли с помощью спектроскопии поглощения в УФ и видимой области. См. фиг. 1. Для измерения оптической плотности антитела, конъюгированное с DFO, измеряли против буфера для получения состава при 252 нм (A₂₅₂), 280 нм (A₂₈₀) и 600 нм (A₆₀₀). Для расчета фонового значения корректировали при каждом значении поглощения с использованием уравнения:

$$A'_{\lambda} = A_{\lambda} - A_{600}$$

Конъюгат антител испытывали в отношении агрегации с использованием гель-проникающей (SEC) хроматографии, при этом 25 мкг образца вводили в колонку Superdex 200 (GE Healthcare, № по кат.: 17-5175-01) с мониторингом при 280 нм с подвижной фазой PBS (0,75 мл/мин). См. фиг. 2. Целостность антитела оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) с использованием 4-20% готового геля Tris/Gly (Novex) с 2 мкг загрязненного образца. Концентрация антител, концентрация конъюгата и DAR рассчитывались с использованием приведенных ниже уравнений:

Расчет концентрации антитела

$$\text{Концентрация антитела (мг/мл)} = \frac{A'_{280}}{\epsilon_{280}} * MW$$

Расчет концентрации конъюгата

$$\text{Концентрация конъюгата (мг/мл)} = \frac{A'_{252} - 1,53A'_{280}}{\epsilon_{252} - 1,53\epsilon_{280}} * MW$$

Расчет DAR

$$DAR = \frac{\epsilon_{252}A'_{280} - \epsilon_{280}A'_{252}}{18800A'_{252} - 28700A'_{280}}$$

Таблица 2

Молярные коэффициенты экстинкции и молекулярная масса

mAb	MW (г·моль ⁻¹)	ϵ_{280} (M ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ_{252} (M ⁻¹ cm ⁻¹)
mAb1	145709	223400	87077

Таблица 3

DAR в УФ, процентное отношение агрегата и концентрация после прикрепления DFO

Антитело	DAR в УФ	Концентрация (мг/мл)	% агрегированных
mAb1	1,48	13,58	1,4%

Пример 3. Хелатирование ⁸⁹Zr конъюгированных с DFO моноклональных антител.

Для использования в исследованиях иммуно-ПЭТ in vivo DFO-конъюгированное антитело к LAG3, mAb1 и DFO-конъюгированное антитело -изотипический контроль метили радиоактивным изотопом ⁸⁹Zr.

DFO-конъюгированное антитело сначала доводили до 1,25 мг/мл в 1 М HEPES, pH 7,2. Композиция растворов конъюгата DFO-Ab для каждого исследования приведена в табл. 4. Отдельно раствор ⁸⁹Zr получали с использованием композиций для каждого соответствующего исследования, представленного в табл. 5. Маточный раствор ⁸⁹Zr-щавелевой кислоты получали из 3D-визуализации. Конечную радиоактивность раствора сначала подтверждали с использованием дозкалибратора Capintec CRC-25R (Capintec, № по кат.: 520), затем сразу же объединяли с раствором конъюгата DFO-Ab, осторожно перемешивали (пипетируя вверх-вниз) и затем инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре.

После инкубации смеси переносили в колонки для обессоливания, либо PD-10 (GE Healthcare, кат. №: 17-0851-01) для исследования 1, либо NAP-5 (GE Healthcare, кат. № 17-0853-02) для исследования 2, предварительно уравновешенные 250 мМ ацетатом натрия при pH 5,4 для гравитационного обессоливания. Для исследования 1 реакцию смесь добавляли в колонку PD-10. После того, как содержимое реакции вошло в основание колонки, поток через нее отбрасывали. Продукт элюировали с помощью 250 мМ ацетата натрия при pH 5,4 (буфер для получения состава) и элюат собирали в соответствии с инструкциями производителя. Для исследования 2 смесь переносили в колонку NAP-5 и поток через нее отбрасывали. Продукт элюировали с помощью 250 мМ ацетата натрия при pH 5,4 (буфер для получения состава) и элюат собирали в соответствии с инструкциями производителя. Впоследствии концентрацию Ab измеряли с помощью спектроскопии поглощения в УФ и видимой области, рассчитывали с использованием соответствующего коэффициента экстинкции и поглощения при 280 нм с использованием уравнения:

Концентрация в мг/мл = поглощение при 280 нм + коэффициент экстинкции при 280 нм (найден в табл. 6)

Конечную массу, измеренную в граммах, записывали в табл. 7. Затем радиоактивность измеряли с использованием дозкалибратора и представляли в табл. 7. Конечный материал (5 мкг) анализировали с использованием эксклюзионной ВЭЖХ в УФ при 280 нм и последовательно подключенным детектором радиоактивных изотопов (Agilent 1260 с детектором Lablogic Radio-TLC/HPLC, SCAN-RAM) с использованием колонки Superdex 200 Increase с подвижной фазой PBS при скорости потока, составляющей 0,75 мл/мин. Радиоактивный индикатор использовали для определения радиохимической чистоты (100% - процент немеченого ⁸⁹Zr) путем сравнения интеграции пика общего белка (~10-16 мин) и немеченого пика ⁸⁹Zr (~25 мин). Процент мономерной чистоты определяли по хроматограмме при 280 нм УФ (UV280) путем сравнения интеграции пика высокомолекулярных (HMW) частиц (от 10 мин до ~15 мин) с мономером (~16 мин).

Удельную активность и извлечение белка (%) каждого меченого радиоактивным изотопом конъю-

гат определяли, используя следующие уравнения:

- масса конъюгата в мг = концентрация в мг/мл × масса раствора в г;
- удельная активность в мКи/мг = активность флакона в мКи ÷ масса конъюгата в мг;
- Извлечение белка = исходная масса конъюгата (мг) ÷ масса конъюгата в мг.

Наконец, отмечали внешний вид и записывали его в табл. 7. Результаты сведены в табл. 7. Хроматограммы эксклюзионной ВЭЖХ с обнаружением радиоактивной метки, показанные на фиг. 3-5, подтверждают по меньшей мере 98% радиохимическую чистоту. Хроматограммы эксклюзионной ВЭЖХ при 280 нм УФ, показанные на фиг. 6-8, подтверждают высокомономерный продукт (>90%).

Таблица 4

Получение конъюгата DFO с антителом путем введения радиоактивной метки

№ введения радиоакт. метки	№ исслед.	Партии введения радиоактивной метки	Концентрац. (мг/мл)	DAR*	Масса конъюгата (мг)	Общий объем (мкл)	Конечная концентрац. (мг/мл)
1	1	Изотип-DFO- ⁸⁹ Zr	15,4	1,53	250	200	1,25
2	1	mAb1-DFO- ⁸⁹ Zr	13,6	1,48	500	400	1,25
3	2	mAb1-DFO- ⁸⁹ Zr	13,6	1,48	100	80	1,25

* DAR определяют как соотношение DFO к антителу

Таблица 5

Получение реакционного раствора ⁸⁹Zr для введения радиоактивной метки

Введение радиоакт. метки	№ исслед.	Партии введения радиоакт. метки	⁸⁹ Zr-оксалат (мкл)	1 М HEPES, pH 7,2 (мкл)	Конечный объем (мкл)	Конечная активность (мКи)	Удельная активность (мКи/мкл)
1	1	Изотип-DFO- ⁸⁹ Zr	~3	500	1000	995	1,0
2	1	mAb1-DFO- ⁸⁹ Zr	~5	500	2000	2060	1,0
3	2	mAb1-DFO- ⁸⁹ Zr	~6	394	400	2010	5,0

Таблица 6

Коэффициенты экстинкции для партий конъюгатов

Партия введения радиоактивной метки	ε ₂₈₀ (ЕОП мл мг ⁻¹ см ⁻¹)
Изотип-DFO- ⁸⁹ Zr	1,70
mAb1-DFO- ⁸⁹ Zr	1,72

Обобщенное представление меченных ^{89}Zr конъюгатов DFO-Ab для визуализации *in vivo* и исследований биораспределения

Введение радиоакт. метки	№ исслед.	Партии конъюгатов	Внешн. вид	Радиохимич. чистота* (%)	Мономер. чистота** (%)	Извлеч. белка (%)	Конц. (мг/мл)	Удельн. активн. (мКи/мг)
1	1	Изотип-DFO- ^{89}Zr	прозрачный	99,7%	98,6%	70%	0,108	3,41
2	1	mAb1-DFO- ^{89}Zr	прозрачный	>99,9%	97,5%	70%	0,133	3,58
3	2	mAb1-DFO- ^{89}Zr	прозрачный	98,2%	93,8 %	57%	0,121	14,7

* с помощью эксклюзионной ВЭЖХ с обнаружением радиоактивной метки,

** с помощью эксклюзионной ВЭЖХ в УФ

Пример 4. Иммунореактивность.

