

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 203**

51 Int. Cl.:

C12N 5/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2009** **E 09807162 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015** **EP 2320940**

54 Título: **Anticuerpos humanos que se unen al gen 3 de activación linfocitaria (LAG-3) y usos de los mismos**

30 Prioridad:

11.08.2008 US 188548 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2015

73 Titular/es:

E. R. SQUIBB & SONS, L.L.C. (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08540, US

72 Inventor/es:

THUDIUM, KENT B.;
KORMAN, ALAN J.;
LEBLANC, HEIDI;
YAMANAKA, MARK;
SELBY, MARK y
ZENS, KYRA D.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 537 203 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanos que se unen al gen 3 de activación linfocitaria (LAG-3) y usos de los mismos

5 Antecedentes de la invención

El gen 3 de activación linfocitaria o LAG-3 (también conocido como CD223), es un miembro de la familia supergénica de las inmunoglobulinas y está estructural y genéticamente relacionado con CD4. El LAG-3 no se expresa en linfocitos de la sangre periférica en reposo, pero se expresa en linfocitos T y en linfocitos citolíticos espontáneos. La LAG-3 es una proteína de membrana codificada por un gen localizado en la parte distal del brazo corto del cromosoma 12, cerca del gen CD4, lo que sugiere que el gen LAG-3 puede haber evolucionado mediante duplicación genética (Triebel *et al.* (1990) *J. Exp. Med.* 171:1393-1405).

Al igual que el CD4, se ha demostrado que la LAG-3 interacciona con moléculas del MHC de clase II pero, a diferencia del CD4, la LAG-3 no interacciona con la proteína gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana (Baixeras *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* 176:327-337). Los estudios con una proteína de fusión LAG-3 inmunoglobulínica (sLAG-3lg) demostraron una unión directa y específica de la LAG-3 al MHC de clase II sobre la superficie celular (Huard *et al.* (1996) *Eur. J. Immunol.* 26:1180-1186).

En los estudios *in vitro* de las respuestas de linfocitos T específicas para un antígeno, la adición de anticuerpos anti-LAG-3 produjo un aumento en la proliferación de linfocitos T, una mayor expresión de antígenos de activación, tales como CD25, y mayores concentraciones de citocinas, tales como interferón gamma e interleucina 4, lo que respalda la teoría de que la interacción entre LAG-/MHC de clase II desempeña una función en la estimulación reductora dependiente del antígeno de linfocitos T CD4⁺ (Huard *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:3216-3221). Se ha demostrado que la región intracitoplásmica de la LAG-3 interacciona con una proteína llamada LAP, que se cree es una molécula de transducción de señales involucrada en la reducción de la vía de activación de CD3/TCR (Iouzalén *et al.* (2001) *Eur. J. Immunol.* 31:2885-2891). Además, se ha detectado que los linfocitos T CD4⁺CD25⁺ reguladores (T_{reg}) expresan la LAG-3 al activarse y los anticuerpos contra la LAG-3 inhiben la supresión por parte de los linfocitos T_{reg} tanto en *in vitro* como en *in vivo*, lo cual sugiere que la LAG-3 contribuye a la actividad supresora de los linfocitos T_{reg} (Huang, C. *et al.* (2004) *Immunity* 21:503-513). Es más, se ha detectado que la LAG-3 regula de forma negativa la homeostasis de linfocitos T por parte de los linfocitos T reguladores tanto en mecanismos dependientes como independientes del linfocito T (Workman, C.J. and Vignali, D.A. (2005) *J. Immunol.* 174:688-695).

En ciertas circunstancias, se ha detectado que la LAG-3 también posee efectos inmunoestimuladores. Por ejemplo, las células tumorales transfectadas con LAG-3 trasplantadas en ratones singénicos mostraron una reducción acusada del crecimiento o regresión total en comparación con células tumorales que no habían sido transfectadas, lo que sugiere que la expresión de la LAG-3 en las células tumorales estimuló una respuesta antitumoral mediante la estimulación de las células presentadoras de antígenos a través de moléculas del MHC de clase II (Prigent *et al.* (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:3867-3876). Además, se ha detectado que la proteína de fusión LAG-3 Ig soluble estimula tanto respuestas inmunitarias humores como celulares cuando se administran a ratones junto con un antígeno, lo que indica que la LAG-3 Ig soluble puede desempeñar las funciones de un adyuvante de una vacuna (El Mir and Triebel (2000) *J. Immunol.* 164:5583-5589). Además, se ha detectado que la LAG-3 Ig soluble humana amplifica la generación *in vitro* de inmunidad específica para un tumor de tipo I (Casati *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66:4450-4460). La actividad funcional de la LAG-3 se examina con más detalle en Triebel (2003) *Trends Immunol.* 24:619-622. En vista de lo anterior, agentes adicionales para modular la actividad de la LAG-3 resultan interesantes.

Resumen

La presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales aislados (en particular anticuerpos monoclonales humanos) y porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a la LAG-3 humana y comprenden: (a) una secuencia de región variable de cadena pesada que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEC ID N°: 37 y una secuencia de región variable de cadena ligera que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEC ID N°: 43.

Los anticuerpos, y porciones de unión a antígeno de los mismos, de la invención presentan propiedades funcionales deseables. Estas propiedades incluyen una gran afinidad de unión a la LAG-3 humana, unión a la LAG-3 humana y de mono (p. ej., LAG-3 de mono *Cynomolgus* y/o *Rhesus*) pero no a la LAG-3 de ratón, la capacidad de inhibir la unión de la LAG-3 a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II y/o la capacidad de estimular respuestas de linfocitos T específicas para un antígeno. Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar, por ejemplo, para detectar la proteína LAG-3 o para estimular las respuestas de linfocitos T específicas para un antígeno, como por ejemplo, en un sujeto que padece un tumor o un sujeto portador de un virus.

En un aspecto, el anticuerpo de la invención, o la porción de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo monoclonal humano aislado, o una porción de unión a antígeno de éste, donde el anticuerpo se une a la LAG-3 humana y presenta al menos una de las siguientes propiedades:

- (a) se une a LAG-3 de mono;
- (b) no se une a LAG-3 de ratón;
- (c) inhibe la unión de la LAG-3 a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II; y
- (d) estimula una respuesta inmunitaria.

5 Preferentemente, el anticuerpo presenta al menos dos de las propiedades (a), (b), (c) y (d). Más preferentemente, el anticuerpo presenta al menos tres de las propiedades (a), (b), (c) y (d). Incluso más preferentemente, el anticuerpo presenta las cuatro propiedades (a), (b), (c) y (d).

10 En una realización preferida, el anticuerpo estimula una respuesta de linfocitos T específica para un antígeno, tal como la producción de interleucina 2 (IL-2) en una respuesta de linfocitos T específica de un antígeno. En otras realizaciones, el anticuerpo estimula una respuesta inmune tal como una respuesta antitumoral (p. ej., inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de injerto tumoral *in vivo*) o una respuesta autoinmunitaria (p. ej., estimula el desarrollo de la diabetes en ratones NOD). En otra realización preferida, el anticuerpo se une a un epítipo de la LAG-3 humana que comprende la secuencia de aminoácidos PGHPLAPG (SEC ID N°: 76). En otra realización preferida, el anticuerpo se une a un epítipo de la LAG-3 humana que comprende la secuencia de aminoácidos HPAPPSSW (SEC ID N°: 77) o PAAPSSWG (SEC ID N°: 78). En otras realizaciones, el anticuerpo se une a la LAG-3 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menor, se une a la LAG-3 humana con una K_D de 1×10^{-8} M o menor, se une a la LAG-3 humana con una K_D de 5×10^{-9} M o menor, o se une a la LAG-3 humana con una K_D de 1×10^{-9} M o menor.

20 En una realización, el anticuerpo tiñe tejido pituitario por inmunohistoquímica, mientras que en otra realización, el anticuerpo no tiñe tejido pituitario por inmunohistoquímica.

25 En otro aspecto, el anticuerpo de la invención, o porción de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo monoclonal humano aislado, o una porción de unión a antígeno de este, donde el anticuerpo presenta competencia cruzada por la unión a la LAG-3 humana con un anticuerpo de referencia, donde el anticuerpo de referencia comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 37 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 43

30 En otro aspecto, el anticuerpo de la invención o porción de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo monoclonal aislado, o a una porción de unión a antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 3-20 humano, un gen V_H 4-34 humano, un gen V_H 3-33 humano o un gen V_H 1-24 humano, donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana. En otro aspecto, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención es un anticuerpo monoclonal aislado, o a una porción de unión a antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L18 humano, un gen V_K L6 humano o un gen V_K A27 humano, donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana. En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, que comprende: una región variable de cadena pesada que el producto de o se deriva de un gen V_H 4-34 humano y una región variable de cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_K L6 humano; donde el anticuerpo se une específicamente a LAG-3 humana.

40 En otro aspecto, el anticuerpo de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno de este, que comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 37; y
- (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 43.

50 Los anticuerpos de la invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, de un isotipo IgG1, IgG2 o IgG4. En una realización preferida, el anticuerpo es un isotipo IgG4. En otra realización preferida, el anticuerpo es un isotipo IgG4 que posee una mutación de serina a prolina en la región constante de la región bisagra de la cadena pesada (en una posición que se corresponde con la posición 241 conforme a lo que se describe en Angal *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-108), de forma que se reduce o suprime la heterogeneidad de los puentes disulfuro entre las cadenas pesadas. Como alternativa, los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab, Fab' o Fab'2, o anticuerpos de cadena sencilla.

55 Esta divulgación también proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno de este, enlazado a un agente terapéutico, p. ej., una citotoxina o un isótopo radioactivo. Esta divulgación también proporciona una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este, de la invención enlazado a un segundo grupo funcional con una especificidad de unión distinta a dicho anticuerpo o porción de unión a antígeno de este.

60 Se proporcionan también composiciones que comprenden un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este, o un inmunoconjugado o una molécula biespecífica de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

65 También quedan contempladas en esta divulgación las moléculas de ácido nucleico que codifiquen los anticuerpos, o las porciones de unión a antígeno de estos, de la invención, así como también los vectores de expresión que comprenden tales ácidos nucleicos y las células huésped que comprenden tales vectores de expresión. También se

proporcionan los métodos de preparación de anticuerpos anti-LAG-3 que utilizan las células huésped que comprenden tales vectores de expresión y que pueden incluir los pasos de (i) expresión del anticuerpo en la célula huésped y (ii) aislamiento del anticuerpo de la célula huésped.

- 5 En otro aspecto, la invención se refiere a anticuerpos anti-LAG-3 de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, para su uso en métodos de estimulación de respuestas inmunitarias. Por ejemplo, se describe en la presente un método de estimulación de una respuesta de un linfocito T específica para un antígeno que comprende poner dicho linfocito T en contacto con un anticuerpo de la invención de forma que se estimule una respuesta del linfocito T específica para el antígeno. Preferentemente, se estimula la producción de interleucina 2 por parte del linfocito T específico para el antígeno. Además, se describe en la presente un método de estimulación de una respuesta inmunitaria (p. ej., una respuesta de linfocito T específica para un antígeno) en un sujeto que comprende administrar un anticuerpo de la invención al sujeto de forma que se estimule una respuesta inmunitaria (p. ej., una respuesta de linfocito T específica para el antígeno) en el sujeto. En un método preferido, el sujeto es un sujeto que padece un tumor y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor. En otro método preferido, el sujeto es un sujeto portador de un virus y se estimula una respuesta inmunitaria contra el virus.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, para su uso en un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo de la invención, o porciones de unión a antígeno del mismo, de forma que se inhiba el crecimiento del tumor en el sujeto. En otro aspecto más, la invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención, o porciones de unión a antígeno del mismo, para su uso en un método para tratar una infección vírica en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de la invención, o porciones de unión a antígeno del mismo, de forma que se trate la infección vírica en el sujeto.

- 25 En otro aspecto más, la invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención, o porciones de unión a antígeno del mismo, para su uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo anti-LAG-3, o porciones de unión a antígeno del mismo, y al menos un anticuerpo inmunoestimulador adicional, tal como un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 y/o un anticuerpo anti-CTLA-4, de forma que se estimule una respuesta inmunitaria en el sujeto, por ejemplo para inhibir el crecimiento tumoral o estimular una respuesta antivírica. En una realización, se administra al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-PD-1. En otra realización, se administra al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-PD-L1. En otra realización más, se administra al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-CTLA-4. En una realización, el anticuerpo anti-LAG-3 es un anticuerpo humano, tal como un anticuerpo de la divulgación. Como alternativa, el anticuerpo anti-LAG-3 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado. En otra realización, el anticuerpo inmunoestimulador adicional (p. ej., el anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 y/o el anticuerpo anti-CTLA-4) es un anticuerpo humano. Como alternativa, el anticuerpo inmunoestimulador adicional puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado.

Breve descripción de las figuras

- 40 La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 49) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 37) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 25F7. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 1), CDR2 (SEC ID N°: 7) y CDR3 (SEC ID N°: 13) están delineadas y las derivaciones V, D y J de la línea germinal están indicadas.
- 45 La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 55) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 43) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal humano 25F7. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 19), CDR2 (SEC ID N°: 25) y CDR3 (SEC ID N°: 31) están delineadas y las derivaciones V y J de la línea germinal están indicadas.
- 50 La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 50) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 38) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 26H10. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 2), CDR2 (SEC ID N°: 8) y CDR3 (SEC ID N°: 14) están delineadas y las derivaciones V, D y J de la línea germinal están indicadas.
- 55 La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 56) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 44) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal humano 26H10. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 20), CDR2 (SEC ID N°: 26) y CDR3 (SEC ID N°: 32) están delineadas y las derivaciones V y J de la línea germinal están indicadas.
- 60 La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 51) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 39) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 25E3. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 3), CDR2 (SEC ID N°: 9) y CDR3 están delineadas y las derivaciones V, D y J de la línea germinal están indicadas.
- 65 La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 57) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 45) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal humano 25E3. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 21), CDR2 (SEC ID N°: 27) y CDR3 (SEC ID N°: 33) están delineadas y las derivaciones V y J de la línea germinal están indicadas.
- La Figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 52) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 40) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 8B7. Las regiones CDR1 (SEC

ID N°: 4), CDR2 (SEC ID N°: 10) y CDR3 (SEC ID N°: 16) están delineadas y las derivaciones V, D y J de la línea germinal están indicadas.

La Figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 58) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 46) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal humano 8B7. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 22), CDR2 (SEC ID N°: 28) y CDR3 (SEC ID N°: 34) están delineadas y las derivaciones V y J de la línea germinal están indicadas.

La Figura 5A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 53) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 41) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 11F2. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 5), CDR2 (SEC ID N°: 11) y CDR3 (SEC ID N°: 17) están delineadas y las derivaciones V, D y J de la línea germinal están indicadas.

La Figura 5B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 59) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 47) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal humano 11F2. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 23), CDR2 (SEC ID N°: 29) y CDR3 (SEC ID N°: 35) están delineadas y las derivaciones V y J de la línea germinal están indicadas.

La Figura 6A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 54) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 42) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 17E5. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 6), CDR2 (SEC ID N°: 12) y CDR3 (SEC ID N°: 18) están delineadas y las derivaciones V, D y J de la línea germinal están indicadas.

La Figura 6B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 60) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 48) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal humano 17E5. Las regiones CDR1 (SEC ID N°: 24), CDR2 (SEC ID N°: 30) y CDR3 (SEC ID N°: 36) están delineadas y las derivaciones V y J de la línea germinal están indicadas.

La Figura 7 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 25F7 (SEC ID N°: 37) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_H 4-34 y JH5b (SEC ID N°: 61 y 62, respectivamente).

La Figura 8 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 25F7 (SEC ID N°: 43) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_K L6 y JK2 (SEC ID N°: 63 y 64, respectivamente).

La Figura 9 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 26H10 (SEC ID N°: 38) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_H 3-33 y JH6B (SEC ID N°: 65 y 66, respectivamente).

La Figura 10 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 26H10 (SEC ID N°: 44) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_K A27 y JK3 (SEC ID N°: 67 y 68, respectivamente).

La Figura 11 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 25E3 (SEC ID N°: 39) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_H 3-20 y JH4b (SEC ID N°: 69 y 70, respectivamente).

La Figura 12 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 25E3 (SEC ID N°: 45) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_K L18 y JK2 (SEC ID N°: 71 y 64, respectivamente).

La Figura 13 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 8B7 (SEC ID N°: 40) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_H 4-34 y JH5b (SEC ID N°: 61 y 62, respectivamente).

La Figura 14 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 8B7 (SEC ID N°: 46) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_K L6 y JK4 (SEC ID N°: 63 y 72, respectivamente).

La Figura 15 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 11F2 (SEC ID N°: 41) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_H 1-24 y JH4b (SEC ID N°: 73 y 70, respectivamente).

La Figura 16 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 11F2 (SEC ID N°: 47) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_K L6 y JK1 (SEC ID N°: 63 y 74, respectivamente).

La Figura 17 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 17E5 (SEC ID N°: 42) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_H 3-33 y 2-2 (SEC ID N°: 65 y 70, respectivamente).

La Figura 18 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 17E5 (SEC ID N°: 48) con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal humana V_K L6 (SEC ID N°: 63 y 75, respectivamente).

La Figura 19 muestra la alineación de la secuencia proteica codificada por el clon pa23-5 de ADNc de la LAG-3 de mono (SEC ID N°: 93) con la secuencia de la proteína LAG-3 de mono rhesus depositada en Genbank (SEC ID N°: 94) (N.º de acceso en Genbank XM_001108923). La región peptídica del bucle extra y el dominio transmembrana están subrayados. El aminoácido diferente entre las dos secuencias (posición de aminoácido 419) está resaltado en negrita.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere a anticuerpos monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales humanos, que se unen a la LAG-3 humana y que presentan propiedades funcionales deseables. Esta divulgación proporciona anticuerpos aislados, métodos de fabricación de tales anticuerpos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que comprenden tales anticuerpos, y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención. Además, se describen en la presente métodos de utilización de los anticuerpos, tales como para detectar una proteína LAG-3, así como también a los métodos de utilización de los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención para estimular respuestas inmunes, solos o combinados con otros anticuerpos inmunoestimuladores. Por consiguiente, esta divulgación también proporciona métodos de utilización de los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención para, por ejemplo, inhibir el crecimiento tumoral o tratar una infección vírica.

Para que la presente divulgación pueda comprenderse más fácilmente, se definen, en primer lugar, ciertos términos. Se presentan otras definiciones adicionales en la descripción detallada.

El término "LAG-3" se refiere al gen 3 de activación linfocitaria. El término "LAG-3" incluye variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para una proteína LAG-3 humana pueden, en ciertos casos, presentar reactividad cruzada con una proteína LAG-3 de una especie no humana. En otras realizaciones, los anticuerpos específicos para una proteína LAG-3 humana pueden ser completamente específicos para la proteína LAG-3 humana y puede que no presenten reactividad cruzada con otras especies u otros tipos de reactividad cruzada, o puede que presenten reactividad cruzada con la LAG-3 de otras especies determinadas pero no de todas las demás especies (p. ej., que presente reactividad cruzada con la LAG-3 de mono pero no con la LAG-3 de ratón). El término "LAG-3 humana" se refiere a la secuencia de la LAG-3 humana, tal como la secuencia de aminoácidos completa de la LAG-3 humana con el N.º de acceso en Genbank NP_002277. El término "LAG-3 de ratón" se refiere a la secuencia de la LAG-3 de ratón, tal como la secuencia de aminoácidos completa de la LAG-3 de ratón con N.º de acceso en Genbank NP_032505. La LAG-3 se conoce también en la materia como, por ejemplo, CD223. La secuencia de la LAG-3 humana puede diferenciarse de la LAG-3 humana con N.º de acceso en Genbank NP_002277 al poseer, p. ej., mutaciones conservadas o mutaciones en regiones no conservadas y la LAG-3 posee sustancialmente la misma función biológica que la LAG-3 humana con N.º de acceso en Genbank NP_002277. Por ejemplo, una función biológica de la LAG-3 humana es poseer un epítipo en el dominio extracelular de la LAG-3 que se une específicamente a un anticuerpo de la presente divulgación, o una función biológica de la LAG-3 humana es la unión a moléculas del MHC de clase II.

Se pretende que el término "LAG-3 de mono" englobe las proteínas LAG-3 expresadas por monos del nuevo mundo y del viejo mundo, incluidas, pero sin limitarse a, LAG-3 de monos cynomolgus y LAG-3 de monos rhesus. Una secuencia de aminoácidos representativa para la LAG-3 de mono es la secuencia de aminoácidos de la LAG-3 de mono rhesus que se muestra en la Figura 19 y la SEC ID N.º: 85, la cual está también depositada con el N.º de acceso en Genbank XM_001108923. Otra secuencia de aminoácidos representativa para la LAG-3 de mono es la secuencia alternativa del clon pa23-5 de mono rhesus que se muestra en la Figura 19 y la SEC ID N.º: 84, aislada como se describe en el Ejemplo 3A, subsección 3. Esta secuencia alternativa de rhesus presenta un único aminoácido diferente en la posición 419 en comparación con la secuencia depositada en Genbank.

Una secuencia particular de la LAG-3 humana será, generalmente, al menos un 90 % idéntica en la secuencia de aminoácidos de la LAG-3 humana con el N.º de acceso en Genbank NP_002277 y contiene residuos aminoacídicos que identifican la secuencia de aminoácidos como humana por comparación con secuencias de aminoácidos de la LAG-3 de otras especies (p. ej., Múridos). En ciertos casos, una LAG-3 humana puede ser al menos un 95 %, o incluso al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica en la secuencia de aminoácidos de la LAG-3 con el N.º de acceso en Genbank NP_002277. En ciertas realizaciones, una secuencia de la LAG-3 humana no puede presentar más de 10 aminoácidos diferentes respecto a la secuencia de la LAG-3 con el N.º de acceso en Genbank NP_002277. En ciertas realizaciones, la LAG-3 humana no puede presentar más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 ó 1 aminoácidos diferentes respecto a la secuencia de la LAG-3 con el N.º de acceso en Genbank NP_002277. El porcentaje de identidad se puede determinar como se describe en la presente.

El término "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células mencionadas anteriormente o el hígado (incluidos anticuerpos, citocinas y el complemento) que produce un daño selectivo a, destrucción de o eliminación de patógenos invasores del cuerpo humano, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas, o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos normales humanos.

Una "respuesta de linfocito T específica para un antígeno" se refiere a las respuestas por parte de un linfocito T que se deben a la estimulación del linfocito T con el antígeno para el cual el linfocito T es específico. Los ejemplos no limitantes de respuestas de linfocitos T debidas a la estimulación específica de antígenos incluyen la proliferación y la producción de citocinas (p. ej., la producción de IL-2).

Tal como se hace referencia en la presente al término "anticuerpo", este incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadenas simples de estos. Los anticuerpos completos son glucoproteínas que comprenden al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviado en la presente como V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios: C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviado en la presente como V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio: C_L . Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), entremezcladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones de entramado (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestos del amino terminal al carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores huésped, incluidos varias células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se utiliza en la presente, hace referencia a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (p. ej., una proteína LAG-3). Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa pueden realizar la función de unión a antígeno de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente constituido por los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3.^a edición, 1993); (iv) un fragmento Fd constituido por los dominios V_H y C_{H1} ; (v) un fragmento Fv constituido por los dominios V_L y V_H de una única rama de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que está constituido por un dominio V_H ; (vii) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada; y (viii) un nanocuerpo, una región variable de la cadena pesada que contiene un dominio variable simple y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , estén codificados por genes separados, estos se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permite convertirlos en una cadena proteica simple en la cual las regiones V_L y V_H se parean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv (scFv); véase, p. ej., Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Se pretende también que tales anticuerpos de cadena simple queden englobados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales con los que estarán familiarizados los expertos en la materia y los fragmentos se someten a estudios de utilidad del mismo modo que ocurre con los anticuerpos intactos.

Se pretende que un "anticuerpo aislado", como se utiliza en la presente, haga referencia a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tengan especificidades antigénicas diferentes (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a una proteína LAG-3 está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de las proteínas LAG-3). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína LAG-3 humana puede, sin embargo, presentar reactividad cruzada con otros antígenos, tales como las proteínas LAG-3 de otras especies. Es más, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o productos químicos.

El término "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se utiliza en la presente se refiere a un preparado de moléculas de anticuerpo de composición molecular simple. Una composición de anticuerpos monoclonales exhibe una única especificidad y afinidad de unión a un epítipo particular.

Se pretende que el término "anticuerpo humano", como se utiliza en la presente, incluya anticuerpos que poseen regiones variables en las cuales tanto las regiones de entramado como las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos aminoacídicos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o dirigida *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo humano", como se utiliza en la presente, incluya anticuerpos en los cuales se han insertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias de entramado humanas.

El término "anticuerpo monoclonal humano" hace referencia a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tienen regiones variables en las cuales tanto las regiones de entramado como las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, p. ej., un ratón transgénico, que posee un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada y un transgén de la cadena ligera humanos fusionados a una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se utiliza en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humanos o un hibridoma preparado a partir de estos (descrito con mayor detalle más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, p. ej., a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una genoteca recombinante combinatoria de anticuerpos humanos y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualesquiera otros medios que impliquen el corte y empalme de las secuencias génicas humanas de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes poseen regiones variables en las cuales las regiones de entramado y las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en ciertas realizaciones dichos anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a mutagénesis *in vitro* (o mutagénesis somática *in vivo* si se utiliza un animal transgénico para las secuencias de Ig humana) y así las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son las secuencias que, aunque se deriven de las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana y se relacionen con estas, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal del anticuerpo humano *in vivo*.

El término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG) que es codificado por los genes de la región constante de la cadena pesada.

Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se utilizan de forma intercambiable en la presente con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

La expresión "derivados de anticuerpos humanos" hace referencia a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, p. ej., un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

Se pretende que la expresión "anticuerpo humanizado" haga referencia a anticuerpos en los cuales se han injertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias de entramado humanas. Se pueden realizar modificaciones adicionales de la región de entramado en las secuencias del entramado humano.

Se pretende que la expresión "anticuerpo quimérico" haga referencia a anticuerpos en los cuales las secuencias de la región variable se derivan de una especie y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el cual las secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante se derivan de un anticuerpo humano.

