

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391397 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.09.20(22) Дата подачи заявки  
2021.11.29(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)  
C12N 15/13 (2006.01)  
C12N 15/85 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)(54) МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ LAG-3 И ЕГО  
АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202011436581.5

(32) 2020.12.10

(33) CN

(86) PCT/CN2021/133941

(87) WO 2022/121720 2022.06.16

(71) Заявитель:

БЕЙДЗИН ДУНФАН БАЙОТЕК КО.,  
ЛТД; БЕЙДЗИН ЦЗИНИТАЙСЯН  
ТЕКНОЛОЖИ ДИВЕЛОПМЕНТ КО.  
ЛТД. (CN)

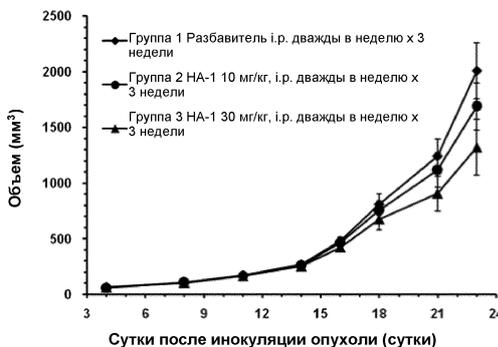
(72) Изобретатель:

Бай И, Чжоу Цзюньцзе, Лю Сы (CN)

(74) Представитель:

Билык А.В., Поликарпов А.В.,  
Соколова М.В., Путинцев А.И.,  
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев  
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.  
(RU)

(57) Изобретение относится к области биомедицины и, в частности, предлагает моноклональное антитело против LAG-3 и его антигенсвязывающий фрагмент и их применение. Моноклональное антитело против LAG-3 содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи. Моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из любого из А-1, А-2, А-3 и А-4. Предложенное моноклональное антитело может специфически связываться с LAG-3, обладает относительно высокой аффинностью и хорошей биологической активностью и может быть использовано для лечения различных видов рака или иммунологических заболеваний. Рак включает лейкоз, рак легкого, рак желудка, рак пищевода, рак яичника, рак головы и шеи, меланому, рак почки, рак молочной железы, колоректальный рак, рак печени, рак поджелудочной железы или рак мочевого пузыря; и иммунологическое заболевание включает псориаз, болезнь Крона, ревматоидный артрит, первичный билиарный цирроз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, язвенный колит и аутоиммунный гепатит.



A1

202391397

202391397

A1

PCT/CN2021/133941

МПК: *C07K 16/28* (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)*C12N 15/13* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)*C12N 15/85* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

## **МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ LAG-3 И ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки на изобретение**

В настоящей заявке на изобретение заявлен приоритет Заявки на китайский патент 202011436581.5, поданной 10 декабря 2020 года, включенной здесь путем ссылки.

### **Область изобретения**

Настоящее изобретение относится к технической области биологической медицины, и, в частности, относится к моноклональному антителу против LAG-3 и его антигенсвязывающему фрагменту и их применению.

### **Предшествующий уровень техники**

Иммунотерапия является наиболее популярным способом лечения рака в настоящее время и известна как третья революция в лечении рака. Так называемая “иммунотерапия рака” является терапевтическим способом атаки на раковые клетки с помощью аутоиммунной системы организма человека. Баланс между иммунной системой и раковыми клетками представляет собой динамичный процесс длительной игры, и как положительно вовлечен, так и переплетен. Иммунные клетки здорового организма могут обнаруживать и убивать раковые клетки, но при индукции различных врожденных и приобретенных факторов иммунная система может потерять абсолютное преимущество и даже “подстрекается” раковыми клетками и помогает возникновению и развитию рака. Надежда была на таргетное лекарство ввиду его точности, но раковые клетки склонны к развитию лекарственной устойчивости из-за их изменчивости и сложности. Поэтому точность также вполне бесполезна. По этой причине ингибиторы контрольных точек иммунного ответа при лечении рака постепенно становятся горячей точкой исследования с момента обнаружения CTLA-4 (гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4) и PD-1 (белок программируемой гибели клеток).

С появлением иммунологической противораковой терапии ген активации лимфоцитов-3 (LAG-3) постепенно распознается как потенциальный рецептор контрольных точек иммунного ответа. Сообщается о том, что LAG-3 играет важную роль в стимулировании активности регуляторных Т-клеток и замедляющей активации и

пролиферации Т-клеток (Workman CJ et al., J. Immunol., 2005; 174: 688-695). Также LAG-3 известен как CD223. Этот ген содержит 8 экзонов и расположен на хромосоме 12 человека (мышьяная хромосома 6). LAG-3 относится к суперсемейству иммуноглобулинов и состоит из 3 частей внеклеточной области, трансмембранной области и цитоплазматической области. Этот ген кодирует трансмембранный белок I типа, состоящий из 498 аминокислот. LAG-3 широко экспрессируется на поверхностях активированных NK-клеток, Т-клеток и других иммунных клеток, может отрицательно регулировать функции лимфоцитов, и было доказано в части исследований, что он играет важную роль в аспектах опухолевых и аутоиммунных заболеваний.

Доклинические исследования показывают, что ингибирование LAG-3 позволяет Т-клеткам восстановить цитотоксичность, таким образом ограничивая рост опухолей и усиливая уничтожающее опухоли действие. В то же самое время, ингибирование LAG-3 также снижает способность регуляторных Т-клеток подавлять иммунный ответ. Следовательно, LAG-3 является рецептором контрольной точки иммунного ответа, который может регулировать функции Т-клеток, ингибирование LAG-3 более полезно для пациентов, особенно с опухолями, содержащими экспрессирующие LAG-3 иммунные клетки. Таким образом, LAG-3 считается более привлекательной мишенью, чем другие белки контрольных точек иммунного ответа. В существующих мишенях контрольных точек иммунного ответа второго поколения LAG-3 является мишенью с большим количеством клинических данных и относительно определенной лекарственной способностью. Ввиду вышеизложенного важность существования LAG-3, чтобы удовлетворить потребностям пациентов с опухолями или другими иммунологическими заболеваниями дома и за границей, срочно необходимо развивать моноклональное антитело против LAG-3 с относительно высокой биологической активностью.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

Для того, чтобы удовлетворять потребностям внутреннего рынка, в настоящем изобретении путем скрининга иммунной библиотеки получены моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут специфически связываться с LAG-3 и обладают относительно высокой биологической активностью.

Конкретные технические решения в соответствии с настоящим изобретением

являются следующими.

В настоящем изобретении предложено моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит 3 определяющие комплементарности области тяжелой цепи, соответственно, представленные HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и переменная область легкой цепи содержит 3 определяющие комплементарности области легкой цепи, соответственно, представленные LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из любого из следующего:

A-1: определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 1, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 2, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 3, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 4, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 5, и определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 6;

A-2: определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 1, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 2, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 3, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 4, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 7, и определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 8;

A-3: определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR1 содержит

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 9, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 10, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 11, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 12, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 13, и определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 14; и

A-4: определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 15, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 16, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 17, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 18, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 19, и определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 20.

Моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, могут специфически связываться с LAG-3 и обладают более хорошей связывающей аффинностью. Блокирование LAG-3 может обращать ингибирующее действие LAG-3 в отношении Т-клеток, усиливать активность Т-клеток, уменьшать количество регуляторных Т-клеток, и также улучшать чувствительность Т-клеточного иммунного ответа, и, таким образом, могут использоваться для лечения иммунологических заболеваний или видов рака.

Кроме того, моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой молекулу мышинового антитела, которая выбрана из любого из

следующего:

МА-1: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 21, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 22;

МА-2: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 21, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 23;

МА-3: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 24, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 25;

и

МА-4: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 26, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 27;

и

предпочтительно, молекула мышинного антитела представляет собой МА-1.

В настоящем изобретении мышей иммунизируют антигеном LAG-3 путем иммунизации мышей, оптимизируют способ иммунизации, подтверждают библиотеку фагового дисплея и посредством скрининга отбирают молекулу мышинного антитела с относительно высокой аффинностью, лучшей активностью и стабильностью. Большое количество экспериментов на клеточном уровне подтвердило, что по сравнению с другими 3 молекулами мышинных антител, МА-1 обладает более высокой биологической активностью. Таким образом, в настоящем изобретении предпочтительно выбирают МА-1.

Кроме того, молекула мышинного антитела дополнительно содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, где константная область тяжелой цепи представляет собой одно из мышинного IgG1 (иммуноглобулин G1) типа, IgG2a типа, IgG2b типа и IgG3 типа, константная область тяжелой цепи IgG1 типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 29, константная область тяжелой цепи IgG2a типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 30, константная область тяжелой цепи IgG2b типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 31, и константная

область тяжелой цепи IgG3 типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 32; и константная область легкой цепи представляет собой мышиную C<sub>k</sub> цепь с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID No: 28; и

предпочтительно, константная область тяжелой цепи представляет собой мышиный IgG1 тип.

Кроме того, моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой молекулу химерного антитела, которая содержит переменную область тяжелой цепи молекулы мышиного антитела, переменную область легкой цепи молекулы мышиного антитела и константную область гуманизированного антитела; константная область гуманизированного антитела содержит константную область тяжелой цепи гуманизированного антитела и константную область легкой цепи гуманизированного антитела, константная область тяжелой цепи гуманизированного антитела представляет собой одно из человеческого IgG1 типа, IgG2 типа или IgG4 типа, константная область тяжелой цепи IgG1 типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 39, константная область тяжелой цепи IgG2 типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 40, и константная область тяжелой цепи IgG4 типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 41; и константная область легкой цепи гуманизированного антитела представляет собой человеческую C<sub>k</sub> цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 42; и

предпочтительно, константная область тяжелой цепи гуманизированного антитела представляет собой человеческий IgG4 тип.

Молекула химерного антитела содержит последовательность переменной области молекулы мышиного антитела и константную область человеческого антитела, и конструкцию молекулы химерного антитела используют для подтверждения того, что константная область в соответствии с настоящим изобретением не изменяет функцию CDR после гуманизации, что обеспечивает основу для дальнейшего исследования и разработки молекулы гуманизированного антитела.

Кроме того, моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой молекулу гуманизированного антитела, и молекула гуманизированного антитела выбрана из любого из следующего:

HA-1: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 33, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 34;

HA-2: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 33, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 35;

HA-3: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 36, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 35;

HA-4: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 36, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 34;  
и

HA-5: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 37, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 38;  
и

предпочтительно, молекула гуманизированного антитела представляет собой HA-1.

В соответствии с настоящим изобретением молекулу гуманизированного антитела получают после скрининга гуманизации. Экспериментальные подтверждения *in-vivo* и *in-vitro* демонстрируют, что среди 5 молекул гуманизированного антитела, предложенных в настоящем изобретении, HA-1 обладает относительно высокой аффинностью и наиболее значимым лекарственным действием, так, что HA-1 предпочтительно выбран в настоящем изобретении.

Кроме того, молекула гуманизированного антитела дополнительно содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, где константная область тяжелой цепи представляет собой одно из человеческого IgG1 типа, IgG2 типа, или IgG4 типа, константная область тяжелой цепи IgG1 типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 39, константная область тяжелой цепи IgG2 типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 40, константная область тяжелой цепи IgG4 типа имеет аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID No: 41, и константная область легкой цепи представляет собой человеческую C<sub>κ</sub> цепь с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID No: 42; и

предпочтительно, константная область тяжелой цепи представляет собой человеческий IgG4 тип.

Кроме того, молекула гуманизированного антитела представляет собой полноразмерное антитело или фрагмент антитела, где молекула гуманизированного антитела содержит одно или комбинацию более чем одного из Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fv или ScFv.

В настоящем изобретении дополнительно предложен полипептид или белок, содержащий моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В настоящем изобретении дополнительно предложена полинуклеотидная последовательность или комбинация, кодирующая аминокислотную последовательность моноклонального антитела против LAG-3 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В настоящем изобретении дополнительно предложен вектор экспрессии рекомбинантной ДНК, содержащий указанную полинуклеотидную последовательность или комбинацию.

В настоящем изобретении дополнительно предложена клетка-хозяин, трансфицированная вектором экспрессии рекомбинантной ДНК, где клетка-хозяин включает прокариотическую клетку, клетку дрожжей, клетку насекомого или клетку млекопитающего; и

предпочтительно клетка-хозяин представляет клетку млекопитающего, и клетка млекопитающего представляет собой клетку HEK293E, клетку CHO или клетку NS0.

В настоящем изобретении дополнительно предложено лекарственное средство или фармацевтическая композиция, содержащие моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В настоящем изобретении дополнительно предложено применение моноклонального антитела против LAG-3 или его антигенсвязывающего фрагмента в приготовлении лекарственного средства для лечения видов рака или иммунологических заболеваний;

предпочтительно, виды рака включают лейкоз, рак легкого, рак желудка, рак пищевода, рак яичников, рак головы и шеи, меланому, рак почки, рак молочной железы,

колоректальный рак, рак печени, рак поджелудочной железы или рак мочевого пузыря; и иммунологические заболевания включают псориаз, болезнь Крона, ревматоидный артрит, первичный билиарный цирроз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, язвенный колит и аутоиммунный гепатит.

