

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 545**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2013 PCT/US2013/048999**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14008218**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2013 E 13737946 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2867258**

54 Título: **Optimización de anticuerpos humanos que se unen al gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3) y sus usos**

30 Prioridad:
02.07.2012 US 201261667058 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2017

73 Titular/es:
**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:
**LONBERG, NILS y
SRINIVASAN, MOHAN**

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 638 545 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

Optimización de anticuerpos humanos que se unen al gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3) y sus usos

5 **Antecedentes de la invención**

Los anticuerpos terapéuticos son uno de los segmentos de crecimiento más rápido de la industria farmacéutica. Para mantener la potencia (es decir, la actividad) y minimizar la inmunogenicidad, los anticuerpos y otros fármacos de proteínas deben protegerse de la degradación física y química durante la fabricación y el almacenamiento. De hecho, una de las principales dificultades al desarrollar anticuerpos terapéuticos es la potencial respuesta inmunógena cuando se administran a un sujeto, que puede conducir a un aclaramiento rápido o incluso inducir efectos que suponen un riesgo para la vida incluyendo un choque anafiláctico. Diversos factores alteran la inmunogenicidad de un anticuerpo, tales como sus propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, pureza, estabilidad, o solubilidad), factores clínicos (por ejemplo, dosis, ruta de administración, heterogeneidad de la enfermedad, o características del paciente), y el tratamiento simultáneo con otros agentes (Swann et al. (2008) *Curr Opin Immunol* 20:493-499).

La inmunogenicidad de los anticuerpos y/o la pérdida de actividad del anticuerpo frecuentemente se debe a la desamidación. La desamidación es un proceso químico degradativo que se produce espontáneamente en las proteínas (por ejemplo, anticuerpos). La desamidación elimina un grupo funcional amida de un resto aminoácido, tal como asparagina y glutamina, dañando de este modo sus cadenas secundarias que contienen amida. Esto, a su vez, produce alteraciones estructurales y biológicas en toda la proteína, creando de esta manera formas heterogéneas del anticuerpo. La desamidación es una de las modificaciones posteriores a la traducción más comunes que se produce en anticuerpos terapéuticos producidos de forma recombinante.

Por ejemplo, la heterogeneidad en la cadena pesada del anticuerpo monoclonal h1B4 (un anticuerpo dirigido contra CD18 humanizado) debida a desamidación durante el cultivo celular fue notificada por Tsai et al. (*Pharm Res* 10(11):1580 (1993)). Además, la reducción/pérdida de la actividad biológica debida a la desamidación ha sido un problema reconocido. Por ejemplo, Kroon et al. caracterizaron varios sitios de desamidación en el anticuerpo terapéutico OKT3, y notificaron que las muestras de los lotes de producción de OKT3 (envejecidas de 14 meses a 3 años) han disminuido su actividad hasta por debajo del 75 % (*Pharm Res* 9(11):1386 (1992), página 1389, segunda columna). Además, las muestras de OKT3 que muestran grandes cantidades de péptidos oxidados en sus cartografías tenían una actividad significativamente reducida en el ensayo de potencia de unión al antígeno (página 1390, primera columna). Los autores concluyeron que los sitios específicos de modificación química que se producen tras el almacenamiento de OKT3 se identificaron mediante cartografía de péptidos y se correlacionaron con los cambios observados en los análisis clínicos y los ensayos biológicos del anticuerpo (página 1392, primera columna). Se ha notificado también la pérdida de actividad biológica para varias diferentes proteínas terapéuticas desamidadas, incluyendo la ADNasa humana recombinante (Cacia et al. (1993) *J. Chromatogr.* 634:229-239) y CD4 soluble recombinante (Teshima et al. (1991) *Biochemistry* 30:3916-3922).

En su conjunto, la desamidación supone un problema un problema significativo e impredecible para la industria farmacéutica. Los esfuerzos asociados con el control de la variabilidad producida por la desamidación en anticuerpos terapéuticos, en particular, así como las preocupaciones de la FDA asociadas con esta variabilidad, aumentan los costes y retrasan los ensayos clínicos. Por otra parte, las modificaciones para abordar este problema, incluyendo las condiciones de desplazamiento (por ejemplo, temperatura, pH, y tipo de célula) asociadas con la producción recombinante y/o la alteración de aminoácidos que son susceptibles a desamidación (por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio) pueden afectar negativamente la estabilidad y la actividad, especialmente, cuando los cambios se realizan en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo. En consecuencia, existe una necesidad de versiones más estables de anticuerpos terapéuticos.