Se pretende que un anticuerpo que "se une específicamente a la LAG-3 humana", como se utiliza en la presente, haga referencia a un anticuerpo que se une a la proteína LAG-3 humana (y posiblemente a una proteína LAG-3 de una o más especies no humanas) pero no se une sustancialmente a proteínas que no sean LAG-3. Preferentemente, el anticuerpo se une a la proteína LAG-3 humana con "alta afinidad", es decir, con una K_D de 1×10^{-7} M o menor, más preferentemente de 5×10^{-8} M o menor, más preferentemente de 3×10^{-8} M o menor, más preferentemente de 1×10^{-8} M o menor, más preferentemente de 5×10^{-9} M o menor o incluso más preferentemente de 1×10^{-9} M o menor.

La expresión "no se une sustancialmente" a una proteína o células, como se utiliza en la presente, significa que no se une o no se une con una alta afinidad a la proteína o células, es decir, se une a la proteína o células con una K_D de 1×10^{-6} M o mayor, más preferentemente de 1×10^{-5} M o mayor, más preferentemente de 1×10^{-4} M o mayor, más preferentemente de 1×10^{-3} M o mayor, aún más preferentemente de 1×10^{-2} M o mayor.

Se pretende que el término " K_{asoc} " o " K_a ", como se utiliza en la presente, haga referencia a la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que se pretende que el término " K_{dis} " o " K_d ", como se utiliza en la presente, haga referencia a la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Se pretende que el término " K_D ", como se utiliza en la presente, haga referencia a la constante de disociación, que se obtiene de la proporción de K_d respecto a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para los anticuerpos pueden ser determinados usando los métodos debidamente establecidos en el arte. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es utilizando la resonancia de plasmones superficiales, preferentemente usando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

El término "alta afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que posee una K_D de 1×10^{-7} M o menor, más preferentemente de 5×10^{-8} M o menor, incluso más preferentemente de 1×10^{-8} M o menor, incluso más preferentemente de 5×10^{-9} M o menor e incluso más preferentemente de 1×10^{-9} M o menor para un antígeno de interés. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos del anticuerpo. Por ejemplo, la unión de "alta afinidad" para un isotipo de IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-6} M o menor, más preferentemente de 10^{-7} M o menor, incluso más preferentemente de 10^{-8} M o menor.

El término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, p. ej., mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas,

caballos, gallinas, anfibios y reptiles, aunque se prefieren los mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas y caballos.

En las siguientes subsecciones se describen varios aspectos de la invención con más detalle.

5

Anticuerpos anti-LAG-3 que poseen propiedades funcionales particulares

Los anticuerpos de la invención se caracterizan por características o propiedades funcionales particulares de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente a la LAG-3 humana y se pueden unir a la LAG-3 de otras especies determinadas, p. ej., LAG-3 de mono (p. ej., mono cynomolgus, mono rhesus), pero no se unen sustancialmente a la LAG-3 de otras especies determinadas, p. ej., LAG-3 de ratón. Preferentemente, un anticuerpo de la invención se une a la LAG-3 humana con alta afinidad.

La capacidad del anticuerpo de estimular una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta de linfocito T específica para un antígeno, puede venir indicada por, por ejemplo, la capacidad del anticuerpo de estimular la producción de interleucina 2 (IL-2) en una respuesta de linfocito T específica para un antígeno. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se une a la LAG-3 humana pero no presenta una capacidad para estimular una respuesta de linfocito T específica para un antígeno. En otras realizaciones, un anticuerpo de la invención se une a la LAG-3 humana pero no presenta una capacidad para estimular una respuesta de linfocito T específica para un antígeno. Otros medios mediante los cuales se puede evaluar la capacidad del anticuerpo de estimular una respuesta inmunitaria incluyen la capacidad del anticuerpo de inhibir el crecimiento tumoral, tal como en un modelo de injerto tumoral *in vivo* (véase, p. ej., el Ejemplo 6) o la capacidad del anticuerpo de estimular una respuesta autoinmunitaria, tal como la capacidad de inducir el desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria en un modelo autoinmunitario, tal como la capacidad de inducir el desarrollo de la diabetes en el modelo de ratones NOD (véase, p. ej., el Ejemplo 7).

25

La unión de un anticuerpo de la invención a la LAG-3 se puede evaluar utilizando una o más de las técnicas debidamente establecidas en la materia. Por ejemplo, en una realización preferida, un anticuerpo se puede estudiar mediante un ensayo de citometría de flujo en el que el anticuerpo se hace reaccionar con una línea celular que expresa la LAG-3 humana, tal como las células CHO que han sido transfectadas para expresar la LAG-3 (p. ej., la LAG-3 humana o la LAG-3 de mono (p. ej., mono rhesus o cynomolgus) o la LAG-3 de ratón) en su superficie celular (véase, p. ej., el Ejemplo 3A para más información sobre un ensayo adecuado). Otras células adecuadas para utilizar en los ensayos de citometría de flujo incluyen linfocitos T CD4⁺ activados estimulados con anti-CD3, que expresan la LAG-3 natural. Además o como alternativa, la unión del anticuerpo, incluida la cinética de la unión (p. ej., el valor de K_D) se puede estudiar en ensayos de unión BIAcore (véase, p. ej., el Ejemplo 3B para más información sobre ensayos adecuados). Otros ensayos de unión adecuados incluyen ensayos ELISA, por ejemplo, utilizando una proteína LAG-3 recombinante (véase, p. ej., el Ejemplo 1 para más información sobre un ensayo adecuado).

35

Preferentemente, un anticuerpo de la invención se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 5×10^{-8} M o menor, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 2×10^{-8} M o menor, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 5×10^{-9} M o menor, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 4×10^{-9} M o menor, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 3×10^{-9} M o menor, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 2×10^{-9} M o menor, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 1×10^{-9} M o menor, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 5×10^{-10} M o menor, o se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 1×10^{-10} M o menor.

40

Normalmente, un anticuerpo de la invención se une a la LAG-3 en tejidos linfoides, tales como amígdala, bazo o timo, lo cual se puede detectar por inmunohistoquímica. Además, como se describe con más detalle en el Ejemplo 8, ciertos anticuerpos anti-LAG-3 de la invención tiñen el tejido pituitario (p. ej., se retienen en la pituitaria) según se midió por inmunohistoquímica, mientras que otros anticuerpos anti-LAG-3 de la invención no tiñen el tejido pituitario (p. ej., no se retienen en la pituitaria) según se midió por inmunohistoquímica. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 humano que tiñe el tejido pituitario por inmunohistoquímica, mientras que en otra realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 humano que no tiñe el tejido pituitario por inmunohistoquímica.

50

Los anticuerpos preferidos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Además o como alternativa, los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos monoclonales quiméricos o humanizados.

55

Anticuerpos monoclonales 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5

Un anticuerpo preferido de la invención es el anticuerpo monoclonal humano 25F7. 25F7 y los anticuerpos anti-LAG3 adicionales 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se aislaron y caracterizaron estructuralmente como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Las secuencias de aminoácidos V_H de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en SEC ID N°: 37-42, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos V_K de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en SEC ID N°: 43-48, respectivamente.

60

Dado que cada uno de estos anticuerpos se puede unir a la LAG-3 humana, las secuencias V_H y V_L pueden "mezclarse y emparejarse" para crear otras moléculas de unión anti-LAG-3. Preferentemente, cuando las cadenas

65

V_H y V_L están mezcladas y emparejadas, una secuencia V_H de un par V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia V_H estructuralmente similar. De modo análogo, preferentemente una secuencia V_L de un par V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia V_L estructuralmente similar.

- 5 En un aspecto, esta divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 37 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 43.

10 En otro aspecto, esta divulgación proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y de la cadena ligera de 25F7. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_H de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en SEC ID N°: 37-42, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_H de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en SEC ID N°: 43-48, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_H de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en SEC ID N°: 13-14, GGY y 16-18, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_K de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en SEC ID N°: 19-24, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_K de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en SEC ID N°: 25-30. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_K de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en SEC ID N°: 31-36, respectivamente. Las regiones CDR se delinean utilizando el sistema de Kabat (Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, N.º de Publicación NIH 91-3242).

25 Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a la LAG-3 humana y que la especificidad de unión a antígeno viene proporcionada fundamentalmente por las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_L pueden "mezclarse y emparejarse" (es decir, se pueden mezclar y emparejar las CDR de anticuerpos diferentes, aunque cada anticuerpo debe contener una CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H y una CDR1, CDR2 y CDR3 de V_L) para crear otras moléculas de unión anti-LAG-3. La unión a LAG-3 de tales anticuerpos "mezclados y emparejados" puede estudiarse utilizando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los ejemplos (p. ej., los ELISA y el análisis Biacore®). Preferentemente, cuando se mezclan y emparejan secuencias CDR de V_H , la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_H particular se reemplaza con una o más secuencias CDR estructuralmente similares. De forma análoga, cuando las secuencias CDR de V_L se mezclan y emparejan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_L en particular se reemplaza preferentemente con una o más secuencias CDR estructuralmente similares. Resultará evidente para un experto en la materia que se pueden crear nuevas secuencias de V_H y V_L sustituyendo una o más secuencias de la región CDR de V_H y/o V_L con secuencias estructuralmente similares a las de las secuencias CDR divulgadas en la presente para los anticuerpos monoclonales 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5. En una realización preferida, el anticuerpo de la invención o la porción de unión a antígeno del mismo comprende:

- 40 (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID N°: 1;
 (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID N°: 7;
 (c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID N°: 13;
 (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID N°: 19;
 (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID N°: 25; y
 (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID N°: 31.

45 Se sabe con certeza en el arte que el dominio CDR3, independientemente del (de los) dominio(s) CDR1 y/o CDR2, solo puede determinar la especificidad de unión de un anticuerpo para un antígeno cognado, y que previsiblemente se pueden generar múltiples anticuerpos con la misma especificidad de unión basándose en una secuencia CDR3 común. Véanse, por ejemplo, Klimka *et al.*, *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000); Beiboer *et al.*, *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000); Rader *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998); Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994); Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995); Ditzel *et al.*, *J. Immunol.* 157:739-749 (1996); Berezov *et al.*, *BLAjournal* 8:Scientific Review 8 (2001); Igarashi *et al.*, *J. Biochem (Tokyo)* 117:452-7 (1995); Bourgeois *et al.*, *J. Virol* 72:807-10 (1998); Levi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:4374-8 (1993); Polymenis and Stoller, *J. Immunol.* 152:5218-5329 (1994) y Xu and Davis, *Immunity* 13:37-45 (2000). Véase también las Patentes de EE. UU. N.ºs 6 951 646; 6 914 128; 6 090 382; 6 818 216; 6 156 313; 6 827 925; 5 833 943; 5 762 905 y 5 760 185.

Anticuerpos que poseen secuencias de la línea germinal particulares

60 En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena pesada de un gen particular de inmunoglobulina de la cadena pesada de la línea germinal y/o una región variable de la cadena ligera de un gen particular de inmunoglobulina de la cadena ligera de la línea germinal.

65 Por ejemplo, en una realización preferida, esta divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 3-20 humano, un gen V_H 4-34 humano, un gen V_H 3-33 humano o un gen V_H 1-24 humano, donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana. En una realización preferida, esta divulgación

proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen V_H 4-34 humano y comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto o se deriva de un gen V_K L6 humano, donde el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana.

Dichos anticuerpos también pueden poseer una o más de las características funcionales descritas anteriormente en detalle, tales como una alta afinidad de unión a la LAG-3 humana, la unión a la LAG-3 de mono, la carencia de unión a la LAG-3 de ratón, la capacidad de inhibir la unión de la LAG-3 a las moléculas del MHC de clase II y/o la capacidad de estimular las respuestas de linfocitos T específicas para un antígeno.

Un ejemplo de un anticuerpo que posee V_H y V_L de V_H 3-20 y V_K L18, respectivamente, es el anticuerpo 25E3. Ejemplos de anticuerpos que poseen V_H y V_L de V_H 4-34 y V_K L6, respectivamente, son los anticuerpos 25F7 y 8B7. Un ejemplo de un anticuerpo que posee V_H y V_L de V_H 3-33 y V_K A27, respectivamente, es el anticuerpo 26H10. Un ejemplo de un anticuerpo que posee V_H y V_L de V_H 1-24 y V_K L6, respectivamente, es el anticuerpo 11F2. Un ejemplo de un anticuerpo que posee V_H y V_L de V_H 3-33 y V_K L6, respectivamente, es el anticuerpo 17E5.

Como se utiliza en la presente, un anticuerpo humano comprende regiones variables de la cadena pesada o ligera que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia particular de la línea germinal si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Dichos sistemas incluyen la inmunización de un ratón transgénico portador de genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o el cribado de una genoteca de inmunoglobulina humana expresada en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana puede identificarse como tal por comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal humana y por selección de la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana que es la más similar en secuencia (es decir, el % de identidad máximo) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia particular de inmunoglobulina de la línea germinal humana puede contener aminoácidos diferentes en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas espontáneas o a la introducción intencional de una mutación dirigida. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado es normalmente al menos un 90 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana y contiene residuos aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se comparan con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal de otras especies (p. ej., las secuencias de la línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos un 95 %, o incluso al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Normalmente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia particular de la línea germinal humana no presentará más de 10 aminoácidos diferentes respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano no puede presentar más de 5, o incluso más de 4, 3, 2 ó 1, aminoácidos diferentes respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

Anticuerpos homólogos

Los anticuerpos de la invención comprenden regiones variables de las cadenas pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos del anticuerpo monoclonal 25F7 descrito en la presente y donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención. Específicamente, esta divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, donde:

- (a) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % homóloga a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 37;
- (b) la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % homóloga a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 43; y
- (c) el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana.

El anticuerpo puede poseer una o más de las siguientes características funcionales indicadas anteriormente, tales como una alta afinidad de unión a la LAG-3 humana, la unión a la LAG-3 de mono, la carencia de unión a la LAG-3 de ratón, la capacidad de inhibir la unión de la LAG-3 a las moléculas del MHC de clase II y/o la capacidad de estimular las respuestas de linfocitos T específicas para un antígeno.

En varias realizaciones, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos V_H y/o V_L pueden ser un 96 %, 97 %, 98 % ó 99 % homólogas a las secuencias expuestas anteriormente. Un anticuerpo que posee regiones V_H y V_L con una alta homología (es

decir, un 95 % o mayor) a las regiones V_H y V_L de las secuencias expuestas anteriormente se puede obtener por mutagénesis (p. ej., la mutagénesis dirigida o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican las SEC ID N°: 49 ó 55, seguida del análisis del anticuerpo alterado codificado para determinar la función retenida (es decir, las funciones expuestas anteriormente) usando los ensayos funcionales descritos en la presente.

Como se utiliza en la presente, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, el % de homología = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de lagunas y la longitud de cada laguna, que precisa(n) ser introducida(s) para la alineación óptima de las dos secuencias. Se puede conseguir comparar las secuencias y determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias utilizando un algoritmo matemático como el que se describe en los ejemplos no limitantes que aparecen más adelante.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de peso de residuo PAM120, una penalización por longitud de espacio de 12 y una penalización por espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) que ha sido incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Además o como alternativa, las secuencias de proteínas de la presente divulgación pueden utilizarse además como "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda de comparación con las bases de datos públicas a fin de, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden realizar usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpo de la invención. Para obtener alineaciones espaciadas con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, los parámetros por defecto de los respectivos programas resultan útiles (p. ej., XBLAST y NBLAST). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticuerpos con modificaciones conservadoras

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, que tienen secuencias específicas de aminoácidos basadas en 25F7, o modificaciones conservadoras de estos, y donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención. Se sobreentiende en la materia que se pueden realizar ciertas modificaciones conservadoras de las secuencias que no suprimen la unión al antígeno. Véanse, p. ej., Brummell *et al.* (1993) *Biochem* 32:1180-8; de Wildt *et al.* (1997) *Prot. Eng.* 10:835-41; Komissarov *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:26864-26870; Hall *et al.* (1992) *J. Immunol.* 149:1605-12; Kelley and O'Connell (1993) *Biochem.* 32:6862-35; Adib-Conquy *et al.* (1998) *Int. Immunol.* 10:341-6 y Beers *et al.* (2000) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43. Por consiguiente, esta divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión al antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, donde:

- (a) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13 y modificaciones conservadoras de esta;
- (b) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 31 y modificaciones conservadoras de ésta; y
- (c) el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humana.

Además o como alternativa, el anticuerpo puede poseer una o más de las siguientes características funcionales descritas anteriormente, tales como una alta afinidad de unión a la LAG-3 humana, la unión a la LAG-3 de mono, la carencia de unión a la LAG-3 de ratón, la capacidad de inhibir la unión de la LAG-3 a las moléculas del MHC de clase II y/o la capacidad de estimular las respuestas de linfocitos T específicas para un antígeno.

En una realización preferida, la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7 y modificaciones conservadoras de ésta; y la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25 y modificaciones conservadoras de ésta. En otra realización preferida, la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 y modificaciones conservadoras de ésta; y la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 19 y modificaciones conservadoras de ésta.

En varias realizaciones, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, anticuerpo humanizado o anticuerpo quimérico.

Se pretende que el término "modificaciones de secuencia conservadoras", como se utiliza en la presente, haga referencia a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo de la invención por medio de técnicas estándares de uso común en la materia, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquellas en las que el residuo aminoacídico se sustituye por un residuo aminoacídico que posee una cadena lateral similar. Se han caracterizado en la materia las familias de los residuos aminoacídicos que poseen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales apolares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, se puede reemplazar uno o más residuos aminoacídicos en las regiones CDR de un anticuerpo de la invención por otros residuos aminoacídicos de la misma familia de cadena lateral y se puede realizar un análisis del anticuerpo alterado para determinar la función retenida (es decir, las funciones expuestas anteriormente) empleando los ensayos funcionales descritos en la presente.

Anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos Anti-LAG-3

Los anticuerpos de la invención que se unen al mismo epítipo de la LAG-3 que el anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 25F7 (es decir, tienen la capacidad de presentar competición cruzada por la unión a la LAG-3 humana con el anticuerpo monoclonal 25F7). En realizaciones preferidas, el anticuerpo de referencia para los estudios de la competición cruzada puede ser el anticuerpo monoclonal 25F7.

Se pueden identificar tales anticuerpos que presentan competición cruzada basándose en su capacidad para competir de forma cruzada con 25F7 en los ensayos estándares de unión a la LAG-3. Por ejemplo, se pueden utilizar los ensayos ELISA estándares en los cuales una proteína LAG-3 recombinante humana se inmoviliza en la placa, se marca uno de los anticuerpos con una marca fluorescente y se evalúa la capacidad de los anticuerpos no marcados de competir por la unión con el anticuerpo marcado. Además o como alternativa, el análisis BIAcore se puede utilizar para determinar la capacidad de los anticuerpos de presentar competición cruzada. La capacidad de un anticuerpo de ensayo de inhibir la unión de, por ejemplo, 25F7 a la LAG-3 humana confirma que el anticuerpo de ensayo puede competir con 25F7 por la unión a la LAG-3 humana y, por lo tanto, se une al mismo epítipo en la LAG-3 humana que el 25F7. En una realización preferida, el anticuerpo que se une al mismo epítipo en la LAG-3 humana que el 25F7 es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar y aislar como se describe en los ejemplos.

Como se indica más detalladamente en el Ejemplo 3C, la unión de 25E3, 25F7 y 8B7 a la LAG-3 humana se ha asignado a una región "bucle extra" en el primer dominio extracelular de la LAG-3 humana. La secuencia de la región de bucle extra se expone en SEC ID N°: 79. Utilizando un experimento de detección de péptidos, la unión del 25E3 a la región de bucle extra se ha asignado a la siguiente secuencia de aminoácidos: PGHPLAPG (SEC ID N°: 76), mientras que la unión del 25F7 a la región de bucle extra se ha asignado a la siguiente secuencia de aminoácidos: HPAAPSSW (SEC ID N°: 77), y la unión del 8B7 a la región de bucle extra se ha asignado a la siguiente secuencia de aminoácidos: PAAPSSWG (SEC ID N°: 78). Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 que se une a un epítipo de la LAG-3 humana que comprende la secuencia de aminoácidos PGHPLAPG (SEC ID N°: 76). Específicamente, la invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 que se une a un epítipo de la LAG-3 humana que comprende la secuencia de aminoácidos HPAAPSSW (SEC ID N°: 77).

Anticuerpos sintetizados por ingeniería genética y modificados

Un anticuerpo que posee una o más secuencias V_H y/o V_L divulgadas en la presente pueden usarse como material de partida para sintetizar por ingeniería genética un anticuerpo modificado. Dicho anticuerpo modificado puede poseer propiedades del anticuerpo de partida alteradas. Un anticuerpo puede sintetizarse por ingeniería genética modificando uno o más residuos en una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo, en una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones de entramado. Además o como alternativa, un anticuerpo se puede sintetizar por ingeniería genética modificando los residuos en la región o regiones constantes para, por ejemplo, alterar la función o las funciones efectoras del anticuerpo.

Por ejemplo, se pueden utilizar injertos de CDR para sintetizar por ingeniería genética regiones variables de anticuerpos. Los anticuerpos interaccionan con los antígenos de interés predominantemente a través de los residuos aminoacídicos que están situados en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y de la cadena ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos en las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que en las secuencias que no pertenecen a las CDR. Debido a que las secuencias CDR son

responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de los anticuerpos específicos espontáneos construyendo vectores de expresión que incluyan las secuencias CDR del anticuerpo específico espontáneo injertadas en las secuencias de entramado de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, p. ej., Riechmann *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; las Patentes de EE. UU. N.^{os} 5 225 539; 5 530 101; 5 585 089; 5 693 762 y 6 180 370).

Por consiguiente, otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEC ID N^o: 1, SEC ID N^o: 7 y SEC ID N^o: 13, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEC ID N^o: 19, SEC ID N^o: 25 y SEC ID N^o: 31, respectivamente. Por lo tanto, dichos anticuerpos contienen las secuencias CDR de V_H y V_L del anticuerpo monoclonal 25F7 y pueden contener secuencias de entramado diferentes de este anticuerpo.

Dichas secuencias de entramado pueden ser obtenidas de bases de datos de ADN públicas o de las referencias publicadas que incluyen secuencias del gen del anticuerpo de la línea germinal. Por ejemplo, se pueden encontrar secuencias de ADN de la línea germinal para genes de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera humanas en la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "VBase" (disponible de Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como también en Kabat *et al.* (1991), cited *supra*; Tomlinson *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Cox *et al.* (1994) "A Directory of Human Germline V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836. A modo de otro ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para genes de la región variable de las cadenas ligera y pesada humanas se pueden encontrar en la base de datos del Genbank. Por ejemplo, las siguientes secuencias de la cadena pesada de la línea germinal encontradas en el ratón HCo7 HuMAb están disponibles con los siguientes números de acceso en Genbank: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 3-33 (NG_0010109 y NT_024637) y 3-7 (NG_0010109 y NT_024637). A modo de otro ejemplo, las siguientes secuencias de la cadena pesada de la línea germinal encontradas en el ratón HCo12 HuMAb están disponibles con los siguientes números de acceso en Genbank: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 5-51 (NG_0010109 y NT_024637), 4-34 (NG_0010109 y NT_024637), 3-30.3 (CAJ556644) y 3-23 (AJ406678).

Las secuencias de proteínas del anticuerpo se comparan con una base de datos de secuencias de proteínas compilada usando uno de los métodos de búsqueda de similitud entre secuencias llamado el Gapped BLAST (Altschul *et al.* (1997), *supra*), con el que estarán familiarizados los expertos en la materia.

Las secuencias de entramado preferidas para utilizar en los anticuerpos de la invención son aquéllas que son estructuralmente similares a las secuencias de entramado utilizadas por los anticuerpos seleccionados de la invención, es decir, similares a la secuencia de entramado V_H 4-34 (SEC ID N^o: 61) y/o la secuencia de entramado V_K L6 (SEC ID N^o: 63) utilizadas por el anticuerpo monoclonal preferido de la invención. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_K se pueden injertar en las regiones de entramado que poseen la secuencia idéntica a aquella encontrada en el gen de inmunoglobulina de la línea germinal a partir del cual la secuencia de entramado se deriva, o las secuencias CDR se pueden injertar en las regiones de entramado que contienen una o más mutaciones comparadas con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha descubierto que en ciertos casos es beneficioso mutar los residuos en las regiones de entramado para mantener o fomentar la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N.^{os} 5 530 101; 5 585 089; 5 693 762 y 6 180 370).

Otro tipo de modificación de la región variable es mutar los residuos aminoacídicos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V_H y/o V_L para mejorar de esta forma una o más propiedades de la unión (por ejemplo, la afinidad) al anticuerpo de interés. La mutagénesis dirigida o mutagénesis mediada por PCR puede realizarse para introducir la o las mutaciones, y se puede evaluar el efecto sobre la unión del anticuerpo u otra propiedad funcional de interés en ensayos *in vitro* o *in vivo* como los que se describen en la presente y se proporcionan en los ejemplos. Se introducen modificaciones preferiblemente conservadoras (como se indicó anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos, pero son preferiblemente sustituciones. Es más, normalmente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos en una región CDR.

Por consiguiente, los anticuerpos anti-LAG-3 monoclonales aislados, o las porciones de unión a antígeno de este, descritas en la presente pueden comprender una región variable de la cadena pesada que comprende: (a) una región CDR1 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N^o 1, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEC ID N^o: 1; (b) una región CDR2 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N^o: 7 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEC ID N^o: 7; (c) una región CDR3 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N^o: 13, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEC ID N^o: 13; (d) una región CDR1 de

V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 19, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEC ID N°: 19; (e) una región CDR2 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEC ID N°: 25; y (f) una región CDR3 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 31 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEC ID N°: 31.

Los anticuerpos de la invención sintetizados por ingeniería genética incluyen aquellos en los que se han llevado a cabo modificaciones de los residuos de entramado en V_H y/o V_L para, por ejemplo, mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, tales modificaciones del entramado se llevan a cabo para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque consiste en "retromutar" uno o más residuos de entramado a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que se ha sometido a mutación somática puede contener residuos de entramado que se diferencian de la secuencia de la línea germinal de la cual se deriva el anticuerpo. Dichos residuos se pueden identificar comparando las secuencias de entramado del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las cuales se deriva el anticuerpo.