Иммунореактивность (IR) меченого радиоактивным изотопом антитела к LAG3 и антитела - изотипического контроля, измеряли следующим образом. В этих анализах 20 нг соответствующих меченных ^{89}Zr антител добавляли к 15×10^6 клеткам MC38-cOVA/eGFP-mLAG3^{-/-}hLAG3^{Tg} в конечном объеме, составляющем 1 мл. Образцы инкубировали в течение 45 мин (при 37°C, 5% CO₂) с непрерывным перемешиванием перед проведением 2 промывок средой для удаления любого несвязанного антитела. Радиоактивность осадков исследуемых клеток затем подсчитывали в автоматическом гамма-счетчике (2470 Wizard2, Perkin Elmer) по 2 эталонным стандартам, содержащим те же 20 нг меченого ^{89}Zr антитела. Процентное отношение иммунореактивности определяли для образцов с использованием среднего значения стандартов в качестве меры общей активности.

Как видно из табл. 8, меченное ^{89}Zr антитело к LAG3 сохраняло иммунореактивность после конъюгирования и введения радиоактивной метки с 86% IR.

Таблица 8
Иммунореактивность хелатированных ^{89}Zr
DFO-конъюгатов

Образцы	^{89}Zr CPM
Стандарт 1	39643
Стандарт 2	40134
Среднее значение стандартов	39889
Клетки	34261
IR	86%

Пример 5. Селективная локализация меченого радиоактивным изотопом антитела к LAG3 в LAGS-положительных опухолях у мышей.

Имплантиция опухолей и выделение групп дозирования.

Для исследований визуализации *in vivo* использовали LAG3-положительную опухолевую линию. Сначала использовали линию клеток карциномы толстой кишки мыши MC38-cOVA/eGFP-mLAG3^{-/-}hLAG3^{Tg}. Здесь клетки избыточно экспрессируют LAG3 человека и полноразмерный куриный овальбумин, слитые с eGFP, который вводили путем лентивирусной трансдукции (pLVX EF1a и pLKO SSFV, соответственно). Для аллотрансплантатов опухолей MC38-cOVA/eGFP-mLAG3^{-/-}hLAG3^{Tg} подкожно имплантировали 1×10^6 клеток в левый бок самца бестимусных мышей NCr (Taconic, Hudson NY). Как только опухоли достигли среднего объема, составляющего 100-150 мм³ (~ 7-й день после имплантации), мышей рандомизировали в группы по 5 особей, которым вводили исследуемые или контрольные антитела с радиоактивной меткой ^{89}Zr .

Дозирование и биораспределение ^{89}Zr -DFO-mAb1.

Для первоначального исследования на бестимусных мышях с опухолями MC38/ova/LAG3 мыши получали 50 ± 1 мКи меченого ^{89}Zr антитела с дозой белка ~0,6 мг/кг. Для исследований биораспределения мышей умерщвляли через 6 дней после введения дозы и брали кровь с помощью пункции сердца. Опухоли и нормальные ткани затем вырезали и помещали в сцинтилляционные флаконы. Затем собирали данные подсчета радиоактивности для ^{89}Zr в CPM путем измерения образцов на автоматическом гамма-счетчике (Wizard 2470, Perkin Elmer). Все ткани также взвешивали и рассчитывали процентное отношение введенной дозы на грамм (%ID/g) для каждого образца с использованием стандартов, полученных из введенного с помощью инъекции материала.

Обобщение результатов и выводы

В этом примере мыши NCr с опухолями MC38/ova/hLAG3 получали конъюгированное ^{89}Zr mAb1 к LAG3 или не связывающееся антитело в конечной дозе, составляющей 50 мкКи/мышь. Впоследствии мышей оставляли на 6 дней до забора крови, опухоли и тканей, и для всех образцов рассчитывали %ID/г для образцов. Среднее значение %ID/г для каждого антитела представлено в табл. 9. Исходя из этого, отчетливо высокое поглощение в опухолях MC38/ova/hLAG3 очевидно по сравнению с другими нормальными тканями, при этом поглощение опухоли, составляющее 43,1%, значительно выше, чем при следующем наивысшем поглощении, составляющем 6,6% ID/г, наблюдаемом в тимусе. Специфичность поглощения mAb1 к LAG3 в опухоли очевидна при значительном снижении поглощения опухоли, составляющем 7,8%, которое наблюдается для не связывающегося антитела.

Таблица 9

Образец	^{89}Zr - mAb1		^{89}Zr -не связывающееся Ab	
	Среднее %ID/г	Стандартн. отклонение %ID/г	Среднее %ID/г	Стандартн. отклонение %ID/г
Печень	0,5	6,2	3,9	0,3
Селезенка	4,2	0,8	6,7	0,8
Почка	5,1	0,8	6,2	1,2
Кость	4,3	2,1	4,9	1,0
Легкое	3,1	2,3	9,3	2,1
Сердце	2,6	0,9	6,5	2,4
Кровь	5,9	3,1	15,7	2,6
Тимус	6,7	1,7	12,1	1,8
MC38/ova/LAG3	43,1	9,5	7,8	0,4
Тонкая кишка	1,7	0,5	2,8	0,5

Пример 6. Селективная локализация меченого радиоактивным изотопом антитела к LAG3 в опухолях Raji/PBMC у мышей.

В этом примере описана *in vivo* визуализация и *ex vivo* биораспределение меченого цирконием-89 конъюгата DFO с антителом к LAG3 у мышей NSG, которым совместно имплантировали клетки Raji и PBMC человека.

Иллюстративное антитело, используемое в этом примере, представляло собой MAb1, содержащее HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 418/426.

Имплантация опухолей и выделение групп дозирования.

Чтобы продемонстрировать специфичность меченого радиоактивным изотопом антитела для нацеливания на LAG3, 2×10^6 клеток Raji и 5×10^5 PBMC человека (партия 0151029, ReachBio Research Labs) совместно имплантировали в правый бок самкам мышей NSG (возрастом 8-10 недель, Jackson Labs). Через 14 дней после имплантации опухоли мышей рандомизировали в группы по 4 особи и внутривенно вводили различные дозы белка ^{89}Zr -DFO-mAb1.

Дозирование и визуализация ПЭТ/КТ ^{89}Zr -DFO-mAb1.

Мышам с опухолями Raji/hPBMC вводили инъекции по 5, 0,3, 0,1 или 0,03 мг/кг ^{89}Zr -DFO-mAb1 на 14-й день после имплантации опухоли. Мыши, которые получали дозы, составляющие 0,1 и 0,03 мг/кг, получали ~30 или ~9 мкКи меченого радиоактивным изотопом ^{89}Zr -DFO-mAb1, соответственно. Мыши, которые получали дозы белка, составляющие 5 или 0,3 мг/кг, получали ~30 мкКи меченого радиоактивным изотопом ^{89}Zr -DFO-mAb1 и дополнительного mAb1, не конъюгированного с DFO, в качестве добавки для получения конечной введенной дозы общего белка.

ПЭТ-визуализацию локализации антитела оценивали через 6 дней после введения ^{89}Zr -DFO-mAb1. Для получения изображений ПЭТ/КТ использовали прибор Sofie Biosciences G8 PET/CT (Sofie Biosciences и Perkin Elmer). Прибор предварительно откалибровали для обнаружения ^{89}Zr до получения изображений. Энергетическое окно варьировалось от 150 до 650 кэВ с восстановленным разрешением, составляющим 1,4 мм в центре поля зрения. Мышей подвергали индукционной анестезии с использованием изофлурана и держали в непрерывном потоке изофлурана во время визуализации. Статические 10-минутные изображения получали с использованием программного обеспечения G8 и впоследствии реконструировали с использованием предварительно заданных настроек. Данные изображения корректировали с учетом затухания и других параметров. Изображения КТ получали после получения ПЭТ и впоследствии совмещали с изображениями ПЭТ. Изображения получали с использованием программного обеспечения для последующей обработки VivoQuant (inviCRO Imaging Services).

Биораспределение ^{89}Zr -DFO-mAb1.