В настоящем изобретении дополнительно предложено применение моноклонального антитела против LAG-3 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с моноклональным антителом против PD-1 (белок программируемой гибели клеток) в изготовлении лекарственного средства для лечения рака или иммунологического заболевания.

Кроме того, моноклональное антитело против PD-1 содержит DFPD1-9, DFPD1-10, DFPD1-11, DFPD1-12, DFPD1-13, ниволумаб, пембролизумаб, торипалимаб, синтилимаб, тизлелизумаб, камрелизумаб, пенпулимаб или зимберелимаб.

Предпочтительно моноклональное антитело против PD-1 представляет собой DFPD1-10, и DFPD1-10 содержит переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID No: 45, и переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID No: 43.

Предпочтительно моноклональное антитело против PD-1 представляет собой ниволумаб.

Предпочтительно рак выбран из лейкоза, рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака яичников, рака головы и шеи, меланомы, рака почки, рака молочной железы, колоректального рака, рака печени, рака поджелудочной железы или рака мочевого пузыря; и иммунологическое заболевание включает псориаз, болезнь Крона, ревматоидный артрит, первичный билиарный цирроз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, язвенный колит и аутоиммунный гепатит.

Настоящее изобретение обладает следующими благоприятными действиями: моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем изобретении, могут специфически связываться с LAG-3, обладают относительно высокой аффинностью и очень хорошей биологической активностью, и могут быть использованы для лечения различных видов рака или иммунологических заболеваний. Рак включает без ограничения лейкоз, рак легкого, рак желудка, рак пищевода, рак яичников, рак головы и шеи, меланому, рак почки, рак молочной железы, колоректальный рак, рак печени, рак поджелудочной железы или рак мочевого пузыря; и иммунологическое заболевание включает без ограничения псориаз,

болезнь Крона, ревматоидный артрит, первичный билиарный цирроз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, язвенный колит и аутоиммунный гепатит.

### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1 представляет собой профиль плазмиды вектора pScFv-Disb-HS в Примере 2 настоящего изобретения.

Фиг. 2 демонстрирует сравнение относительных аффинностей фаговых моноклональных антител против LAG-3 в ELISA (иммуноферментный анализ) с градиентным разведением в Примере 3 настоящего изобретения.

Фиг. 3 представляет собой профиль вектора pTSE в Примере 5 настоящего изобретения.

Фиг. 4 демонстрирует электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях молекул мышинных антител в Примере 5 настоящего изобретения.

Фиг. 5 демонстрирует сравнение связывающих способностей мышинных антител в отношении LAG-3 в Примере 6 настоящего изобретения.

Фиг. 6 демонстрирует секрецию цитокина IL-2 при помощи мышинового антитела в смешанной лимфоцитарной реакции (MLR) в Примере 7 настоящего изобретения.

Фиг. 7 демонстрирует электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях молекул гуманизированного антитела в Примере 12 настоящего изобретения.

Фиг. 8 демонстрирует сравнение связывающих аффинностей молекул гуманизированного антитела в отношении LAG-3 в Примере 15 настоящего изобретения.

Фиг. 9 демонстрирует активности молекул гуманизированного антитела против LAG-3, протестированных при помощи MLR в Примере 16 настоящего изобретения.

Фиг. 10 демонстрирует эффект тестирования моноклонального антитела против LAG-3 в соответствии с Примером 17 в отношении ингибирования колоректального рака MC38 у мышей.

Фиг. 11 демонстрирует оценку молекулярной термостабильности моноклонального антитела против LAG-3, представляющего собой белок HA-1, в Примере 18 настоящего изобретения.

Фиг. 12 представляет собой график кривой роста объема опухоли для моноклонального антитела против LAG-3 в комбинации с моноклональным антителом против PD-1 в модели колоректального рака MC38 в Примере 22 настоящего изобретением.

Фиг. 13 представляет собой столбчатую диаграмму массы опухоли для моноклонального антитела против LAG-3 в комбинации с моноклональным антителом против PD-1 в модели колоректального рака MC38 в Примере 22 настоящего изобретения.

### **Подробное описание воплощений**

Чтобы легче понять настоящее изобретение, перед описанием примеров сначала проиллюстрированы ниже некоторые технические и научные термины в соответствии настоящим изобретением.

Используемый здесь термин “LAG-3” относится к гену активации лимфоцитов-3. LAG-3 здесь включает, без ограничения ими, LAG-3, экспрессирующийся в форме димера (например, CD223, хорошо известный в области техники) на поверхностях активированных Т-клеток, клеток NK и В-клеток, и растворимую форму LAG-3, обнаруживаемую в человеческой сыворотке крови, причем все называются здесь как LAG-3.

Используемый здесь термин “антитело” включает целое антитело и любой его антигенсвязывающий фрагмент. Антитело включает мышинное антитело, гуманизированные антитело, биспецифическое антитело или химерное антитело. Антитело также может представлять собой Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fv или ScFv (одноцепочечное антитело), и может представлять собой природное антитело или также измененное антитело (например с мутацией, делецией, заменой и т.д.).

Здесь используются термины “вариабельная область” и “константная область”, а именно, область последовательности около сегментов N тяжелой цепи и легкой цепи антитела, которая представляет собой вариабельную область (V область), а остальная аминокислотная последовательность около сегментов C, которая является относительно стабильной, представляет собой константную область (C область). Вариабельная область включает в себя 3 определяющие комплементарность области (CDR) и 4 каркасные области (FR), причем каждая вариабельная область легкой цепи и вариабельная область тяжелой цепи состоит из 3 CDR и 4 FR, где 3 CDR тяжелой цепи представлены HCDR1, HCDR2 и HCDR3, соответственно, и 3 CDR легкой цепи представлены LCDR1, LCDR2 и LCDR3, соответственно.

“Молекула мышинного антитела” при использовании здесь имеет происхождение из антитела, полученного после иммунизирующей инъекции мыши антигеном LAG-3.

Используемый здесь термин “молекула химерного антитела” относится к антителу, полученному путем слияния вариабельной области мышинового антитела с константной областью гуманизированного антитела, что может уменьшить иммунный ответ, индуцируемый мышинным антителом в человеческом организме. Химерное антитело получают путем встраивания генов вариабельной области легкой и тяжелой цепей мышинового моноклонального антитела в экспрессирующие векторы, содержащие константные области гуманизированного антитела, таким образом, что вариабельные области легкой цепи и тяжелой цепи в экспрессируемой молекуле антитела являются мышинными, тогда как константная область является гуманизированной, и около 2/3 целой молекулы антитела являются гуманизированными. Полученные таким образом антитела уменьшают иммуногенность мышинового антитела и в то же время сохраняют способность родительского антитела специфически связываться с антигеном.

Используемый здесь термин “молекула гуманизированного антитела” относится к прививанию CDR мышинового моноклонального антитела на вариабельные области гуманизированного антитела для замены CDR гуманизированного антитела таким образом, что гуманизированное антитело может приобретать антигенсвязывающую специфичность мышинового моноклонального антитела при снижении его гетерогенности.

Термин “клетка CHO” представляет собой клетку яичника китайского хомячка; термин “клетка HEK 293E” относится к клетке эмбриональной почки человека 293E; а термин “клетка NS0” означает клетку мышинной тимомы NS0.

Настоящее изобретение описано более подробно ниже со ссылкой на примеры.

### **Пример 1**

В примере 1 в соответствии с настоящим изобретением предложено моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент, а именно, содержащие вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит 3 определяющие комплементарность области тяжелой цепи, соответственно, представленные HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а вариабельная область легкой цепи содержит 3 определяющие комплементарность области легкой цепи, соответственно, представленные LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и где указанные моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из любого из следующего:

Комбинация	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
A-1	DTYMH	KIDPANGNTKYDPKFQG	DTTVGLDY	RASSSVNYMY	YTSKLAS	QQWSSNPHT
	(SEQ ID No:1)	(SEQ ID No:2)	(SEQ ID No:3)	(SEQ ID No:4)	(SEQ ID No:5)	(SEQ ID No:6)
A-2	DTYMH	KIDPANGNTKYDPKFQG	DTTVGLDY	RASSSVNYMY	YTSNLAP	QQFTSSP5MT
	(SEQ ID No:1)	(SEQ ID No:2)	(SEQ ID No:3)	(SEQ ID No:4)	SEQ ID No:7	(SEQ ID No:8)
A-3	GYSFTSY	WIFPGTGNTRYNEKFKG	IGGRLTGDAMDY	RASESVDSYGN5FMH	LASNLES	QQNNEPWT
	(SEQ ID No:9)	(SEQ ID No:10)	(SEQ ID No:11)	(SEQ ID No:12)	(SEQ ID No:13)	(SEQ ID No:14)
A-4	ГYAVH	VTWSGGSTDYNTAFISR	LDGTFDY	TASSSVSSYLH	STSNLAS	HQYHRSPTT
	(SEQ ID No:15)	(SEQ ID No:16)	(SEQ ID No:17)	(SEQ ID No:18)	(SEQ ID No:19)	(SEQ ID No:20)

## Пример 2. Скрининг молекулы мышинового антитела

В соответствии с настоящим изобретением мышей иммунизировали антигеном LAG-3, способ иммунизации оптимизировали, получали библиотеку фагового дисплея, и конструкция, скрининг и идентификация специфической библиотеки фагового дисплея были следующими.

Стадия 1: иммунизация мышей антигеном LAG-3

1. Экспериментальные животные:

виды и штаммы: самки мышей BALB/c;

масса: 18-20 г; и

поставщик экспериментальных животных: Beijing HFK Bioscience Co., Ltd.

2. Иммунизация: мышей иммунизировали, и иммунный антиген представлял собой человеческий LAG-3 (ген синтезировали в GenScript Biotech Corporation (Nanjing), конструировали вектор и белок экспрессировали и очищали в компании авторов изобретения).

Стадия 2: Конструирование фаговой библиотеки антител

Отбирали мышинные спленоциты с более высоким титром, общую РНК из мышинных спленоцитов экстрагировали с помощью реактива Trizol (приобретенного в Ambion с № по каталогу 15596026), кДНК получали с помощью RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией), PCR амплификацию проводили с использованием кДНК в качестве матрицы и вырожденных праймеров (используемые вырожденные праймеры относятся к ссылке: Journal of Immunological Methods, 233(2000), 167-177), и таким образом получали библиотеку генов варибельной области тяжелой цепи (VH) и библиотеку генов варибельной области легкой цепи (VL) антитела у иммунизированных мышей, легкую цепь и тяжелую цепь, соответственно, расщепляли двумя ферментами и связывали с вектором, который также постадийно расщепляли

ферментом для конструирования библиотеки генов pScFv-Disb-HS-VH-VL, вектор PscFv-DisB-HS был модифицирован из вектора pComb3 (приобретенного в Biovector Science Lab, Inc) при помощи серий способов клонирования генов, таким образом, что вектор использовали для конструирования и экспрессии фаговой библиотеки одноцепочечных антител. Модифицированный вектор был назван как вектор pScFv-Disb-HS, его полученный плазмидный профиль представлен на Фиг.1, и была сконструирована фаговая библиотека антител иммунизированных мышей на основе этого вектора.

Стадия 3: пробирку для иммунной библиотеки покрывали LAG-3 в качестве антигена, где количество покрывающего антигена составляло 5 мкг/500 мкл/пробирку, и покрытие проводили при 4°C в течение ночи, пробирку для иммунной библиотеки и иммунную фаговую библиотеку антител блокировали при комнатной температуре в течение 1 часа с помощью смеси 4% обезжиренное сухое молоко/PBST (забуференный фосфатом физиологический раствор с твином), соответственно. Блокированную иммунную фаговую библиотеку антител добавляли в пробирку для иммунной библиотеки с входным количеством фагов приблизительно  $10^9$ - $10^{12}$  для связывания антиген-антитело, после реакции при комнатной температуре в течение 1 часа несвязанные фаги отмывали PBST-PBS, элюирование проводили с помощью 0,1 М глицин-HCl при pH 2,2, и, наконец, элюированный раствор фаговых антител нейтрализовали до pH 7,0 с помощью 1,5 М трис-HCl при pH 8,8.

Стадия IV: 10 мл раствора бактерий TG1, выросших до логарифмической фазы, инфицировали нейтрализованными фагами, оставляли раствор в инкубаторе при 37°C в течение 30 мин, часть бактериального раствора извлекали для градиентного разбавления и наносили в планшет 2YTAG для расчета выхода фагов. Оставшийся бактериальный раствор центрифугировали, супернатант отбрасывали, и бактериальный осадок ресуспендировали в небольшом количестве культуральной среды, отсасывали и наносили покрытием в большой планшет 2YTAG для подготовки к следующему раунду скрининга.

Стадия V: нанесенные на планшет инфицированные бактерии соскребли с большого планшета, инокулировали в жидкую культуральную среду 2YTAG, встряхивали до логарифмической фазы и для суперинфицирования добавляли хэлперный фаг M13KO7, бактерии культивировали в течение ночи при 220 об./мин при 28°C для получения фагов, и фаги осаждали и очищали при помощи PEG

(полиэтиленгликоль)/NaCl для следующего раунда скрининга для осуществления раунда обогащающего скрининга фаговой библиотеки.