Por ejemplo, la Tabla A muestra regiones en las que una posición de un aminoácido de la región de entramado (utilizando el sistema de numeración de Kabat) es diferente de la línea germinal y cómo se puede retromutar esta posición a la línea germinal mediante las sustituciones indicadas:

Tabla A – Ejemplos de retromutaciones		
Región	Posición del aminoácido del entramado (numeración de Kabat)	Retromutación
25E3 V_H	72	G72R
25E3 V_H	95	Y95H
25E3 V_H	97	T97A
25E3 V_H	98	T98R
25F7 V_H	69	L69I
25F7 V_H	71	L71V
25F7 V_H	83	R83S
25F7 V_H	97	F97R
8B7 V_H	76	K76N
8B7 V_H	79	A79S
8B7 V_H	83	N83S
8B7 V_H	112	P112Q
11F2 V_H	3	D3A
17E5 V_H	3	H3Q
8B7 V_H	59	C59Y
8B7 V_H	59	C59S

Otro tipo de modificación del entramado implica mutar uno o más residuos en la región de entramado o incluso en una o más regiones CDR para eliminar los epítomos de los linfocitos T con el fin de reducir de este modo la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. También se hace referencia a este enfoque como "desinmunización" y se describe más detalladamente en la Publicación de Patente de EE. UU. N.º 20030153043.

Además o como alternativa a las modificaciones llevadas a cabo en las regiones CDR o de entramado, los anticuerpos de la invención se pueden sintetizar por ingeniería genética para que incluyan modificaciones en la región Fc, normalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la unión al complemento, la unión al receptor Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de la invención se puede modificar químicamente (p. ej., se pueden enlazar una o más partes de grupos químicos al anticuerpo) o se puede modificar para alterar su glucosilación, para alterar así una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe más detalladamente a continuación. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice UE de Kabat.

En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo isotópico IgG4 que comprende una mutación de Serina a Prolina en la posición correspondiente con la posición 228 (S228P; índice UE) en la región bisagra de la región constante de la cadena pesada. Se ha detectado que esta mutación suprime la heterogeneidad de los puentes disulfuro entre las cadenas pesadas en la región bisagra (Angal *et al. supra*; la posición 241 se basa en el sistema de numeración de Kabat). Por ejemplo, en varias realizaciones, un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención puede comprender una región variable de la cadena pesada de 25F7 (SEC ID N°: 37) enlazada a una región constante de

IgG4 humana en la que la Serina en una posición correspondiente con la posición 241 como se describe en Angal *et al.*, *supra*, se ha mutado a Prolina. Por lo tanto, par la región variable de la cadena pesada de 25F7 enlazada a la región constante de IgG4 humana, esta mutación se corresponde con una mutación S228P por el índice UE.

5 En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de manera tal que se altere el número de residuos de cisteína en la región bisagra, p. ej., aumenta o disminuye. Este enfoque se describe además en la Patente de EE. UU. N.º 5 677 425. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar la unión de las cadenas ligeras y pesadas, o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

10 En otra realización, se muta la región bisagra Fc de un anticuerpo para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfase entre los dominios CH2-CH3 del fragmento bisagra Fc de forma que el anticuerpo dificulte la unión de la proteína A estafilocócica (SpA) relativa a la unión natural de la SpA con el dominio bisagra Fc. Este enfoque se describe más detalladamente en la Patente de EE. UU. N.º 6 165 745.

15 En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de EE. UU. N.º 6 277 375. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo se puede alterar dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión al receptor de reciclaje tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Patentes de EE. UU. N.ºs 5 869 046 y 6 121 022.

25 En otras realizaciones más, la región de Fc se altera sustituyendo al menos un residuo aminoácido por un residuo aminoácido diferente para alterar la o las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden sustituir uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 por un residuo aminoácido diferente de manera que el anticuerpo posea una afinidad alterada por un ligando efector pero retenga la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo de partida. El ligando efector cuya afinidad se altera puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Este método se describe más detalladamente en las Patentes de EE. UU. N.ºs 5 624 821 y 5 648 260.

30 En otro ejemplo, se pueden sustituir uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos aminoácidos 329, 331 y 322 por un residuo aminoácido diferente de manera que el anticuerpo altere la unión a C1q y/o reduzca o suprima la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe más detalladamente en la Patente de EE. UU. N.º 6 194 551.

35 En otro ejemplo, se alteran uno o más residuos aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 231 y 239 para alterar de ese modo la capacidad del anticuerpo de fijar el complemento. Este enfoque se describe además en la Publicación PCT WO 94/29351.

40 En otro ejemplo más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ mediante la modificación de uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 45 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ó 439. Este enfoque se describe más detalladamente en la Publicación PCT WO 00/42072. Es más, se han asignado los sitios de unión sobre la IgG1 humana para FcγR1, FcγRII, FcγRIII y FcγRn, y se han descrito variantes con una unión mejorada (véase Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Se demostró que las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoraban la unión a FcγRIII. Además, se demostró que las siguientes mutaciones combinadas mejoraban la unión a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

50 En otra realización más, se modifica la glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede sintetizar un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones del carbohidrato se pueden llevar a cabo, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glucosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una o más sustituciones de aminoácidos, lo cual produce la eliminación de uno o más sitios de glucosilación en el entramado de la región variable para eliminar de esta forma la glucosilación en ese sitio. Tal aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N.ºs 5 714 350 y 6 350 861.

60 Además o como alternativa, se puede sintetizar un anticuerpo que posee un tipo de glucosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado con cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo que posee más estructuras de GlcNac de bisección. Se ha demostrado que tales patrones de glucosilación alterados aumentan la capacidad CCDA de los anticuerpos. Tales modificaciones del carbohidrato se pueden llevar a cabo por, por ejemplo, expresión del anticuerpo en una célula huésped con el mecanismo de glucosilación alterado. Las células con el mecanismo de glucosilación alterado han sido descritas en la materia y se pueden utilizar como células

huésped en las cuales se expresan anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con la glucosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (α -(1,6)-fucosiltransferasa), de forma que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos. Las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 FUT8^{-/-} se crearon mediante la interrupción intencionada del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de reemplazo (véase la Publicación de Patente de EE. UU. N.º 20040110704 y Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). A modo de otro ejemplo, la EP 1 176 195 describe una línea celular con un gen FUT8 interrumpido funcionalmente, que codifica una fucosil transferasa, de forma que los anticuerpos expresados en dicha línea celular presenten hipofucosilación reduciendo o eliminando la enzima α -1,6 relacionada con el enlace. La EP 1 176 195 también describe líneas celulares que poseen una actividad enzimática baja para agregar fucosa a la N-acetilglucosamina la cual se une a la región Fc del anticuerpo o que no posee actividad enzimática, por ejemplo, la línea celular YB2/O (ATCC CRL 1662) del mieloma de rata. La Publicación PCT WO 03/035835 describe una variante de la línea celular CHO, células Lec13, con capacidad reducida para agregar fucosa a los carbohidratos unidos a Asn(297), lo que también produce la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Los anticuerpos con un perfil de glucosilación modificado también se pueden producir en huevos de gallina, como se describe en la Publicación PCT WO 06/089231. Como alternativa, se pueden producir anticuerpos con un perfil de glucosilación modificado en células vegetales, tales como *Lemna*. Se divulgan métodos para la producción de anticuerpos en un sistema vegetal en la Solicitud de Patente de EE. UU. correspondiente de Alston & Bird LLP, N.º de expediente 040989/314911, presentada el 11 de agosto de 2006. La publicación PCT WO 99/54342 describe líneas celulares modificadas por ingeniería genética para expresar glicosiltransferasas que modifican glicoproteínas (p. ej., β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de forma que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas por ingeniería genética presentan estructuras GlcNAc de bisección incrementadas, lo que produce un aumento de la actividad de CCD4 de los anticuerpos (véase también Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Como alternativa, los residuos de fucosa del anticuerpo pueden ser escindidos utilizando una enzima fucosidasa; p. ej., la α -L-fucosidasa para eliminar los residuos fucosilo de los anticuerpos (Tarentino *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Otra modificación de los anticuerpos de la presente que está contemplada por esta divulgación es la pegilación. Un anticuerpo se puede pegar para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (p. ej., en suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o un fragmento de este, normalmente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado aldehídico de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se enlazan al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se lleva a cabo a través de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero reactivo análogo hidrosoluble). Se pretende que el término "polietilenglicol", como se utiliza en la presente, englobe cualquiera de las formas de PEG que han sido utilizadas para derivatizar otras proteínas, tales como mono-(C₁-C₁₀)-alcoxi- o ariloxipolietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a pegar es un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para pegar proteínas son de uso común en la materia y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véase, p. ej., EP 0 154 316 y EP 0 401 384.

Propiedades físicas de los anticuerpos

Los anticuerpos de esta divulgación se pueden caracterizar por sus diferentes propiedades físicas y sirven para detectar y/o diferenciar sus diferentes clases.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden contener uno o más sitios de glucosilación en la región variable de la cadena ligera o en la región variable de la cadena pesada. Dichos sitios de glucosilación pueden producir una mayor inmunogenicidad del anticuerpo o una alteración del pK del anticuerpo debido a una unión al antígeno alterada (Marshall *et al.* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al.* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al.* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Se sabe que la glucosilación tiene lugar en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-LAG-3 que no contenga glucosilación en la región variable. Esto se puede conseguir seleccionando los anticuerpos que no contienen el motivo de glucosilación en la región variable o mutando residuos en la región de glucosilación.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente divulgación no contienen sitios de isomerismo de asparragina. La desamidación de la asparragina puede tener lugar en las secuencias N-G o D-G y da origen a la creación de un residuo de ácido isoaspártico que introduce una curvatura en la cadena polipeptídica y disminuye su estabilidad (efecto del ácido isoaspártico).

Cada anticuerpo tendrá un punto isoeléctrico (pI) único, que generalmente entrará en el intervalo de pH entre 6 y 9,5. El pI para un anticuerpo IgG1 entra normalmente en el intervalo de pH de 7 y 9,5, y el pI para un anticuerpo IgG4 entra normalmente en el intervalo de pH de 6 y 8. Se sospecha que los anticuerpos con un pI que no pertenece al intervalo normal pueden tener cierto despliegue e inestabilidad en condiciones *in vivo*. Por tanto, es preferible tener un anticuerpo anti-LAG-3 que contenga un valor de pI que entre en el intervalo normal. Esto se puede conseguir seleccionando los anticuerpos con un valor pI en el intervalo normal o mutando residuos superficiales cargados.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión característica, con una temperatura de fusión más elevada indicando una mayor estabilidad general *in vivo* (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Generalmente, es preferible que la T_{M1} (la temperatura inicial de despliegue) sea mayor que 60 °C, preferiblemente mayor que 65 °C, aún más preferiblemente mayor que 70 °C. El punto de fusión de un anticuerpo se puede medir usando calorimetría diferencial de barrido (Chen *et al* (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al* (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) dicroísmo circular (Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

En una realización preferida, se seleccionan anticuerpos que no se degradan rápidamente. La degradación de un anticuerpo puede medirse utilizando electroforesis capilar (EC) y MALDI-MS (Alexander AJ and Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

En otra realización preferida, se seleccionan anticuerpos que presentan efectos de agregación mínimos, lo cual puede conducir a que se desencadene una respuesta inmunitaria no deseada y/o a propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. Generalmente, los anticuerpos con una agregación del 25 % o menor son aceptables, preferiblemente del 20 % o menor, más preferiblemente del 15 % o menor, aún más preferiblemente del 10 % o menor y aún más preferiblemente del 5 % o menor. La agregación se puede medir mediante varias técnicas, incluyendo columna de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y dispersión de luz.

Métodos de síntesis de anticuerpos por ingeniería genética

Como se indicó anteriormente, los anticuerpos anti-LAG-3 que poseen secuencias de V_H y V_L divulgadas en la presente se pueden utilizar para crear nuevos anticuerpos anti-LAG-3 modificando las secuencias V_H y/o V_L , o la o las regiones constantes enlazadas a estas. Por lo tanto, las características estructurales de un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención, p. ej., 25F7, se utilizan para crear anticuerpos estructuralmente relacionados con los anticuerpos anti-LAG-3 que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como la unión a la LAG-3 humana. Por ejemplo, se pueden combinar una o más regiones CDR de 25F7 o mutaciones de esta, recombinantemente con regiones de entramado conocidas y/u otras CDR para crear otros anticuerpos anti-LAG-3 de la invención sintetizados recombinantemente por ingeniería genética, como se indicó anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de síntesis por ingeniería genética es una o más de las secuencias de V_H y/o V_L proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de estas. Para crear el anticuerpo sintetizado por ingeniería genética, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como proteína) un anticuerpo que posea una o más de las secuencias V_H y/o V_L proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de estas. En vez de esto, se utiliza la información contenida en la o las secuencias como el material de partida para crear una o más secuencias de "segunda generación" derivadas de la o las secuencias originales, y después de esto se prepara la o las secuencias de "segunda generación", y se expresan como una proteína.

Por consiguiente, se describe en la presente un método para preparar un anticuerpo anti-LAG-3 que comprende:

- (a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia CDR1 de SEC ID N°: 1, la secuencia CDR2 de SEC ID N°: 7 y/o la secuencia CDR3 de SEC ID N°: 13; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia CDR1 de SEC ID N°: 19, la secuencia CDR2 de SEC ID N°: 25 y/o la secuencia CDR3 de SEC ID N°: 31;
- (b) alterar al menos un residuo aminoacídico de la secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena ligera para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y
- (c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

Se pueden emplear técnicas de biología molecular estándares para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada.

Preferentemente, el anticuerpo codificado por la o las secuencias de anticuerpo alteradas es uno que retiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-LAG-3 descritos en la presente, dichas propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a:

- (i) alta afinidad de unión a la LAG-3 humana;
- (ii) unión a la LAG-3 de mono;
- (iii) carencia de unión a la LAG-3 de ratón;
- (iv) una capacidad para inhibir la unión de la LAG-3 a las moléculas del MHC de clase II; y/o
- (v) una capacidad para estimular una respuesta inmunitaria (p. ej., una respuesta de linfocito T específica para un antígeno).

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden evaluar utilizando ensayos estándares de uso común en la materia y/o descritos en la presente, tales como aquellos que se exponen en los ejemplos.

En ciertas realizaciones de los métodos de síntesis por ingeniería genética de los anticuerpos de la invención, pueden introducirse mutaciones aleatoria o selectivamente a lo largo de la totalidad o en parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-LAG-3, y los anticuerpos anti-LAG-3 modificados resultantes pueden cribarse respecto a su actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describe en la presente. Existen varios métodos mutacionales descritos en la materia (véanse, p. ej., las Publicaciones PCT WO 02/092780 y WO 03/074679).

Moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención

Otro aspecto de la invención se refiere a las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se presenta sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas estándares, incluidos el tratamiento SDS/ alcalino, formación de bandas en CsCl, cromatografía de columna, electroforesis en gel de agarosa y otras de uso común en la materia. Véase, Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrínsecas. En una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener empleando técnicas de biología molecular estándares. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos portadores de genes de inmunoglobulina humana como se describe a continuación) los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo creado por el hibridoma se pueden obtener por técnicas de amplificación por PCR o clonación de ADNc estándares. Para los anticuerpos obtenidos de una genoteca de genes de inmunoglobulina (p. ej., utilizando técnicas de exposición en fagos), un ácido nucleico que codifica dichos anticuerpos puede obtenerse de la genoteca.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidos de la invención son las que codifican las secuencias V_H y V_L del anticuerpo monoclonal 25F7. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias V_H de 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 y 17E5 se muestran en SEC ID N°: 49-54, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias V_L de 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 y 17E5 se muestran en SEC ID N°: 55-60, respectivamente.

Una vez que se obtienen fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L , estos fragmentos de ADN pueden manipularse ulteriormente por técnicas estándar de recombinación de ADN, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de las cadenas de anticuerpos de longitud total, en genes de fragmentos Fab o en un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H se une operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un conector flexible. El término "operativamente unidos", como se utiliza en este contexto, se pretende que signifique que los dos fragmentos de ADN están unidos de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanezcan en fase.

El ADN aislado que codifica la región V_H puede convertirse en un gen de la cadena pesada de longitud total enlazando operativamente el ADN que codifica V_H a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Se han descrito las secuencias de genes humanos de la región constante de la cadena pesada en la materia (véase, por ejemplo, Kabat *et al.* (1991), *supra*) y los fragmentos de ADN que engloban estas regiones se pueden obtener por amplificación estándar por PCR. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero la más preferible es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede estar operativamente unido a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica región de V_L se puede convertir en un gen de la cadena ligera de longitud completa (así como en un gen de la cadena ligera de Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica V_L a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Se han descrito las secuencias de genes humanos de la región constante de la cadena ligera en la materia (véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, *supra*) y los fragmentos de ADN que contienen estas regiones se pueden obtener por medio de amplificación estándar por PCR. En realizaciones preferidas, la región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se unen operativamente a otro fragmento que codifica un conector flexible, p. ej., que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de tal modo que las secuencias V_H y V_L pueden expresarse como una proteína de cadena simple contigua, con las regiones V_H y V_L unidas por el conector flexible (véanse, p. ej., Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

Producción de los anticuerpos monoclonales de la invención

Se pueden obtener anticuerpos monoclonales (mAb) de la presente divulgación utilizando la famosa técnica de hibridación celular somática (hibridoma) de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Otras realizaciones para la

producción de anticuerpos monoclonales incluyen la transformación oncogénica o vírica de linfocitos B y técnicas de expresión en fagos. Los anticuerpos quiméricos o humanizados están debidamente descritos en la materia. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N.º 4 816 567; 5 225 539; 5 530 101; 5 585 089; 5 693 762 y 6 180 370.

En una realización preferida, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra la LAG-3 humana se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos portadores de partes del sistema inmunitario humano en vez del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones a los que se hace referencia en la presente como el ratón HuMab[®] y el ratón KM[®], respectivamente, y se hace referencia colectivamente a estos en la presente como "ratones portadores de Ig humana".

El ratón HuMab[®] (Medarex[®] Inc.) contiene minilocus de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de las cadenas pesada (μ y γ) y ligera (κ) humanas no transpuestas, junto con mutaciones direccionadas que desactivan los loci endógenos de las cadenas μ y κ (véase, p. ej., Lonberg, *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan una expresión reducida de IgM o κ de ratón, y como respuesta a la inmunización, los transgenes de las cadenas pesada y ligera humanas introducidos sufren un cambio de clase y una mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgGk humanos de alta afinidad (Lonberg *et al.* (1994), *supra*; examinado en Lonberg (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, y Harding y Lonberg (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y el uso del ratón HuMab[®], y las modificaciones genómicas portadas por dichos ratones, se describen más detalladamente en Taylor *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, cuyo contenido se incorpora a la presente específicamente en su totalidad por referencia. Véanse además las Patentes de EE. UU. N.ºs 5 545 806; 5 569 825; 5 625 126; 5 633 425; 5 789 650; 5 877 397; 5 661 016; 5 814 318; 5 874 299; 5 770 429; y 5 545 807; las Publicaciones PCT N.ºs WO 92/03918; WO 93/12227; WO 94/25585; WO 97/13852; WO 98/24884; WO 99/45962 y WO 01/14424.

Se pueden generar anticuerpos humanos utilizando un ratón portador de secuencias de inmunoglobulina humanas en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón portador de un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Se hace referencia a este ratón en la presente como a un "ratón KM[®]" y se describe detalladamente en la Publicación PCT WO 02/43478. También se describe una forma modificada de este ratón, que comprende además un trastorno homocigótico de los genes endógenos del receptor Fc γ RIIB, en la Publicación PCT WO 02/43478 y se hace referencia a este como a un "ratón KM/FCGR2D[®]". Se pueden utilizar también ratones con transgenes de la cadena pesada de HCo7 o HCo12, o de ambos.

Otras realizaciones con animales transgénicos incluyen el Xenomouse (Abgenix, Inc., Patentes de EE. UU. N.ºs 5 939 598; 6 075 181; 6 114 598; 6 150 584 y 6 162 963). Otras realizaciones incluyen "ratones TC" (Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727) y vacas portadoras de transcromosomas de las cadenas pesada y ligera humanas (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894; Publicación PCT WO 02/092812).

Como alternativa, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se preparan utilizando métodos de expresión en fagos para cribar genotecas de genes de inmunoglobulina humanos. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N.º 5 223 409; 5 403 484; 5 571 698; 5 427 908; 5 580 717; 5 969 108; 6 172 197; 5 885 793; 6 521 404; 6 544 731; 6 555 313; 6 582 915 y 6 593 081.

Los anticuerpos monoclonales humanos anti-LAG-3 también se pueden preparar utilizando ratones SCID en los cuales se han reconstituido células inmunitarias humanas de manera tal que se puede generar una respuesta del anticuerpo humano tras la inmunización. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N.ºs 5 476 996 y 5 698 767.

Además, los anticuerpos anti-LAG-3 humanos pueden prepararse utilizando la exposición en fagos en la que los fagos comprenden ácidos nucleicos que codifican anticuerpos generados en animales transgénicos previamente inmunizados con LAG-3. Preferiblemente, el animal transgénico es un ratón HuMab, KM o Kirin. Véase, p. ej., la Patente de EE. UU. N.º 6 794 132.

Inmunización de ratones portadores de Ig humana

Pueden inmunizarse ratones portadores de Ig humana con un prepado purificado o enriquecido de un antígeno LAG-3, una proteína LAG-3 recombinante o células que expresan una proteína LAG-3. Véanse, p. ej., Lonberg *et al.* (1994), *supra*; Fishwild *et al.* (1996), *supra*; las Publicaciones PCT WO 98/24884 o WO 01/14424. Preferentemente, se inmunizan ratones de 6-16 semanas con 5-50 μ g de proteína LAG-3. Como alternativa, se utiliza una porción de LAG-3 fusionada a un polipéptido que no sea del tipo LAG-3.

Pueden inmunizarse los ratones transgénicos por vía intraperitoneal (IP) o intravenosa (IV) con antígeno LAG-3 en el adyuvante completo de Freund, seguido de las subsecuentes inmunizaciones IP o IV con antígeno en el adyuvante

incompleto de Freund. Como alternativa, se utilizan adyuvantes que no sean los de Freund o células completas en ausencia de adyuvante. El plasma puede ser cribado por medio de ELISA y las células de los ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina anti-LAG-3 humana se pueden utilizar para las fusiones.

5 Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos anti-LAG-3, se pueden aislar y fusionar esplenocitos y/o células de los ganglios linfáticos de ratones inmunizados a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden cribar según su producción de anticuerpos específicos para el antígeno. La generación de hibridomas es de uso común en la materia. Véase, p. ej., Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York.

15 Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales de la invención

Los anticuerpos de la invención pueden obtenerse en un transfectoma de células huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de recombinación de ADN y métodos de transfección de genes como es de uso común en la materia (p. ej., Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202). En una realización, se inserta ADN que codifica cadenas pesadas y ligeras de longitud parcial o completa obtenido por técnicas estándares de biología molecular en uno o más vectores de expresión de forma que los genes estén operativamente unidos a las secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción. En este contexto, el término "operativamente unido" se pretende que signifique que un gen del anticuerpo está ligado en un vector de manera que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector cumplan con la función deseada de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo.

Se pretende que el término "secuencia reguladora" incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de las cadenas de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células huésped de mamíferos incluyen elementos víricos que controlan los niveles de expresión elevados de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), Simian Virus 40 (SV40), adenovirus, (p. ej., el promotor principal tardío de adenovirus (AdMLP) y polioma. Como alternativa, se pueden utilizar secuencias reguladoras que no sean víricas, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de β -globina. Además, elementos reguladores compuestos por secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SR α , que contiene secuencias del promotor temprano del SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de linfocitos humanos T tipo 1 (Takebe et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472). El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan de modo que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada.

Los genes de la cadena ligera del anticuerpo y los genes de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en el mismo o en diferentes vectores de expresión. En realizaciones preferidas, las regiones variables se utilizan para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en los vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de la cadena pesada y de la cadena ligera del isotipo deseado de forma que el segmento V_H esté operativamente unido al o a los segmentos C_H en el vector y el segmento V_L esté operativamente unido al segmento C_L en el vector. Además o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señalización que facilite la secreción de la cadena del anticuerpo de una célula huésped. Los genes de la cadena del anticuerpo se pueden clonar en el vector de forma que el péptido de señalización se una en fase al amino terminal de los genes de la cadena del anticuerpo. El péptido de señalización puede ser un péptido de señalización inmunoglobulínico o un péptido de señalización heterólogo (es decir, un péptido de señalización de una proteína no inmunoglobulínica).

Además de los genes de la cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar otras secuencias, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (p. ej., orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las cuales el vector ha sido introducido (véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N.^{os} 4 399 216, 4 634 665 y 5 179 017). Por ejemplo, el gen marcador seleccionable normalmente confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, o una célula huésped en la cual el vector ha sido introducido. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para utilizar en células huésped dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el neo gen (para la selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, se transfecta el o los vectores de expresión que codifican las cadenas ligera y pesada en una célula huésped por técnicas estándares. Se pretende que las diferentes formas del término "transfección" engloben una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procarionte o eucariota, p. ej., electroporación, precipitación de calcio-fosfato, transfección de DEAE-dextrano y análogos. Aunque en teoría es posible expresar los anticuerpos de la invención en

células huésped procariotas o eucariotas, se prefiere la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferentemente células huésped de mamíferos, porque dichas células eucariotas y, en particular, las células de mamíferos son más propensas a ensamblar y secretar un anticuerpo debidamente plegado e inmunológicamente activo que las células procariotas .

Las células huésped de mamífero preferidas para la expresión de los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células ováricas de hámster chino (CHO) (incluidas las células dhfr⁻ CHO, descritas en Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, utilizadas con un marcador de DHFR seleccionable, p. ej., como el que se describe en R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621); células NSO de mieloma; células COS y células SP2. En particular, para utilizar con células NSO de mieloma, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión de genes GS divulgado en WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841. Cuando se introducen vectores de expresión que codifican genes de anticuerpos en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen por cultivo de las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual se cultivan las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos estándares de purificación de proteínas.