Для исследований биораспределения мышей умерщвляли в конечный момент времени (через 6 дней после введения ^{89}Zr -DFO-mAb1) и кровь собирали посредством пункции сердца. Опухоли Raji/hPBMC и нормальные ткани затем вырезали, помещали в сцинтилляционные флаконы и взвешивали. Затем собирали данные подсчета радиоактивности для ^{89}Zr в СРМ путем измерения образцов на автоматическом гамма-счетчике (Wizard 2470, Perkin Elmer). Процентное отношение введенной дозы на грамм (% ID/г) рассчитывали для каждого образца с использованием стандартов, полученных из введенного с помощью инъекции материала.

Обобщение результатов и выводы

Это исследование демонстрирует антигенспецифическое нацеливание ^{89}Zr -DFO-mAb1 на LAG3, экспрессируемый на лимфоцитах человека в подкожных опухолях Raji/hPBMC, выращенных в организме мышей NSG. Блокирующая доза 5 мг/кг ^{89}Zr -DFO-mAb1 показала повышенное поглощение в крови (% ID/г) и более низкое поглощение в опухоли (% ID/г) в опухолях Raji/hPBMC по сравнению с более низкими дозами, составляющими 0,3, 0,1 и 0,03 мг/кг ^{89}Zr -DFO-mAb1 (Табл. 10). Кроме того, когда доза белка снижалась, среднее отношение сигнала опухоль:кровь увеличивалось, демонстрируя специфичность к LAG3 *in vivo* (Табл. 10). В дополнение к нацеливанию на LAG3, экспрессируемый в опухолях Raji/hPBMC, более низкие дозы 0,3, 0,1 и 0,03 мг/кг ^{89}Zr -DFO-mAb1 продемонстрировали нацеливание на селезенку и подмышечные лимфатические узлы мышей с опухолями. Репрезентативные изображения ПЭТ (Фиг. 9) на 6 день после введения ^{89}Zr -DFO-mAb1 демонстрируют более высокое нацеливание ^{89}Zr -DFO-mAb1 на опухоль, селезенку и подмышечные лимфатические узлы в дозе, составляющей 0,03 мг/кг, по сравнению с дозой, составляющей 5 мг/кг.

Таблица 10

Биораспределение *ex vivo* на 6 день после введения ^{89}Zr -DFO-mAb1, введенного путем инъекции в дозах белка, составляющих 5, 3, 0,1 или 0,03 мг/кг, мышам NSG с опухолями Raji/hPBMC. Значения приведены в виде среднего и стандартного отклонения от % ID/г и соотношений сигнала опухоль:кровь

Образец	^{89}Zr -DFO- mAb1 5 мг/кг		^{89}Zr -DFO- mAb1 0,3 мг/кг		^{89}Zr -DFO- mAb1 0,1 мг/кг		^{89}Zr -DFO- mAb1 0,03 мг/кг	
	Среднее % ID/г	Станд. откл. % ID/г	Среднее % ID/г	Станд. откл. % ID/г	Среднее % ID/г	Станд. откл. % ID/г	Среднее % ID/г	Станд. откл. % ID/г
Кровь	18,45	1,69	12,17	3,20	8,13	4,28	7,81	5,37
Опухоль	20,52	5,34	40,43	8,09	33,26	10,81	48,92	28,53
Тимус	7,78	0,64	6,57	2,04	7,98	4,71	3,22	2,43
Сердце	5,5	0,45	3,74	0,57	2,79	1,14	2,39	1,47
Легкие	10,14	0,54	8,30	2,40	9,72	1,63	8,14	1,08
Селезенка	7,74	0,17	22,32	13,82	103,68	126,79	59,20	40,84
Тонкая кишка	1,82	0,23	1,43	0,20	0,80	0,44	1,19	0,23
Печень	4,51	0,26	5,56	1,16	9,75	3,87	10,75	5,58
Почка	6,73	0,99	6,17	1,28	5,77	1,59	5,49	1,56
Кость	8,78	1,75	8,39	3,10	8,87	2,64	9,83	1,54
Соотношение сигнала опухоль:кровь	1,10	0,21	3,46	1,05	5,44	3,60	9,71	8,27

Пример 7. Количественное определение с помощью LC-PRM-MS LAG3 в ксенотрансплантатах Raji/PBMC и клинических образцах.

Образцы замороженной ткани (опухоли Raji/PBMC, селезенка мыши и ткань меланомы; см. фиг. 12 в отношении источника и характеристик тканей меланомы) лизировали буфером для лизиса (8 М мочевины в 50 мМ N NH_4HCO_3 с 1% RapiGest). Ткани разрезали на маленькие кусочки и гомогенизировали с помощью 1 мл буфера для лизиса в плотно прилегающем гомогенизаторе Даунса. Лизат инкубировали на льду в течение 30 мин с обработкой ультразвуком в течение 30 с каждые 10 мин для достижения полной экстракции белка. Лизат центрифугировали при 14000 г в течение 10 мин. Концентрацию белка измеряли с помощью анализа ВСА. Каждый образец разбавляли до 1 мг/мл, затем центрифугировали при 14000

g в течение 10 мин и хранили в аликвотах при -80°C .

Лизат селезенки мыши NSG без имплантированной опухоли использовали в качестве суррогатных матриц для получения стандартной кривой для количественного определения LAG3. LAG3.Fc добавляли в каждый из 100 мкг лизата селезенки мыши в конечной концентрации в диапазоне от 0,39 до 50 нг/мг белка (серийное разведение 1:2). Стандарты, ксенотрансплантаты и клинические лизаты меланомы осаждали в 900 мкл холодного ацетона в течение ночи и затем денатурировали в 90 мкл 8 М буфера мочевины/TCEP при 37°C в течение 1 ч, пептид LAG3 человека с интенсивным включением метки (FVWS-SLDTPSQR¹³C6¹⁵N4) добавляли ко всем образцам в качестве внутреннего стандарта. Стандарты и исследуемые образцы алкилировали с помощью IAA при комнатной температуре в течение 30 мин и расщепляли лизином-С (1:100 мас./мас.) в течение 4 ч, затем трипсином (1:20 мас./мас.) в течение ночи при 37°C . Образцы гасили с помощью 10% FA до достижения конечного объема, составляющего 100 мкл.

Каждый обработанный образец (2 мкл) вводили в предварительно уравновешенную предколонку папо-С18 и отделяли с помощью разделительной колонки Easy папо-С18. Скорость потока составляла 250 нл/мин (подвижная фаза А: вода:муравьиная кислота/100:0,1 (об.:об.) и подвижная фаза В: ацетонитрил:муравьиная кислота/100:0,1 (об.:об.)). Время удерживания и площадь пика определяли с использованием программного обеспечения Skyline. Калибровочную кривую получали путем построения графика зависимости площади пика эталонного стандарта LAG3.Fc (немеченый пептид LAG3 FVWS-SLDTP-SQR¹²C6¹⁴N4, полученный в результате триптического расщепления hLAG3) к внутреннему стандарту (меченный стабильным изотопом пептид LAG3). Концентрацию LAG3 в каждом образце рассчитывали с использованием линейной регрессии. Самая низкая концентрация эталонного стандарта LAG3 (0,39 нг/мг белка) находилась в пределах динамического диапазона анализа и ее определяли как нижний предел количественного определения анализа.

Обобщение результатов и выводы

Количественное определение LAG3 проводили на образцах ткани из 4 ксенотрансплантатов PBMC/Raji от 27 дней, 5 ксенотрансплантатов через 15 дней после имплантации опухоли и 10 клинических образцов меланомы. Масса ткани, количества белка, выход при экстракции и экспрессия LAG3 приведены в табл. 11. Вmax рассчитывали на основе следующего уравнения с оценкой плотности опухоли при 1 г/мл.

$$\text{Вmax (нМ)} = \frac{\text{LAG3 (нг/мг белка)} \times \text{общее количество белка (мг)} \times 10\text{E6}}{5,74 * 10\text{E4} \times \text{масса опухоли (мг)}}$$

Обнаружили, что пять из 10 образцов ткани меланомы являлись LAG3-положительными со средним уровнем экспрессии, составляющим $2,52 \pm 1,87$ нМ. Этот уровень экспрессии аналогичен модели Raji/PBMC через 27 дней ($3,79 \pm 1,93$ нМ) и через 15 дней ($6,06 \pm 4,04$ нМ). Смотрите табл. 11, а также фиг. 10.