Стадия VI: скрининг клона, положительного в отношении LAG-3 фагового одноцепочечного антитела: после раунда скрининга хорошо отделяемые моноклональные колонии собирали, инокулировали в 96-луночный планшет, содержащий жидкую культуральную среду 2YTAG, культивировали при 37°C в условиях 220 об./мин до логарифмической фазы роста, добавляли приблизительно  $10^{10}$  хелперных фагов M13KO7 на лунку и осуществляли статическое инфицирование при 37°C в течение 30 мин. Проводили центрифугирование при 4000 об./мин в течение 15 мин, супернатант отбрасывали, бактериальный осадок ресуспендировали с 2YTAG, и бактерии культивировали в течение ночи при 28°C в условиях 220 об./мин. После центрифугирования при 4000 об./мин и 4°C в течение 15 мин амплифицированный фаговый супернатант отсасывали для идентификации при помощи ELISA, наконец отбирали четыре молекулы мышиных антител против LAG-3 с относительно высокой аффинностью, названные, соответственно, как MA-1, MA-2, MA-3 и MA-4, полученные моноклональные антитела подвергали секвенированию генов для определения правильности последовательностей антител, и после секвенирования последовательности 4 моноклональных антител, отобранных выше, были следующими:

Молекула мышиного антитела	Последовательность вариабельной области тяжелой цепи	Последовательность вариабельной области легкой цепи
MA-1	SEQ ID No:21	SEQ ID No:22
MA-2	SEQ ID No:21	SEQ ID No:23
MA-3	SEQ ID No:24	SEQ ID No:25
MA-4	SEQ ID No:26	SEQ ID No:27

В частности, SEQ ID No:21 (аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи MA-1 и MA-2):

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQRPEQGLEWIGKID  
PANGNTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSRLTSEDVAVYYCARDTTVGLDYWGQ  
GTTLTVSS;

SEQ ID No: 22 (аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи МА-1):

DIVITQSTAIMSASLGEKVTMSCRASSSVNYMYWYQQKSDASPKLWIYYTSKL  
ASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPHTFGGGTKLEIK;

SEQ ID No: 23 (аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи МА-2):

DIVLTQTPAIMSASLGEKVTMSCRASSSVNYMYWYQQKSDASPKLWIYYTSN  
LAPGVPARFSGSGSGNSYSLTISSMEGEDAATYYCQQFTSSPSMTFGGGTKLEIK;

SEQ ID No: 24 (аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи МА-3):

EVKLEESGPELVKPGASVKISCKASGYSFTSYYIHWVKQRPQGGLWIGWIFP  
GTGNTRYNEKFKGKATLTADTSSSTVYMQLSGLTSEDSAVYFCARIGGRLTGDAMDY  
WGQGTSVTVSS;

SEQ ID No: 25 (аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи МА-3):

DIVLTQSTASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYL  
ASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEPWTFGGGTKLEIK;

SEQ ID No: 26 (аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи МА-4):

QVKLEESGPELVQPSQSLTCTVSAFSLTTYAVHWVRQSPGKGLEWLGVVWS  
GGSTDYNTAFISRLNITKDNSKSQVFFKMNSLQANDTAIYYCARLDGTFFDYWGQGT  
TLTVSS; и

SEQ ID No: 27 (аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи МА-4):

DIVLTQTPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSN  
LASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPPTFGGGTKLEIK.

### **Пример 3. Сравнение аффинностей фаговых моноклональных антител против LAG-3 путем градиентного разведения**

4 молекулы мышинных антител (МА-1, МА-2, МА-3 и МА-4), полученные в Примере 2, подвергали дисплею и очистке моноклональных фагов, затем фаги подвергали эксперименту ELISA с градиентной элюцией для идентификации аффинности, и в качестве контрольного антитела выбирали моноклональное антитело

против LAG-3, предложенное в заявке на патент CN105992595A. Конкретный способ был следующим.

100 нг/лунку/100 мкл LAG-3 покрывали раствором карбонатной буферной системы при pH 9,6 в течение ночи при 4°C и трижды промывали PBST, 4 фаговые моноклональные антитела, отобранные в результате скрининга в Примере 2, соответственно разбавляли PBST в трехкратном градиенте, и 100 мкл разбавленного образца добавляли в каждую лунку и хранили при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшет для ELISA промывали PBST, и в этот планшет для ELISA добавляли HRP (пероксидаза хрена)-анти-M13 моноклональное антитело, разведенное в PBST, и хранили при комнатной температуре в течение 1 ч. Развитие окраски осуществляли при помощи набора TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид) для развития окраски при комнатной температуре в течение 10 минут, и останавливали при помощи 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Считывание осуществляли при 450 нм/630 нм, рассчитывали соответствующую величину EC<sub>50</sub> (полуМаксимальная эффективная концентрация), и конкретные данные были следующими:

Клон	MA-1	MA-2	MA-3	MA-4	Контрольное антитело
EC <sub>50</sub>	0,010	0,058	0,024	0,117	0,115

Как видно из вышеприведенных данных и Фиг. 2, все 4 различных молекулы мышинных антител, отобранные в Примере 2, могут связываться с LAG-3. Моноклональные антитела, предложенные в настоящем изобретении, обладают относительно высокой аффинностью в отношении LAG-3.

#### **Пример 4**

На основе Примера 2 в Примере 4 настоящего изобретения дополнительно определили, что молекула мышинового антитела дополнительно содержала константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, где константная область тяжелой цепи представляла собой одно из мышинового IgG1 типа, IgG2a типа, IgG2b типа и IgG3 типа, константная область тяжелой цепи IgG1 типа имела аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 29, константная область тяжелой цепи IgG2a типа имела аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 30, константная область тяжелой цепи IgG2b типа имела аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID No: 31, и константная область тяжелой цепи IgG3 типа имела аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 32; и константная область легкой цепи представляла собой мышиную C<sub>κ</sub> цепь с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID No: 28. Конкретные последовательности были следующими:

SEQ ID No: 28 (последовательность константной области легкой цепи мышинной C<sub>κ</sub> цепи):

ADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNS  
WTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECS;

SEQ ID No: 29 (последовательность константной области тяжелой цепи мышинного IgG1 типа):

AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTF  
PAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVP  
EVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREE  
QFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPP  
PKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSK  
LNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPG;

SEQ ID No: 30 (последовательность константной области тяжелой цепи мышинного IgG2a типа):

AKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFP  
AVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPA  
PNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQ  
THREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQV  
YVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSY  
FMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK;

SEQ ID No: 31 (последовательность константной области тяжелой цепи мышинного IgG2b типа):

AKTTPPSVYPLAPGCGDITGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHTFP  
ALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTVVDKLEPSGPISTINPCPPCKE  
CHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMLSLTPKVTCTVVDVSEDDPDVQISWVFNNE  
VHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGL  
VRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDS

DGSYFIYSKLNMKTSKWEKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK; и

SEQ ID No: 32 (последовательность константной области тяжелой цепи мышинового IgG3 типа):

ATTTAPSVYPLVPGCSDTSGSSVTLGCLVKGYFPEPVTVKWNYGALSSGVRTV  
SSVLQSGFYSSLVTVPSSTWPSQTVICNVAHPASKTELIKRIEPRIPKPSTPPGSSCPPG  
NILGGPSVFIFPPKPKDALMISLTPKVTCTVVDVSEDDPDVHVSWFVDNKEVHTAWT  
QPREAQYNSTFRVVSALPIQHQDWMRGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGRAQTP  
QVYTIPPPREQMSKKKVSILTCLVTNFFSEAISVEWERNGELEQDYKNTPPILDSGTYF  
LYSKLTVDTDSWLQGEIFTCSVVHEALHNHHTQKNLSRSPLELNETCAEAQDGELD  
GLWTTITIFISLFLLSVCYSASVTLFKVKWIFSSVVQVKQTAIPDYRNMIGQGA.

### **Пример 5. Получение молекулы мышинового антитела против LAG-3**

На основе Примера 4 в Примере 5 настоящего изобретения предпочтительно определено, что константная область тяжелой цепи молекулы мышинового антитела представляла собой мышиный IgG1 тип, и IgG1 тип содержал аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 29; и константная область легкой цепи представляла собой мышиную C<sub>κ</sub> цепь, и мышиная C<sub>κ</sub> цепь содержала аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 28. Способ получения антитела в частности включал следующие стадии.

1. Кодированные гены тяжелой цепи VH и легкой цепи VL 4 моноклональных антител, отобранных посредством скрининга в Примере 2, соответственно клонировали в вектор pTSE (смотри Фиг. 3), содержащий гены константных областей тяжелой цепи и легкой цепи, где предпочтительно константная область тяжелой цепи представляла собой константную область мышинового IgG1 типа (аминокислотная последовательность, представлена в SEQ ID No: 29), константная область легкой цепи представляла собой мышиную C<sub>κ</sub> цепь (аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID No: 28), и структура вектора pTSE представлена на Фиг. 3 (на способ получения вектора pTSE ссылка на стр. 3, абзац [0019] описания CN103525868A).

2. Вектор временно трансфицировали в клетки HEK293Es (приобретенные в Институте основной медицины Китайской Академии Медицинских Наук (Institute of Basic Medicine of Chinese Academy of Medical Sciences), кат. № GNHu43) для экспрессии антитела, 4 моноклональные антитела получали путем очистки на аффинной колонке с белком А с использованием прибора АКТА, где концентрацию белка измеряли при

помощи набора BSA (приобретенного в Beijing HuitianDongfang Technology Co., Ltd., Cat. No: BSA0020), и затем размер белка идентифицировали при помощи SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецисульфатом натрия). Результаты представлены на Фиг. 4, невосстановленные МА-1, МА-2, МА-3 и МА-4, белковый маркер молекулярной массы Маркер 1 и Маркер 2, и восстановленные МА-1, МА-2, МА-3 и МА-4 мышинные моноклональные антитела против LAG-3 последовательно представлены слева направо, и молекулярная масса каждой полосы согласовывалась с теоретическим значением.

#### **Пример 6. Эксперимент по связыванию мышинового антитела с LAG-3**

100 нг/лунку/100 мкл LAG-3 покрывали раствором карбонатной буферной системы при pH 9,6 в течение ночи при 4°C. LAG-3 пять раз промывали 300 мкл/лунку PBST, затем добавляли 1% BSA(бычий сывороточный альбумин)-PBST, LAG-3 блокировали при 37°C в течение 1 ч, добавляли мышинные антитела МА-1, МА-2, МА-3 и МА-4 с различными концентрациями разведений, где все 4 полноразмерных антитела обладали самой высокой исходной концентрацией 5 мкг/мл и соответственно были разбавлены в 3 раза, и по 12 градиентов получали для каждого антитела, и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Полученный продукт пять раз промывали 300 мкл/лунку PBST, затем добавляли анти-мышинный Fc, конъюгированный с пероксидазой хрена (Fc-HRP), разбавленный 1% BSA-PBST в соотношении 1:10000, и смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Развитие окраски осуществляли при помощи 100 мкл/лунку набора TMB для развития окраски при комнатной температуре в течение 8 минут, и останавливали при помощи 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Считывание осуществляли при 450 нм/630 нм, рассчитывали соответствующую величину EC<sub>50</sub>, и конкретные данные были следующими:

Клон	МА-1	МА-2	МА-3	МА-4
EC <sub>50</sub> (нг/мл)	10,08	25,99	255,9	22,12

Как видно из вышеприведенных данных и Фиг. 5 все 4 различающихся отобранных в результате скрининга мышинных антитела могут связываться с LAG-3. Кроме того, величина EC<sub>50</sub> для МА-1 среди 4 молекул мышинных антител была самая низкая. Последнее свидетельствует о том, что МА-1 обладает самой лучшей связывающей способностью и самой высокой аффинностью.

#### **Пример 7. Эффект мышинных антител на секретируемые количества**

### цитокина ИЛ-2 в смешанной лимфоцитарной реакции

Свежие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) разделяли при помощи центрифугирования в градиенте плотности, и CD14<sup>+</sup> Т-клетки отсортировывали при помощи магнитных шариков; эти CD14<sup>+</sup> Т-клетки выращивали в культуральной среде 20 нг/мл GM-CSF (колониестимулирующий фактор гранулоцитов-макрофагов) и 10 нг/мл ИЛ-4, культуральную среду меняли каждые 2 суток, и клетки индуцировали в дендритные клетки (DC) на 7-10 сутки. За двое суток до использования DC добавляли 25 нг/мл TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухоли альфа) для индукции DC в зрелые DC, и зрелые DC собирали и готовили клеточную суспензию с плотностью клеток  $1 \times 10^5$  клеток/мл. CD4<sup>+</sup> Т-клетки отсортировывали из PBMC при помощи магнитных шариков, подсчитывали и готовили клеточную суспензию с плотностью клеток  $1 \times 10^6$  клеток/мл. 100 мкл CD4<sup>+</sup> Т-клеток и DC отбирали и добавляли в 96-луночный планшет в соответствии с отношением 10:1.