Caracterización de la unión del anticuerpo al antígeno

Se pueden analizar los anticuerpos de la invención para determinar su unión a la LAG-3 humana, por ejemplo, por ELISA estándar. Las IgG anti-LAG-3 humanas se pueden analizar además para determinar su reactividad con un antígeno LAG-3 por inmunotransferencia de tipo Western. La especificidad de unión de un anticuerpo de la invención también se puede determinar monitorizando la unión del anticuerpo a las células que expresan una proteína LAG-3, por ejemplo, por citometría de flujo. Estos métodos son de uso común en la materia. Véase, p. ej., Harlow and Lane (1988), citado *supra*.

Inmunoconjugados

Los anticuerpos de esta invención se pueden conjugar con un agente terapéutico para formar un inmunoconjugado tal como un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). Los agentes terapéuticos adecuados incluyen antimetabolitos, agentes alquilantes, ligandos de unión al surco menor de ADN, intercaladores de ADN, entrecruzadores de ADN, inhibidores de la histona deacetilasa, inhibidores de exportación nuclear, inhibidores de proteasomas, inhibidores de la topoisomerasa I o II, inhibidores de proteínas de choque térmico, inhibidores de la tirosina cinasa, antibióticos y agentes antimetabólicos. En el ADC, el anticuerpo y el agente terapéutico están preferentemente conjugados a través de un conector escindible tal como un conector peptídico, disulfuro o hidrazona. Más preferentemente, el conector es un conector peptídico tal como Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEC ID N°:15), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser o Glu. Los ADC se pueden preparar como se describe en las Patentes de EE. UU. N.ºs 7 087 600; 6 989 452 y 7 129 261; las Publicaciones PCT WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312 y WO 08/103693; las Publicaciones de Patentes de EE. UU. 20060024317; 20060004081 y 20060247295.

Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente divulgación presenta moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-LAG-3 unido a al menos una molécula funcional diferente, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une al menos a dos sitios de unión o moléculas diana diferentes. Por lo tanto, como se utiliza en la presente, "molécula biespecífica" incluye moléculas que poseen tres o más especificidades. En una realización preferida, la molécula biespecífica comprende una primera especificidad de unión para la LAG-3 y una segunda especificidad de unión para una molécula inductora que recopila células efectoras citotóxicas que pueden matar una célula diana que expresa la LAG-3. Son ejemplos de moléculas inductoras adecuadas CD64, CD89, CD16 y CD3. Véase, p. ej., Kufer *et al.*, *TRENDS in Biotechnology*, 22 (5), 238-244 (2004).

En una realización, una molécula biespecífica posee, además de una especificidad de unión para anti-Fc y una especificidad de unión para anti-LAG-3, una tercera especificidad. La tercera especificidad puede ser para un anti-factor potenciador (EF, por sus siglas en inglés), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína superficial involucrada en la actividad citotóxica y, por lo tanto, aumenta la respuesta inmunitaria contra la célula diana. Por ejemplo, el anti-factor potenciador puede unirse a un linfocito T citotóxico (por ejemplo, a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40 ó ICAM-1) u otra célula inmunitaria, lo que da lugar a una mayor respuesta inmunitaria contra la célula diana.

Las moléculas biespecíficas pueden presentarse en diferentes formatos y tamaños. En un extremo del espectro de tamaños, una molécula biespecífica retiene el formato tradicional del anticuerpo, a no ser porque en vez de poseer dos ramas de unión de idéntica especificidad, posee dos ramas de unión cada una con una especificidad diferente. En el otro extremo, las moléculas biespecíficas que consisten en dos fragmentos de anticuerpo monocatenarios (scFv's) unidos por una cadena peptídica, llamada constructo Bs(scFv)₂. Las moléculas biespecíficas de tamaño

intermedio incluyen dos fragmentos F(ab) diferentes unidos por un conector peptídico. Las moléculas biespecíficas en estos u otros formatos se pueden preparar por ingeniería genética, hibridación somática o métodos químicos. Véase, p. ej., Kufer *et al.*, citado *supra*; Cao and Suresh, *Bioconjugate Chemistry*, 9 (6), 635-644 (1998) y van Spriel *et al.*, *Immunology Today*, 21 (8), 391-397 (2000), y las referencias citadas en estos.

5

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente divulgación formulado junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Puede contener opcionalmente uno o más principios farmacéuticamente activos, tales como otro anticuerpo o un fármaco. Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en una terapia combinada con, por ejemplo, otro agente inmunoestimulador, un agente anticanceroso, un agente antivírico o una vacuna, de forma que el anticuerpo anti-LAG-3 aumente la respuesta inmunitaria contra la vacuna.

10

La composición farmacéutica puede comprender múltiples excipientes. Los excipientes que se pueden utilizar incluyen portadores, agentes activos superficiales, agentes espesantes o emulsionantes, aglutinantes sólidos, agentes de suspensión o dispersión, solubilizadores, colorantes, saborizantes, recubrimientos, disgregantes, lubricantes, edulcorantes, conservantes, agentes isotónicos y combinaciones de estos. La selección y el uso de excipientes adecuados se explica en Gennaro, ed., Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20.^a ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003).

15

20

Preferiblemente, una composición farmacéutica es adecuada para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (p. ej., por inyección o infusión). Según la vía de administración, el compuesto activo puede estar recubierto con un material para proteger el compuesto contra la acción de ácidos y de otras condiciones naturales que pueden desactivarlo. La expresión "administración parenteral", tal como se utiliza en la presente, hace referencia a los diferentes modos de administración aparte de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluye, sin limitar, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intrarraquídea, epidural e intraesternal. Como alternativa, un anticuerpo de la invención se puede administrar por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

25

30

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden estar en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" hace referencia a una sal que retiene la actividad biológica del compuesto de partida deseada y no confiere ningún efecto toxicológico no deseado. Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos atóxicos, tales como hidróclórico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico y análogos, así como también ácidos orgánicos atóxicos, tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos aromáticos y alifáticos, y análogos. Las sales de adición de bases incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y análogos, así como también de aminas orgánicas atóxicas, tales como N, N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaina y análogos.

35

40

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse en forma de soluciones o dispersiones acuosas estériles. También se pueden formular en forma de una microemulsión, liposoma u otras estructuras ordenadas adecuadas para una alta concentración de fármaco.

45

La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material portador para obtener una forma farmacéutica simple variará dependiendo del sujeto que se está tratando y el modo particular de administración y será generalmente la cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, de un 100 %, esta cantidad variará de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 99 % de principio activo, preferentemente de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 70 %, más preferentemente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 30 % de principio activo combinado con un portador farmacéuticamente aceptable.

50

55

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el transcurso de un tiempo determinado o se puede reducir o aumentar la dosis proporcionalmente según sea indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidades de dosis para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. Como se utiliza en la presente, forma farmacéutica unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociado con el portador farmacéutico requerido. Como alternativa, el anticuerpo se puede administrar como formulación de liberación prolongada, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente.

60

65

Para la administración del anticuerpo, la dosis varía desde aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y más frecuentemente de 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen ejemplar de tratamiento implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez de cada 3 a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención incluyen 1 mg/kg peso corporal o 3 mg/kg peso corporal mediante administración intravenosa, siendo el anticuerpo administrado mediante uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosis, después cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguidos de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas. En algunos métodos, la dosis se ajusta para alcanzar una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos métodos de aproximadamente 25-300 µg/ml.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención produce preferentemente una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los periodos exentos de síntomas de la enfermedad o una prevención del deterioro o la incapacidad debidos a la aflicción causada por la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de sujetos que sufren tumores, una "dosis terapéuticamente eficaz" inhibe preferiblemente el crecimiento del tumor al menos aproximadamente en un 20 %, más preferentemente al menos aproximadamente en un 40 %, aún más preferentemente al menos aproximadamente en un 60 % y aún más preferentemente al menos aproximadamente en un 80 % con relación a los sujetos sin tratar. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño de un tumor o si no aliviar los síntomas en un sujeto, que suele ser un ser humano o puede ser otro mamífero.

La composición farmacéutica puede ser una formulación de liberación regulada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Se suelen emplear polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como un copolímero de acetato de vinilo y etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar mediante dispositivos médicos tales como (1) dispositivos para inyecciones hipodérmicas sin agujas (p. ej., US 5 399 163; 5 383 851; 5 312 335; 5 064 413; 4 941 880; 4 790 824 y 4 596 556); (2) bombas para microinfusión (US 4 487 603); (3) dispositivos transdérmicos (US 4 486,194); (4) equipos para infusión (US 4 447 233 y 4 447 224); y (5) dispositivos osmóticos (US 4 439 196 y 4 475 196).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden formular para garantizar una distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención traspasen la barrera hematoencefálica, se pueden formular en forma de liposomas, que pueden comprender además grupos de direccionamiento para potenciar un transporte selectivo a células u órganos específicos. Véase, p. ej., US 4 522 811; 5 374 548; 5 416 016 y 5 399 331; V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685; Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038; Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180; Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134; Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090; Keinanen and Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123 y Killion and Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Usos y métodos de la invención

Los anticuerpos, las composiciones de los anticuerpos y los métodos de la presente invención poseen múltiples usos *in vitro* e *in vivo* relacionados con, por ejemplo, la detección de la LAG-3 o la potenciación de una respuesta inmunitaria por bloqueo de la LAG-3. En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos humanos. Por ejemplo, se pueden administrar estas moléculas a células en cultivos, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, p. ej., *in vivo*, para potenciar la inmunidad en varias situaciones. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este, de la invención para su uso en un método para modificar una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este, de la invención de forma que se modifique la respuesta inmunitaria en el sujeto. Preferiblemente, la respuesta se intensifica, estimula o regula en sentido creciente.

Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que requieran potenciar una respuesta inmunitaria. Los métodos son particularmente adecuados para tratar pacientes humanos que sufran un trastorno que puede ser tratado mediante el incremento de una respuesta inmunitaria (p. ej., la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T). En una realización particular, los métodos son particularmente adecuados para tratar el cáncer *in vivo*. Para conseguir potenciar la inmunidad específica para un antígeno, se pueden administrar los anticuerpos anti-LAG-3 junto con un antígeno de interés o el antígeno puede que ya esté presente en el sujeto a tratar (p. ej., un sujeto que padece un tumor o portador de un virus). Cuando los anticuerpos contra la LAG-3 se administran junto con otro agente, se pueden administrar los dos en cualquier orden o simultáneamente.

La invención proporciona además métodos para detectar la presencia del antígeno de LAG-3 humana en una muestra o medir la cantidad del antígeno de LAG-3 humana, que comprenden poner en contacto la muestra y una muestra de control con un anticuerpo monoclonal humano, o una porción de unión a antígeno de este, que se une específicamente a la LAG-3 humana, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo, o una porción de este, y la LAG-3 humana. Posteriormente se detecta la formación de un complejo. Cuando, al comparar, exista una diferencia en la formación de complejo entre la muestra y la muestra de control esto indica la presencia de antígeno LAG-3 humano en la muestra. Es más, los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención se pueden utilizar para purificar LAG-3 humana mediante purificación según su inmutofafinidad.

Debido a la capacidad de los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención de inhibir la unión de la LAG-3 a moléculas del MHC de clase II y estimular respuestas de linfocitos T específicas para un antígeno, los anticuerpos de la invención también pueden usarse en métodos *in vitro* e *in vivo* para estimular, intensificar o aumentar respuestas de linfocitos T específicas para un antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede usarse en un método de estimulación de una respuesta de un linfocito T específica para un antígeno que comprende poner dicho linfocito T en contacto con el anticuerpo de la invención de forma que se estimule una respuesta del linfocito T específica para el antígeno. Cualquier indicador adecuado de una respuesta de linfocito T específica para un antígeno se puede utilizar para medir la respuesta de linfocito T específica del antígeno. Los ejemplos no limitantes de tales indicadores adecuados incluyen una mayor proliferación de linfocitos T en presencia del anticuerpo y/o una mayor producción de citocinas en presencia del anticuerpo. En una realización preferida, se estimula la producción de interleucina 2 por parte del linfocito T específico para el antígeno.

La invención también proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método de estimulación de una respuesta inmunitaria (p. ej., una respuesta de linfocito T específica para un antígeno) en un sujeto que comprende administrar el anticuerpo de la invención al sujeto de forma que se estimule una respuesta inmunitaria (p. ej., una respuesta de linfocito T específica para el antígeno) en el sujeto. En una realización preferida, el sujeto es un sujeto que padece un tumor y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor. En otra realización preferida, el sujeto es un sujeto portador de un virus y se estimula una respuesta inmunitaria contra el virus.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo de la invención de forma que se inhiba el crecimiento del tumor en el sujeto. En otro aspecto más, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método para tratar una infección vírica en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo de la invención de forma que se trate la infección vírica en el sujeto.

Este y otros usos de la invención se explican con más detalle a continuación.

Cáncer

El bloqueo de la LAG-3 por parte de los anticuerpos puede potenciar la respuesta inmunitaria a células cancerosas en el paciente. En un aspecto, la presente invención hace referencia a un anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento de un sujeto *in vivo* de modo que se inhiba el crecimiento de tumores cancerosos. Puede utilizarse un anticuerpo anti-LAG-3 exclusivamente para inhibir el crecimiento de tumores cancerosos. Como alternativa, se puede utilizar un anticuerpo anti-LAG-3 junto con otros agentes inmunogénicos, tratamientos estándares del cáncer u otros anticuerpos, como se describe a continuación.

Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno de este, para su uso en un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-LAG-3 o una porción de unión a antígeno de este. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-LAG-3 humano (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos anti-LAG-3 humana descritos en la presente). Además o como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-LAG-3 quimérico o humanizado.

Los cánceres preferidos cuyo crecimiento puede inhibirse utilizando los anticuerpos de la invención incluyen los cánceres normalmente sensibles a inmunoterapia. Los ejemplos no limitantes de cánceres preferidos para el tratamiento incluyen melanoma (p. ej., melanoma maligno metastásico), cáncer renal (p. ej., carcinoma de células claras), cáncer prostático (p. ej., adenocarcinoma prostático refractario a hormonas), cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de pulmón (p. ej., cáncer no microcítico de pulmón). Además, la invención incluye neoplasias refractarias o recurrentes cuyo crecimiento se puede inhibir utilizando los anticuerpos de la invención.

Los ejemplos de otros cánceres que pueden tratarse utilizando los métodos de la invención incluyen cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovarios, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias

crónicas o agudas incluidos la leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasma del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis de tumores, tumor del eje raquídeo, glioma del tallo cerebral, adenoma de la hipófisis, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos por el medio ambiente incluidos los inducidos por asbesto y combinaciones de dichos cánceres. La presente invención también es útil para el tratamiento de cánceres metastásicos, especialmente de cánceres metastásicos que expresan la PD-L1 (Iwai *et al.* (2005) *Int. Immunol.* 17:133-144).

Opcionalmente, los anticuerpos contra la LAG-3 se pueden combinar con un agente inmunogénico, tal como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluidos proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidrato), células y células transfectadas con genes codificantes de citocinas inmunoestimulantes (He *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Los ejemplos no limitantes de vacunas contra tumores que se pueden utilizar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citocina GM-CSF (se explica más detalladamente a continuación).

En los seres humanos, se ha detectado que algunos tumores son inmunogénicos, como por ejemplo los melanomas. Al aumentar el umbral de activación de linfocitos T mediante el bloqueo de la LAG-3, se pueden activar las respuestas tumorales en el huésped.

El bloqueo de la LAG-3 es posible que alcance su máxima eficacia cuando se combina con un protocolo de vacunación. Se han desarrollado muchas estrategias experimentales para la vacunación contra tumores (véase Rosenberg, S. (2000) *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; véase también Restifo, N. and Sznol, M., *Cancer Vaccines*, cap. 61, págs. 3023-3043 en DeVita *et al.* (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, quinta edición). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna utilizando células tumorales autólogas o alogénicas. Se ha demostrado que estas vacunas celulares alcanzan su máxima efectividad cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. Se ha demostrado que GM-CSF es un activador potente de la presentación de antígeno para la vacunación contra tumores (Dranoff *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43).

El estudio de la expresión génica y de los patrones de expresión génica a gran escala en varios tumores ha conducido a la definición de los denominados antígenos específicos de tumores (Rosenberg, SA (1999) *Immunity* 10: 281-7). En muchos casos, estos antígenos específicos de tumores son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula de la que surgió el tumor, por ejemplo, antígenos de melanocitos gp100, antígenos MAGE y Trp-2. Cabe destacar que se puede demostrar que muchos de estos antígenos que son las dianas de linfocitos T específicos para el tumor localizados en el huésped. El bloqueo de la LAG-3 se puede utilizar junto con un conjunto de proteínas y/o péptidos recombinantes expresados en un tumor a fin de generar una respuesta inmunitaria a estas proteínas. Estas proteínas son normalmente consideradas como autoantígenos por el sistema inmunitario y son por lo tanto tolerantes a ellas. El antígeno tumoral puede incluir la proteína telomerasa, que se requiere para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85 % de los cánceres humanos y solamente en un número limitado de tejidos somáticos (Kim *et al.* (1994) *Science* 266: 2011-2013). (Estos tejidos somáticos pueden estar protegidos contra el ataque inmunitario por diversos medios). Los antígenos tumorales también pueden ser "neoantígenos" expresados en células cancerosas debido a mutaciones somáticas que alteran la secuencia de las proteínas o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no afines (es decir, bcr-abl en el cromosoma Filadelfia) o idiotipo de tumores de linfocitos B.

Otras vacunas contra tumores pueden incluir las proteínas de virus implicados en cánceres humanos tales como el virus del papiloma humano (VPH), el virus de la hepatitis (VHB y VHC) y el virus herpético del sarcoma de Kaposi (VSHK). Otra forma de antígeno específico de un tumor que se puede utilizar junto con el bloqueo de la LAG-3 es la de las proteínas de choque térmico (PCT) purificadas aisladas del propio tejido del tumor. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales y estas PCT son muy eficaces en el suministro a las células presentadoras de antígeno para estimular la inmunidad contra el tumor (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura *et al.* (1997) *Science* 278:117-120).

Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígeno potentes que se pueden utilizar para cebar respuestas específicas para un antígeno. Las CD se pueden producir *ex vivo* y cargarse con varios antígenos proteínicos y peptídicos así como también extractos de células tumorales (Nestle *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). Las CD pueden transducirse por medios genéticos para expresar también estos antígenos tumorales. Las CD también se han fusionado directamente a células tumorales a efectos de inmunización (Kugler *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). Como método de vacunación, la inmunización con CD se puede combinar eficazmente con el bloqueo de la LAG-3 para activar respuestas antitumorales más potentes.

El bloqueo de la LAG-3 también se puede combinar con tratamientos contra el cáncer estándares. El bloqueo de la LAG-3 se puede combinar eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, puede ser posible

reducir la dosis de agente quimioterapéutico administrada (Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Un ejemplo de dicha combinación es un anticuerpo anti-LAG-3 combinado con decarbazina para el tratamiento de un melanoma. Otro ejemplo de dicha combinación es un anticuerpo anti-LAG-3 combinado con interleucina 2 (IL-2) para el tratamiento de un melanoma. La base científica racional que respalda el uso combinado del bloqueo de la LAG-3 y quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería dar como resultado niveles incrementados de antígeno tumoral en el sistema de presentación del antígeno. Otras terapias combinatorias que pueden dar como resultado sinergia con el bloqueo de la LAG-3 por muerte celular son radiación, cirugía y supresión hormonal. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el huésped. También se pueden combinar inhibidores de la angiogénesis con el bloqueo de la LAG-3. La inhibición de la angiogénesis produce la muerte de las células tumorales que pueden alimentar el antígeno tumoral en los sistemas de presentación de antígeno del huésped.

Los anticuerpos bloqueantes de la LAG-3 se pueden utilizar también combinados con anticuerpos biespecíficos que dirigen las células efectoras que expresan el receptor Fc α o Fc γ a las células tumorales (véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N.ºs 5 922 845 y 5 837 243). Pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos para hacer frente a dos antígenos separados. Por ejemplo, se han utilizado anticuerpos biespecíficos anti-receptor Fc/antígeno tumoral (p. ej., Her-2/neu) para dirigir macrófagos a los sitios de un tumor. Este direccionamiento puede activar más eficazmente las respuestas específicas contra tumores. La rama de linfocitos T de estas respuestas podría incrementarse mediante el uso del bloqueo de la LAG-3. Como alternativa, puede suministrarse directamente el antígeno a las CD mediante el uso de anticuerpos biespecíficos que se unen al antígeno tumoral y a un marcador de la superficie celular específico para células dendríticas.

Los tumores eluden la vigilancia inmunitaria del huésped mediante una gran diversidad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden ser contrarrestados mediante la desactivación de las proteínas que son expresadas por los tumores y que son inmunosupresoras. Estas incluyen entre otras el TGF- β (Kehrl *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) y el ligando Fas (Hahne *et al.* (1996) *Science* 274: 1363-1365). Pueden utilizarse anticuerpos para cada una de estas entidades combinados con anti-LAG-3 para contrarrestar los efectos del agente inmunosupresor y favorecer las respuestas inmunitarias a los tumores por parte del huésped.

Otros anticuerpos que activan la capacidad de respuesta inmunitaria del huésped se pueden utilizar combinados con anti-LAG-3. Estos incluyen moléculas en la superficie de las células dendríticas que activan la función de las CD y la presentación de antígeno. Los anticuerpos anti-CD40 son capaces de sustituir eficazmente la actividad auxiliar de los linfocitos T (Ridge *et al.* (1998) *Nature* 393: 474-478) y se pueden utilizar junto con anticuerpos de la LAG-3 (Ito *et al.* (2000) *Immunobiology* 201 (5) 527-40). Los anticuerpos activantes de moléculas coestimuladoras de linfocitos T tales como CTLA-4 (p. ej., la Patente de EE. UU. N.º 5 811 097), OX-40 (Weinberg *et al.* (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997) e ICOS (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397: 262-266) también pueden proporcionar niveles incrementados de activación de linfocitos T.

El trasplante de médula ósea se está utilizando actualmente para tratar diversos tumores de origen hematopoyético. Si bien la enfermedad de injerto contra huésped es una consecuencia de este tratamiento, puede obtenerse beneficio terapéutico de las respuestas del injerto contra el tumor. Puede utilizarse el bloqueo de la LAG-3 para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos para el tumor injertados en el donante.

Existen también varios protocolos de tratamiento experimentales que implican la activación y expansión *ex vivo* de linfocitos T específicos para el antígeno y la transferencia adoptiva de estos linfocitos a los destinatarios para estimular linfocitos T contra el tumor específicos para el antígeno (Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546-51). Estos métodos pueden utilizarse también para activar las respuestas de linfocitos T a agentes infecciosos tales como CMV. La activación *ex vivo* en presencia de anticuerpos anti-LAG-3 puede aumentar la frecuencia y la actividad de los linfocitos T transferidos adoptivamente.

Enfermedades infecciosas

La invención también es útil para tratar pacientes que han estado expuestos a toxinas o patógenos particulares. Por consiguiente, se describe en la presente un método para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3, o una porción de unión a antígeno de este, de forma que se trate la enfermedad infecciosa del sujeto. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-LAG-3 humano (tal como cualquiera de los anticuerpos anti-LAG-3 humanos descritos en la presente). Además o como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado.

De forma análoga a su aplicación en tumores como se indicó anteriormente, el bloqueo de la LAG-3 mediado por anticuerpos puede utilizarse solo o como adyuvante, combinado con vacunas, para estimular la respuesta inmunitaria a patógenos, toxinas y autoantígenos. Los ejemplos de patógenos para los cuales puede ser particularmente útil este enfoque terapéutico, incluyen patógenos para los cuales no existe actualmente ninguna vacuna eficaz o patógenos para los cuales las vacunas convencionales no son completamente eficaces. Estos incluyen, pero no se limitan a, VIH, hepatitis (A, B y C), gripe, herpes, giardia, malaria, leishmania, *Staphylococcus*

aureus y *Pseudomonas aeruginosa*. El bloqueo de la LAG-3 es particularmente útil contra infecciones establecidas por agentes tales como el VIH que presentan antígenos alterados durante el curso de las infecciones. Estos nuevos epítomos se reconocen como extraños en el momento de la administración de anti-LAG-3 humanos, provocando de este modo una respuesta fuerte de los linfocitos T que no es amortiguada por señales negativas procedentes de la LAG-3.

Algunos ejemplos de virus patógenos causantes de infecciones tratables por los métodos de la invención incluyen VIH, hepatitis (A, B o C), virus herpéticos (p. ej., VZV, VHS-I, VHA-6, VHS-II y CMV, virus de Epstein-Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus Coxsackie, coronavirus, virus respiratorio sincitial, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubéola, parvovirus, virus de la vacuna, virus VLTH, virus del dengue, papilomavirus, virus del molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus de JC y virus arboviral de la encefalitis.

Algunos ejemplos de bacterias patógenas causantes de infecciones tratables por los métodos de la invención incluyen clamidia, bacterias rickettsiales, micobacterias, estafilococos, estreptococos, pneumococos, meningococos y gonococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionela, difteria, salmonela, bacilos, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospirosis y la bacteria de la enfermedad de Lyme.

Algunos ejemplos de hongos patógenos causantes de infecciones tratables por los métodos de la invención incluyen *Candida* (*albicans*, *kruzei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), el género Mucorales (mucor, absidia, rizopus), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*.

Algunos ejemplos de parásitos patógenos causantes de infecciones tratables por los métodos de la invención incluyen *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondi*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

En todos los métodos anteriores, el bloqueo de la LAG-3 puede combinarse con otras formas de inmunoterapia tales como el tratamiento con citocinas (p. ej., interferones, GM-CSF, G-CSF, IL-2) o terapia con anticuerpos biespecíficos, lo cual proporciona una mejor presentación de antígenos tumorales (véase, p. ej., Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Reacciones autoinmunitarias

Los anticuerpos anti-LAG-3 pueden provocar y amplificar respuestas autoinmunitarias. De hecho, la inducción de respuestas antitumorales utilizando células tumorales y vacunas peptídicas pone de manifiesto que muchas respuestas antitumorales implican anti-autoreactividades (van Elsas *et al.* (2001) *J. Exp. Med.* 194:481-489; Overwijk, *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 2982-2987; Hurwitz, (2000) *supra*; Rosenberg & White (1996) *J. Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19 (1): 81-4). Por lo tanto, es posible considerar la utilización del bloqueo de la anti-LAG-3 junto con diversas autoproteínas para elaborar protocolos de vacunación para generar eficazmente respuestas inmunitarias contra estas autoproteínas para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer da lugar a la acumulación inadecuada del péptido A β en depósitos de amiloide en el cerebro; las respuestas de anticuerpos contra el amiloide son capaces de eliminar estos depósitos de amiloide (Schenk *et al.*, (1999) *Nature* 400: 173-177).