Таблица 11

		Масса	Общее	%	Lag3	Vmax
		ткани	количество	белка	(нг/мг	(нМ)
		(мг)	белка (мг)		белка)	
Ткань меланомы	131815T2(3)	290	9,1	3,14%	BLQ	BLQ
	131719T2(3)	230	17,6	7,65%	BLQ	BLQ
	13841T2(1)	220	20,1	9,14%	0,73	1,16
	13788T2(4)	250	24,1	9,64%	1,04	1,75
	13765T2(2)	250	19,4	7,76%	BLQ	BLQ
	131778T2(5)	180	9,2	5,11%	BLQ	BLQ
	131291T2(1)	240	17,4	7,25%	0,84	1,06
	131086T6(1)	180	9,32	5,18%	BLQ	BLQ
	13547T2(1)	220	16,1	7,32%	2,42	3,08
	13524T2(7)	200	13	6,50%	4,90	5,53
	Среднее	226	15,5	6,87%	1,99	2,52
	SD	34	5,2	1,96%	1,76	1,87
Ксенотрансплантат Raji/PBMC (27 дней)	85100_0	419,5	20,9	4,98%	4,74	4,10
	85101_8	248,9	10,3	4,14%	1,58	1,14
	85104_23	256,5	9,74	3,80%	6,24	4,12
	85103_19	112,5	5,92	5,26%	6,32	5,78
	Среднее	259	11,72	4,54%	4,72	3,79
	SD	126	6,43	0,69%	2,21	1,93
Ксенотрансплантат Raji/PBMC (15 дней)	213_1	140	8,8	6,29%	11,46	12,5
	213_2	260	10,14	3,90%	4,54	3,08
	213_3	230	9,3	4,04%	7,22	5,09
	213_4	160	7,9	4,94%	2,95	2,54
	213_5	50	2,8	5,60%	7,23	7,05
	Среднее	168	7,8	4,95%	6,68	6,06
	SD	82	6,43	0,69%	2,21	1,93

Пример 8. Положительная регуляция экспрессии LAG-3 и PD-1 человека в отношении Т-клеток в микроокружении опухоли путем терапии с помощью REGN2810 (антитело к PD-1 человека) и mAb1 (антитело к LAG-3 человека).

Этот эксперимент проводили для оценки модуляции уровней экспрессии LAG-3 и PD-1 человека на Т-клетках в микроокружении опухоли при лечении с помощью REGN2810 и mAb1 с использованием патентованного дважды гуманизированных иммунокомпетентных мышей PD-1^{hu/hu}/LAG-3^{hu/hu} компании Regeneron. Линия опухолевых клеток, используемая в этом эксперименте, представляет собой клеточную линию карциномы толстой кишки мыши MC38 (полученную от NCI в Frederick, MD, Laboratory of Tumor Immunology and Biology), которая была самостоятельно разработана для экспрессии полноразмерного куриного овальбумина, слитого с eGFP, таким образом, упоминается в настоящем документе как MC38-sOVA/eGFP. Уровень экспрессии LAG-3 человека оценивали ex vivo как на CD4, так и на CD8 Т-клетках из ферментативно диссоциированных опухолей, экстрагированных из двойных гуманизированных мышей с опухолями. Все поверхностное окрашивание выполняли с помощью коммерчески доступного флуорохрома, непосредственно конъюгированным с антителами (антитело к LAG-3 человека: eBioscience, клон 3DS223H; антитело к PD-1 человека: BioLegend, клон EH12.2H7), следуя стандартному протоколу. Вкратце, опухолевые клетки один раз промывали PBS, один раз промывали ледяным буфером для окрашивания, окрашивали коммерчески доступным флуорохромом, непосредственно конъюгированным с антителом к PD-1 человека или к LAG-3 человека в буфере для окрашивания в течение 30 мин на льду в темноте, снова промывали с помощью 2 мл PBS. Закрепляемый краситель eFluor506 также включали в соответствии с протоколом производителя (eBioscience). Данные от образцов получали на BD FAC-SCanto II™ IVD10, оборудованном DIVA v8. Данные дополнительно анализировали с помощью FlowJo

го лечения, исключали из анализа PD-1 человека. Аналогичным образом, группы, получившие лечение с помощью mAb1 и комбинированного лечения, также исключали из анализа LAG-3 человека. После двух терапевтических доз REGN2810 значительно увеличил частоту LAG-3+ CD4 Т-клеток человека в микроокружении опухоли на ~24% ($p=0,0006$), хотя, по-видимому, он играл прямую модулирующую роль в экспрессии LAG-3 на CD8 Т-клетках с исследованной схемой введения доз. Интересно, что mAb1 также увеличивал частоту положительных в отношении PD-1 человека CD4 ($p=0,0026$) и CD8 Т-клеток ($p=0,0249$) в микроокружении опухоли на ~28%, соответственно. См. фиг. 11.

Результаты исследований, проведенных согласно настоящему документу, ясно демонстрируют, что антитело к LAG3, меченное с помощью ^{89}Zr , может значительно и специфически локализоваться в опухолях. Можно представить сценарий, в котором антитело к LAG3 используют при выборе пациентов с LAG3-положительными опухолями для последующего лечения с помощью ингибиторов LAG3, отдельно или в комбинации с другими противораковыми терапевтическими средствами, включая в себя ингибиторы ветки сигнального каскада PD-1/PD-L1.

Пример 9. Увеличенный в масштабе производственный процесс получения конъюгатов DFO с антителом к LAG3.

В этом пример детально изложен увеличенный в масштабе производственный процесс получения антитела к LAG3, подходящего для введения радиоактивной метки, путем прикрепления р-SCN-Bn-дефероксамина (DFO) к антителу к LAG3 (mAb, H4sH15482P), описанному в настоящем документе: (1) процессы ультрафильтрации и диафильтрации (UFDF) перед конъюгированием mAb удаляют вспомогательные вещества, которые ингибируют процесс конъюгирования; (2) после UFDF перед конъюгированием проводят конъюгирование mAb с р-SCN-Bn-дефероксаминном для получения конъюгатов DFO-mAb; и (3) UFDF после конъюгирования для удаления остаточных солей обеспечивает подходящую концентрацию, содержание вспомогательных веществ и pH конъюгированного моноклонального антитела. Полученные конъюгаты DFO-mAb затем предоставляются в забуференном состоянии с улучшенной стабильностью для последующего получения состава.

(1) Ультрафильтрация и диафильтрация перед конъюгированием (UFDF).

100 г mAb подвергали буферной замене на 5 мМ ацетатный буферный раствор, характеризующийся pH 5,50, с использованием мембраны Sius Prostream (TangenX Technology Corporation) (емкость мембраны $\leq 500 \text{ г/м}^2$) для удаления остаточных солей перед конъюгированием. Объем процесса уменьшали, чтобы дополнительно сконцентрировать антитело, затем антитело стерильно фильтровали с использованием мембраны Sartopore 2 (Sartorius), характеризующуюся 0,45/0,2 мкм (гетерогенный двойной слой PES) или эквивалентным размером пор. Температуру ацетатного буфера поддерживали при целевой температуре, составляющей $20 \pm 5^\circ\text{C}$. Растворы хорошо перемешивали.

(2) Конъюгирование.

Концентрированное и отфильтрованное антитело (20 г) переносили в сосуд для конъюгирования, содержащий карбонатную буферную систему без амина (56 мМ карбонат, 167 мМ хлорид натрия, pH 9,40), что приводило к незначительным содержаниям остаточного ацетата. DFO (25 мМ р-SCN-Bn-дефероксамин) солибутилизировали в DMSO и добавляли в сосуд для конъюгирования вместе с дополнительным DMSO, так что DMSO присутствовал в конечном количестве, составляющем 5%. DFO добавляли в молярном избытке при соотношении DFO к mAb 4,5:1. Общий объем реакции составлял 2,0 л. Буферную систему перемешивали в течение всего времени добавления ингредиентов реакции и в течение всего времени реакции.

Температуру реакции контролировали в течение определенного времени с использованием уравнения, которое связывает температуру с временем реакции. В этом случае температуру реакции поддерживали на уровне $20 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 180 мин. Реакцию гасили добавлением 2М уксусной кислоты (23 мл/л), что давало в результате раствор с pH, составляющим 6.

(3) UFDF после конъюгирования.

После стадии конъюгирования гашеный раствор для конъюгирования DFO-mAb подвергали буферному обмену на гистидиновый буфер (10 мМ гистидин, pH 5,50, с добавлением 0,0005% (мас./объем) суперрафинированного полисорбата 80 в качестве защитного средства от сдвига) для удаления остаточных технологических солей, DMSO и непрореагировавшего DFO. После диафильтрации раствор концентрировали и затем составляли. Гистидиновый буфер выбирали для длительного хранения белка при -80°C . Ту же самую мембрану Sius Prostream, упомянутую на стадии (1), использовали на последней стадии UFDF. Полученный концентрированный раствор конъюгата DFO-mAb стерильно фильтровали с использованием фильтра Sartopore 2, упомянутого выше.