Мышиные антитела МА-1, МА-2, МА-3 и МА-4, полученные в Примере 5, соответственно подвергали 4-кратному градиентному разведению, для каждого антитела устанавливали по 6 градиентов, 50 мкл каждого антитела затем отбирали и добавляли в 96-луночный планшет, определяли концентрацию ИЛ-2 после культивирования в течение 5 суток, считывание осуществляли при 450 нм, рассчитывали соответствующую величину EC<sub>50</sub>, и конкретные данные были следующими:

Клон	МА-1	МА-2	МА-3	МА-4
EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	0,024	0,030	0,076	0,121

Как видно из данных и Фиг. 6, все 4 отобранных посредством скрининга в настоящем изобретении молекулы мышиных антител обладали относительно хорошей активностью. Кроме того, из этих данных можно сделать вывод, что величина EC<sub>50</sub> для МА-1 была самой низкой среди этих 4 моноклональных антител, отобранных посредством скрининга в настоящем изобретении, и, таким образом, МА-1 обладает самой лучшей активностью. Таким образом, в настоящем изобретении молекула мышиного антитела МА-1 может быть гуманизирована.

### Пример 8

В примере 8 настоящего изобретения дополнительно определено, что моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляли собой

молекулу химерного антитела, которая содержала переменную область тяжелой цепи молекулы мышиного антитела, переменную область легкой цепи молекулы мышиного антитела и константную область гуманизированного антитела в примере 2; константная область гуманизированного антитела содержала константную область тяжелой цепи гуманизированного антитела и константную область легкой цепи гуманизированного антитела, константная область тяжелой цепи гуманизированного антитела представляла собой человеческий IgG1 типа, IgG2 типа или IgG4 типа, константная область тяжелой цепи IgG1 типа имела аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 39, константная область тяжелой цепи IgG2 типа имела аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 40, и константная область тяжелой цепи типа IgG4 имела аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 41; и константная область легкой цепи гуманизированного антитела представляла собой человеческую C<sub>κ</sub> цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 42.

SEQ ID No: 39 (аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи человеческого IgG1 типа):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP  
APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR  
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK;

SEQ ID No: 40 (аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи человеческого IgG2 типа):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECPAP  
PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV  
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFL  
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK;

SEQ ID No: 41 (аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи человеческого IgG4 типа):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE  
 FLGGPSVFLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK  
 PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV  
 YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL  
 YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK; и

SEQ ID No: 42 (аминокислотная последовательность константной области легкой цепи человеческой C<sub>κ</sub> цепи):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
 ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

#### **Пример 9. Получение молекулы химерного антитела**

На основе Примера 8 в Примере 9 настоящего изобретения дополнительно определено, что константная область тяжелой цепи молекулы химерного антитела представляла собой человеческий IgG4 типа, а константная область тяжелой цепи IgG4 типа имела аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 41; и константная область легкой цепи химерного антитела представляла собой человеческую C<sub>κ</sub> цепь с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID No: 42.

Конкретный способ получения был следующим.

Гены варибельной области тяжелой цепи VH (SEQ ID No: 21) и варибельной области легкой цепи VL (SEQ ID NO: 22) молекулы антитела MA-1, отобранные посредством скрининга из фаговой библиотеки антител в Примере 2, сохраняли неизменными мышинные последовательности, и они были клонированы в вектор pTSE (представленный на Фиг. 3), содержащий, соответственно, гены константной области тяжелой цепи и легкой цепи, где константная область тяжелой цепи представляла собой человеческий IgG4 типа (аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID No: 41) и константная область легкой цепи представляла собой человеческую C<sub>κ</sub> цепь (аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID No: 42). Вектор временно трансфицировали в клетки HEK293E (приобретенные в Институте основной медицины Китайской Академии Медицинских Наук (Institute of Basic Medicine of Chinese Academy of Medical Sciences), кат. №: GNHu43) для экспрессии антитела с получением химерного антитела CA-1.

#### **Пример 10. Гуманизация молекулы мышинового антитела MA-1**

Во первых, последовательность молекулы мышиноного антитела MA-1 в Примере 2 сравнивали с базой данных человеческих антител зародышевого типа (v-base), где легкие цепи и тяжелые цепи человеческого антитела зародышевого типа с относительно высокой гомологией отбирали в качестве последовательностей-кандидатов, и затем последовательности CDR молекулы мышиноного антитела MA-1 прививали на гуманизованную последовательность-кандидата для гомологичного моделирования. Затем, ключевые скелетные аминокислотные остатки, которые могут играть важную роль в поддержании петлевой структуры CDR, рассчитывали путем имитации трехмерной структуры, таким образом, чтобы конструировать обратную мутацию гуманизованного антитела.

Сконструированные гуманизованные переменные области, содержащие обратную мутацию легкой цепи и тяжелой цепи, оптимизировали и синтезировали в GenScript Biotech Corporation (Nanjing), и затем связывали с вектором для временной экспрессии. Комбинацию легкой цепи и тяжелой цепи, полученных путем гуманизации, анализировали с получением следующих молекул гуманизованных антител: HA1, HA-2, HA-3, HA-4, и HA-5, где последовательности отобранных 5 моноклональных антител были следующими:

Моноклональное антитело	Переменная область тяжелой цепи	Переменная область легкой цепи
HA-1	SEQ ID No:33	SEQ ID No:34
HA-2	SEQ ID No:33	SEQ ID No:35
HA-3	SEQ ID No:36	SEQ ID No:35
HA-4	SEQ ID No:36	SEQ ID No:34
HA-5	SEQ ID No:37	SEQ ID No:38

В частности, SEQ ID No: 33 (аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи HA-1 и HA-2):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDTYMHWRQAPGQGLEWIGKI  
DPANGNTKYDPKFQGRATITADTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARDTTVGLDYWG  
QGTLVTVSS;

SEQ ID No: 34 (аминокислотная последовательность переменной области легкой

цепи HA-1 и HA-4):

DIVITQSPAFLSVTPGEKVTITCRASSSVNYMYWYQQKPDASPKLWIYYTSKLA  
SGVPSRFSGSGSGTDYFTISSLEAEDAATYYCQQWSSNPHTFGGGTKVEIK;

SEQ ID No: 35 (аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи HA-2 и HA-3):

DIVITQSPAFLSVTPGEKVTITCRASSSVNYMYWYQQKPDQAPKLLIYYTSKLA  
SGVPSRFSGSGSGTDYFTISSLEAEDAATYYCQQWSSNPHTFGGGTKVEIK;

SEQ ID No: 36 (аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи HA-3 и HA-4):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYNITDTYMHWRQAPGQGLEWIGKI  
DPANGNTKYDPKFQGRATITADTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYCARDTTVGLDYGW  
QGTLVTVSS;

SEQ ID No: 37 (аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи HA-5):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYNIKDTYMHVVKQAPGQGLEWIGKI  
DPANGNTKYDPKFQGGKATITADTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYCARDTTVGLDYGW  
QGTLVTVSS; и

SEQ ID No: 38 (аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи HA-5):

DIVITQSPAFLSVTPGEKVTITCRASSSVNYMYWYQQKPDASPKLWIYYTSKLA  
SGVPARFSGSGSGTSYFTISSLEAEDAATYYCQQWSSNPHTFGGGTKVEIK.

### **Пример 11**

На основе Примера 10 в Примере 11 настоящего изобретения дополнительно определили, что молекула гуманизированного антитела дополнительно содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, где константная область тяжелой цепи представляла собой одно из человеческого IgG1 типа, IgG2 типа или IgG4 типа, константная область тяжелой цепи IgG1 типа имела аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 39, константная область тяжелой цепи IgG2 типа имела аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 40, константная область тяжелой цепи IgG4 типа имела аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 41, и константная область легкой цепи представляла собой человеческую C<sub>κ</sub> цепь с аминокислотной последовательностью,

представленной в SEQ ID No: 42.

### **Пример 12. Получение молекулы гуманизированного антитела**

На основе Примера 11 в Примере 12 настоящего изобретения дополнительно определили, что константная область тяжелой цепи молекулы гуманизированного антитела представляла собой человеческий IgG4 тип, и константная область тяжелой цепи IgG4 типа имела аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No. 41; и константная область легкой цепи представляла собой человеческую C<sub>κ</sub> цепь с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID No. 42.

Кодирующие гены тяжелой цепи VH и легкой цепи VL для 5 молекул гуманизированных антител, полученных путем гуманизации в Примере 10, клонировали в вектор pTSE (смотри Фиг. 3), содержащий, соответственно, гены константной области тяжелой цепи и легкой цепи, где константная область тяжелой цепи представляла собой человеческий IgG4 типа (аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID No: 41), и константная область легкой цепи представляла собой C<sub>κ</sub> цепь (аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID No: 42).

Химерное антитело CA-1 и гуманизированное антитело временно трансфицировали в клетку HEK293E (приобретенную в Институте основной медицины Китайской Академии Медицинских Наук (Institute of Basic Medicine of Chinese Academy of Medical Sciences), кат. №: GNHu43) для экспрессии антитела, моноклональные антитела получали путем очистки на аффинной колонке с белком А с использованием прибора АКТА, где концентрацию белка измеряли при помощи набора BCA (приобретенного в Beijing HuitianDongfang Technology Co., Ltd., Cat. No. BCA0020), и затем размер белка идентифицировали при помощи SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия). Результаты представлены на Фиг. 7, невосстановленный маркер белковой молекулярной массы 1, HA-1, HA-2, HA-3, HA-4, HA-5, химерное антитело CA-1, полученное в Примере 9, и моноклональное антитело против LAG-3, приведенные в основной заявке на патент CN105992595A, и восстановленный белковый маркер молекулярной массы 2, HA-1, HA-2, HA-3, HA-4, HA-5, химерное антитело CA-1 и моноклональное антитело против LAG-3, приведенные в основной заявке на патент CN105992595A, последовательно представлены слева направо, и молекулярная масса каждой полосы согласовывалась с теоретической величиной.

**Пример 13**

На основе вышеприведенного примера в Примере 13 настоящего изобретения дополнительно определили, что молекула гуманизированного антитела представляла собой полноразмерное антитело или фрагмент антитела, и содержала одно из или комбинацию более чем одного из Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fv или ScFv.

**Пример 14**

На основе вышеприведенного примера в Примере 14 настоящего изобретения дополнительно определили следующее решение.

Дополнительно определяли полипептид или белок, содержащий моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент, определенный в одном из вышеприведенных примеров.

Дополнительно определяли полинуклеотидную последовательность или комбинацию, кодирующую аминокислотную последовательность моноклонального антитела против LAG-3 или его антигенсвязывающего фрагмента, определенных в любом из вышеприведенных примеров.

Дополнительно определяли вектор, экспрессирующий рекомбинантную ДНК, содержащий указанную полинуклеотидную последовательность или комбинацию.

Дополнительно определяли клетку-хозяина, трансфицированную определенным вектором, экспрессирующим рекомбинантную ДНК, где клетка включала прокариотическую клетку, клетку дрожжей, клетку насекомого или клетку млекопитающего; и

предпочтительно клетка-хозяин представляла собой клетку млекопитающего, и клетка млекопитающего представляла собой клетку HEK293E, клетку CHO или клетку NS0.

Дополнительно определяли лекарственное средство или фармацевтическую композицию, содержащие моноклональное антитело против LAG-3 или антигенсвязывающий фрагмент, определенные в любом из вышеприведенных примеров.

В настоящем изобретении дополнительно предложено применение моноклонального антитела против LAG-3 или его антигенсвязывающего фрагмента в изготовлении лекарственного средства для лечения рака или иммунологического заболевания; и

предпочтительно указанный рак включает, без ограничения ими, лейкоз, рак

легкого, рак желудка, рак пищевода, рак яичников, рак головы и шеи, меланому, рак почки, рак молочной железы, колоректальный рак, рак печени, рак поджелудочной железы или рак мочевого пузыря; а указанное иммунологическое заболевание включает, без ограничения ими, псориаз, болезнь Крона, ревматоидный артрит, первичный билиарный цирроз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, язвенный колит и аутоиммунный гепатит.