También se pueden utilizar otras autoproteínas como dianas tales como IgE para el tratamiento de alergias y de asma así como el TNF α para la artritis reumatoide. Por último, se pueden inducir respuestas de anticuerpos a varias hormonas mediante el uso del anticuerpo anti-LAG-3. Las respuestas de anticuerpos neutralizantes a hormonas reproductoras se pueden utilizar para la anticoncepción. La respuesta de anticuerpos neutralizantes a hormonas y otros factores solubles que se requieren para el crecimiento de tumores particulares también pueden considerarse como posibles dianas de vacunación.

Se pueden utilizar métodos análogos a los descritos anteriormente para el uso del anticuerpo anti-LAG-3 con el fin de inducir respuestas terapéuticas autoinmunitarias para tratar pacientes que sufran una acumulación inadecuada de otros autoantígenos, tales como depósitos de amiloide, incluidos de A β en la enfermedad de Alzheimer, de citocinas tales como del TNF α , y de IgE.

Vacunas

Se pueden utilizar anticuerpos anti-LAG-3 para estimular respuestas inmunitarias específicas para un antígeno mediante la administración de un anticuerpo anti-LAG-3 junto con un antígeno de interés (p. ej., una vacuna). Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención, o porción de unión a antígeno de este, para su uso en un método para potenciar una respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto: (i) el antígeno; y (ii) el anticuerpo anti-LAG-3, o una porción de unión a antígeno de este, de forma que se potencia una respuesta inmunitaria al antígeno en el sujeto. Preferentemente, el

anticuerpo es un anticuerpo anti-LAG-3 humano (tal como cualquiera de los anticuerpos anti-LAG-3 humanos descritos en la presente). Además o como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral, un antígeno vírico, un antígeno bacteriano o un antígeno procedente de un patógeno. Los ejemplos no limitantes de tales antígenos incluyen los indicados en las secciones anteriores, tales como los antígenos tumorales (o vacunas contra tumores) indicados anteriormente o antígenos de los virus, bacterias u otros patógenos descritos anteriormente.

Se conocen perfectamente en la materia las vías adecuadas de administración *in vivo* e *in vitro* de las composiciones de anticuerpo (p. ej., anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención y pueden ser elegidas por un experto en la materia. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos se pueden administrar por inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosis adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpo.

Como se ha descrito previamente, los anticuerpos anti-LAG-3 humanos de la invención se pueden administrar junto con uno o más agentes terapéuticos diferentes, p. ej., un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede estar unido al agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo se puede administrar antes, después o a la vez que el agente o se puede administrar junto con otras terapias de uso habitual, por ejemplo, una terapia contra el cáncer, por ejemplo, radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos, tales como doxorrubicina (adriamicina), cisplatino-sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucil, dacarbazina y ciclofosfamida-hidroxiurea que, por sí solos, son eficaces solamente a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino se administra por vía intravenosa en una dosis de 100 mg/ml una vez cada cuatro semanas y la adriamicina se administra por vía intravenosa en una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La administración conjunta de anticuerpos anti-LAG-3 humanos, o fragmentos de unión a antígeno de estos, de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerosos que operan mediante diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico sobre las células tumorales humanas. Dicha administración conjunta puede solucionar los problemas ocasionados por el desarrollo de resistencia a los fármacos o por un cambio en la antigenicidad de las células tumorales lo que las harían no reactivas al anticuerpo.

Asimismo, dentro del alcance de la presente invención se encuentran kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la invención (p. ej., anticuerpos humanos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o inmunoconjugados) y las instrucciones para su empleo. El kit puede contener además como mínimo un reactivo adicional, o uno o más anticuerpos humanos adicionales de la invención (p. ej., un anticuerpo humano que posea una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno LAG-3 distinto del primer anticuerpo humano). Los kits normalmente incluyen una etiqueta que indica el uso indicado del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o registrado suministrado en o con el kit, o comoquiera que acompañe el kit.

Terapia combinada

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención para su uso en métodos de terapia combinada en los que se administra el anticuerpo anti-LAG-3 junto con uno o más anticuerpos adicionales que son eficaces en la estimulación de respuestas inmunitarias para de este modo potenciar, estimular o aumentar las respuestas inmunitarias en un sujeto. Por ejemplo, la invención proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3 y uno o más anticuerpos inmunoestimuladores adicionales, tales como un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 y/o un anticuerpo anti-CTLA-4, de forma que se estimule una respuesta inmunitaria en el sujeto, por ejemplo, para inhibir el crecimiento tumoral o estimular una respuesta antivírica. En una realización, se administra al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-PD-1. En otra realización, se administra al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-PD-L1. En otra realización más, se administra al sujeto un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-CTLA-4. En una realización, el anticuerpo anti-LAG-3 es un anticuerpo humano, tal como un anticuerpo de la divulgación. Como alternativa, el anticuerpo anti-LAG-3 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado (p. ej., preparado de un mAb anti-LAG-3 de ratón). En otra realización, dicho anticuerpo inmunoestimulador adicional (p. ej., el anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 y/o anti-CTLA-4) es un anticuerpo humano. Como alternativa, dicho anticuerpo inmunoestimulador adicional puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado (p. ej., preparado a partir de un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 y/o anti-CTLA-4).

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención para su uso en un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa (p. ej., el cáncer), que comprende administrar el anticuerpo LAG-3 y un anticuerpo CTLA-4 a un sujeto. En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-LAG-3 se administra en una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-CTLA-4 se administra en una dosis subterapéutica o se administran ambos en una dosis subterapéutica. En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención para su uso en un método para alterar un acontecimiento adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar el anticuerpo anti-LAG-3 y una dosis subterapéutica del anticuerpo anti-CTLA-4 a un sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 es el anticuerpo monoclonal 10D1 de secuencia

humana (descrito en la Publicación PCT WO 01/14424) y el anticuerpo anti-LAG-3 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como 25F7 descrito en la presente. Otros anticuerpos anti-CTLA-4 englobados por los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, los divulgados en: WO 98/42752; WO 00/37504; la Patente de EE. UU. N.º 6 207 156; Hurwitz *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17):10067-10071; Camacho *et al.* (2004) *J. Clin. Oncology* 22(145): Resumen N.º 2505 (anticuerpo CP-675206); y Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58:5301-5304. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 se une a la CTLA-4 humana con una K_D de 5×10^{-8} M o menor, se une a la CTLA-4 humana con una K_D de 1×10^{-8} M o menor, se une a la CTLA-4 humana con una K_D de 5×10^{-9} M o menor, o se une a la CTLA-4 humana con una K_D de entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M o menor.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención para su uso en un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa (p. ej., el cáncer), que comprende administrar el anticuerpo LAG-3 y un anticuerpo PD-1 a un sujeto. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-LAG-3 se administra en una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-PD-1 se administra en una dosis subterapéutica o se administran ambos en una dosis subterapéutica. En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención para su uso en un método para alterar un acontecimiento adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar el anticuerpo anti-LAG-3 y una dosis subterapéutica del anticuerpo anti-PD-1 a un sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana y el anticuerpo anti-LAG-3 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como 25F7 descrito en la presente. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 de secuencia humana incluyen 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 y 4A11, que se describen en la Publicación PCT WO 06/121168. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se une a la PD-1 humana con una K_D de 5×10^{-8} M o menor, se une a la PD-1 humana con una K_D de 1×10^{-8} M o menor, se une a la PD-1 humana con una K_D de 5×10^{-9} M o menor, o se une a la PD-1 humana con una K_D de entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M o menor.

En una realización, la presente invención proporciona anticuerpo anti-LAG-3 de la invención para su uso en un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa (p. ej., el cáncer), que comprende administrar el anticuerpo LAG-3 y un anticuerpo PD-L1 a un sujeto. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-LAG-3 se administra en una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-PD-L1 se administra en una dosis subterapéutica o se administran ambos en una dosis subterapéutica. En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención para su uso en un método para alterar un acontecimiento adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar el anticuerpo anti-LAG-3 y una dosis subterapéutica del anticuerpo anti-PD-L1 a un sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana y el anticuerpo anti-LAG-3 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como 25F7 descrito en la presente. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 de secuencia humana incluyen 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 y 13G4, que se describen en la Publicación PCT WO 07/005874. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 se une a la PD-L1 humana con una K_D de 5×10^{-8} M o menor, se une a la PD-L1 humana con una K_D de 1×10^{-8} M o menor, se une a la PD-L1 humana con una K_D de 5×10^{-9} M o menor, o se une a la PD-L1 humana con una K_D de entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M o menor.

El bloqueo de la LAG-3 y uno o más antígenos segunda diana tales como CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 por parte de anticuerpos pueden aumentar la respuesta inmunitaria a células cancerosas en el paciente. Se incluyen entre los cánceres cuyo crecimiento puede ser inhibido utilizando los anticuerpos de la presente divulgación incluyen cánceres normalmente sensibles a inmunoterapia. Los ejemplos representativos de cánceres a tratar con la terapia combinada de la presente divulgación incluyen los cánceres específicamente enumerados anteriormente en la explicación de la monoterapia con anticuerpos anti-LAG-3.

En ciertas realizaciones, se puede administrar la combinación de anticuerpos terapéuticos indicada en la presente a la vez que una sola composición en un portador farmacéuticamente aceptable, o a la vez que composiciones separadas con cada anticuerpo en un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la combinación de anticuerpos terapéuticos se puede administrar secuencialmente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-LAG-3 se pueden administrar secuencialmente, tal como la administración del anticuerpo anti-CTLA-4 en primer lugar y la del anticuerpo anti-LAG-3 en segundo lugar, o la administración del anticuerpo anti-LAG-3 en primer lugar y la del anticuerpo anti-CTLA-4 en segundo lugar. Además o como alternativa, un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo anti-LAG-3 se pueden administrar secuencialmente, tal como la administración del anticuerpo anti-PD-1 en primer lugar y la del anticuerpo anti-LAG-3 en segundo lugar, o la administración del anticuerpo anti-LAG-3 en primer lugar y la del anticuerpo anti-PD-1 en segundo lugar. Además o como alternativa, un anticuerpo anti-PD-L1 y un anticuerpo anti-LAG-3 se pueden administrar secuencialmente, tal como la administración del anticuerpo anti-PD-L1 en primer lugar y la del anticuerpo anti-LAG-3 en segundo lugar, o la administración del anticuerpo anti-LAG-3 en primer lugar y la del anticuerpo anti-PD-L1 en segundo lugar.

Además, si se administra secuencialmente más de una dosis de terapia combinada, el orden de la administración secuencial puede invertirse o mantenerse en el mismo orden en cada momento de la administración, pueden combinarse administraciones secuenciales con administraciones simultáneas o cualquier combinación de estas. Por ejemplo, la primera administración de una combinación de anticuerpo anti-CTLA-4 y anticuerpo anti-LAG-3 puede ser simultánea, la segunda administración puede ser secuencial con anti-CTLA-4 en primer lugar y anti-LAG-3 en

segundo lugar, y la tercera administración puede ser secuencial con anti-LAG-3 en primer lugar y anti-CTLA-4 en segundo lugar, etc. Además o como alternativa, la primera administración de una combinación de anticuerpo anti-PD-1 y anticuerpo anti-LAG-3 puede ser simultánea, la segunda administración puede ser secuencial con anti-PD-1 en primer lugar y anti-LAG-3 en segundo lugar, y la tercera administración puede ser secuencial con anti-LAG-3 en primer lugar y anti-PD-1 en segundo lugar, etc. Además o como alternativa, la primera administración de una combinación de anticuerpo anti-PD-L1 y anticuerpo anti-LAG-3 puede ser simultánea, la segunda administración puede ser secuencial con anti-PD-L1 en primer lugar y anti-LAG-3 en segundo lugar, y la tercera administración puede ser secuencial con anti-LAG-3 en primer lugar y anti-PD-L1 en segundo lugar, etc. Otro régimen de dosificación representativo puede suponer una primera administración que es secuencial con anti-LAG-3 en primer lugar y anti-CTLA-4 (y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1) en segundo lugar, y las administraciones posteriores pueden ser simultáneas.

Opcionalmente, la combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y uno o más anticuerpos adicionales (p. ej., anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1) puede combinarse posteriormente con un agente inmunogénico, tal como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluidos proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidrato), células y células transfectadas con genes que codifican citocinas inmunoestimuladoras (He *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Los ejemplos no limitantes de vacunas contra tumores que se pueden utilizar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citocina GM-CSF (se explica más detalladamente a continuación). Un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 se puede combinar además con un protocolo de vacunación, tal como cualquiera de los protocolos de vacunación indicados en detalle anteriormente con respecto a la monoterapia con anticuerpos anti-LAG-3.

Un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 también se puede combinar con tratamientos estándares contra el cáncer. Por ejemplo, un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 se puede combinar eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, es posible reducir la dosis de otro reactivo quimioterapéutico administrado con la combinación de la presente divulgación (Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Un ejemplo de dicha combinación es una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1 combinados a su vez con decarbazina para el tratamiento de un melanoma. Otro ejemplo es una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1 combinados a su vez con interleucina 2 (IL-2) para el tratamiento de un melanoma. La base científica racional que respalda el uso combinado del bloqueo de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 con quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería dar como resultado niveles incrementados de antígeno tumoral en el sistema de presentación del antígeno. Otras terapias combinatorias que pueden dar como resultado sinergia con un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 por muerte celular incluyen radiación, cirugía o supresión hormonal. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el huésped. Los inhibidores de la angiogénesis también se pueden combinar con un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1. La inhibición de la angiogénesis produce la muerte de las células tumorales, lo cual puede ser una fuente de antígeno tumoral alimentado en los sistemas de presentación de antígeno del huésped.

También se puede utilizar una combinación de anticuerpos bloqueantes de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 combinados con anticuerpos biespecíficos que dirigen células efectoras que expresan el receptor Fc α o Fc γ a las células tumorales (véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N.^{os} 5 922 845 y 5 837 243). Pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos para hacer frente a dos antígenos separados. La rama de linfocitos T de estas respuestas podría incrementarse mediante el uso de un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1.

En otro ejemplo, se puede utilizar una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 junto con anticuerpos antineoplásicos, tales como Rituxan[®] (rituximab), Herceptin[®] (trastuzumab), Bexxar[®] (tositumomab), Zevalin[®] (ibritumomab), Campath[®] (alemtuzumab), Lymphocide[®] (epruzumab), Avastin[®] (bevacizumab), y Tarceva[®] (erlotinib), y análogos. A modo de ejemplo y sin pretender quedar limitados por la teoría, el tratamiento con un anticuerpo anticanceroso o un anticuerpo anticanceroso conjugado a una toxina puede producir la muerte de las células cancerosas (p. ej., las células tumorales) lo que podría potenciar una respuesta inmunitaria mediada por CTLA-4, PD-1, PD-L1 o LAG-3. En un ejemplo de una realización, un tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (p. ej., un tumor canceroso) puede incluir un anticuerpo anticanceroso combinado con anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1, simultánea o secuencialmente o cualquier combinación de estos, lo cual puede potenciar respuestas inmunitarias antitumorales por parte del huésped.

Los tumores eluden la vigilancia inmunitaria del huésped mediante una gran diversidad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden ser contrarrestados por la desactivación de proteínas, que son expresadas por los tumores y que son inmunosupresoras. Estas incluyen entre otras el TGF- β (Kehrl *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) y el ligando Fas (Hahne *et al.* (1996) *Science* 274: 1363-1365). En otro ejemplo, se pueden combinar además anticuerpos para cada una de estas entidades con una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 para contrarrestar los efectos de los agentes inmunosupresores y favorecer las respuestas inmunitarias antitumorales por parte del huésped.

Otros anticuerpos que se pueden utilizar para activar la capacidad de respuesta inmunitaria del huésped se pueden utilizar además combinados con una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1. Estos incluyen moléculas en la superficie de células dendríticas que activan la función de CD y la presentación de antígeno. Los anticuerpos anti-CD40 (Ridge *et al.*, *supra*) se pueden utilizar junto con una combinación de anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 (Ito *et al.*, *supra*). Otros anticuerpos activadores de moléculas coestimuladoras de linfocitos T (Weinberg *et al.*, *supra*, Melero *et al.* *supra*, Hutloff *et al.*, *supra*) pueden proporcionar además niveles incrementados de activación de linfocitos T.

Como se indicó anteriormente, el trasplante de médula ósea se está utilizando actualmente para tratar diversos tumores de origen hematopoyético. Puede utilizarse un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos para tumores injertados en el donante.

Varios protocolos de tratamiento experimentales que implican la activación y expansión *ex vivo* de linfocitos T específicos para el antígeno y la transferencia adoptiva de estos linfocitos a los destinatarios para identificar linfocitos T contra el tumor específicos para el antígeno (Greenberg & Riddell, *supra*). Estos métodos pueden utilizarse también para activar las respuestas de linfocitos T a agentes infecciosos tales como CMV. Cabe esperar que la activación *ex vivo* en presencia de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 aumente la frecuencia y la actividad de los linfocitos T transferidos adoptivamente.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención para su uso en un método para alterar un acontecimiento adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (p. ej., el cáncer) con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar el anticuerpo anti-LAG-3 y una dosis subterapéutica del anticuerpo anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 a un sujeto. Por ejemplo puede reducirse la frecuencia de la colitis o diarrea inducida por anticuerpos terapéuticos inmunoestimuladores mediante la administración de un esteroide no absorbible al paciente. Debido a que cualquier paciente que recibe un anticuerpo terapéutico inmunoestimulador corre el riesgo de desarrollar colitis o diarrea inducida por dicho anticuerpo, esta población entera de pacientes es adecuada para terapia de acuerdo con los métodos de la presente invención. Aunque se han administrado esteroides para tratar la enfermedad intestinal inflamatoria (EII) y prevenir las exacerbaciones de la EII, estos no se han utilizado para prevenir (reducir la aparición de) la EII en pacientes que no han sido diagnosticados de EII. Los efectos secundarios significativos asociados con esteroides, incluso esteroides no absorbibles, han hecho que se desaconseje su uso profiláctico.

En otras realizaciones, un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 blockade (es decir, anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1 terapéuticos inmunoestimuladores) se pueden combinar además con el uso de un esteroide no absorbible cualquiera. Como se utiliza en la presente, un "esteroide no absorbible" es un glucocorticoide que exhibe un metabolismo extenso de primer paso de tal manera que, después del metabolismo en el hígado, la biodisponibilidad del esteroide es baja, es decir, menor de aproximadamente el 20 %. En una realización de la invención, el esteroide no absorbible es budesónida. La budesónida es un glucocorticosteroide de acción local, que se metaboliza extensamente, fundamentalmente en el hígado, tras su administración oral. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) es una formulación oral de budesónida dependiente del pH y del tiempo desarrollada para optimizar el suministro de fármacos al íleon y a lo largo del colon. ENTOCORT EC® está autorizado en los Estados Unidos para el tratamiento de la enfermedad de Crohn leve a moderada relacionada con el íleon y/o el colon ascendente. La dosis oral habitual de ENTOCORT EC® para el tratamiento de la enfermedad de Crohn es de 6 a 9 mg/día. ENTOCORT EC® se libera en los intestinos antes de ser absorbido y retenido en la mucosa intestinal. Una vez que pasa a través del tejido diana de la mucosa intestinal, ENTOCORT EC® es metabolizado extensamente por el sistema del citocromo P450 en el hígado para dar metabolitos con una actividad glucocorticoide insignificante. Así pues, la biodisponibilidad es baja (aproximadamente del 10 %). La baja biodisponibilidad de la budesónida da como resultado una proporción terapéutica mejorada en comparación con otros glucocorticoides con metabolismo de primer paso menos extenso. La budesónida da lugar a menos efectos adversos, incluida una menor supresión hipotálamico-hipofisaria, que los corticosteroides de acción sistémica. Sin embargo, la administración crónica de ENTOCORT EC® puede dar lugar a efectos glucocorticoides sistémicos tales como hipercorticismismo y supresión adrenal. Véase PDR 58.^a ed. 2004; 608-610.

En otras realizaciones más, un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 (es decir, anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1 terapéuticos inmunoestimuladores) junto con un esteroide no absorbible se pueden combinar además con un salicilato. Los salicilatos incluyen agentes 5-ASA tales como, por ejemplo: sulfasalazina (AZULFIDINE®, Pharmacia & UpJohn); olsalazina (DIPENTUM®, Pharmacia & UpJohn); balsalazida (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); y mesalamina (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire EE. UU.; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

De acuerdo con los usos médicos de la presente invención, un salicilato administrado combinado con anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y un esteroide no absorbible puede incluir cualquier administración superpuesta o secuencial del salicilato y el esteroide no absorbible con el objetivo de reducir la incidencia de colitis inducida por los anticuerpos inmunoestimulantes. Así pues, por ejemplo, los métodos para reducir la incidencia de colitis inducida por los anticuerpos inmunoestimuladores de acuerdo con la presente invención engloban la administración de un salicilato y un esteroide no absorbible simultánea o secuencialmente (p.

ej., se administra un salicilato 6 horas después de un esteroide no absorbible), o cualquier combinación de estos. Además, de acuerdo con la presente invención, se pueden administrar un salicilato y un esteroide no absorbible por la misma vía (p. ej., se administran ambos por vía oral) o por vías diferentes (p. ej., se administra un salicilato por vía oral y se administra un esteroide no absorbible por vía rectal), que pueden diferir de la o las vías utilizadas para administrar los anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1.

La presente divulgación se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, los cuales no se deben interpretar como limitantes.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales humanos contra la LAG-3

Los anticuerpos monoclonales anti-LAG-3 humanos se generaron utilizando ratones transgénicos que expresan genes de anticuerpos humanos, como se indica a continuación.

Antígenos

Las proteínas de fusión LAG-3 recombinantes humanas se utilizaron como inmunógeno para generar anticuerpos anti-LAG-3 humanos. En ciertas inmunizaciones, se utilizó como inmunógeno una proteína de fusión que comprendía la región extracelular completa (dominios 1-4) de la LAG-3 humana fusionada a un dominio Fc de inmunoglobulina humana (R&D Systems, # de catálogo 2319-L3) (D1-D4 hFc) o a un dominio Fc de inmunoglobulina de ratón (D1-D4 mFc). Para otras inmunizaciones, se utilizó como inmunógeno una proteína de fusión que comprendía solo los dos primeros dominios extracelulares de la LAG-3 humana fusionada con un dominio Fc de inmunoglobulina de ratón (D1-D2 mFc). Las proteínas de fusión LAG-3 se prepararon utilizando técnicas estándares de recombinación de ADN.

Razas KM Mouse™ y KM/FCGR2D Mouse™ de ratones transgénicos

Se preparon anticuerpos monoclonales completamente humanos contra la LAG-3 humana utilizando las razas KM Mouse™ y KM/FCGR2D Mouse™ de ratones transgénicos, que expresan genes de anticuerpos humanos.

En la raza KM Mouse™, se ha alterado homocigóticamente el gen de la cadena ligera kappa endógena de ratón como se describe en Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:811-820 y se ha alterado homocigóticamente el gen de la cadena pesada de ratón endógeno como se describe en el Ejemplo 1 de la Publicación PCT WO 01/09187. Además, esta raza de ratón porta un transgen de la cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild *et al.*, *supra*. La raza también contiene el transgen SC20, que porta el locus de la cadena pesada de la Ig humana, como se describe en la Publicación PCT WO 02/43478. La raza KM/FCGR2D Mouse™ es la misma que la raza KM Mouse™ salvo que su genoma también comprende una alteración homocigótica del gen FcγRIIB endógeno. Las razas KM Mouse™ y KM/FCGR2D Mouse™ también se describen detalladamente en la Publicación de la Solicitud de EE. UU. N.º 20020199213.

Inmunizaciones de KM Mouse™ y KM/FCGR2D Mouse™:

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos de la LAG-3, se inmunizaron ratones de las razas KM Mouse™ y KM/FCGR2D Mouse™ con una de las tres proteínas de fusión LAG-3 recombinantes diferentes descritas anteriormente (D1-D4 hFc, D1-D4 mFc, D1-D2, mFc). Los esquemas de inmunización general se describen en Lonberg *et al.* (1994) *supra*; Fishwild *et al.*, *supra* y la Publicación PCT WO 98/24884. Los ratones tenían una edad de 6-16 semanas en el momento de la primera infusión de antígeno. Los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal (IP) y/o subcutánea (SC). Los ratones se inmunizaron cuatro veces cada dos semanas con 10 µg de la proteína de fusión LAG-3 recombinante, seguida de dos inmunizaciones con 20 µg del mismo inmunógeno en Ribi como adyuvante. La respuesta inmunitaria se monitorizó mediante extracciones de sangre retroorbitales. El plasma se cribó por ELISA (como se describe más adelante) y se utilizaron para las fusiones ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-LAG-3. Antes de sacrificar los ratones y extirpar sus bazo, se estimularon por vía intravenosa e intraperitoneal con 20 µg de antígeno, seguidos de una estimulación intravenosa posterior con 20 µg de antígeno.

Selección de ratones KM y KM/FCGR2D que producen anticuerpos anti-LAG-3

Para seleccionar ratones que producían anticuerpos que se unían a la proteína LAG-3, se analizaron sueros de ratones inmunizados con la proteína de fusión D1-D4 hFc por un ELISA modificado como se describe originariamente en Fishwild *et al.* (1996). Resumiendo, se cubrieron placas de microtítulos con proteína de fusión LAG-3 recombinante purificada con densidad de 1 µg/ml en PBS, 50 µl/pocillos incubados a 4°C durante la noche, posteriormente se bloquearon con 200 µl/pocillo de BSA al 5 % en PBS. Se añadieron diluciones de plasma procedente de ratones inmunizados con LAG-3 a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y se incubaron posteriormente con un anticuerpo policlonal de cabra anti-cadena ligera kappa humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante una hora a

temperatura ambiente. Después de lavar, las placas se revelaron con sustrato ABTS y se analizaron por espectrofotometría con DO 405.