Определение DAR в УФ (мишень 1,5) и определение концентрации белка выполняли, как описано в примере 2.

Таблица 14

Молярные коэффициенты экстинкции и молекулярная масса

Антитело	MW (г·моль ⁻¹)	ϵ_{280} (л·г ⁻¹ см ⁻¹)	ϵ_{252} (л·г ⁻¹ см ⁻¹)
H4sH15482P	145709	223400	87077

Пример 10. Иммуно-ПЭТ-визуализация LAG3 в опухолях с использованием меченного ⁸⁹Zr конъюгата DFO с антителом к LAG3 у пациентов с метастатической меланомой.

Первичная цель этого исследования состоит в определении безопасности и переносимости конъюгата ⁸⁹Zr-DFO-антитело к LAG3, в котором антитело к LAG3, используемое в меченном радиоактивным изотопом конъюгате, представляет собой H4sH15482P. Критерии оценки эффективности контролируют нежелательные явления и рутинные лабораторные тесты на безопасность.

Вторичные цели исследования представляют собой следующее.

Часть исследования А. Определить ПЭТ ⁸⁹Zr-DFO-антитело к LAG3 в качестве биомаркера для оценки экспрессии LAG3 в опухолях. Это будет достигнуто путем оценки безопасности радиоактивного индикатора для ПЭТ ⁸⁹Zr-DFO-антитело к LAG3, определения оптимальной массовой дозы радиоактивного индикатора и оптимального времени визуализации после инъекции, установления взаимосвязи ПЭТ-сигнала опухоли с экспрессией LAG3 в ткани и оценки дозиметрии у пациентов. Часть А содержит схему последовательного наращивания дозы радиоактивного индикатора с биопсией опухоли. Визуализация и взятие крови в дни 1, 4 и 7 после инъекции радиоактивного индикатора позволяют установить следующее: SUV крови (стандартизованное значение накопления радиоизотопа) с последующим расчетом соотношения опухоль: кровь во время визуализации; клиническая дозиметрия, основанная на поглощенной тканью дозе излучения и эффективной дозе, рассчитанной на основе данных получения ПЭТ-изображения и концентрации активности радиоактивного индикатора в крови; стандартизированные значения накопления (SUV - концентрация активности с поправкой на распад в ткани-мишени, деленная на среднюю концентрацию активности в организме во время инъекции) для представляющих интерес областей опухоли; максимальные значения SUV в представляющих интерес областях опухоли (ROI) (SUV_{max}); и концентрация активности радиоактивного индикатора в плазме с расчетом площади под кривой (AUC₀₋₇ дней).

Часть исследования В. Изучить конструктивную и критериальную достоверность ПЭТ с использованием ⁸⁹Zr-DFO-антитела к LAG3 путем корреляции сигнала ПЭТ с тканевой экспрессией LAG3 и клиническим результатом (частота объективного ответа и выживаемость без прогрессирования) после 10 терапии. Последовательное иммуно-ПЭТ-сканирование и биопсии опухолей выполняют до и после лечения стандартными видами иммунотерапии, выбранными из следующих: ниволумаб, ипилимумаб, пембролизумаб и комбинации, как разрешено на этикетке.

Применимость индикатора иммуно-ПЭТ (iPET) можно первоначально оценить путем испытания на способность обнаруживать присутствие опухолей LAG3, а также изменений в сигнале LAG3, вызванных общепринятой иммунотерапией, и путем изучения корреляции сигнала иммуно-ПЭТ с клиническими результатами (критериальная достоверность: по отношению к биологически и клинически значимых результатам).

Можно определить безопасную оптимальную массовую дозу ⁸⁹Zr-DFO-антитело к LAG3, которая показывает адекватное поглощение опухолью с помощью ПЭТ, РК индикатора и дозиметрии. Выбор трех уровней массовой дозы индикатора основан на доклинических исследованиях с использованием ксенотрансплантата мыши и биораспределении, а также на клинических и доклинических данных с использованием немеченых терапевтических антител к LAG3. Планируемое повышение массовой дозы составляет 2 мг, 5 мг и 10 мг. Подход заключается в использовании доз, которые являются субтерапевтическими или фармакологически инертными, чтобы не препятствовать предполагаемой противоопухолевой терапии.

Оптимальная массовая доза продемонстрирует SUV опухоли, максимальное SUV (SUV_{max}) в пределах представляющей интерес области опухолевого очага (ROI) и соотношение опухоль: кровь, все из которых составляют >1 (и в идеале соотношение опухоль: кровь составляет 3-4) в по меньшей мере один очаг (в идеале >1 очага у пациентов с несколькими метастазами).

Активность индикатора в плазме (или сыворотке) и/или объединенное SUV крови (показатели активности РК для этого исследования) будут обнаруживать в течение 7-дневного окна визуализации после введения доз, что указывает на адекватную доступность индикатора для компартиментализации в опухолевые очаги. Соотношения сигнала в опухоли и в крови будут основываться на SUV, хотя можно использовать и другие единицы концентрации активности. То же самое относится к измерениям концентрации активности в крови, которые могут быть представлены в абсолютных единицах или нормированных единицах.

Интенсивность ПЭТ-сигнала LAG3 в очаге, подвергнутом биопсии, будет зависеть от степени экспрессии LAG3 при биопсии ткани с использованием полуколичественных измерений.

Авторадиографический ПЭТ-сигнал LAG3 будет пространственно коррелировать с экспрессией LAG3 в образцах биопсии ткани.

Интенсивность ПЭТ-сигнала LAG3 будет увеличиваться после лечения с помощью иммунотерапии.

Интенсивность ПЭТ-сигнала LAG3 будет коррелировать с ответом после лечения с помощью иммунотерапии.

Кроме того, поисковые цели и критерии оценки эффективности включают в себя определение экспрессии LAG3 в биоптатах ткани в корреляции с поглощением опухолью ⁸⁹Zr-DFO-антитела к LAG3 с использованием иммуногистохимии, RNAscope, жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ/МС) и авторадиографии. Только для части В поисковые цели включают в себя измерение изменений сигнала ⁸⁹Zr-DFO-антитела к LAG3 после лечения и корреляцию сигнала ⁸⁹Zr-DFO-антитела к LAG3 с клиническим результатом после лечения. Критерии оценки эффективности включают в себя SUV, SUVmax, соотношение сигнала опухоль:кровь и клинический результат после лечения с помощью иммунотерапии (серийная КТ с целью расчета статуса пациента с объективным ответом с использованием RECIST 1.1 и объема опухоли), частоту объективного ответа и выживаемость без прогрессирования заболевания.

Целевая популяция пациентов.

Целевая популяция будет состоять из пациентов в возрасте 18 лет или старше с прогрессирующей метастатической меланомой, гистологически или цитологически подтвержденным диагнозом, по меньшей мере с одним очагом, поддающимся биопсии. Пациент должен характеризоваться показателем общего состояния по шкале ECOG, меньшим или равным 2, ожидаемой продолжительностью жизни не менее 3 месяцев и адекватным функционированием органов и костного мозга.

Включение пациентов с показанием, которое характеризуется высокой распространенностью мишени, поддержит оценку иммуно-ПЭТ-локализации опухоли LET3, которая является основным результатом исследования. Обнаружение и корреляция экспрессии LAG3 после иммунотерапии с клиническими результатами требует наличия популяции пациентов с хорошо изученными значениями процента пациентов с клиническим ответом на иммунотерапию. Пациенты с метастатической меланомой представляют собой популяцию пациентов с установленными значениями процента пациентов с объективным ответом на ингибиторы контрольных точек, а также с высокими уровнями распространенности и экспрессии LAG3.

Дизайн исследования.

Исследование включает в себя часть А (конструктивная достоверность) и часть В (критериальная достоверность). Продолжительность исследования составляет 9 недель для части А (4 недели скрининга, 1 неделя введения доз индикатора, сканирования и биопсии, 4 недели последующего наблюдения для оценки безопасности) и 18 недель для части В (4 недели скрининга, 1 недели введения доз индикатора, сканирования и биопсии, вплоть до 8 недель на иммунотерапию, 1 неделя введения второй дозы индикатора и сканирования, 4 недели последующего наблюдения для оценки безопасности).

Часть А.

Часть А представляет собой исследование по определению дозы, в котором пациенты получают однократную дозу индикатора, после чего проводят серийное сканирование и биопсию в течение 7 дней. Как только завершена последовательность сканирования и биопсия, субъекты могут немедленно получить лечение с помощью схемы стандартной иммунотерапии (антитело к PD-1 отдельно или в комбинации с антителом к CTLA4 в соответствии с показанием, указанным в инструкции).