**Пример 15. Эксперимент по связыванию молекулы гуманизированного антитела с LAG-3**

100 нг/лунку/100 мкл LAG-3 покрывали раствором карбонатной буферной системы при pH 9,6 в течение ночи при 4°C. LAG-3 пять раз промывали 300 мкл/лунку PBST, затем добавляли 1% BSA-PBST, LAG-3 блокировали при 37°C в течение 2 ч, добавляли гуманизированные антитела HA-1, HA-2, HA-3, HA-4 и HA-5, химерное антитело CA-1, полученное в Примере 9, и антитело против LAG-3 из заявки на патент CN105992595A с различными концентрациями разведений, где все 7 антител обладали самой высокой исходной концентрацией 5 мкг/мл и соответственно были разбавлены в 5 раз, и по 8 градиентов получали для каждого антитела, и смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Полученный продукт пять раз промывали 300 мкл/лунку PBST, затем добавляли анти-человеческий Fc-HRP, разбавленный 1% BSA-PBST в отношении 1:10000, и смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Развитие окраски осуществляли при помощи 100 мкл/лунку набора для развития окраски TMB при комнатной температуре в течение 8 минут, и останавливали при помощи 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Считывание осуществляли при 450 нм/630 нм, рассчитывали соответствующую величину EC<sub>50</sub>, и конкретные данные были следующими:

Клон	HA-1	HA-2	HA-3	HA-4	HA-5	Химерное антитело CA-1	CN105992595 A
EC <sub>50</sub> (нг/мл)	46,25	150,7	102,5	538,8	350,3	52,16	747,2

Как видно из указанных данных и экспериментального результата, представленного на Фиг. 8, все 5 различающихся молекул гуманизированного антитела могут связываться с LAG-3. Величины EC<sub>50</sub> для всех 5 различающихся моноклональных антител, предложенных в настоящем изобретении, были значительно ниже, чем

величины для антитела против LAG-3 в заявке на патент CN105992595A, что свидетельствует о том, что моноклональные антитела, предложенные в настоящем изобретении, обладают сильной связывающей способностью с LAG-3 и высокой аффинностью. Помимо этого, также из Фиг. 8 и указанных данных можно видеть, что величина  $EC_{50}$  для HA-1 среди 5 различных моноклональных антител была самой низкой, что указывает на то, что это моноклональное антитело обладает самой лучшей связывающей способностью с LAG-3 и самой высокой аффинностью. В то же самое время, величина  $EC_{50}$  для HA-1 была схожей с величиной для химерного антитела CA-1, что свидетельствует о том, что гуманизованное HA-1 сохраняло высокую аффинность мышинового родительского антитела MA-1 и LAG-3, и аффинность не уменьшалась.

**Пример 16. Активность молекулы гуманизованного антитела против LAG-3, протестированная при помощи смешанной лимфоцитарной реакции (MLR)**

Свежие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) разделяли при помощи центрифугирования в градиенте плотности, и  $CD14^+$  Т-клетки отсортировывали при помощи магнитных шариков; и  $CD14^+$  Т-клетки культивировали в культуральной среде 20 нг/мл GM-CSF и 10 нг/мл IL-4, культуральную среду меняли каждые двое суток, и клетки индуцировали в дендритные клетки (DC) на 7-10 суток. За двое суток до использования DC добавляли 25 нг/мл TNF- $\alpha$  для индукции DC в зрелые DC, и зрелые DC собирали и готовили клеточную суспензию с плотностью клеток  $1 \times 10^5$  клеток/мл.  $CD14^+$  Т-клетки отсортировывали из PBMC при помощи магнитных шариков, подсчитывали и готовили клеточную суспензию с плотностью клеток  $1 \times 10^6$  клеток/мл. 100 мкл каждой из  $CD14^+$  Т-клеток и DC отбирали и добавляли в 96-луночный планшет в соответствии с отношением 10:1.

5 молекул гуманизованного антитела против LAG-3, полученные в Примере 12, химерное антитело CA-1, полученное в Примере 9, и антитело против LAG-3, предложенное в заявке на патент CN105992595A, использовали в качестве положительных контролей, соответственно, подвергали 4-кратному градиентному разведению, 8 градиентов устанавливали для каждого антитела, 50 мкл каждого антитела соответственно отбирали и добавляли в 96-луночный планшет, затем через 5 суток пролиферацию  $CD14^+$  Т-клеток тестировали при помощи ССК8, считывание осуществляли при 450 нм/630 нм, рассчитывали соответствующую величину  $EC_{50}$ , и конкретные данные были следующими:

Клон	HA-1	HA-2	HA-3	HA-4	HA-5	Химерное антитело CA-1	DN105992595 A
EC <sub>50</sub> (нг/мл)	6,875	27,09	15,01	33,8	31,84	7,226	39,59

Как видно из указанных данных и Фиг. 9, величины EC<sub>50</sub> для всех 5 различающихся антител против LAG-3, отобранных посредством скрининга в настоящем изобретении, были значительно ниже, чем для антитела против LAG-3, предложенного в заявке на патент CN105992595A, что свидетельствует о том, что все антитела против LAG-3, предложенные в настоящем изобретении, обладают более высокой активностью. В то же самое время, полноразмерное антитело против LAG-3 HA-1 обладало самой низкой величиной EC<sub>50</sub> среди 5 отобранных моноклональных антител, что свидетельствует о том, что антитело обладает самой высокой активностью. Кроме того, в соответствии с Фиг. 9 можно видеть, что величина EC<sub>50</sub> химерного антитела CA-1 была ближе к величине антитела против LAG-3 HA-1, что свидетельствует о том, что гуманизованное антитело HA-1 сохраняет биологическую активность мышинового родительского антитела MA-1, и его биологическая активность не уменьшалась.

**Пример 17. Тест на ингибирование моноклональным антителом HA-1 против LAG-3 колоректального рака MC38 у мышей**

1. Экспериментальное животное:

штамм видов: Mus Musculus, NCG, мышь;

возраст в неделях: 6-8 недель; и

поставщик экспериментального животного: GemPharmatech Co., Ltd.

2. Клеточная культура: опухолевые клетки MC38 (приобретенные в Biovector NTCC Inc., Cat. No. NTCC-MC38). Опухолевые клетки выращивали в DMEM (среда Игла, модифицированная Дульбекко), содержащей инактивированную 10% фетальную телячью сыворотку (ExCell Bio., Cat. No. FND500), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ глутамина (приобретенного в ThermoFisher Scientific (China) Co., Ltd. (Gibco), Cat. No. 10566-016) в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C, и переносили во флаконы через каждые 3-4 суток после полного нарастания клеток, и опухолевые клетки в фазе логарифмического роста использовали для инокулирования опухоли *in vivo*.

3. Инокулирование опухолевых клеток и разбивка на группы: суспендированные

в PBS опухолевые клетки МС38 в концентрации  $1,0 \times 10^7$ /мл инокулировали подкожно в правую грудинную часть экспериментального животного в количестве 100 мкл на животное. Когда опухоль вырастала приблизительно до  $61 \text{ мм}^3$ , мышей разделяли на 3 группы по 8 мышей в каждой группе. Группы представляли собой контрольную группу с разбавителем, НА-1 (10 мг/кг, i.p. (внутрибрюшинно), два раза в неделю  $\times$  3 недели), и НА-1 (30 мг/кг, i.p., два раза в неделю  $\times$  3 недели).

4. Показатели обнаружения: объем опухоли измеряли дважды в неделю с использованием штангельциркуля с нониусом, причем измеряли длинный диаметр и короткий диаметр опухоли, и формула для расчета объема представляла собой:  $\text{объем} = 0,5 \times \text{длинный диаметр} \times \text{короткий диаметр}^2$ , и регистрировали взаимосвязь между изменением объема опухоли и временем введения, и результат представлен на Фиг. 10.

Как видно из данных на Фиг. 10, моноклональное антитело НА-1 против LAG-3 может ингибировать рост опухоли, демонстрируя дозозависимый ответ.

#### **Пример 18. Оценка термостабильности белковой молекулы моноклонального антитела НА-1 против LAG-3**

Белковую молекулу моноклонального антитела НА-1 против LAG-3 подвергали ультрафильтрации, переносили в буферную систему PBS и центрифугировали при 12000 об./мин и  $4^\circ\text{C}$  в течение 5 мин, и термостабильность белковой молекулы моноклонального антитела НА-1 против LAG-3 оценивали при помощи мультифункциональной системы анализа белковой термостабильности (приобретенной в Uncaptured Labs). Путем мониторинга изменения эндогенной флуоресценции белка в зависимости от температуры (от  $25^\circ\text{C}$ , нагревание до  $95^\circ\text{C}$  при скорости нагревания  $0,3^\circ\text{C}/\text{мин}$ ) было обнаружено изменение белковой конформации, определяли температуру плавления белка  $T_m$  и оценивали стабильность белковой конформации. При агрегации образца волна рассеянного света интерферировала, а сигнал рассеянного света увеличивался. Коллоидную стабильность белка (охарактеризованную по Tagg) определяли посредством статического светорассеяния. Результат представлен в следующей таблице и на Фиг. 11.

Образец	Температура (°C)	Средняя температура (°C)	Tagg 266 (°C)	Среднее по Tagg 266 (°C)
2 мг/мл белковой молекулы моноклонального антитела HA-1 против LAG-3	66,6	66,6	67,96	68,0
	66,6		68,02	

Как очевидно из вышеприведенной Таблицы и Фиг. 11, белковая молекула моноклонального антитела HA-1 против LAG-3 имела температуру 66,6°C и среднее по Tagg 68,0°C и демонстрировала превосходную конформационную стабильность и коллоидную стабильность.

#### **Пример 19**

На основе вышеприведенного примера в Примере 19 настоящего изобретения дополнительно определено следующее решение.

В настоящем изобретении дополнительно предложено применение моноклонального антитела против LAG-3 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с моноклональным антителом против PD-1 в изготовлении лекарственного средства для лечения рака или иммунологического заболевания.

Далее, моноклональное антитело против PD-1 выбирали из DFPD1-9, DFPD1-10, DFPD1-11, DFPD1-12, DFPD1-13, ниволумаба, пембролизумаба, торипалимаба, синтилимаба, тизлелизумаба, камрелизумаба, пенпулимаба или зимберелимаба.

Все из ниволумаба, пембролизумаба, торипалимаба, синтилимаба, тизлелизумаба, камрелизумаба, пенпулимаба или зимберелимаба представляли собой продукты, имеющиеся в продаже.

DFPD1-9, DFPD1-10, DFPD1-11, DFPD1-12 и DFPD1-13 представляли собой моноклональные антитела против PD-1, предложенные в патенте под номером заявки CN201510312910.8, DFPD1-9 содержало переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID No: 44, и переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID No: 43; DFPD1-10 содержало переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID No: 45, и переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID No: 43; DFPD1-11 содержало переменную область легкой

цепи, представленную в SEQ ID No: 44, и переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID No: 46; DFPD1-12 содержало переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID No: 44, и переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID No: 47; и DFPD1-13 содержало переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID No: 45, и переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID No: 46. Конкретные последовательности были следующими.

Последовательность SEQ ID No. 43 была следующей:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI  
WYDSSRKYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNNDYWGQGT  
LVTVSS;

Последовательность SEQ ID No. 44 была следующей:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIHNYLDWYQQKPGKAPKLLIYNASTR  
ATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQELHLPLTFGQGTKVEIK;

Последовательность SEQ ID No. 45 была следующей:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSNYLDWYQQKPGKAPKLLIYDAST  
RATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNMQLPLTFGQGTKVEIK;

Последовательность SEQ ID No. 46 была следующей:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNNGMHWVRQAPGKGLEWVAVI  
WYDSSRKYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNNDYWGQGT  
LVTVSS; и

Последовательность SEQ ID No. 47 была следующей:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI  
WYDGSKKYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNNDYWGQG  
TLVTVSS.

Кроме того, моноклональное антитело против PD-1 дополнительно содержало константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи. Последовательности константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи были такими же, что и последовательности константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи моноклонального антитела против PD-1, предложенного в патенте с номером заявки CN201510312910.8.

Далее, рак выбирали из лейкоза, рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака яичников, рака головы и шеи, меланомы, рака почки, рака молочной железы,

колоректального рака, рака печени, рака поджелудочной железы или рака мочевого пузыря; и иммунологическое заболевание включает псориаз, болезнь Крона, ревматоидный артрит, первичный билиарный цирроз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, язвенный колит и аутоиммунный гепатит.

#### **Пример 20**

На основе примера 19 в Примере 20 настоящего изобретения дополнительно определили, что моноклональное антитело против PD-1 представляло собой DFPD1-10, и DFPD1-10 содержало вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID No: 45, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID No: 43.

#### **Пример 21**

На основе Примера 19 в Примере 21 настоящего изобретения дополнительно определили, что моноклональное антитело против PD-1 представляло собой ниволумаб.

**Пример 22. Эксперимент по *in-vivo* фармацевтическому эффекту моноклонального антитела против LAG-3 в комбинации с моноклональным антителом против PD-1 для модели колоректального рака MC38**

##### 1. Тестируемое лекарственное средство

(1) Моноклональное антитело HA-1 против LAG-3, предложенное в Примере 10, под номером JY03;

поставщик: Beijing Dongfang Biotech Co., Ltd; и

количество: 11 мл на каждое, 4,9 мг/мл, и в общем 7;

(2) Моноклональное антитело против PD-1, предложенное в Примере 20, представляло собой DFPD1-10 под номером JY034 в этом эксперименте;

поставщик: Beijing Dongfang Biotech Co., Ltd; и

количество: 10 мл, 10 мг/мл, 3 флакона, и в общем 300 мг; и

##### (3) Opdivo (ниволумаб)

производитель: Bristol Myers Squibb; и

количество: 100 мг/10 мл, 1

##### 2. Экспериментальное животное

Штамм видов: MusMusculus, B6/JGpt-PdcdlemlCin (hPDCD1) Lag3em 1 Cin (hLAG3)/Gpt

Пол: самки

Возраст в неделях: 6-8 недель

Масса: 18-22 г

Количество: 75

Поставщик экспериментального животного: GemPharmatech Co. Ltd.