Para ratones inmunizados con proteínas de fusión D1-D4 mFc o D1-D2 mFc, se analizaron sueros de estos ratones por ELISA indirecto utilizando anti-Ig de ratón de cabra para cubrir las placas durante una hora antes de cubirlas con el antígeno para eliminar la unión no específica a la parte Fc de ratón. Posteriormente se llevaron a cabo los mismos pasos de ELISA que se describieron anteriormente.

Los ratones que desarrollaron los títulos más elevados de anticuerpos anti-LAG-3 se utilizaron para las fusiones. Las fusiones se realizaron como se describe a continuación y los sobrenadantes de hibridoma se analizaron para determinar la actividad anti-LAG-3 por ELISA.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos contra proteínas LAG-3

Los esplenocitos de ratón, aislados de ratones KM o KM/FCGR2D, se fusionaron por electrofusión basada en un campo eléctrico utilizando un electroporador de fusión con eliminación selectiva Cyto Pulse de cámara grande (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD) de una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se cribaron posteriormente según su producción de anticuerpos específicos para el antígeno. Se fusionaron suspensiones celulares simples de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con un cuarto del número de células P3X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580) de células de mieloma de ratón no secretoras. Las células se colocaron con una densidad de aproximadamente 1×10^5 /pocillo en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido de aproximadamente dos semanas de incubación en un medio selectivo que contenía suero fetal bovino al 10 % complementado con origen (IGEN) en RPMI, L-glutamina, piruvato sódico, HEPES, penicilina, estreptamicina, gentamicina, lx HAT y β -mercaptoetanol. Después de 1-2 semanas, se cultivaron las células en un medio en el cual se había reemplazado el HAT por HT. Posteriormente, se cribaron los pocillos individuales por ELISA (descrito anteriormente) según su contenido en anticuerpos anti-LAG-3 IgG monoclonales humanos. Una vez que se produjo un crecimiento extenso del hibridoma, se monitorizó el medio normalmente al cabo de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos se colocaron de nuevo en las placas, se cribaron de nuevo y, en caso de ser todavía positivos para la IgG humana, se subclonaron los anticuerpos monoclonales anti-LAG-3 al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables se cultivaron posteriormente *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para su posterior caracterización.

Se seleccionaron clones de hibridomas de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 para análisis y secuenciación posteriores.

Ejemplo 2: Caracterización estructural de los anticuerpos monoclonales anti-LAG-3 humanos 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5

Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de mAb expresadas por los clones de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 descritos en el Ejemplo 1, se secuenciaron utilizando el siguiente protocolo. El ARN total se preparó a partir de 5×10^6 células de hibridoma utilizando el Mini Kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). El ADNc se preparó mediante el protocolo 5'-RACE con el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) y transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las regiones V de cada anticuerpo se amplificaron utilizando un cebador de la región constante específico para 3' humano, apareado con la mezcla de cebador universal 5' RACE. Los productos de PCR que contenían las regiones V se clonaron en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transformaron en cepas de *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se prepararon las muestras de ADN miniprep o Templiphi (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, EE. UU.) y se sometieron a secuenciación de ADN (Sequetech, Mountain View, CA). Las secuencias de ADN resultantes se analizaron para determinar sus redistribuciones en fase y otras características de los anticuerpos. Las proteínas expresadas se caracterizaron por análisis químicos de proteínas estándar. Se detectó que los clones de 125E3, 25F7 y 26H10 expresaban un anticuerpo que comprendía una cadena pesada y una cadena ligera kappa de IgG1, mientras que se detectó que los clones de 8B7 y 17E5 expresaban un anticuerpo que comprendía una cadena pesada y una cadena ligera kappa de IgG4 y se detectó que el clon de 11F2 expresaba un anticuerpo que comprendía una cadena pesada y una cadena ligera kappa de IgG2.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 25F7 se muestran en la Figura 1A y en SEC ID N°: 49 y 37, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa de 25F7 se muestran en la Figura 1B y en SEC ID N°: 55 y 43, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 25F7 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 7) demostró que la cadena pesada de 25F7 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 4-34 (SEC ID N°:61) y un segmento J_H de la línea germinal humana JH5b (SEC ID N°:62). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_H de 25F7 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestra en la Figura 1A y en SEC ID N°: 1, 7 y 13, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 25F7 con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 8) demostró que la cadena ligera kappa de

25F7 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K L6 (SEC ID N°:63) y un segmento J_K de la línea germinal humana JK 2 (SEC ID N°:64). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_K de 25F7 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 1B y en SEC ID N°: 19, 25 y 31, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 26H10 se muestran en la Figura 2A y en SEC ID N°: 50 y 38, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 26H10 se muestran en la Figura 2B y en SEC ID N°: 56 y 44, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 26H10 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 9) demostró que la cadena pesada de 26H10 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-33 (SEC ID N°:65) y un segmento J_H de la línea germinal humana JH 6B (SEC ID N°:66). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_H de 26H10 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestra en la Figura 2A y en SEC ID N°: 2, 8 y 14, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 26H10 con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 10) demostró que la cadena ligera kappa de 26H10 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K A27 (SEC ID N°:67) y un segmento J_K de la línea germinal humana JK 3 (SEC ID N°:68). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_K de 26H10 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 2B y en SEC ID N°: 20, 26 y 32, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 25E3 se muestran en la Figura 3A y en SEC ID N°: 51 y 39, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 25E3 se muestran en la Figura 3B y en SEC ID N°: 57 y 45, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 25E3 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 11) demostró que la cadena pesada de 25E3 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-20 (SEC ID N°:69) y un segmento J_H de la línea germinal humana JH 4b (SEC ID N°:70). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_H de 25E3 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestra en la Figura 3A y en SEC ID N°: 3, 9 y GGY, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 25E3 con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 12) demostró que la cadena ligera kappa de 25E3 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K L18 (SEC ID N°:71) y un segmento J_K de la línea germinal humana JK 2 (SEC ID N°:64). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_K de 25E3 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 3B y en SEC ID N°: 21, 27 y 33, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 8B7 se muestran en la Figura 4A y en SEC ID N°: 52 y 40, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 8B7 se muestran en la Figura 4B y en SEC ID N°: 58 y 46, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 8B7 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 13) demostró que la cadena pesada de 8B7 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 4-34 (SEC ID N°:61) y un segmento J_H de la línea germinal humana JH 5B (SEC ID N°:62). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_H de 8B7 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestra en la Figura 4A y en SEC ID N°: 4, 10 y 16, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 8B7 (Figura 14) con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera kappa de 8B7 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K L6 (SEC ID N°:63) y un segmento J_K de la línea germinal humana JK 4 (SEC ID N°:72). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_K de 26H10 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 4B y en SEC ID N°: 22, 28 y 34, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 11F2 se muestran en la Figura 5A y en SEC ID N°: 53 y 41, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 11F2 se muestran en la Figura 5B y en SEC ID N°: 59 y 47, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 11F2 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 15) demostró que la cadena pesada de 11F2 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 1-24 (SEC ID N°:73), un segmento D de la línea germinal humana 2-15 y un segmento J_H de la línea germinal humana JH 4B (SEC ID N°:70). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_H de 11F2 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestra en la Figura 13A y en SEC ID N°: 5, 11 y 17, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 11F2 con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 16) demostró que la cadena ligera kappa de 11F2 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K L6 (SEC ID N°:63) y un segmento J_K de la línea germinal humana JK 1 (SEC ID N°:74). Mediante el análisis posterior de

la secuencia V_K de 11F2 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 5B y en SEC ID N°: 23, 29 y 35, respectivamente.

5 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 17E5 se muestran en la Figura 6A y en SEC ID N°: 54 y 42, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 17E5 se muestran en la Figura 6B y en SEC ID N°: 60 y 48, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 17E5 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 17) demostró que la cadena pesada de 17E5 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-33 (SEC ID N°:65), un segmento D de la línea germinal humana 2-2 y un segmento J_H de la línea germinal humana J_H 4B (SEC ID N°:70). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_H de 17E5 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestra en la Figura 6A y en SEC ID N°: 6, 12 y 18, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 17E5 con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas (Figura 18) demostró que la cadena ligera kappa de 17E5 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K L6 (SEC ID N°:63) y un segmento J_K de la línea germinal humana J_K 5 (SEC ID N°:75). Mediante el análisis posterior de la secuencia V_K de 17E5 utilizando el sistema de Kabat para la determinación de las regiones CDR se obtuvo la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 6B y en SEC ID N°: 24, 30 y 36, respectivamente.

Las regiones variables de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se pueden convertir en anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo deseado utilizando técnicas de recombinación de ADN estándares. Por ejemplo, las regiones V_H y V_L que codifican ADN se pueden clonar en un vector de expresión que porta las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de forma que las regiones variables estén operativamente enlazadas a las regiones constantes. Como alternativa, se pueden utilizar vectores separados para la expresión de la cadena pesada de longitud completa y de la cadena ligera de longitud completa. Los ejemplos no limitantes de vectores de expresión adecuados para usar en la creación de anticuerpos de longitud completa incluyen los vectores pIE descritos en la Publicación de Patente de EE. UU. N.º 20050153394.

Ejemplo 3: Caracterización de las propiedades de unión de los anticuerpos monoclonales LAG-3

En este ejemplo, se examinó la unión de anticuerpos anti-LAG-3 humanos a la LAG-3 de la superficie celular (LAG-3 humana, de mono y de ratón) por citometría de flujo. Además, se analizó la cinética de la unión a la LAG-3 mediante un análisis BIACORE. Es más, el mapeo de los epítomos se llevó a cabo utilizando un experimento de escaneo peptídico.

A. Estudios por citometría de flujo

1. Unión de células CHO-LAG-3 humana

Para analizar la capacidad de los anticuerpos de unirse a la proteína LAG-3 de la superficie celular, se incubaron los anticuerpos con una línea celular CHO que había sido transfectada para expresar la LAG-3 humana en la superficie celular. Los anticuerpos monoclonales 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se diluyeron en serie con 1x tampón PFAE frío (1x PBS + 2 % de FBS, 0,02 % de azida de sodio, Na EDTA 2mM). Para la reacción de unión, se añadieron 50 μ l de solución de anticuerpo diluido a 50 μ l de suspensión celular que contenía 2×10^5 células y la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con 1x tampón PFAE. Se añadió una dilución 1:100 de anticuerpo de cabra anti-cadena ligera kappa humana marcado con FITC (Bethyl Laboratories, Inc., # de Cat. A80-115F) y la mezcla se incubó durante 30 minutos a 4°C, seguido de dos lavados con 1x tampón PFAE frío. Tras el último lavado, se añadieron 150 μ l de 1x PFAE frío que contenía 10 μ g/ml de yoduro de propidio (Roche Applied Science, # de Cat. 1_348_639) a cada solución y se realizó un análisis de la unión de anticuerpo por citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (BD Bioscience).

Los resultados del análisis por citometría de flujo se resumen a continuación en la Tabla 1, que muestra los valores de CE_{50} para la unión CHO-LAG-3 humana, lo que demuestra que 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se unen eficazmente a la LAG-3 de la superficie celular humana, donde 25F7 posee una CE_{50} aproximadamente 20 veces menor que 25E3 pero una CE_{50} aproximadamente equivalente a la de 8B7 y 26H10. Los resultados de CE_{50} para 11F2 y 17E5 estaban en el mismo intervalo que para 25E3.

Tabla 1: Unión de anticuerpos anti-LAG-3 a células CHO que expresaban LAG-3 humana

Anticuerpo	CE_{50} (nM)
25F7	0,45 – 2,52
8B7	1,93 – 4,44
26H10	1,81 – 3,64

11F2	15,12
25E3	14,9 – 25,39
17E5	12,3

2. Unión de linfocitos T CD4⁺ activados humanos

Para analizar la capacidad de los anticuerpos de unirse a la LAG-3 humana natural en la superficie de linfocitos T activados humanos, se aislaron linfocitos T CD4⁺ en reposo de células sanguíneas mononucleares periféricas purificadas y se sometieron a tres días de estimulación con una combinación de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 fijados a microesferas de poliestireno. Los anticuerpos monoclonales 25F7, 8B7 y 26H10 se diluyeron en serie con 1x tampón PFAE frío (1x PBS + 2 % de FBS, 0,02 % de azida de sodio, Na EDTA 2mM). Para la reacción de unión, se mezclaron 50 µl de la solución de anticuerpo diluido con 50 µl de anti-CD4 humano marcado con PE (BD Bioscience, # de Cat. 555347). Se procesaron los linfocitos T activados mediante el mismo protocolo descrito anteriormente. El análisis de la unión de anticuerpo se llevó a cabo como se describió anteriormente.

Los resultados del análisis por citometría de flujo se resumen a continuación en la Tabla 2, que muestra las CE₅₀ para la unión a los linfocitos T CD4⁺ T humanos activados, lo que demuestra que los tres anticuerpos se unen de forma similar a la LAG-3 de la superficie celular humana.

Tabla 2: Unión de anticuerpos anti-LAG-3 a linfocitos T CD4⁺ humanos activados

<u>Anticuerpo</u>	<u>CE₅₀ (nM)</u>
25F7	0,27 – 0,45
26H10	0,41 – 0,84
8B7	0,69 – 1,80

3. Unión de antígeno LAG-3 de mono

Para determinar si los anticuerpos anti-LAG-3 presentan reactividad cruzada con la LAG-3 de mono, se clonó una secuencia de ADNc por RT-PCR a partir de un preparado de ADNc combinado preparado por transcripción inversa de ARN de una serie de muestras de tejido de monos cynomolgus y rhesus. La secuencia se amplificó primero a partir del ADNc combinado utilizando cebadores (cebador directo 5': 5Mcyn1408; 5'-atgtgggaggctcagttcctg-3' (SEC ID N°: 91) y cebador inverso 3': 3Mcyn1408a; 5'-gtcagagctgtccggctc-3' (SEC ID N°: 92)) utilizando un sistema de amplificación por PCR GC-rich (Roche) y se clonó en un vector de clonación TOPO receptor (Invitrogen) para el análisis de secuencias. Posteriormente, se reamplificaron clones concordantes con la secuencia de referencia de la LAG-3 de mono rhesus de Genbank (N.º de acceso en Genbank XM_001108923) a partir del vector de clonación de ADN TOPO utilizando un segundo grupo de cebadores que incorporaban los sitios de restricción enzimática para la clonación direccional en un vector de expresión de células de mamífero.

El clon pa23-5 de la LAG-3 de mono se aisló y se secuenció. La secuencia de mono aislada presentaba un 99,6 % de identidad con la secuencia de referencia de la LAG-3 de mono rhesus de Genbank. Se muestra una comparación de la secuencia de aminoácidos del clon pa23-3 de ADNc (SEC ID N°: 93) con la LAG-3 de mono rhesus (SEC ID N°: 94) de Genbank (con N.º de acceso XM_001108923) en la Figura 19. Las dos secuencias son idénticas salvo por un aminoácido diferente en la posición 419 (arginina en el clon pa23-5 frente a treonina en la secuencia de rhesus de Genbank) y a partir de esto se concluye que el clon pa23-5 de ADNc representa la secuencia genética de la LAG-3 de rhesus.

El clon pa23-5 de ADNc se insertó en un constructo de expresión, que se transfirió en células en suspensión CHO-S por nucleofección (Amaxa). La expresión de la LAG-3 de rhesus por parte de clones resistentes a fármacos seleccionados y clasificados se confirmó mediante un análisis FACS. Esta línea celular CHO clonal que sobreexpresa la LAG-3 de rhesus se utilizó en ensayos FACS similares a los que se describieron anteriormente para medir la reactividad cruzada que presentan los anticuerpos a la proteína de mono. En resumen, los anticuerpos monoclonales 25F7, 8B7 y 26H10 se diluyeron en serie con 1x tampón PFAE frío (1x PBS + 2 % de FBS, 0,02 % de azida de sodio, Na EDTA 2mM). Para la reacción de unión, se añadieron 50 µl de solución de anticuerpo diluido a 50 µl de suspensión celular que contenía 2 x 10⁵ células y la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. Se procesaron las células mediante el mismo protocolo descrito anteriormente. El análisis de la unión de anticuerpo se llevó a cabo como se describió anteriormente.

En un experimento separado, se analizaron los anticuerpos para determinar la unión a la LAG-3 de mono cynomolgus utilizando linfocitos T de mono cynomolgus activados. La activación *in vitro* de estos linfocitos T de mono se consiguió mediante tratamiento con anti-CD3/anti-CD28 de linfocitos T mediante esencialmente el mismo protocolo descrito anteriormente para la activación *in vitro* de linfocitos T humanos, seguido de un análisis por citometría de flujo realizado como se describió anteriormente para teñir linfocitos T CD4⁺ humanos activados *in vitro*.

Los resultados de los análisis por citometría de flujo utilizando las células CHO-LAG-3 de rhesus y los linfocitos T de cynomolgus activados se resumen a continuación en la Tabla 3, que muestra las CE_{50} para la unión a los dos tipos diferentes de células que expresan la LAG-3 de mono. Estos resultados demostraron que todos los anticuerpos se unen eficazmente tanto a la LAG-3 en los linfocitos T de cynomolgus activados como a la LAG-3 de rhesus (SEC ID N°: 93) transfectada en células CHO. Sin embargo, existe una jerarquía de afinidades de unión, donde el clon de 26H10 muestra la afinidad más alta, que es aproximadamente 2,5 y 6 veces mejor que la de los clones de 8B7 y 25F7, respectivamente. La diferencia en la jerarquía de unión entre los dos tipos de células puede reflejar diferencias en las secuencias de aminoácidos entre las proteínas LAG-3 de rhesus y de cynomolgus.

Tabla 3: Unión de anticuerpos anti-LAG-3 a la LAG-3 de mono

Anticuerpo	CE_{50} de linfocitos T CD4 ⁺ de cyno activados (nM)	CE_{50} de CHO-LAG-3 de rhesus (nM)
26H10	5,19	4,684
25F7	14,18	22,72
8B7	30,45	10,01

4. Unión de antígeno LAG-3 de ratón

Para determinar si los anticuerpos presentaban reactividad cruzada con la LAG-3 de ratón, se realizaron estudios por citometría de flujo similares a los descritos anteriormente utilizando como célula diana una línea celular de hibridoma de linfocito T de ratón (3A9) que había sido transfectada para expresar la LAG-3 de ratón en su superficie celular, seguidos de un análisis FACS para detectar la unión de anticuerpo. Los resultados indicaron que, a diferencia de un anticuerpo de control anti-LAG-3 de ratón de control que presentaba una fuerte tinción, ninguno de los anticuerpos 25E3, 25F7, 8B7 ó 26H10 humanos presentó una unión por encima de los niveles de fondo a la LAG-3 de ratón de la superficie celular, lo que demostró que ninguno de estos anticuerpos presentaba reactividad cruzada con la LAG-3 de ratón.

B. Análisis BIACORE

La unión de los anticuerpos 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 y 17E5 a la proteína LAG-3 recombinante se examinó por BIAcore™ utilizando un método de captura. Cada uno de los anticuerpos 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 y 17E5 se capturaron utilizando anti-CH1, un anticuerpo reactivo que es específico para la región constante 1 de la cadena pesada de anticuerpo humano (Zymed, Clon HP6045, conc. patrón 1,0 mg/ml). El anti-CH1 se cubrió con un chip CM5 (BR-1000-14, grado de investigación) con una densidad alta (9700-11500RUs). El recubrimiento se llevó a cabo según el procedimiento de inmovilización estándar recomendado por el fabricante. El anticuerpo 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 ó 17E5 purificado, con concentraciones en el intervalo de 0,5-3 µg/ml, se capturó posteriormente en la superficie recubierta anti-CH1 con una velocidad de flujo de 10 µL/min durante 1 minuto. Se inyectó una única concentración de la proteína de fusión LAG-3 humana (20 nM) sobre el anticuerpo capturado durante 3 minutos con una velocidad de flujo 25 µg/ml. Se dejó que el antígeno se disociara durante 7,5 minutos. La superficie del chip se regeneró después de cada ciclo con 25 µL de NaOH 25 mM, seguido de 30 µL de lavado con HBS-EP. Los controles isotípicos se analizaron en el chip y los datos se emplearon para restar la unión no específica. Todos los experimentos se llevaron a cabo en un equipo de resonancia de plasmones superficiales Biacore 3000, utilizando un software BIAcore Control v 3.2. Se llevó a cabo un análisis de datos utilizando un software BiaEvaluation v3.2. Los resultados se muestran en la Tabla 4 siguiente. Los resultados de BIAcore para 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 y 17E5 confirman los resultados de citometría de flujo de los cinco anticuerpos, todos ellos son capaces de unirse con alta afinidad a la LAG-3 humana.

Tabla 4: Cinética de unión de anticuerpos anti-LAG-3 a la LAG-3 humana recombinante

Anticuerpo	$K_D \times 10^{-9}$ (M)
25E3	0,09
8B7	0,09
26H10	0,10
25F7	0,47
17E5	4,53

C. Mapeo de epítomos

En la proteína LAG-3, el primer dominio similar a inmunoglobulina de la región extracelular contiene un "bucle extra" expuesto que posee la secuencia de aminoácidos: GPAAAPGHPLAPGHPAAPSWSGPRPRRY (SEC ID N°: 79). Para examinar la unión de 25E3, 25F7, 8B7 y 26H10 a esta región de la LAG-3, y mapear el epítipo al que se une cada anticuerpo, se realizó un experimento de escaneo peptídico a lo largo de esta región. Se preparó una serie de 10 péptidos solapados que se escaneaban a lo largo de la longitud completa de la secuencia del bucle extra y se conjugó con biotina. Para el análisis ELISA, se utilizaron placas de microtitulación recubiertas previamente con

estreptavidina (Sigma-Aldrich, # de Cat. M5432) para capturar los conjugados de péptidos del bucle biotinilados aplicados en un volumen de 100 µl con una concentración de 2 µg/ml y se incubaron 18 horas a 4°C, después de lo cual las placas se lavaron 3 veces y se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con tampón de bloqueo (1x PBS + FBS al 10 %). A continuación, se aplicaron anticuerpos anti-LAG-3 humanos diluidos en serie 3 veces en tampón de bloqueo de 10 µg/ml y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas y posteriormente se lavaron tres veces. Para detectar el anticuerpo humano unido, se diluyó un anticuerpo de cabra anti-cadena ligera kappa humana conjugado con HRP (Bethyl Laboratories, # de Cat. A80-115P) hasta 1 µg/ml en tampón de bloqueo y se aplicó a los pocillos de ensayo durante una hora, seguido de tres lavados y la aplicación del sustrato TMB (eBioscience, # de Cat. 00-4201-56). Se realizaron lecturas de densidad óptica con una longitud de onda de 650 nm en un espectrofotómetro Spectramax 340PC (Molecular Dynamics, Inc.). Los resultados del experimento de escaneo peptídico se resumen a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5: Unión de anticuerpos anti-LAG al escaner peptídico del bucle extra de la LAG-3

Escaner peptídicos del bucle extra de la LAG-3	SEQ				
GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRRRY	79	25E3	8B7	25F7	26H10
GPPAAAPGHPLA	80	-	-	-	-
PAAAPGHPLAPG	81	++	-	-	-
AAPGHPLAPGPH	82	++	-	-	-
PGHPLAPGPHPA	83	+	-	-	-
HPLAPGPHPAAP	84	±	-	-	-
LAPGPHPAAPSS	85	-	-	-	-
PGPHPAAPSSWG	86	-	++	++	-
PHPAAPSSWGPR	87	-	++	++	-
PAAPSSWGPRPR	88	-	++	+	-
APSSWGPRRRY	89	-	-	-	-

Según estos resultados, se determinó que el anticuerpo 25E3 reconocía una región dentro del bucle extracelular que comprendía la secuencia de aminoácidos PGHPLAPG (SEC ID N°: 76), mientras que el anticuerpo 25F7 reconocía una región dentro del bucle extra que comprendía la secuencia de aminoácidos HPAAPSSW (SEC ID N°: 77) y 8B7 parecía reconocer una región dentro del bucle extracelular que comprendía la secuencia de aminoácidos PAAPSSWG (SEC ID N°: 78). En cambio, no se pudo detectar ninguna unión del péptido bucle extra de longitud completa o de cualquiera de los péptidos escaneados más cortos por parte del anticuerpo 26H10.

Las regiones identificadas en este estudio se subrayan en la secuencia del bucle extra de longitud completa:

GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRRRY (SEC ID N°: 79)

Por lo tanto, los resultados del escáner peptídico indican que los anticuerpos 25E3, 25F7 y 8B7 se unen a epítomos diferentes, aunque próximos, en la LAG-3 humana.

Para examinar más detalladamente la unión de estos anticuerpos a la región del péptido bucle extra, se realizaron ensayos ELISA adicionales. En un ensayo ELISA utilizando el péptido bucle extra de longitud completa humano (SEC ID N°: 79), se determinaron los valores de CE₅₀ para la unión de 25E3, 25F7 y 8B7. Además, se realizó un ensayo peptídico ELISA similar utilizando la secuencia del péptido bucle extra de longitud completa de la LAG-3 de mono rhesus, que poseía la secuencia GPPAPAGHPPAPGHRPAAP YSWGPRRRY (SEC ID N°: 90), y se determinaron los valores de CE₅₀ para la unión de 25F7 y 8B7. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 6. Los resultados confirman que los anticuerpos 25E3, 25F7 y 8B7 son capaces de reconocer la región del péptido bucle extra de la LAG-3 humana. Es más, los anticuerpos 25F7 y 8B7 también se unen a la región del péptido bucle extra de la LAG-3 de rhesus, aunque su unión es peor si se compara con la secuencia humana, lo cual puede deberse a la divergencia de secuencias de especie en este polipéptido. Los resultados también confirman que el anticuerpo 26H10 no es capaz de reconocer el péptido bucle extra de la LAG-3.