Когорты, получающие дозы, в части А.

Часть А включает три последовательные когорты дозы, состоящие из 3 пациентов, с возможностью расширения когорты в общей сложности до 6 пациентов (дизайн 3 + 3). Решения об увеличении дозы будут основаны на: а) безопасности и б) оценке положительного результата иммуно-ПЭТ. Ограничивающую дозу токсичность, (DLT), определяют как нежелательное явление (АЕ) степени 3 или выше (NTCAE), связанное или, возможно, связанное с ⁸⁹Zr-DFO-антителом к LAG3, через одну неделю после введения индикатора. Для гематологических лабораторных АЕ DLT определяют как 4 класс или выше. Положительный результат анализа поглощения опухоли/локализацию опухоли определяют с помощью соотношения сигнала опухоль: кровь, составляющего больше чем 1. Адекватное значение РК определяют с помощью SUV в крови в диапазоне 1-5 при оптимальном времени визуализации (4 или 7 дней после инъекции).

Расширение когорты до 6 пациентов произойдет, если будет выполнено любое из следующих условий: (а) ровно 1 пациент испытывает DLT или (б) по меньшей мере 1 пациент из 3 показывает локализацию опухоли и адекватное значение РК и не больше чем 1 пациент испытывает DLT.

При завершении комплектации когорты из 3 или 6 субъектов повышение дозы будет происходить до более высокой доступной дозы, если менее 3 пациентов в расширенной когорте испытывают DLT.

Часть А исследования прекращают, если выполняется любое из следующих условий (правила останова части А): более чем 1 пациент в когорте испытывает DLT; более 3 пациентов демонстрируют визуальную локализацию опухоли и адекватное значение РК в каждой из двух последовательных расширенных когорт; или более высокие дозы не доступны для эскалации дозы.

При достижении правила останова части А, дозу для части В выбирают следующим образом: а)

если две или три расширенные когорты показывают более 3 пациентов с локализацией опухоли и адекватным значением РК, то будут выбирать когорту дозы с локализацией опухоли у большего количества пациентов или с самым высоким соотношением сигнала опухоль/кровь. Когда они одинаковы между когортами, будут выбирать более низкую дозу; b) если одна когорта показывает более 3 пациентов с локализацией опухоли и адекватным значением РК, то будут выбирать эту дозу, c) если никакие когорты не показывают более 3 пациентов с локализацией опухоли и адекватным значением РК, исследование прекращается без перехода к части В.

Часть В.

В части В будут измерять иммуно-ПЭТ-сигнал LAG3 при определенной дозе индикатора и в момент времени после инъекции (определенный в части А), как до, так и после иммунотерапии, чтобы оценить гипотезы, касающиеся роли LAG3 в качестве индикатора воспалительного ответа опухоли (поисковые цели). Все пациенты в части В получат оптимальную массовую дозу индикатора и визуализацию в такое время после инъекции, как идентифицировано в части А.

Пациенты части В будут получать иммуно-ПЭТ-сканирование LAG3 на исходном уровне, а также биопсию до начала терапии. Затем пациенты получат стандартную иммунотерапию (в настоящее время это блокаторы пути PD-1 и CTLA-4 на основе моноклональных антител), как указано на этикетке. Через четыре-восемь недель проведут дополнительное иммуно-ПЭТ-сканирование с последующей повторной биопсией, если это возможно.

Пациенты в части А, которые получили оптимальную массовую дозу индикатора и достигли адекватного качества сканирования, могут удовлетворять критериям включения в часть В и получить в общей сложности две инъекции индикатора иммуно-ПЭТ. Общее количество субъектов в части В (включая в себя те, которые входят в часть А) не будет превышать 20.

Соображения в отношении биопсии

Очаги будут отбирать для биопсии на основе доступности и размера (с диаметром, как правило, по меньшей мере 20 мм). Все пациенты будут проходить биопсию на исходном уровне в последний день первого набора иммуно-ПЭТ-сканирования, независимо от того, является ли иммуно-ПЭТ-исследование положительным или нет. Таким образом, ткани от пациентов с широким спектром тканевой экспрессии LAG3 будут собирать для корреляции с сигналом LAG3, включая в себя отрицательных пациентов. Биопсию будут назначать не позднее, чем через 7 дней от даты введения с помощью инъекции, чтобы минимизировать задержку терапии для пациента.

Последовательность оценок начинается с биопсии, за которой следует введение дозы индикатора и сканирование, а затем начало терапии может являться предпочтительным по практическим причинам.

Для части В можно предпринять вторую биопсию после второго сканирования, если это возможно, и она будет необязательной. Последующие биопсии возьмут из того же участка, если это практически возможно.

Авторадиографические исследования будут выполнять в подгруппе подвергнутых биопсии опухолей, которые являются положительными при иммуно-ПЭТ-сканировании, со соседними срезами, окрашенными в отношении LAG3.

Исследуемые воздействия

Часть А.

После скрининга каждый субъект получит дозу ^{89}Zr -ДФО-антитела к LAG3 с последующими тремя последовательными иммуно-ПЭТ-сканированиями в течение 6-7 дней. Начальная доза будет составлять 2 мг, как определено в исследованиях на животных и моделировании. Не позднее, чем через 1 день после последнего иммуно-ПЭТ-сканирования, субъект подвергнется биопсии под рентгенологическим контролем. Если возможно, архивный биоптат опухолевой ткани будет также проанализирован с помощью ИГХ в отношении экспрессии LAG3.

Для Части А биопсия является необязательной, поскольку не все субъекты получают в конечном итоге определенную оптимальную дозу индикатора.

Решение о переходе к части В будет принято на основе данных части А и темпа набора пациентов в исследование.

Часть В.

После скрининга каждый пациент с меланомой получит ^{89}Zr -ДФО-антитела к LAG3 в оптимизированной массовой дозе (из части А) с последующим ПЭТ-сканированием в оптимальный момент времени после инъекции (из части А). Затем, не позднее, чем через 1 день после иммуно-ПЭТ-визуализации, субъекта будут подвергать радиологической биопсии очага. Впоследствии пациент будет проходить лечение открытым способом с помощью доступных одобренных схем иммунотерапии (дозированными в соответствии с указаниями на этикетке). Субъекты будут проходить повторное сканирование через 4-8 недель после начала иммунотерапии. Вторая биопсия после второго сканирования может быть предпринята, если это возможно, и будет необязательной.

Всех пациентов будут подвергать скринингу с помощью ^{18}F -FDG ПЭТ/КТ-сканирования. КТ-часть ПЭТ/КТ должна характеризоваться диагностическим качеством или диагностическая КТ, полученная в течение периода скрининга, должна быть доступна для оценки местоположения и размера очагов. Эти

изображения будут использовать для оценки очагов в отношении метаболической активности/жизнеспособности и соответствующих размеров.

Варианты осуществления и примеры, описанные выше, предназначены только для иллюстрации и не являются ограничивающими. Специалисты в настоящей области техники поймут или смогут установить с помощью не более чем рутинных экспериментов, многочисленные эквиваленты конкретных соединений, материалов и процедур. Все такие эквиваленты считаются находящимися в объеме и включены в прилагаемую формулу изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Меченный радиоактивным изотопом конъюгат антитела, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают ген 3 активации лимфоцитов (LAG3), и позитронный излучатель, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 418 варибельной области тяжелой цепи (HCVR) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 426 варибельной области легкой цепи (LCVR).

2. Конъюгат по п.1, дополнительно содержащий хелатирующий фрагмент.

3. Конъюгат по п.1 или 2, в котором указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связаны с одним или несколькими фрагментами согласно формуле (A):

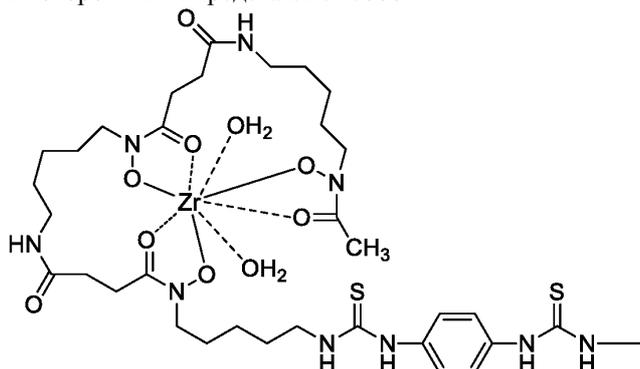


где L представляет собой хелатирующий фрагмент; M представляет собой позитронный излучатель; и z независимо в каждом случае равен 0 или 1; и где по меньшей мере один из z равен 1.