Номер производственной лицензии: SCXK (Su) 2018-0008

### 3. Экспериментальный метод

#### (1) Клеточная культура

Опухолевые клетки МС38 выращивали в DMEM, содержащей инактивированную 10% фетальную телячью сыворотку, 100 Ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ глутамина, в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C, и переносили в флаконы через каждые 3-4 суток после полного нарастания клеток, и опухолевые клетки в фазе логарифмического роста использовали для инокулирования опухоли *in vivo*.

#### (2) Инокулирование опухолевых клеток и разбивка на группы

Суспендированные в PBS опухолевые клетки МС38 в концентрации  $1,0 \times 10^7$ /мл подкожно инокулировали в правую грудинную часть экспериментального животного в количестве  $1 \times 10^6$ /100 мкл на животное. Когда опухоль вырастала приблизительно до 50 мм<sup>3</sup>, мышей разделяли (эти сутки обозначили как PG-D0) на 8 групп по 10 мышей в каждой группе.

#### (3) Измерение массы мыши и экспериментальных показателей

Объем опухоли измеряли 2-3 раза в неделю с использованием штангельциркуля с нониусом, массу мыши определяли с использованием электронных весов, измеряли длинный диаметр и короткий диаметр опухоли, и формула для расчета объема представляла собой:  $\text{объем} = 0,5 \times \text{длинный диаметр} \times \text{короткий диаметр}^2$ . Величину T/C рассчитывали в зависимости от объема опухоли, где T представляет собой среднюю величину относительного объема опухоли (RTV) для каждой из групп, обработанных тестируемым образцом, C представляет собой среднюю величину RTV в контрольной группе, и RTV представляет собой отношение объема опухоли после введения к объему до введения. Степень ингибирования опухолевого роста (TGITV) (%) =  $(1 - T/C) \times 100\%$ .

В конце эксперимента животных умерщвляли, опухоли извлекали, взвешивали, помещали в последовательности и фотографировали. Степень ингибирования опухолевой массы (TGITW) (%) рассчитывали при помощи формулы  $(1 - T/C) \times 100\%$ , где T/C = TW средняя величина для обрабатываемых групп/TW средняя величина для контрольной группы.

В принципе, критерий оценки представлял собой:  $T/C (\%) > 40\%$  - не эффективно; и  $T/C (\%)$  был меньше чем или равен  $40\%$ , и  $P < 0,05$  - эффективно после статистической обработки.

#### 4. Схема введения

Группы	Количество животных	Обработка	Доза (мг/кг)*	Путь введения	Частота введения
1	10	Разбавитель	-	i.p.	Два раза в неделю x 3 недели
2	10	JY03	30	i.p.	Два раза в неделю x 3 недели
3	10	JY034	0,5	i.p.	Два раза в неделю x 3 недели <sup>#</sup>
4	10	Opdivo	0,5	i.p.	Два раза в неделю x 3 недели <sup>#</sup>
5	10	JY03	30	i.p.	Два раза в неделю x 3 недели
		JY034	0,5		Два раза в неделю x 3 недели <sup>#</sup>
6	10	JY03	30	i.p.	Два раза в неделю x 3 недели
		Opdivo	0,5		Два раза в неделю x 3 недели <sup>#</sup>

Замечание: \*, вводимый объем для каждой группы составлял 10 мкл/г в соответствии с массой животного, и вводимое количество может быть скорректировано, когда масса уменьшалась на 15-20%; i.p.: внутрибрюшинная инъекция; два раза в неделю x 3 недели: дважды в неделю на протяжении трех недель, и в общем 6 раз; и<sup>#</sup>: введение лекарственного средства начиналась с момента второго введения JY03 и реальное время введения в общем составляло 5 раз в течение трех недель.

#### 5. Статистический анализ

Статистический анализ между группами осуществляли в отношении объема

опухоли и массы опухоли с использованием программного обеспечения для статистического анализа IBM SPSS Statistics 22.0 и одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA). Статистически значимое различие считали при  $P < 0,05$ .

## 6. Результаты

### (1) Результаты подавления опухолевого роста:

Группы	Количество животных	Масса тела (г) <sup>g</sup>		Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>h</sup>		T/C (%)	Степень ингибирования опухолевого роста (%)	$P^b$	$P^c$	$P^d$	$P^e$	$P^f$
		Перед введением	После введения	Перед введением	После введения							
		(PG-D0)	(PG-D17)	(PG-D0)	(PG-D17)							
Разбавитель	10	21.1±0.4	25.4±0.8	50±3	3032±577	-	-	-	<0.001	0.149	0.001	<0.001
JY03	10	21.8±0.5	25.2±0.5	50±3	2173±339	75%	25%	0.149	0.016	-	0.059	0.002
JY034	10	21.3±0.3	24.6±0.9	50±3	1308±487	42%	58%	0.005	0.316	0.146	0.653	0.095
Opdivo	10	21.2±0.2	22.6±0.7	50±3	713±478	28%	72%	<0.001	-	0.016	0.579	0.497
JY03+JY034	10	21.1±0.3	23.8±0.8	50±3	1041±331	38%	62%	0.001	0.579	0.059	-	0.219
JY03+Opdivo	10	21.0±0.5	22.4±0.5	49±3	311±129	10%	90%	<0.001	0.497	0.002	0.219	-

Замечание: Односторонний ANOVA проводили для каждой группы, минимальное значимое различие (LSD) использовали для ретроспективного анализа; <sup>a</sup>, среднее±стандартные ошибки среднего; <sup>b</sup>, по сравнению с группой, которой вводили разбавитель; <sup>c</sup>, по сравнению с группой Opdivo; <sup>d</sup>, по сравнению с группой JY03; <sup>e</sup>, по сравнению с группой JY03+JY034; и <sup>f</sup>, по сравнению с группой JY03+Opdivo. Отсутствовало статистически значимое различие между группами, обработанными JY034 (все  $P > 0,05$ ). У 3, 5, 1 и 4 мышей опухоли полностью регрессировали соответственно в группе JY034, группе Opdivo, группе JY03+JY034 и группе JY03+Opdivo.

### (2) Масса опухоли

Группы	Количество животных	Масса опухоли (г) <sup>a</sup>	Степень ингибирования опухоли массой (%)	$P^b$	$P^c$	$P^d$	$P^e$	$P^f$
Разбавитель	10	2,980±0,596	-	-	< 0,001	0,255	0,003	< 0,001
JY03	10	2,254±0,379	24%	0,255	0,027	-	0,057	0,002

JY034	10	1,318±0,500	56%	0,010	0,443	0,143	0,655	0,097
Opdivo	10	0,830±0,541	72%	0,001	-	0,027	0,748	0,367
JY03+JY034	10	1,034±0,349	65%	0,003	0,748	0,057	-	0,223
JY03+Opdivo	10	0,256±0,113	91%	< 0,001	0,367	0,002	0,223	-

Замечание: односторонний ANOVA проводили для каждой группы, минимальное значимое различие (LSD) использовали для ретроспективного анализа; <sup>a</sup>, среднее±стандартные ошибки среднего; <sup>b</sup>, по сравнению с группой, которой вводили разбавитель; <sup>c</sup>, по сравнению с группой Opdivo; <sup>d</sup>, по сравнению с группой JY03; <sup>e</sup>, по сравнению с группой JY03+JY034; и <sup>f</sup>, по сравнению с группой JY03+Opdivo.

В заключение, как видно из этих данных и Фиг. 12 и 13, в группе, в которой тестировали лекарственное средство JY03, группе JY034, группе Opdivo, группе JY03+JY034 и группе JY03+Opdivo определенный противоопухолевый эффект получали в гуманизированной модели колоректального рака MC38 с двойной мишенью PD-1 и LAG3, где эффект ингибирования опухоли в группе JY03+JY034 был очевидно сильнее, чем в группе с единственным лекарственным средством JY03 и группе с единственным лекарственным средством JY034, и эффект ингибирования опухоли в группе JY03+Opdivo был очевидно сильнее, чем эффект в группе с единственным лекарственным средством JY03 и группе с единственным лекарственным средством Opdivo. Таким образом, моноклональное антитело против LAG-3 может улучшать эффект ингибирования опухоли моноклонального антитела против PD-1. Кроме того, животные в каждой группе обладают хорошей переносимостью и продемонстрировано отсутствие очевидных неблагоприятных действий.

Настоящее изобретение не ограничено вышеупомянутыми оптимальными воплощениями, и любой может получить различные другие формы продуктов под действием мотивации в соответствии с настоящим изобретением. Тем не менее, независимо от каких-либо изменений в своей форме или конструкциях, любое техническое решение, которое является таким же или похожим на настоящее применение, входит в объем защиты в соответствии с настоящим изобретением.

### **Формула изобретения**

1. Моноклональное антитело против LAG-3 (ген активации лимфоцитов-3) или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит 3 определяющие комплементарности области тяжелой цепи, соответственно представленные HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и переменная область легкой цепи содержит 3 определяющие комплементарности области легкой цепи, соответственно представленные LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и где указанные моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из любого из следующего:

A-1: определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 1, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 2, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 3, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 4, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 5, и определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 6;

A-2: определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 1, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 2, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 3, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 4, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 7, и определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 8;

A-3: определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR1 содержит

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 9, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 10, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 11, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 12, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 13, и определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 14; и

A-4: определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 15, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 16, определяющая комплементарность область тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 17, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 18, определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 19, и определяющая комплементарность область легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 20.

2. Моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где указанные моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой молекулу мышинового антитела, которая выбрана из любого из следующего:

MA-1: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 21, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 22;

MA-2: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 21, и переменная область легкой

цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 23;

МА-3: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 24, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 25; и

МА-4: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 26, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 27; и

предпочтительно указанная молекула мышинного антитела представляет собой МА-1.

3. Моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, где указанная молекула мышинного антитела дополнительно содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, где константная область тяжелой цепи представляет собой одно из мышинного IgG1 (иммуноглобулин G1) типа, IgG2a типа, IgG2b типа и IgG3 типа, где константная область тяжелой цепи IgG1 типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 29, константная область тяжелой цепи IgG2a типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 30, константная область тяжелой цепи IgG2b типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 31, и константная область тяжелой цепи IgG3 типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 32; и константная область легкой цепи представляет собой мышиную C<sub>κ</sub> цепь с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID No: 28; и

предпочтительно указанная константная область тяжелой цепи представляет собой мышиный IgG1 тип.

4. Моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, где указанные моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой молекулу химерного антитела, которая содержит переменную область тяжелой цепи молекулы мышинного антитела, переменную область легкой цепи молекулы мышинного антитела и константную область гуманизированного антитела; где константная область гуманизированного антитела

содержит константную область тяжелой цепи гуманизированного антитела и константную область легкой цепи гуманизированного антитела, где константная область тяжелой цепи гуманизированного антитела представляет собой одно из человеческого IgG1 типа, IgG2 типа или IgG4 типа, где константная область тяжелой цепи гуманизированного антитела IgG1 типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 39, константная область тяжелой цепи гуманизированного антитела IgG2 типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 40, и константная область тяжелой цепи гуманизированного антитела IgG4 типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 41; и константная область легкой цепи гуманизированного антитела представляет собой человеческую C<sub>κ</sub> цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 42; и

предпочтительно указанная константная область тяжелой цепи гуманизированного антитела представляет собой человеческий IgG4 тип.

5. Моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где указанные моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой молекулу гуманизированного антитела, которая выбрана из любого из следующего:

HA-1: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 33, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 34;

HA-2: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 33, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 35;

HA-3: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 36, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 35;

HA-4: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 36, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 34;

и

HA-5: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID No: 37, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 38; и

предпочтительно указанная молекула гуманизированного антитела представляет собой HA-1.

6. Моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 5, где указанная молекула гуманизированного антитела дополнительно содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, где константная область тяжелой цепи представляет собой одно из человеческого IgG1 типа, IgG2 типа или IgG4 типа, где константная область тяжелой цепи IgG1 типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 39, константная область тяжелой цепи IgG2 типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 40, константная область тяжелой цепи IgG4 типа имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No: 41, и константная область легкой цепи представляет собой человеческую C<sub>k</sub> цепь с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID No: 42; и

предпочтительно указанная константная область тяжелой цепи представляет собой человеческий IgG4 тип.

7. Моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 5, где указанная молекула гуманизированного антитела представляет собой полноразмерное антитело или фрагмент антитела, и где указанная молекула гуманизированного антитела содержит одно или комбинацию более чем одного из Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fv или ScFv.

8. Полипептид или белок, содержащий моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7.

9. Полинуклеотидная последовательность или комбинация, кодирующая аминокислотную последовательность моноклонального антитела против LAG-3 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-7.

10. Вектор экспрессии рекомбинантной ДНК, содержащий полинуклеотидную последовательность или комбинацию по п. 9.

11. Клетка-хозяин, трансфицированная вектором экспрессии рекомбинантной ДНК по п. 10, где указанная клетка-хозяин включает прокариотическую клетку, клетку

дрожжей, клетку насекомого или клетку млекопитающего; и

предпочтительно указанная клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, которая представляет собой клетку HEK293E, клетку CHO или клетку NS0.

12. Лекарственное средство или фармацевтическая композиция, содержащие моноклональное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7.