Tabla 6: Unión de anticuerpos anti-LAG-3 al péptido bucle extra de la LAG-3 humana y de rhesus

Anticuerpo	CE ₅₀ del bucle extra humano (nM)	CE ₅₀ del bucle extra de rhesus (nM)
25E3	0,55	No ensayado
25F7	0,29-0,95	13,09
8B7	0,28-1,35	0,60
26H10	No existe unión	No existe unión

Ejemplo 4: Inhibición de la unión de la LAG-3 al MHC de clase II por mAb anti-LAG-3

- 5 Para comprobar la capacidad de los anticuerpos anti-LAG-3 de inhibir la unión de la LAG-3 a moléculas del MHC de clase II, se realizó un ensayo de unión *in vitro* en el cual una proteína de fusión LAG-3, que comprendía un dominio extracelular de la LAG-3 humana fusionado a Fc de ratón (hLAG-3-mIg), se hizo reaccionar con células Daudi, las cuales expresan moléculas del MHC de clase II humano.
- 10 Para comprobar la inhibición por parte de los anticuerpos de la unión de la LAG-3 al MHC de clase II, 25E3, 25F7, 8B7 y 26H10 se diluyeron en serie a partir de 20 µg/ml en tampón PFAE y a estas diluciones en serie se añadió 1 µg/ml de proteína de fusión hLAG-3-mIg. Esta mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de añadirla a 2x10⁵ células Daudi lavadas con 1x PFAE. La mezcla se aplicó a células Daudi y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Las células se sedimentaron (3 minutos, 400 xg), se lavaron una vez con 1x tampón PFAE y se
- 15 volvieron a sedimentar, y se detectó la unión de hLAG-3-mIg a las células Daudi utilizando un reactivo secundario anti-mIgG Fc $\square$ marcado con PE recombinante. El análisis de la unión LAG-3-mIg se llevó a cabo con el citómetro de flujo FACScalibur (BD Bioscience). Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 7, que muestra los valores de Cl₅₀ en nM.

20 Tabla 7: Inhibición de la unión de la LAG-3 al MHC de clase II por parte de anticuerpos anti-LAG-3

Anticuerpo	Cl ₅₀ (nM)
25E3	0,8 - 6,78
25F7	0,12 - 0,92
8B7	0,19 - 0,95
26H10	0,10

Los resultados demuestran que los cuatro anticuerpos son eficaces en la inhibición de la unión de la LAG-3 a anticuerpos del MHC de clase II, donde 25F7, 8B7 y 26H10 presentan valores de Cl₅₀ aproximadamente de 7 a 13 veces menores que los de 25E3.

25 **Ejemplo 5: Estimulación de respuesta de linfocito T específica para un antígeno por parte de mAb anti-LAG-3**

- 30 Para comprobar la capacidad de los anticuerpos anti-LAG-3 para estimular una respuesta de linfocito T específica para un antígeno, se empleó un ensayo de estimulación peptídica de linfocitos T 3A9 (véanse, por ejemplo, Workman *et al.* (2003) *J. Immunol.* 169:5392-5395; Workman *et al.* (2002) *Eur. J. Immunol.* 32:2255-2263).

- 35 En este ensayo, se utilizó como linfocito T respondedor un hibridoma de linfocito T de ratón, 3A9, específico para el péptido HEL₄₈₋₆₂. El linfocito 3A9 T respondedor se transdujo retroviralmente para expresar la LAG-3 humana o la LAG-3 de ratón en su superficie celular. La célula presentadora de antígeno (APC) usada para presentar el péptido antigénico HEL₄₈₋₆₂ a las células 3A9 fue la línea celular LK35.2 positiva del MHC de clase II. Otros estudios indicaron que una proteína de fusión LAG-3 humana era capaz de unirse a moléculas del MHC de clase II de ratón, validando de este modo el uso de APC LK35.2 de ratón en este ensayo. La estimulación específica para un antígeno de las células 3A9 fue indicada por la producción de interleucina 2 (IL-2), cuya secreción se midió por ELISA (kit
- 40 OptEIA de IL-2 de ratón, BD Bioscience, # de Cat. 555148 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante).

- La expresión ectópica de la LAG-3 humana o de ratón en los linfocitos T 3A9, en ausencia de anticuerpos, produjo un efecto inhibitorio sobre las respuestas específicas para un antígeno cuando se incubaron los linfocitos T transfectados con las APC LK35.2 presentadoras del péptido antigénico HEL₄₈₋₆₂, como se indica por un aumento en
- 45 la cantidad de péptido antigénico necesaria para estimular la producción de la IL-2 por parte de las células 3A9 en comparación con el perfil de respuesta-dosis de péptido de los linfocitos T 3A9 de control.

- 50 Para comprobar la estimulación de una respuesta de linfocitos T específica de un antígeno por parte de anticuerpos, las APC (2,5x10⁴ células) se incubaron previamente con el péptido antigénico (200 nM) durante 30 minutos a 37°C y los linfocitos T 3A9 (5,0x10⁴ células que expresan mLAG-3, hLAG-3 o células de control) se incubaron previamente con un anticuerpo anti-hLAG-3 (25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2, 17E5), se diluyeron con una dilución de tres veces en serie a partir de 25 µg/ml) durante 15 minutos a 37°C. Los linfocitos T 3A9 se añadieron posteriormente a las

APC impulsadas por antígeno y el cultivo se incubó durante 24 horas a 37°C. El sobrenadante se recogió y se midió la producción de IL-2 de ratón. Los resultados para los linfocitos T 3A9 que expresaban la LAG-3 humana se presentan en la Tabla 8, que muestra los valores de CI_{50} en nM.

5 **Tabla 8: Estimulación de respuestas de linfocito T específicas para un antígeno por parte de anticuerpos anti-LAG-3**

Anticuerpo	CI_{50} del ensayo peptídico 3A9-hLAG-3 (nM)
25F7	0,14 – 1,94
26H10	1,45 – 6,49
8B7	3,25 – 13,90
25E3	3,88 – 70,78
11F2	81,50 – 240
17E5	No existe inhibición

Los resultados muestran que los anticuerpos 25F7, 8B7 y 26H10, y 25E3 en un grado menor, fueron capaces de estimular la producción de IL-2 en un ensayo de respuestas de linfocito T específicas para un antígeno, mientras que el anticuerpo 11F2 presentaba una capacidad mínima de inhibición y el anticuerpo 17E5 no fue funcional en este ensayo. Ninguno de los anticuerpos alteró la producción de IL-2 medida por parte de los linfocitos T 3A9 de control o de células T 3A9 transfectadas con la proteína LAG-3 de ratón, lo que demostró la especificidad del efecto estimulatorio.

Ejemplo 6: Inhibición del crecimiento tumoral por parte de mAb anti-LAG-3 mAb, solo o combinado

Para comprobar la capacidad del anticuerpo anti-LAG-3, solo o combinado con otro anticuerpo inmunoestimulador, de inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo*, se utilizaron dos modelos diferentes de injerto tumoral de ratón singénico. El primer modelo utilizó células de fibrosarcoma Sa1N mÚrido. El segundo modelo utilizó la línea celular MC38 de cáncer de colon mÚrido.

En un primer experimento, se implantó cada ratón (raza A/J) con 2×10^6 células de fibrosarcoma Sa1N el día 0 y las células tumorales se dejaron crecer siete días. Los días 7, 10 y 12 posimplantación, se trataron los ratones con 10 mg/kg de mAb anti-LAG-3 solo (el mAb C9B7W de rata anti-LAG-3 de ratón; eBioscience, N.º de Cat. 14-2231), un anticuerpo anti-PD-L1 solo (un mAb 14D8 anti-PD-L1 de ratón), los anticuerpos anti-LAG-3 y anti-PD-L1 combinados o un anticuerpo isotípico IgG1 de control. El mAb 14D8 es un anticuerpo de rata anti-PD-L1 de ratón que ha sido quimerizado para contener la IgG1 de ratón y las regiones constantes kappa de ratón.

Se midieron los volúmenes tumorales en los ratones durante los 50 días posteriores a la implantación, y se determinaron la mediana y la media de los volúmenes tumorales. La media de la inhibición del crecimiento tumoral se calculó (sobre la base de un 0 % de inhibición para el tratamiento con el anticuerpo isotópico IgG1 de control). Los resultados para el día 24 posimplantación se resumen a continuación en la Tabla 9:

Tabla 9: Media de la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de tumor Sa1N

Día	IgG1	LAG-3	PD-L1	Combinación
24	-	68	74,9	95,8

Por lo tanto, el tratamiento con anticuerpo anti-LAG3 solo o con el anticuerpo anti-PD-L1 solo, produjo la inhibición del crecimiento tumoral, mientras que la combinación de ambos anticuerpos produjo una inhibición incluso mayor del crecimiento tumoral. Respecto a los grupos de tratamiento, al final del experimento los resultados fueron una remisión total del tumor en 4 de los 10 ratones tratados con anti-LAG3 solo, mientras que únicamente se observó una remisión total del tumor en 1 de los 10 ratones tratados con el anticuerpo IgG1 de control. De forma análoga, se observó una remisión total del tumor en 4 de los 11 ratones tratados con anti-PD-L1 solo. El tratamiento de los ratones con la combinación de anti-LAG3 y anti-PD-L1 produjo una remisión total del tumor en 9 de 10 ratones; el resto de los ratones que seguían presentado el tumor tenían un tumor indolente que permaneció pequeño durante el estudio.

Dos estudios adicionales utilizaron ratones implantados con células de la línea celular MC38 de cáncer de colon mÚrido. En el primer experimento, se implantó cada ratón C57Bl/6 con 2×10^6 células MC38 el día 0, y se trataron el día 7, 10 y 12 posimplantación con 200 µg/dosis de anti-LAG-3 solo (mAb C9B7W), anti-PD-1 solo (el mAb 4H2) o anti-LAG-3 y anti-PD-1 combinados. Se utilizó un anticuerpo isotípico IgG1 apareado, 400 µg/dosis, como control. El mAb 4H2 es un anticuerpo de rata anti-PD-1 de ratón que ha sido quimerizado para contener la IgG1 de ratón y las regiones constantes kappa de ratón.

La media del volumen tumoral, la mediana del volumen tumoral y el % de supervivencia se determinaron 80 días después de la implantación. Los resultados mostraron que la monoterapia con LAG-3 en este modelo tumoral (MC38) mostró una actividad mínima o ninguna actividad en la inhibición del crecimiento tumoral y ninguno de los

ratones tratados sobrevivió el experimento. En cambio, la monoterapia con anti-PD-1 mostró una actividad significativa, con una remisión total del tumor en 4 de 10 ratones al final del experimento. Es más, de forma análoga a los resultados para el modelo Sa1N, la terapia combinada de anti-LAG-3 junto con anti-PD-1 fue más eficaz que cualquiera de los tratamientos solos, con una remisión total del tumor en 7 de 8 ratones al final del experimento.

En un segundo experimento con el modelo MC38, se implantó cada ratón C57Bl/6 con 2×10^6 células MC38 el día 0, y se trataron los días 5, 8 y 11 posimplantación con 200 µg/dosis de anticuerpo de ensayo y/o 400 µg/dosis de anticuerpo IgG de control, como sigue: (i) un anticuerpo anti-IgG1 de control; (ii) un mAb anti-LAG-3 (mAb C9B7W) junto con la IgG1 de control; (iii) un anticuerpo anti-PD-1 (4H2) con la IgG1 de control; (iv) un anticuerpo anti-CTLA-4 (el mAb 9D9 de ratón anti-CTLA-4 de ratón) junto con la IgG1 de control; (v) el mAb anti-LAG-3 junto con el mAb anti-PD-1; o (vi) el mAb anti-LAG-3 junto con el mAb anti-CTLA-4. El mAb 9D9 es un anticuerpo de ratón anti-CTLA-4 de ratón que se generó en un ratón en el cual el CTLA-4 endógeno de ratón había sido desactivado.

La media del volumen tumoral, la mediana del volumen tumoral y el % de supervivencia se determinaron durante 100 días después de la implantación. Los resultados fueron similares al primer experimento en que la monoterapia con LAG-3 mostró una actividad mínima o ninguna actividad en la inhibición del crecimiento tumoral MC38 y ninguno de los ratones tratados sobrevivió el experimento. La monoterapia con CTLA-4 también mostró una actividad mínima o ninguna actividad en la inhibición del crecimiento tumoral MC38 y ninguno de los ratones tratados sobrevivió el experimento. En cambio, la monoterapia con anti-PD-1 mostró de nuevo una actividad significativa, con una remisión total del tumor en 4 de 10 ratones al final del experimento. Es más, la terapia combinada fue más eficaz que la monoterapia. Para los ratones tratados con la combinación de anti-LAG-3 y anti-CTLA-4, se observó una remisión total del tumor en 3 de 10 ratones al final del experimento y, para los ratones tratados con la combinación de anti-LAG-3 y anti-PD-1, se observó una remisión total del tumor en 8 de 10 ratones al final del experimento.

Por lo tanto, los estudios de injertos de tumores *in vivo* descritos anteriormente mostraron que, para al menos algunos modelos tumorales, el tratamiento con anticuerpo anti-LAG solo producía una inhibición significativa del crecimiento tumoral *in vivo*. Es más, para modelos tumorales múltiples, la terapia combinada del anticuerpo anti-LAG-3 junto con el anticuerpo anti-PD-1, el anticuerpo anti-PD-L1 o el anticuerpo anti-CTLA-4 producía una actividad antitumoral incluso mayor que únicamente la monoterapia.

Ejemplo 7: Promoción de la autoinmunidad en ratones NOD por inhibición por parte de mAb anti-LAG-3

Para comprobar la capacidad del anticuerpo anti-LAG-3 de estimular una respuesta inmunitaria, como se indica mediante el desarrollo de autoinmunidad, se utilizó el modelo de diabetes de ratón NOD. Se sabe que los ratones NOD son propensos a desarrollar la diabetes autoinmunitaria. La progresión de la diabetes se puede monitorizar en ratones NOD hembra midiendo la glucosa en suero. Así pues, se examinó el efecto del tratamiento con anti-LAG-3, solo o combinado con cualquiera de los anticuerpos inmoestimuladores, sobre el desarrollo de la diabetes en ratones NOD hembra.

Se trataron ratones NOD hembra el día 0, 2 y 5 con 250 µg/dosis de bien sea: (i) un anticuerpo isotípico IgG1 de control; (ii) mAb anti-LAG-3 solo (mAb C9B7W); (iii) mAb anti-PD-1 solo (mAb 4H2); (iv) mAb anti-CTLA-4 solo (mAb 9D9); (v) mAb anti-LAG-3 junto con mAb anti-PD-1; o (vi) mAb anti-LAG-3 junto con anti-CTLA-4. Los resultados obtenidos con el tratamiento con anti-LAG-3 solo o el tratamiento con anti-PD-1 solo (pero no el tratamiento con anti-CTLA-4 solo) aumentaron el número de ratones que se convertían en el fenotipo diabético. Es más, el tratamiento combinado de anti-LAG-3 junto con anti-PD-1, o anti-LAG-3 junto con anti-CTLA-4, era incluso más eficaz en la conversión de ratones en el fenotipo diabético.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que el bloqueo de la interacción de la LAG-3 con su receptor interfería con una señal inmunorreguladora negativa que permitía una actividad inmunológica mayor en los ratones NOD, y esta mayor actividad inmunológica en los ratones tratados con LAG-3 se podía potenciar por tratamiento combinado bien sea con el anticuerpo anti-PD-1 o anti-CTLA-4.

Ejemplo 8: Inmunohistoquímica utilizando mAb anti-LAG-3

En este experimento, se utilizaron anticuerpos anti-LAG-3 marcados fluorescentemente en los experimentos de inmunohistoquímica. Se utilizaron los siguientes anticuerpos anti-LAG-3 humanos marcados con FITC: 25F7-FITC (F:P = 2,9; versión IgG1); 25F7-G4-FITC (F:P = 2,7; versión IgG4); 8B7-FITC (F:P = 2,6) y 26H10-FITC (F:P = 3,4). Se examinó un panel de tejidos linfoides, específicamente de amígdala (dos muestras), de bazo (dos muestras) y del timo (dos muestras), junto con tejido pituitario (cuatro muestras). También se utilizaron las células CHO transfectadas con LAG-3 como control. Se utilizaron secciones criostato fijadas con acetona. Las secciones se tiñeron con anticuerpo anti-LAG-3 marcado con FITC (0,2-5 µg/ml), seguido de la tinción con anticuerpo de conejo anti-FITC como anticuerpo puente y posteriormente se visualizaron utilizando el EnVision™+ System Kit de conejo (Dako EE. UU., Carpintería, CA). Los resultados se resumen en la Tabla 10 siguiente:

Tabla 10: Inmunohistoquímica utilizando mAb anti-LAG-3

Tejido	25F7-FITC	25F7-G4-FITC	8B7-FITC	26H10-FITC
Células CHO/LAG-3	+(fuerte)	+(fuerte)	+(fuerte)	+(fuerte)
Amígdala(n=2)	+(fuerte; rara en LC dispersos, 2/2)	+(fuerte; rara en LC dispersos, 2/2)	+(fuerte; rara en LC dispersos, 2/2)	+(fuerte; rara en LC dispersos, 2/2)
Bazo(n=2)	+(muy débil, principalmente en la pulpa roja, 2/2)	+(muy débil, principalmente en la pulpa roja, 2/2)	+(débil, principalmente en la pulpa roja, 2/2)	+(muy débil, principalmente en la pulpa roja, 2/2)
Timo(n=2)	+(fuerte; muy rara en LC dispersos, 1/2)	+(fuerte; muy rara en LC dispersos, 1/2)	+(fuerte; muy rara en LC dispersos, 1/2)	+(fuerte; muy rara en LC dispersos, 1/2)
Pituitaria(n=4)	+(fuerte; ocasional en la adenohipófisis, 3/4)	+(fuerte; ocasional en la adenohipófisis, 3/4)	-	+(fuerte; ocasional en la adenohipófisis, 3/4; moderada débil, rara 1/4)

LC = linfocito; + = tinción positiva; - = tinción negativa

Como cabía esperar, la expresión LAG-3 se detectó en el panel del tejido linfóide. Además, dos de los tres anticuerpos anti-LAG-3 examinados, 25F7 (versiones IgG1 y IgG4) y 26H10, exhibieron retención en el tejido pituitario, mientras que un anticuerpo examinado, 8B7, no mostró esta retención en el tejido pituitario. Por lo tanto, el experimento de inmunohistoquímica identificó dos subgrupos de anticuerpos anti-LAG-3, donde se retiene un subgrupo en el tejido pituitario y el otro subgrupo no se retiene en el tejido pituitario.

RESUMEN del LISTADO de SECUENCIAS

SEC ID Nº:	SECUENCIA	SEC ID Nº:	SECUENCIA
1	V _H CDR1 a.a. 25F7	49	V _H n.t. 25F7
2	V _H CDR1 a.a. 26H10	50	V _H n.t. 26H10
3	V _H CDR1 a.a. 25E3	51	V _H n.t. 25E3
4	V _H CDR1 a.a. 8B7	52	V _H n.t. 8B7
5	V _H CDR1 a.a. 11F2	53	V _H n.t. 11F2
6	V _H CDR1 a.a. 17E5	54	V _H n.t. 17E5
7	V _H CDR2 a.a. 25F7	55	V _K n.t. 25F7
8	V _H CDR2 a.a. 26H10	56	V _K n.t. 26H10
9	V _H CDR2 a.a. 25E3	57	V _K n.t. 25E3
10	V _H CDR2 a.a. 8B7	58	V _K n.t. 8B7
11	V _H CDR2 a.a. 11F2	59	V _K n.t. 11F2
12	V _H CDR2 a.a. 17E5	60	V _K n.t. 17E5
13	V _H CDR3 a.a. 25F7	61	V _H 4-34 línea germinal a.a.
14	V _H CDR3 a.a. 26H10	62	V _H JH5b línea germinal a.a.
15	PVGVV	63	V _K L6 línea germinal a.a.
16	V _H CDR3 a.a. 8B7	64	V _K JK2 línea germinal a.a.
17	V _H CDR3 a.a. 11F2	65	V _H 3-33 línea germinal a.a.
18	V _H CDR3 a.a. 17E5	66	V _H JH5b línea germinal a.a.
		67	V _K A 27 línea germinal a.a.
19	V _H CDR1 a.a. 25F7	68	V _K JK3 línea germinal a.a.
20	V _K CDR1 a.a. 26H10	69	V _H 3-20 línea germinal a.a.
21	V _K CDR1 a.a. 25E3		
22	V _K CDR1 a.a. 8B7	70	V _H JH5b línea germinal a.a.
23	V _K CDR1 a.a. 11F2	71	V _K L-18 línea germinal a.a.
24	V _K CDR1 a.a. 17E5	72	V _K JK4 línea germinal a.a.
		73	V _H 1-24 línea germinal a.a.

25	V _K CDR2 a.a. 25F7	74	V _K JK1 línea germinal a.a.
26	V _K CDR2 a.a. 26H10	75	V _K JK5 línea germinal a.a.
27	V _K CDR2 a.a. 25E3		
28	V _K CDR2 a.a. 8B7	76	PGHPLAPG
29	V _K CDR2 a.a. 11F2	77	HPAAPSSW
30	V _K CDR2 a.a. 17E5	78	PAAPSSWG
		79	GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY
31	V _K CDR3 a.a. 25F7	80	GPPAAAPGHPLA
32	V _K CDR3 a.a. 26H10	81	PAAAPGHPLAPG
33	V _K CDR3 a.a. 25E3	82	AAPGHPLAPGPH
34	V _K CDR3 a.a. 8B7	83	PGHPLAPGPHPA
35	V _K CDR3 a.a. 11F2	84	HPLAPGPHPAAP
36	V _K CDR3 a.a. 17E5	85	LAPGPHPAAPSS
		86	PGPHPAAPSSWG
37	V _H a.a. 25F7	87	PHPAAPSSWGPR
38	V _H a.a. 26H10	88	PAAPSSWGPRPR
39	V _H a.a. 25E3	89	APSSWGPRPRRY
40	V _H a.a. 8B7	90	GPPAPAPGHPPAPGHRPAAPYSWGPRPRRY
41	V _H a.a. 11F2		
42	V _H a.a. 17E5	91	atgtgggaggctcagttcctg
		92	gtcagagctgctccggctc
43	V _K a.a. 25F7	93	LAG-3 de rhesus clon pa23-5 a.a.
44	V _K a.a. 26H10	94	LAG-3 de rhesus a.a. (XM_001108923)
45	V _K a.a. 25E3		
46	V _K a.a. 8B7		
47	V _K a.a. 11F2		
48	V _K a.a. 17E5		

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Medarex, Inc.
- <120> Anticuerpos humanos que se unen al Gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3), y usos de los mismos
- <130> MXI-392PC
- 10 <140>
- <141> 11-08-2009
- <150> US 61/188548
- <151> 11-08-2008
- 15 <160> 94
- <170> PatentIn versión 3.4
- 20 <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 25 <400> 1

ES 2 537 203 T3

		Asp Tyr Tyr Trp Asn
		1 5
5		
	<210> 2	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 2	
10		
		Ser Tyr Gly Met His
		1 5
15		
	<210> 3	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 3	
20		
		Asp Tyr Gly Met Ser
		1 5
25		
	<210> 4	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 4	
30		
		Gly Tyr Tyr Trp Ser
		1 5
35		
	<210> 5	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 5	
40		
		Glu Val Ser Met His
		1 5
45		
	<210> 6	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 6	
50		
		Ser Tyr Gly Met His
		1 5
	<210> 7	
	<211> 16	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 7	

ES 2 537 203 T3

Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

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

Gly

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

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

Gly

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Cys Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

ES 2 537 203 T3

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

Gly

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 14
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Glu Trp Ala Val Ala Ser Trp Asp Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Pro Val Gly Val Val
1 5

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

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

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Ala Phe Val Val Val Val Ala Ala Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> 18
<211> 14
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Asp Pro His Cys Ser Ser Thr Asn Cys Tyr Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

5

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 19

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

15

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 20

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

25

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 21

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Ala Leu Ala
1 5 10

35

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

40

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

45

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

50

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

ES 2 537 203 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
5	1				5					10	

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr
15	1				5		

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 26

	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr
25	1				5		

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

	Asp	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser
35	1				5		

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

	Asn	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr
45	1				5		

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 29

	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr
55	1				5		

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

ES 2 537 203 T3

<213> *Homo sapiens*
 <400> 30
 5 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> *Homo sapiens*
 <400> 31
 15 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 32
 25 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 33
 35 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 34
 45 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 35
 50 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> *Homo sapiens*

<400> 36

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr
1 5

5

<210> 37

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

<210> 38

<211> 122

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 38

ES 2 537 203 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 39
<211> 112
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 39

ES 2 537 203 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Gly Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 40
<211> 120
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 40

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Cys Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Gly Asp Thr Ser Lys Lys Gln Phe Ala Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Glu Asp Ser Trp Gly Pro
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 41
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

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

ES 2 537 203 T3

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

Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala Phe Val Val Val Val Ala Ala Ser Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42
<211> 123
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 42

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro His Cys Ser Ser Thr Asn Cys Tyr Leu Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 43

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 44
<211> 108
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 44

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

10

<210> 45
<211> 107
<212> PRT

ES 2 537 203 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 45

```

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105

```

5

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 46

```

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
          20           25           30

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

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

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

```

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

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

<210> 47
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 47

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp
85 90 95

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

<210> 48
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 48

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

ES 2 537 203 T3

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 49
<211> 360
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 49

cagggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc 120
ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata atggaaacac caactccaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccctatca ctgacacagt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcggt tggatatagt 300
gactacgagt acaactggtt cgaccctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctctca 360

<210> 50
<211> 366
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 50

cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaatgg 300
gcagtggcct cctgggacta cggtatggac gtctggggcc aagggaaccac ggtcacccgc 360
tctca 366

<210> 51
<211> 336
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 51

ES 2 537 203 T3

```

gagggtgcagt tgggtggagtc tggggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatggca tgagctgggt ccgccaagct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctctggt attaatgga atgggtggtag cacatattat      180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccggagaca acgccaagaa ctccctgtat      240
ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtac cactgggggc      300
tactggggcc agggaaccct ggtcacgcgc tctctca      336

```

<210> 52
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 52

```

cagggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctggtgaagc catcggaac cctgtccctc      60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc      120
ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaaacac caactgcaac      180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca ggagatacgt ccaagaaaca gttcgccctg      240
aagctgaact ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtctatt actgtgcgag aggatacgat      300
atcttgactg gttattatga ggactcctgg ggcccgggaa cctgggtcac cgtctcctca      360