4. Конъюгат по п.2, причем хелатирующий фрагмент содержит десферриоксамин.

5. Конъюгат по любому из пп.1-4, в котором позитронный излучатель представляет собой ^{89}Zr .

6. Конъюгат по п.3, в котором -L-M представляет собой



в котором Zr представляет собой позитронный излучатель ^{89}Zr .

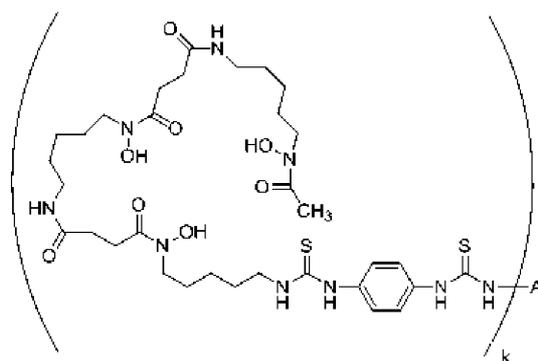
7. Конъюгат по любому из пп.1-6, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связаны с одним, двумя или тремя фрагментами согласно формуле (A).

8. Конъюгат по любому из пп.1-7, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 420; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 422; и HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 424; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 428; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 430; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 432.

9. Конъюгат по любому из пп.1-8, в котором антитело содержит HCVR согласно SEQ ID NO: 418; и LCVR согласно SEQ ID NO: 426.

10. Способ визуализации ткани, которая экспрессирует LAG3, предусматривающий введение меченного радиоактивным изотопом конъюгата антитела по любому из пп.1-9 в ткань; и визуализацию экспрессии LAG3 путем визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

11. Соединение согласно формуле (III)



где А представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают LAG3, и k равно от 1-30, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарности области тяжелой цепи (HCDR) в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 418 вариательной области тяжелой цепи (HCVR) и три определяющие комплементарности области легкой цепи (LCDR) в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 426 вариательной области легкой цепи (LCVR).

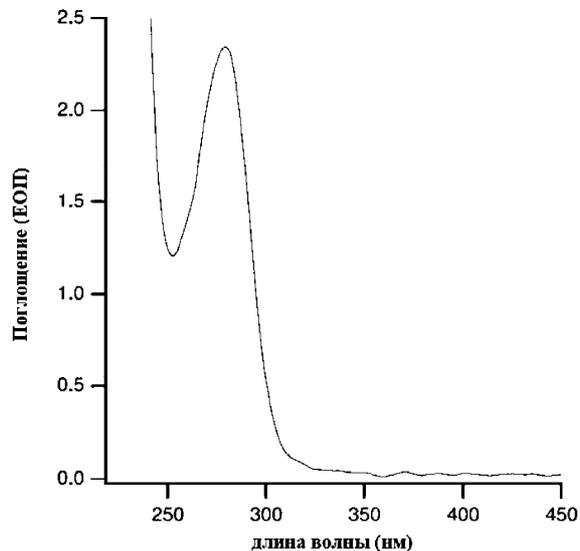
12. Соединение по п.11, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей вариательной области тяжелой цепи (HCVR)/вариательной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 418/426.

13. Соединение по п.11, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 420; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 422; и HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 424; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 428; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 430; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 432.

14. Соединение по любому из пп.11-13, в котором k меньше или равно 2.

15. Соединение по любому из пп.11-13, в котором k равно 1 или 2.

Спектр mAb1-DFO в УФ/видимой области спектра



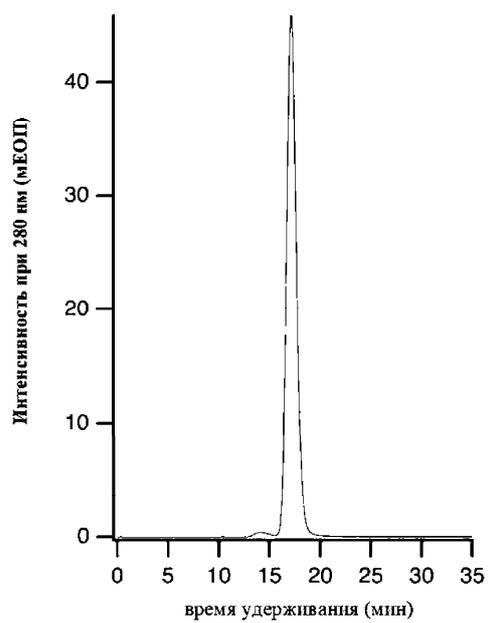
10-кратное разведение в PBS

Фиг. 1

043673

Эксклюзионная ВЭЖХ mAb1-DFO

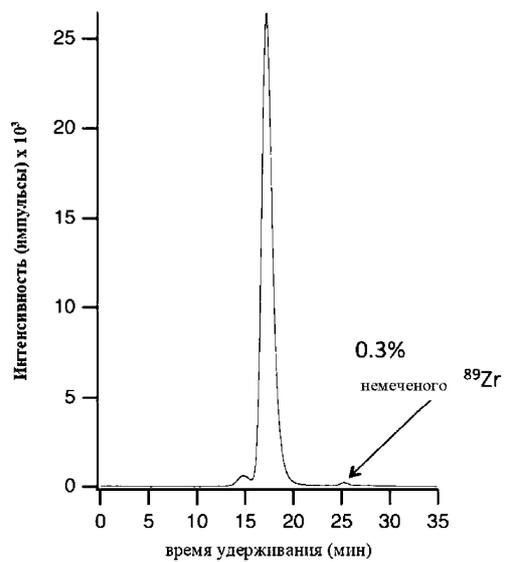
Мономерная чистота : 99%



25 мкг инъекции
Superdex 200 в PBS

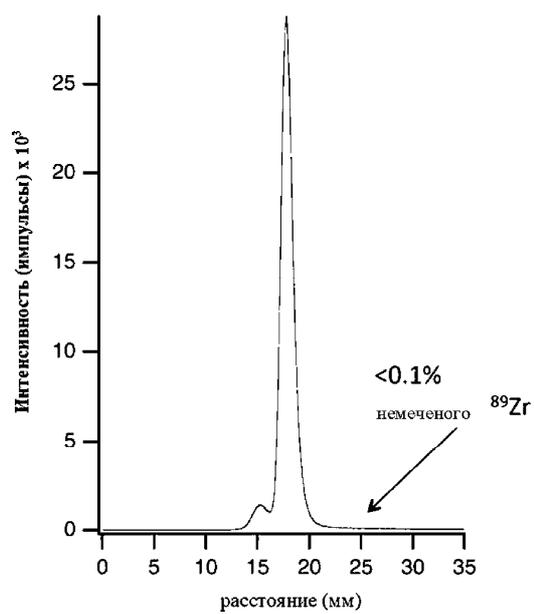
Фиг. 2

Гель-фильтрация с обнаружением радиоактивной метки
изотипический контроль-DFO-⁸⁹Zr