13. Применение моноклонального антитела против LAG-3 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-7 в изготовлении лекарственного средства для лечения рака или иммунологического заболевания;

предпочтительно рак включает лейкоз, рак легкого, рак желудка, рак пищевода, рак яичников, рак головы и шеи, меланому, рак почки, рак молочной железы, колоректальный рак, рак печени, рак поджелудочной железы или рак мочевого пузыря; и иммунологическое заболевание включает псориаз, болезнь Крона, ревматоидный артрит, первичный билиарный цирроз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, язвенный колит и аутоиммунный гепатит.

14. Применение моноклонального антитела против LAG-3 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-7 в комбинации с моноклональным антителом против PD-1 (белок программируемой гибели клеток) в изготовлении лекарственного средства для лечения рака или иммунологического заболевания.

15. Применение по п. 14, где указанное моноклональное антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из DFPD1-9, DFPD1-10, DFPD1-11, DFPD1-12, DFPD1-13, ниволумаба, пембролизумаба, торипалимаба, синтилимаба, тизлелизумаба, камрелизумаба, пенпулимаба или зимберелимаба.

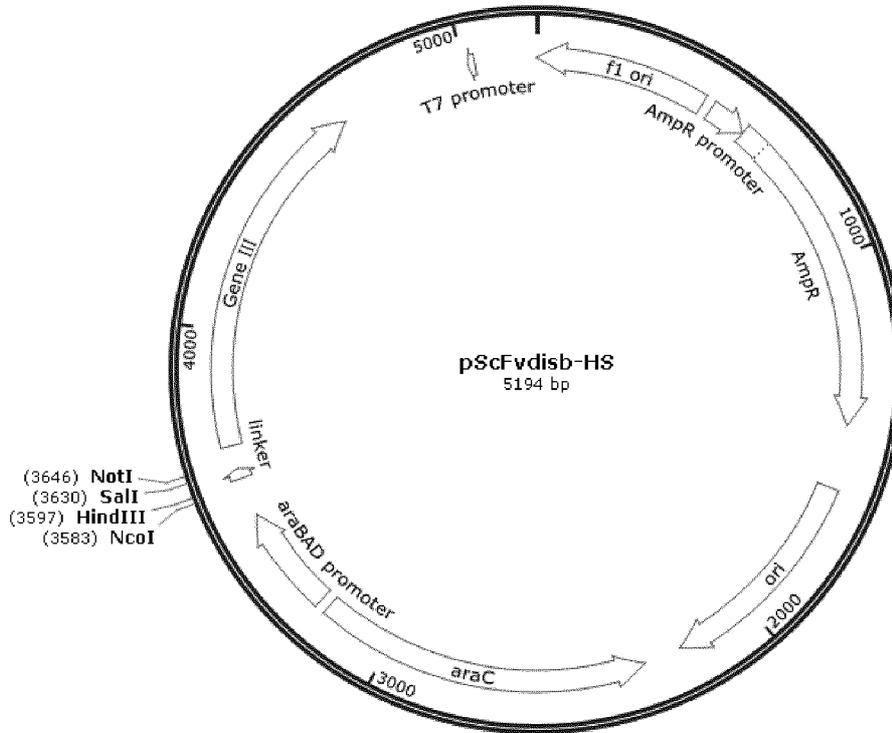
16. Применение по п. 15, где моноклональное антитело против PD-1 представляет собой DFPD1-10, которое содержит вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID No: 45, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID No: 43.

17. Применение по п. 15, где моноклональное антитело против PD-1 представляет собой ниволумаб.

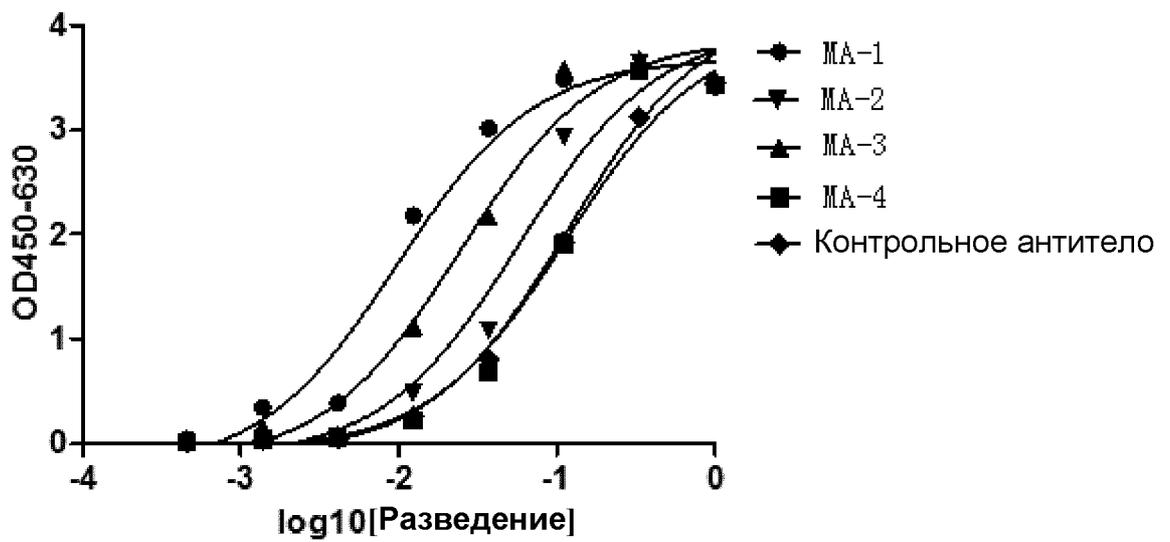
18. Применение по п. 14, где рак выбран из лейкоза, рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака яичников, рака головы и шеи, меланомы, рака почки, рака молочной

железы, колоректального рака, рака печени, рака поджелудочной железы или рака мочевого пузыря; и иммунологическое заболевание включает псориаз, болезнь Крона, ревматоидный артрит, первичный билиарный цирроз, системную красную волчанку, рассеянный склероз, язвенный колит и аутоиммунный гепатит.