```

<210> 53
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 53

```

acccacgacc aggtccagct ggtacagtct ggggctgagg tgaagaagcc tggggcctca      60
gtgaagggtct cctgcaagggt ttccggatac accctcactg aagtatccat gcactgggtg      120
cgacaggctc ctggaaaagg gcttgagtgg atgggaggtt ttgatcctga agatggtgaa      180
acaatctacg cacagaagtt ccagggcaga gtcacatga ccgaggacac atctacagac      240
acagcctaca tggagctgag cagcctgaga tctgaggaca cggccgtgta ttactgtgca      300
acagcctttg tagtggtggt agctgcttct gactactggg gccagggaac cctggtcacc      360
gtctcctca      369

```

<210> 54
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 54

ES 2 537 203 T3

caggtgcacc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaaggggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatccc 300
 cattgtagta gtaccaactg ctaccttttt gactactggg gccagggaac cctgggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 55
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 55

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agctacttag cctgggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcaccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccacagcag cctagagcct 240
 gaagattitg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctctcac ttttggccag 300
 gggaccaacc tggagatcaa a 321

<210> 56
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 56

gaaattgtgt tgacgcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcacca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtga ttactgtcag cagtatggta gctcaccatt cactttcggc 300
 cctgggacca aagtggatat caaa 324

<210> 57
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 57

ES 2 537 203 T3

```

gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60

atcaacttgcc gggcaagtca gggcattagg agtgcttttag cctggtatca gcagaaacca      120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca      180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccgtagac ttttggccag      300

gggaccaagc tggagatcaa a                                                  321

```

<210> 58
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 58

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60

ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct      120

ggccaggctc ccaggctcct catctataat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc      180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct      240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgctcac tttcggcgga      300

gggaccaagg tggagatcaa a                                                  321

```

<210> 59
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 59

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60

ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct      120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc      180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct      240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgtggac gttcggccaa      300

gggaccaagg tggaaatcaa a                                                  321

```

<210> 60
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 60

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct      120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc      180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct      240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctatcac cttcggccaa      300
gggacacgac tggagattaa a                                          321

```

<210> 61
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (98)..(98)
 <223> El resto 98 solo se presenta en un subconjunto de figuras.

<400> 61

```

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

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

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

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

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

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

```

Arg Gly

<210> 62
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(3)
 <223> Los restos 1-3 solo se presentan en un subconjunto de figuras.

<400> 62

Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 63
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 63

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
 85 90 95

<210> 64
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> El resto 1 solo se presenta en un subconjunto de figuras.

<400> 64

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 65
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 65

ES 2 537 203 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 66
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 66

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 67
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 67

ES 2 537 203 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

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

<210> 68
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 68

5

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
1 5 10

10

<210> 69
<211> 98
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 69

15

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

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 70
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(2)
<223> Los restos 1-2 solo se presentan en un subconjunto de figuras.

<400> 70

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 71
<211> 95
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 71

ES 2 537 203 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 72
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 72

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 73
<211> 101
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 73

Thr His Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

ES 2 537 203 T3

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu
20 25 30

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

Glu Trp Met Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala
50 55 60

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Cys Ala Thr
100

<210> 74
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 74

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 75
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 75

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 76

Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly
1 5

<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 77

ES 2 537 203 T3

His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
 1 5

5
 <210> 78
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 78

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly
 1 5

10
 <210> 79
 <211> 30
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 79

Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His
 1 5 10 15

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr
 20 25 30

20
 <210> 80
 <211> 12
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 80

Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala
 1 5 10

30
 <210> 81
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 81

Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly
 1 5 10

40
 <210> 82
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 82

45
 Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His
 1 5 10

50
 <210> 83
 <211> 12
 <212> PRT

ES 2 537 203 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 83

5 Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala
 1 5 10

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 84

15 His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro
 1 5 10

<210> 85

<211> 12

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 85

25 Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser
 1 5 10

<210> 86

<211> 12

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 86

35 Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly
 1 5 10

<210> 87

<211> 12

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

<400> 87

45 Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg
 1 5 10

<210> 88

<211> 12

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 88

55 Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg
 1 5 10

<210> 89

<211> 12

ES 2 537 203 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 89

5

Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr
1 5 10

<210> 90
<211> 30
<212> PRT
<213> *Macaca sp.*

10

<400> 90

Gly Pro Pro Ala Pro Ala Pro Gly His Pro Pro Ala Pro Gly His Arg
1 5 10 15

Pro Ala Ala Pro Tyr Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr
20 25 30

15

<210> 91
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

20

<220>
<223> cebador 5Mcyn1408

25

<400> 91
atgtgggagg ctcagttcct g21

<210> 92
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

30

<220>
<223> cebador 3Mcyn1408a

35

<400> 92
gtcagagctg ctccggctc 19

<210> 93
<211> 532
<212> PRT
<213> *Macaca mulatta*

40

<400> 93

45

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
 1 5 10 15
 Val Ala Pro Val Lys Pro Pro Gln Pro Gly Ala Glu Ile Ser Val Val
 20 25 30
 Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
 35 40 45
 Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
 50 55 60
 His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Pro Ala Pro Gly His Pro Pro
 65 70 75 80
 Ala Pro Gly His Arg Pro Ala Ala Pro Tyr Ser Trp Gly Pro Arg Pro
 85 90 95
 Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
 100 105 110
 Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
 115 120 125
 Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
 130 135 140
 Gly Glu Tyr Arg Ala Thr Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
 145 150 155 160
 Arg Leu Arg Leu Arg Val Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
 165 170 175
 Gly Ser Leu Arg Thr Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
 180 185 190
 Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Ser Arg Gly Gln
 195 200 205
 Gly Arg Val Pro Val Gln Gly Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
 210 215 220

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

Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro Arg
465 470 475 480

Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln Ser
485 490 495

Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Leu Glu Pro Glu Pro Glu
500 505 510

Leu Glu Arg Glu Leu Gly Pro Glu Pro Glu Pro Gly Pro Glu Pro Glu
515 520 525

Pro Glu Gln Leu
530

<210> 94
<211> 533
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<400> 94

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
1 5 10 15

Val Ala Pro Val Lys Pro Pro Gln Pro Gly Ala Glu Ile Ser Val Val
20 25 30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
35 40 45

Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
50 55 60

His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Pro Ala Pro Gly His Pro Pro
65 70 75 80

Ala Pro Gly His Arg Pro Ala Ala Pro Tyr Ser Trp Gly Pro Arg Pro
85 90 95

Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
100 105 110

Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
115 120 125

Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala

130		135		140
Gly Glu Tyr Arg Ala Thr Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys				
145		150		155
				160
Arg Leu Arg Leu Arg Val Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro				
		165		170
				175
Gly Ser Leu Arg Thr Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser				
		180		185
				190
Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Ser Arg Gly Gln				
		195		200
				205
Gly Arg Val Pro Val Gln Gly Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser				
		210		215
				220
Phe Leu Phe Leu Pro His Val Gly Pro Met Asp Ser Gly Leu Trp Gly				
		225		230
				235
Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn				
		245		250
				255
Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Ala Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala				
		260		265
				270
Gly Ala Gly Ser Arg Val Glu Leu Pro Cys Arg Leu Pro Pro Ala Val				
		275		280
				285
Gly Thr Gln Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Ala Pro Pro Gly Gly Gly				
		290		295
				300
Pro Asp Leu Leu Val Ala Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu				
		305		310
				315
Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Ile Cys His Ile Arg				
		325		330
				335
Leu Gln Gly Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr				
		340		345
				350
Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu				
		355		360
				365
Cys Glu Val Thr Pro Ala Ser Gly Gln Glu His Phe Val Trp Ser Pro				
		370		375
				380

Leu Asn Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala
385 390 395 400

Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu His Gln
405 410 415

Gly Glu Thr Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser
420 425 430

Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Arg Ala Gly
435 440 445

His Leu Pro Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Phe Leu Leu Leu Leu
450 455 460

Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
465 470 475 480

Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
485 490 495

Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Leu Glu Pro Glu Pro
500 505 510

Glu Leu Glu Arg Glu Leu Gly Pro Glu Pro Glu Pro Gly Pro Glu Pro
515 520 525

Glu Pro Glu Gln Leu
530

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une al gen 3 de activación de linfocitos humanos (LAG-3), en donde el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEC ID N°: 37 y una secuencia de región variable de cadena ligera que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEC ID N°: 43.
- 10 2. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que tiene al menos un 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEC ID N°: 37 y una secuencia de región variable de cadena ligera que tiene al menos un 98 % de identidad de secuencia con SEC ID N°: 43.
- 15 3. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende secuencias de región variable de cadenas ligera y pesada tal como se exponen en SEC ID N°: 37 y SEC ID N°: 43, respectivamente.
- 20 4. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que inhibe la unión de LAG-3 a moléculas de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).
5. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que estimula una respuesta de linfocito T específica para un antígeno.
- 25 6. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 5, en donde el anticuerpo estimula la producción de interleucina-2 por parte del linfocito T específico para un antígeno.
7. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se une a la proteína LAG-3 humana con una K_D de 1×10^{-9} o menos.
- 30 8. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se une a la proteína LAG-3 humana con una K_D de 5×10^{-10} o menos.
9. Una composición que comprende el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 10. La composición de la reivindicación 9, que además comprende al menos un anticuerpo inmunoestimulador adicional.
- 40 11. La composición de la reivindicación 10, en la que el anticuerpo inmunoestimulador es un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 y/o un anticuerpo anti-CTLA-4.
12. La composición de la reivindicación 10, en el que el anticuerpo inmunoestimulador es un anticuerpo anti-PD-1.
- 45 13. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, unido a un agente terapéutico.
14. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 50 15. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 14.
16. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 15.
- 55 17. Un método para preparar un anticuerpo anti-LAG-3 que comprende expresar el anticuerpo en la célula huésped de la reivindicación 16 y aislar el anticuerpo de la célula huésped.
18. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, para su uso en terapia.
- 60 19. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y al menos un anticuerpo inmunoestimulador adicional, para su uso en terapia.
- 65 20. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, y el al menos un anticuerpo inmunoestimulador adicional, de la reivindicación 19 para el uso de la reivindicación 19, en donde el anticuerpo inmunoestimulador es un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 y/o un anticuerpo anti-CTLA-4.

21. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, y el al menos un anticuerpo inmunoestimulador adicional, de la reivindicación 19, para el uso de la reivindicación 19, en donde el anticuerpo inmunoestimulador es un anticuerpo anti-PD-1.
- 5 22. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, y al menos un anticuerpo inmunoestimulador adicional, de una cualquiera de las reivindicaciones 19-21 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en donde el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, y el al menos un anticuerpo inmunoestimulador adicional se administran de manera concurrente, por separado o secuencialmente.
- 10 23. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, para su uso en la estimulación de una respuesta de linfocito T específica para un antígeno.
- 15 24. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, para su uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto.
- 20 25. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, para su uso en la inhibición del crecimiento de células tumorales en un sujeto.
- 25 26. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, para su uso en el tratamiento de una infección viral en un sujeto.

Anti-LAG3 25F7 VH

Segmento V: 4-34
Segmento D: 5-12
Segmento J: JH5b

```

1      Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L
      CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
                                -----
55     S L T C A V Y G G S F S D Y Y W N W
      TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GAT TAC TAC TGG AAC TGG

                                CDR2
                                -----
109    I R Q P P G K G L E W I G E I N H N
      ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AAT

                                CDR2
                                -----
163    G N T N S N P S L K S R V T L S L D
      GGA AAC ACC AAC TCC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC CTA TCA CTA GAC

217    T S K N Q F S L K L R S V T A A D T
      ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGG TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                CDR3
                                -----
271    A V Y Y C A F G Y S D Y E Y N W F D
      GCT GTG TAT TAC TGT GCG TTT GGA TAT AGT GAC TAC GAG TAC AAC TGG TTC GAC

      CDR3
      ~~~~
325    P W G Q G T L V T V S S
      CCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

FIGURA 1A

Anti-LAG3 25F7 VK

Segmento V: L6
Segmento J: JK2

```

1      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
55     A T L S C R A S Q S I S S Y L A W Y
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT ATT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                ~~~~~
109    Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
      CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      ~~~~~
163    A T G I P A R F S G S G S G T D F T
      GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
217    L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      ~~~~~
271    R S N W P L T F G Q G T N L E I K
      CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAC CTG GAG ATC AAA
  
```

FIGURA 1B

Anti-LAG3 26H10 VH

Segmento V: 3-33
 Segmento D: 6-19
 Segmento J: JH6b

```

      Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
1 CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
      R L S C A A S G F T F S S Y G M H W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
      V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT

                                CDR2
                                ~~~~~
      G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R
163 GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
      T A V Y Y C A R E W A V A S W D Y G
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAA TGG GCA GTG GCC TCC TGG GAC TAC GGT

                                CDR3
                                ~~~~~
      M D V W G Q G T T V T V S S
325 ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

FIGURA 2A

Anti- LAG3 26H10 VK

Segmento V: A27
Segmento J: JK3

```

      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
      -----
      A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
      -----
      Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
      -----
      R A T G I P D R F S G S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
      -----
      T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      -----
      Q Y G S S P F T F G P G T K V D I K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA

```

FIGURA 2B

Anti-LAG3 25E3 VH

Segmento V: 3-20
Segmento D: ND
Segmento J: JH4b

```

      E V Q L V E S G G G V V R P G G S L
1 GAG GTG CAG TTG GTG GAG TCT GGG GGA GGT GTG GTA CGG CCT GGG GGG TCC CTG

                                CDR 1
                                ~~~~~
      R L S C A A S G F T F D D Y G M S W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GGC ATG AGC TGG

                                CDR 2
                                ~~~~~
      V R Q A P G K G L E W V S G I N W N
109 GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCT GGT ATT AAT TGG AAT

                                CDR 2
                                ~~~~~
      G G S T Y Y A D S V K G R F T I S G
163 GGT GGT AGC ACA TAT TAT GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC GGA

      D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D
217 GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR 3
                                ~~~~~
      T A L Y Y C T T G G Y W G Q G T L V
271 ACG GCC TTG TAT TAC TGT ACC ACT GGG GGC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC

      T V S S
325 ACC GTC TCC TCA

```

FIGURA 3A

Anti-LAG3 25E3 VK

Segmento V: L18

Segmento J: JK2

A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
1 GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

CDR 1

V T I T C R A S Q G I R S A L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGG AGT GCT TTA GCC TGG TAT

CDR 2

Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

CDR 2

E S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

CDR 3

L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

CDR 3

F N S Y P Y T F G Q G T K L E I K
271 TTT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

FIGURA 3B

Anti-LAG3 8B7 VH

Segmento V: 4-34
Segmento D: 3-9
Segmento J: JH5b

```

      Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L
1 CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCA TCG GAA ACC CTG

                                CDR1
      S L T C A V Y G G S F S G Y Y W S W
55 TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG

                                CDR2
      I R Q P P G K G L E W I G E I N H R
109 ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT CGT

                                CDR2
      G N T N C N P S L K S R V T I S G D
163 GGA AAC ACC AAC TGC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GGA GAT

      T S K K Q F A L K L N S V T A A D T
217 ACG TCC AAG AAA CAG TTC GCC CTG AAG CTG AAC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                CDR3
      A V Y Y C A R G Y D I L T G Y Y E D
271 GCT GTC TAT TAC TGT GCG AGA GGA TAC GAT ATT TTG ACT GGT TAT TAT GAG GAC

                                CDR3
      S W G P G T L V T V S S
325 TCC TGG GGC CCG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

FIGURA 4A

Anti-LAG3 8B7 VK

Segmento V: L6
 Segmento J: JK4

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
 1 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
 55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

CDR2

Q Q K P G Q A P R L L I Y N A S N R
 109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT AAT GCA TCC AAC AGG

CDR2

A T G I P A R F S G S G S G T D F T
 163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

CDR3

L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
 217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

CDR3

R S N W P L T F G G G T K V E I K
 271 CGT AGC AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

FIGURA 4B

Anti- LAG3 11F2 VH

Segmento V: 1-24
Segmento D: 2-15
Segmento J: JH4b

```

      T  H  D  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G
1 ACC CAC GAC CAG GTC CAG CTG GTA CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG

                                         CDR 1
      A  S  V  K  V  S  C  K  V  S  G  Y  T  L  T  E  V  S
55 GCC TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG GTT TCC GGA TAC ACC CTC ACT GAA GTA TCC

CDR 1                                     CDR 2
-----
      M  H  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  M  G  G  F
109 ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCT CCT GGA AAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGT TTT

                                         CDR 2
-----
      D  P  E  D  G  E  T  I  Y  A  Q  K  F  Q  G  R  V  T
163 GAT CCT GAA GAT GGT GAA ACA ATC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC

      M  T  E  D  T  S  T  D  T  A  Y  M  E  L  S  S  L  R
217 ATG ACC GAG GAC ACA TCT ACA GAC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA

                                         CDR 3
-----
      S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  T  A  F  V  V  V  V  A
271 TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA ACA GCC TTT GTA GTG GTG GTA GCT

CDR 3
-----
      A  S  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
325 GCT TCT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

FIGURA 5A

Anti-LAG3 11F2 VK

Segmento V: L6
Segmento J: JK1

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR 1

A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

CDR 2

Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

CDR 2

A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

CDR 3

L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

CDR 3

R S N W P W T F G Q G T K V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

FIGURA 5B

Anti-LAG3 17E5 VH

Segmento V: 3-33
Segmento D: 2-2
Segmento J: JH4b

Q V H L V E S G G G V V Q P G R S L
1 CAG GTG CAC CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

CDR 1

R L S C A A S G F T F S S Y G M H W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAC TGG

CDR 2

V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT

CDR 2

G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R
163 GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

CDR 3

T A V Y Y C A R D P H C S S T N C Y
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CCC CAT TGT AGT AGT ACC AAC TGC TAC

CDR 3

L F D Y W G Q G T L V T V S S
325 CTT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

FIGURA 6A

Anti-LAG3 17E5 VK

Segmento V: L6
Segmento J: JK5

```

      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

      CDR 1
      ~~~~~
      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

      CDR 2
      ~~~~~
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR 2
      ~~~~~
      A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

      CDR 3
      ~~~~~
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR 3
      ~~~~~
      R S N W P I T F G Q G T R L E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCT ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA

```

FIGURA 6B

4-34 Lin. Germ Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G S F S G Y Y W S W
CDRI
25E7 VH - - - - - - - - - - - - - - D - - N -

4-34 Lin. Germ
25F7 VH

	CDR3
4-34 Lin. Germ	T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R
JH5b Lin. Germ	
25F7 VH	- - - - - R - - - - - F G Y S D Y E Y - - - - - N W F D

JH5b Lín. Germ
25E7 VH

FIGURA 7

Anti-LAG3 25F7 VK

L6 Lín. Germ 25F7 VK	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S	CDR1
	- - - - -	- - - - - I - -

L6 Lín. Germ 25F7 VK	Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F	CDR2
	- - - - -	- - - - -

L6 Lín. Germ 25F7 VK	S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y C Q R S N	CDR3
	- - - - -	- - - - -

L6 Lín. Germ JK2 Lín. Germ 25F7 VK	W P T F G Q G T K L E I K - - L - - - - N - - - -	(JK2)
--	---	-------

FIGURA 8

Anti-LAG3 26H10 VH

3-33 Lin. Germ 26H10 VH	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y G M H W	CDR1
3-33 Lin. Germ 26H10 VH	V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R	CDR2
3-33 Lin. Germ JH6b Lin. Germ 26H10 VH	D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	CDR3
JH6b Lin. Germ 26H10 VH	M D V W G Q G T T V T V S S	Y G

FIGURA 9

Anti-LAG3 26H10 VK

A27 Lín. Germ	E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
26H10 VK	- - - - - CDR1 - - - - -

A27 Lín. Germ	Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F
26H10 VK	- - - - - CDR2 - - - - -

A27 Lín. Germ	T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Y G S S P
JK3 Lín. Germ	F T F G P G T K V D I K
26H10 VK	- - - - - CDR3 - - - - -

FIGURA 10

Anti-IAG3 25E3 VH

3-20 Lin. Germ 25E3 VH E V Q L V E S G G G V V R P G G S L R L S C A A S G F T F D ^{CDR1} D Y G M S W - - - - -

3-20 Lin. Germ 25E3 VH V R Q A P G K G L E W V S ^{CDR2} G I N W N G G S T G Y A D S V K G R F T I S R - - - - - Y - - - - - G

3-20 Lin. Germ JH4b Lin. Germ 25E3 VH D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A L Y H C A R ^{CDR 3} Y W G Q G T L V - - - - - Y - T T G G - - - - -

JH4b Lin. Germ 25E3 VH T V S S - - - - (JH4B).

FIGURA 11

Anti-LAG3 25E3 VK

L18 Lín. Germ	A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S	CDR 1
25E3 VK1	- - - - -	- - - - - R -

L18 Lín. Germ	A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F	CDR 2
25E3 VK1	- - - - -	- - - - -

L18 Lín. Germ	S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N S	CDR 3
25E3 VK1	- - - - -	- - - - -

L18 Lín. Germ	Y P	CDR 3
JK2 Lín. Germ	Y T F G Q G T K L E I K (JK2)	

FIGURA 12

Anti-LAG3 8B7 VH

4-34 Lín. Germ 8B7 VH	Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G S F S ^{CDR1} G Y Y W S W
4-34 Lín. Germ 8B7 VH	I R Q P P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D ^{CDR2} R N C
4-34 Lín. Germ JH5b Lín. Germ 8B7 VH	T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y C A R G ^{CDR3} D E
JH5b Lín. Germ 8B7 VH	P W G Q G T L V T V S S S - - P - - - - -

FIGURA 13

Anti-LAG3 8B7 VK

L6 Lin. Germ 8B7 VK	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S	CDR1
L6 Lin. Germ 8B7 VK	Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F	CDR2
L6 Lin. Germ 8B7 VK	S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N	CDR3
L6 Lin. Germ JK4 Lin. Germ 8B7 VK	W P L T F G G G T K V E I K	

FIGURA 14

Anti-LAG3 11F2 VK

L6 Lin. Germ 11F2.6 VK	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S	CDR1
L6 Lin. Germ 11F2.6 VK	Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F	CDR2
L6 Lin. Germ 11F2.6 VK	S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y C Q Q R S N	CDR3
L6 Lin. Germ JK1 Lin. Germ 11F2.6 VK	W P W T F G Q G T K V E I K --(JK1)	

FIGURA 16

[illegible]

FIGURA 17

Anti-LAG3 17E5 VK

L6 Lín. Germ
17E5 VK
E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S
CDR1

L6 Lín. Germ
17E5 VK
Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F
CDR2

L6 Lín. Germ
17E5 VK
S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y C Q Q R S N
CDR3

L6 Lín. Germ
JK5 Lín. Germ
17E5 VK
W P I T F G Q G T R L E I K

FIGURA 18

Rhesus LAG-3 (XM_001108923)	(1)	MWEAQFLGLLFLQLWVAPVKPPQPGAEISVVWAEQAPQLPCSPPTIPL	1	50
Clon de pa23-5	(1)	MWEAQFLGLLFLQLWVAPVKPPQPGAEISVVWAEQAPQLPCSPPTIPL	51	100
Rhesus LAG-3 (XM_001108923)	(51)	QDLSLRRAGVTWQHQPDSGPPAPAPGHPAPGHRPAAPYSWGPRPRRYT	101	150
Clon de ADNc pa23-5	(51)	QDLSLRRAGVTWQHQPDSGPPAPAPGHPAPGHRPAAPYSWGPRPRRYT	151	200
		extra loop peptide		
Rhesus LAG-3 (XM_001108923)	(101)	VLSVGGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQGRGDFSLWLRPARRADAGEYRAT	201	250
Clon de ADNc pa23-5	(101)	VLSVGGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQGRGDFSLWLRPARRADAGEYRAT	251	300
Rhesus LAG-3 (XM_001108923)	(151)	VHLRDRALSCRLRLRVGQASMTASPPGSLRTSDWVILNCSFSRDPDRPASV	301	350
Clon de pa23-5	(151)	VHLRDRALSCRLRLRVGQASMTASPPGSLRTSDWVILNCSFSRDPDRPASV	351	400
Rhesus LAG-3 (XM_001108923)	(201)	HWFRSRGQGRVPVQGSPPHHLAESFLFLPHVGPMDSGLWGCILTYRDGFN	401	450
Clon de ADNc pa23-5	(201)	HWFRSRGQGRVPVQGSPPHHLAESFLFLPHVGPMDSGLWGCILTYRDGFN	451	500
Rhesus LAG-3 (XM_001108923)	(251)	VSIMYNLTVLGLEPATPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVGTQSFLLAKWAP	501	550
Clon de ADNc pa23-5	(251)	VSIMYNLTVLGLEPATPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVGTQSFLLAKWAP	551	600
Rhesus LAG-3 (XM_001108923)	(301)	PGGGPDLLVAGDNGDFTLRLEDVSAQAQAGTYICHIRLQGGQQLNATVTLAI	601	650
Clon de ADNc pa23-5	(301)	PGGGPDLLVAGDNGDFTLRLEDVSAQAQAGTYICHIRLQGGQQLNATVTLAI	651	700
Rhesus LAG-3 (XM_001108923)	(351)	ITVTPKSFSGSPGLKLLCEVTPASGQEHFVWSPLNTPSQRSFSGPWLEA	701	750
Clon de pa23-5	(351)	ITVTPKSFSGSPGLKLLCEVTPASGQEHFVWSPLNTPSQRSFSGPWLEA	751	800

FIGURA 19

Rhesus LAG-3 (XM_001108923)	(401)	QEAQLLSQPWCQQLHQGFETILGAAYFTTELSSPGAQRSGRAPGALRAGHL	450
Clon de ADNc pa23-5	(401)	QEAQLLSQPWCQQLHQGERLLGAAYFTTELSSPGAQRSGRAPGALRAGHL	451
Rhesus LAG-3 (XM_001108923)	(451)	PLFLILGVLFLLLLVTGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIE	500
Clon de : pa23-5	(451)	PLFLILGVLFLLLLVTGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIE	
		Transmembrane Domain	
Rhesus LAG-3 (XM_001108923)	(501)	ELEQEPELEPEPELERELGPEPEPGPEPEPEQL-	534
Clon de ADNc pa23-5	(501)	ELEQEPELEPEPELERELGPEPEPGPEPEPEQL-	

FIGURA 19 Con.