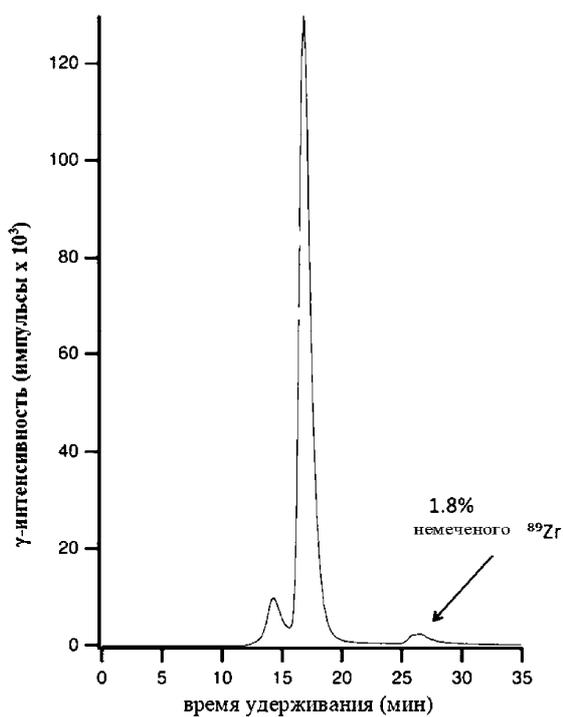
Фиг. 3

Гель-фильтрация с обнаружением радиоактивной метки
mAb1-DFO-⁸⁹Zr



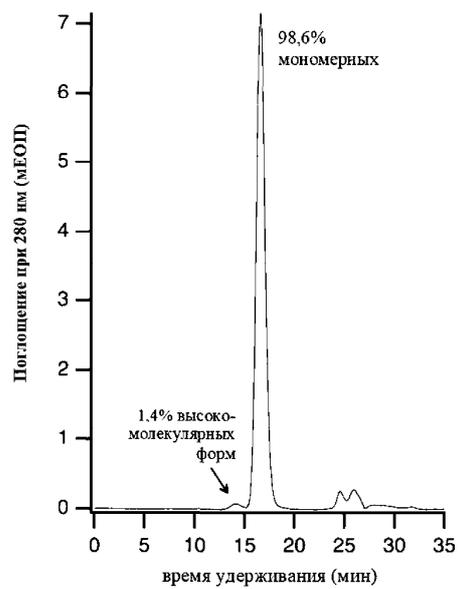
Фиг. 4

Гель-фильтрация с обнаружением радиоактивной метки
mAb1-DFO-⁸⁹Zr



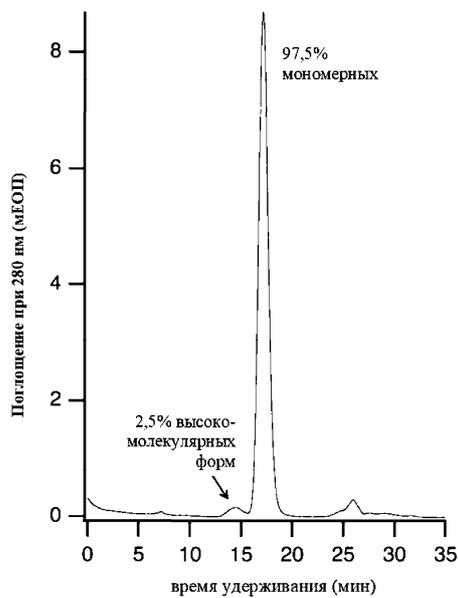
Фиг. 5

Гель-фильтрация в УФ (UV-SEC):
изотип-DFO-⁸⁹Z



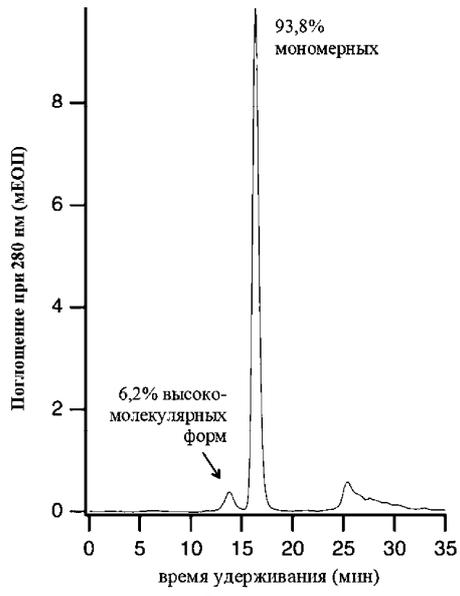
Фиг. 6

Гель-фильтрация в УФ (UV-SEC):
mAb1-DFO-⁸⁹Z



Фиг. 7

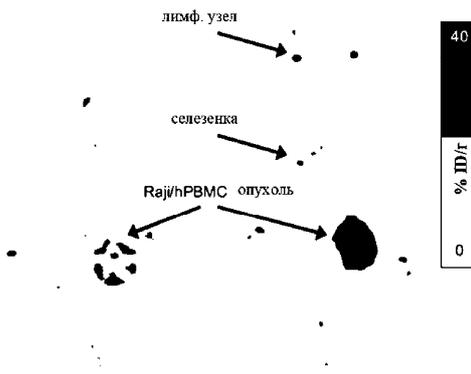
Гель-фильтрация в УФ (UV-SEC):
mAb1-DFO-⁸⁹Z



Фиг. 8

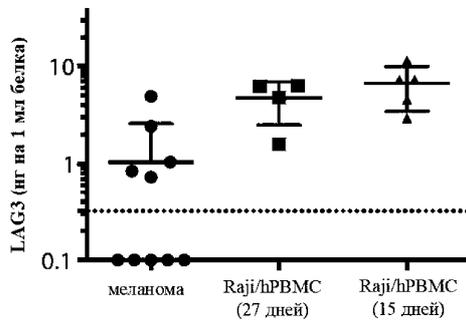
Ms 01 : 5 мг/кг

Ms 14 : 0.03 мг/кг

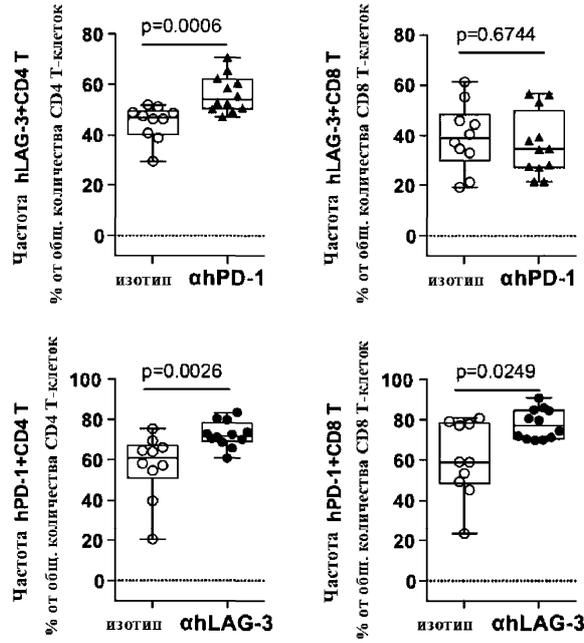


Фиг. 9

Экспрессия LAG3
(нг/мл общего белка)



Фиг. 10



Статистический анализ проводили с использованием непарного непараметрического t-критерия Манна-Уитни

Фиг. 11

Информация об образцах ткани меланомы

ID образца	пол	возраст	этнич.	тип образца	матрица	диагноз	гист. диагноз	TNM	стадия	Уровень инвазии по Кларку	микроста- дирование по Бреслоу, см	размер опухоли, см	мета- стазы	дата операции	содерж. опухоли, %	Масса, г
13181512(3)	М	45	европеоид	FF	кожа	меланома	меланома из эпителиоидн. клеток	T4bN3M0	IIIС	V	1	1.8x1x1	9/9 лимф. узл.	03/16/2015	95	0.9
13171912(3)	М	58	европеоид	FF	кожа	меланома	веретеноклеточн. меланома	T4bN0M0	IIС	V	1	6x5x1	нет	09/23/2014	100	0.8
1384112(1)	Ж	51	европеоид	FF	кожа	меланома	меланома из смешан. клеток	T4aN0M0	IIВ	IV	1.3	3.5x3.5x1.3	нет	02/08/2010	100	0.8
1378812(4)	Ж	63	европеоид	FF	кожа	меланома	веретеноклеточн. меланома	T4bN1bM0	IIIС	III	2.5	7 см	1/1 лимф. узл.	10/23/2009	100	0.7
1376512(2)	М	56	европеоид	FF	кожа	меланома	меланома из эпителиоидн. клеток	T4bN3M0	IIIС	III	0.7	2.5x1.5	6/6 лимф. узл.	08/26/2009	90	0.8
13177812(5)	М	58	европеоид	FF	кожа	меланома	меланома из эпителиоидн. клеток	T4bN3M0	IIIС	V	30 мм	5x3x3	11/17 лимф. узл.	12/15/2014	100	0.7
13129112(1)	Ж	33	европеоид	FF	кожа	меланома	меланома из невоядн. клеток	T4bN3M0	IIIС	III	15 мм	3x1.5	6/6 лимф. узл.	03/15/2012	100	1
13108616(1)	М	59	европеоид	FF	кожа	меланома	меланома из эпителиоидн. клеток	T4aN0M0	IIВ	V	10 мм	2.5 см	нет	05/12/2011	75	0.6
1354712(1)	М	73	европеоид	FF	кожа и жир. ткань	меланома	меланома из эпителиоидн. клеток	рецидив	рецидив	III	15 мм	N/A	1/18 лимф. узл.	05/21/2008	100	0.9
1352412(7)	Ж	44	европеоид	FF	кожа	меланома	меланома из эпителиоидн. клеток	T4bN2aM0	IIIС	III	22 мм	2 см	2/12 лимф. узл.	01/24/2008	100	0.65

Фиг. 12



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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