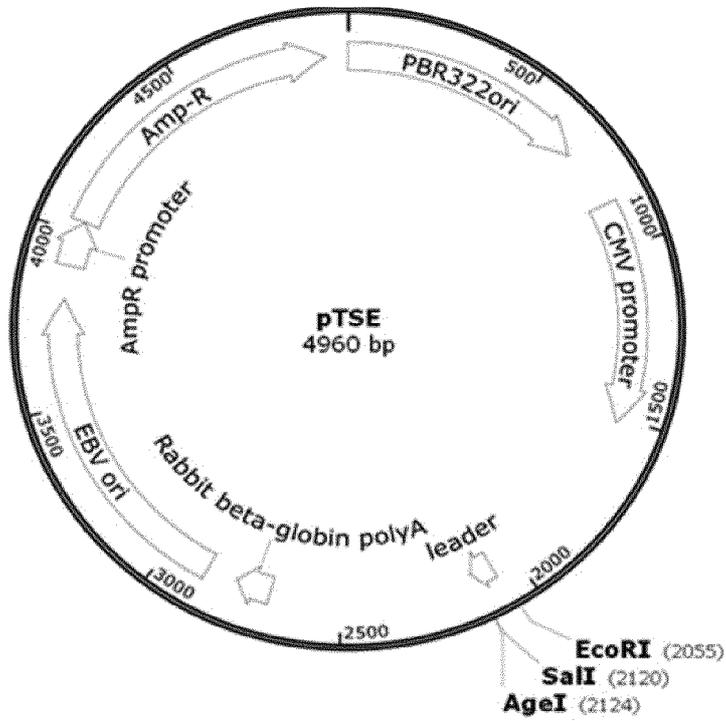
Фиг. 1



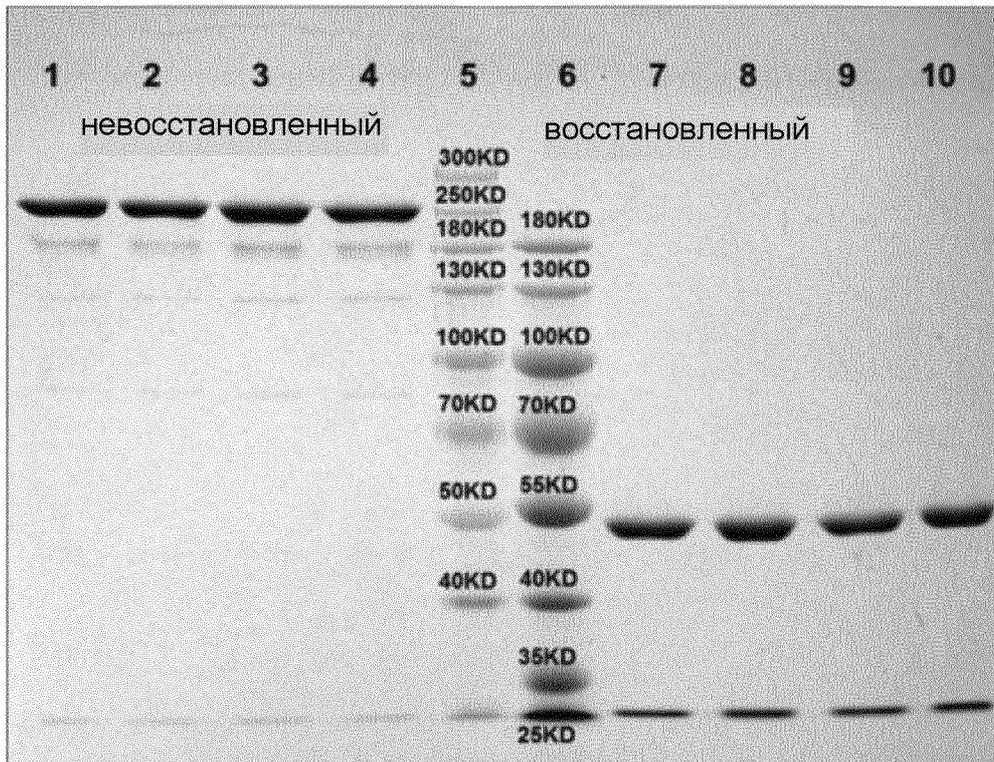
Фиг. 2



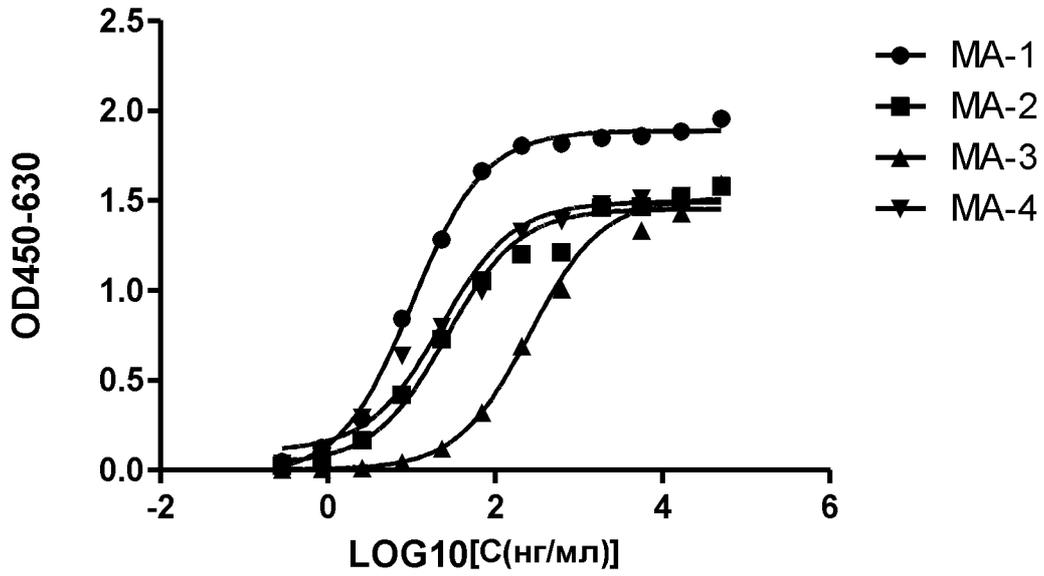
Фиг. 3



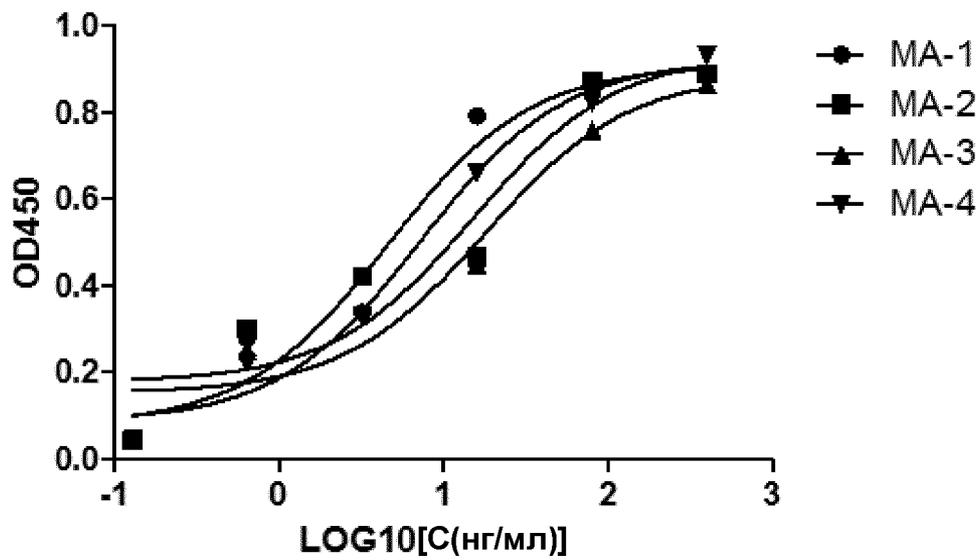
Фиг. 4



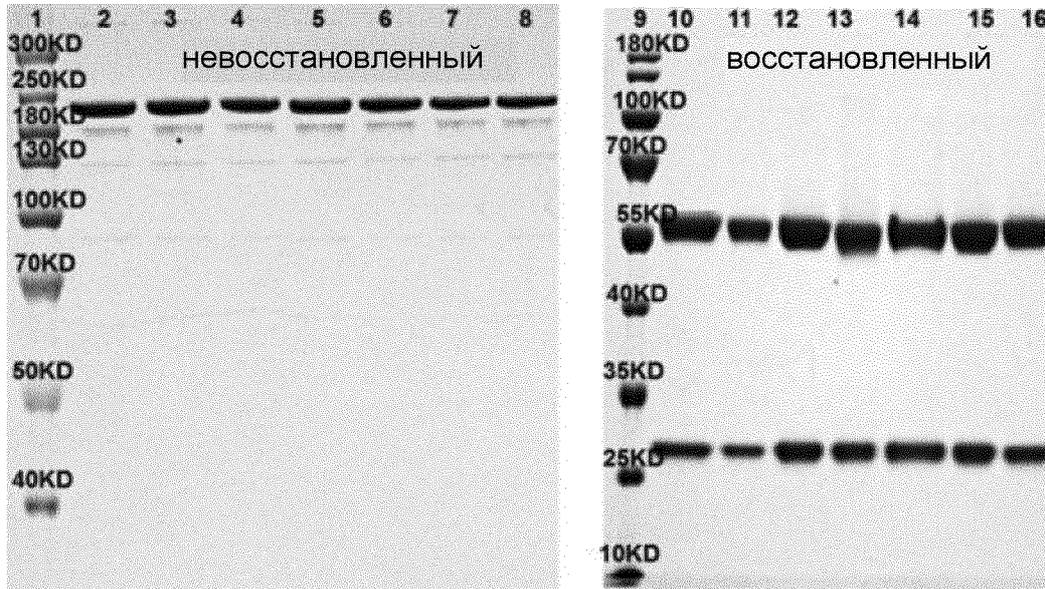
Фиг. 5



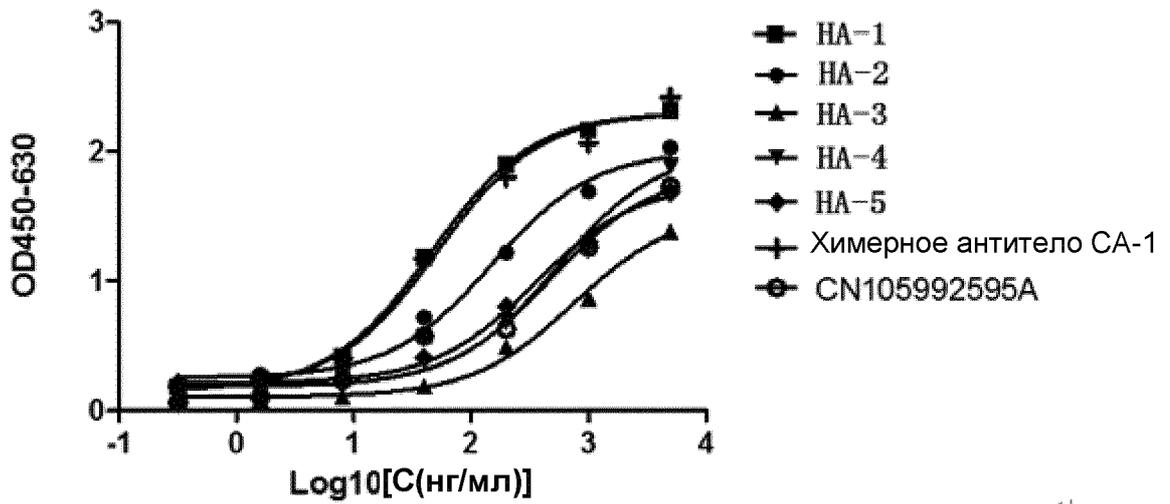
Фиг. 6



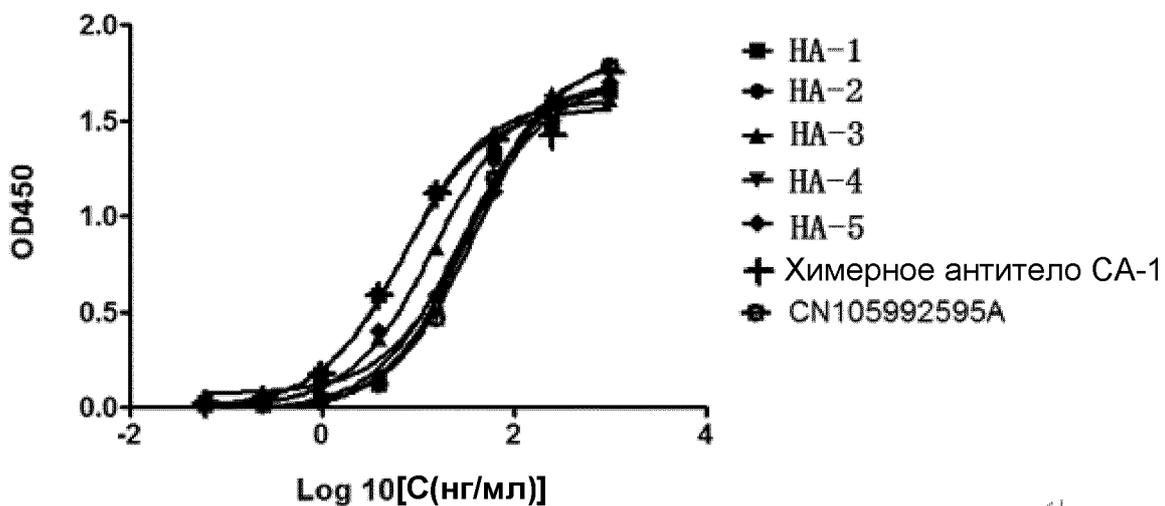
Фиг. 7



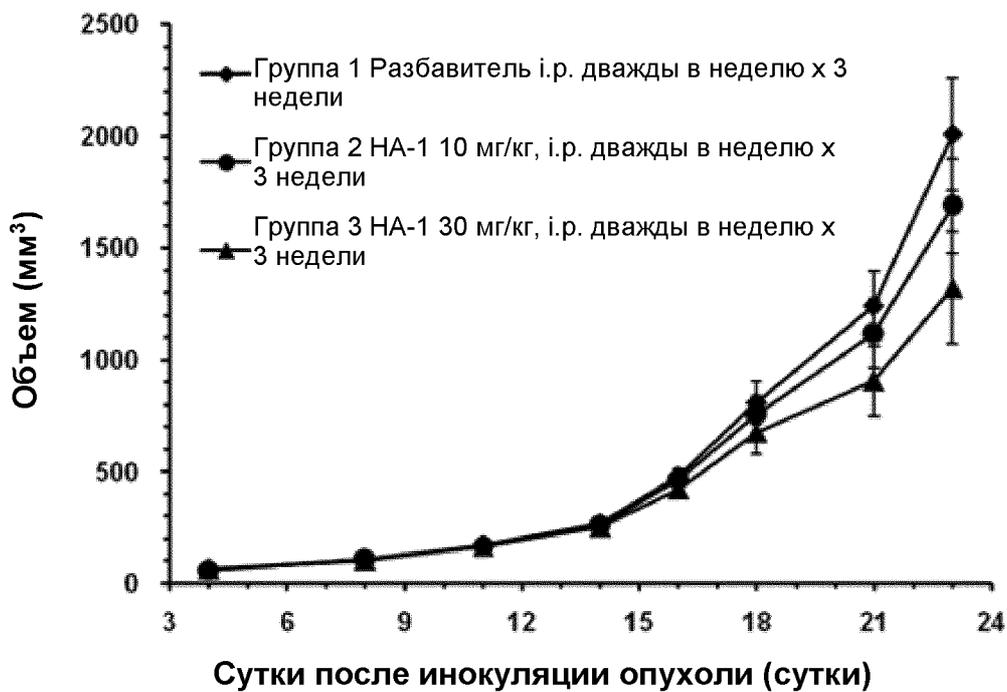
Фиг. 8



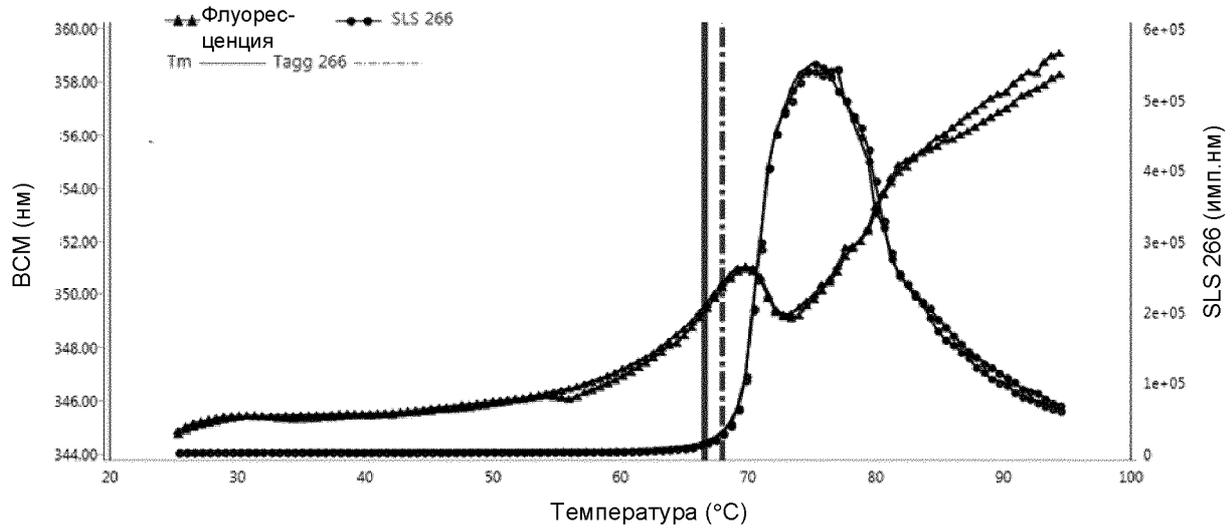
Фиг. 9



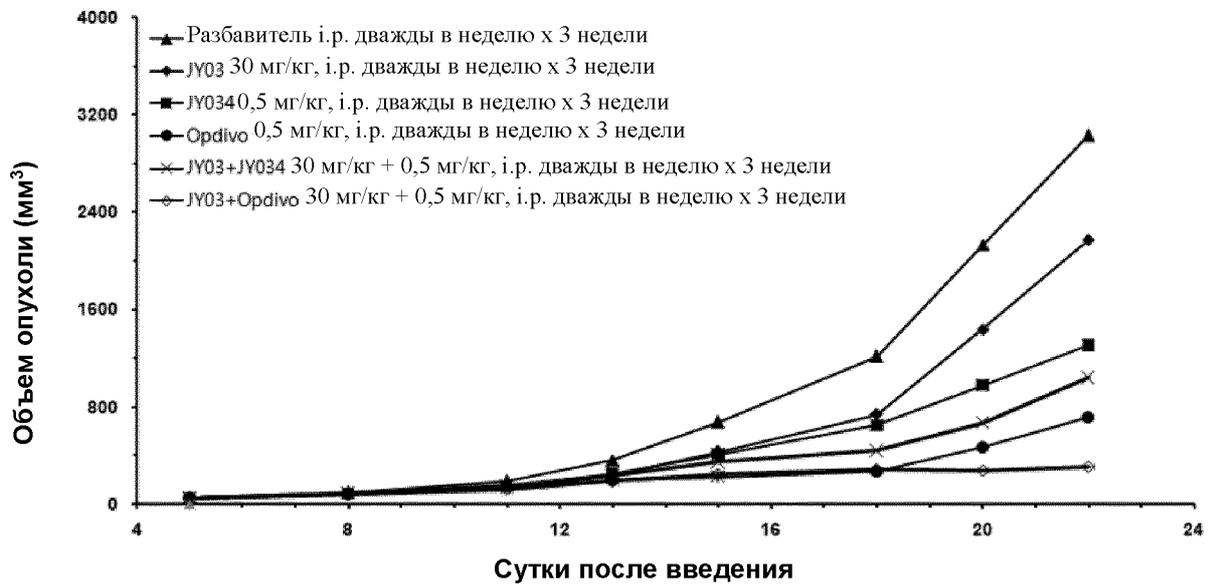
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