50 **Sumario**

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales aislados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos), y porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen al LAG-3 humano como se define en las reivindicaciones. Los anticuerpos monoclonales de la invención tienen una estabilidad física optimizada en comparación con los anticuerpos dirigidos contra LAG-3 descritos anteriormente. En particular, la invención se refiere a una forma modificada del anticuerpo 25F7 (documento US 2011/0150892 A1) que presenta una estabilidad térmica y química significativamente mejorada en comparación con el anticuerpo sin modificar. Específicamente, mediante la alteración de la crítica región de unión del dominio CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo 25F7, se ha mostrado que el anticuerpo modificado presentaba una estabilidad física y térmica significativamente mayor, una desamidación reducida, mayor reversibilidad térmica, y menor agregación. Al mismo tiempo, se observó de forma inesperada que el anticuerpo modificado retenía la misma afinidad de unión elevada por el LAG-3 humano y la actividad funcional del anticuerpo sin modificar, incluyendo la capacidad de inhibir la unión de LAG-3 con las moléculas de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase II y estimular las respuestas de linfocitos T específicos de antígenos. El aumento sustancial combinado de la estabilidad y la retención de la actividad de unión/biológica del anticuerpo modificado era sorprendente, particularmente a la vista de la criticidad de las regiones CDR para la

función del anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para varias aplicaciones, incluyendo la detección de la proteína LAG-3 y la estimulación de las respuestas de los linfocitos T específicos de antígenos en sujetos que con tumores o

5

Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la invención comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 15, 16, y 17, respectivamente. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la invención comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 18, 19, y 20, respectivamente. En una realización, el anticuerpo monoclonal aislado (por ejemplo, un anticuerpo humano), o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12. En otra realización, el anticuerpo incluye además una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

10

15

En una realización preferida, el anticuerpo presenta propiedades físicas mejoradas (es decir, estabilidad térmica y química) en comparación con el anticuerpo 25F7, aunque reteniendo a la vez al menos la misma afinidad de unión por LAG-3 humano que 25F7. Por ejemplo, el anticuerpo presenta una menor variabilidad de la secuencia en la región CDR2 de la cadena pesada debida a desamidación, en comparación con el anticuerpo 25F7, por ejemplo, aproximadamente un 2,5 % o menos de modificaciones de la secuencia de aminoácidos después de 12 semanas a 4 °C (es decir, según los estudios de estabilidad en "tiempo real" que se describen en el presente documento) y/o aproximadamente un 12,0 % o menos modificaciones de la secuencia de aminoácidos después de 12 semanas a 40 °C (es decir, en condiciones de estrés acelerado, como se describe en el presente documento), aunque reteniendo a la vez una afinidad de unión por LAG-3 humano de aproximadamente al menos K_D de 1×10^{-7} M o menos (más preferentemente, una K_D de 1×10^{-8} M o menos, una K_D de 5×10^{-9} M o menos, o una K_D de 1×10^{-9} M o menos). En otra realización, el anticuerpo presenta una reversibilidad térmica de al menos aproximadamente 40 % en PBS a pH 8,0.

20

25

En otra realización, el anticuerpo posee una mayor temperatura de fusión (indicando mayor estabilidad global *in vivo*), en comparación con el anticuerpo sin modificar (Krishnamurthy R y Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). En una realización, el anticuerpo presenta una T_{M1} (la temperatura del desplegamiento inicial) de más de 60 °C, por ejemplo, más de 65 °C, o más de 70 °C. El punto de fusión de un anticuerpo puede medirse utilizando calorimetría de barrido diferencial (Chen et al. (2003) *Pharm Res* 20: 1952-60; Ghirelandoli et al. (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) o dicroísmo circular (Murray et al. (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

30

35

En otra realización, el anticuerpo se caracteriza por su resistencia a la degradación rápida. La degradación de un anticuerpo puede medirse utilizando electroforesis capilar (EC) y MALDI-EM (Alexander AJ and Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

40

En otra realización, el anticuerpo presenta efectos de agregación mínimos, por ejemplo, una agregación del 25 % o menos, tal como del 20 % o menos, 15 % o menos, 10 % o menos, 5 % o menos, o 4 % o menos. La agregación puede conducir a la estimulación de una respuesta inmunitaria indeseada y/o alterada o a propiedades farmacocinéticas desfavorables. La agregación puede medirse mediante diversas técnicas, incluyendo columna de exclusión por tamaños (SEC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), y dispersión de luz.

45

En otra realización, el anticuerpo presenta además al menos una de las siguientes propiedades:

(a) unión a LAG-3 de mono;

(b) ausencia de unión a LAG-3 de ratón;

(c) inhibición de la unión de LAG-3 a moléculas de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase II; y

(d) estimulación de respuestas inmunitarias, particularmente respuestas de linfocitos T específicos de antígenos.

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).

50

55

En otra realización, el anticuerpo estimula una respuesta de linfocitos T específicos de antígenos, tales como la producción de interleucina-2 (IL-2) en una respuesta de linfocitos T específicos de antígenos. En otras realizaciones, el anticuerpo estimula una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta antitumoral (por ejemplo, inhibición del crecimiento del tumor en un modelo de injerto tumoral *in vivo*) o una respuesta autoinmunitaria (por ejemplo, desarrollo de diabetes en ratones NOD).

60

En otra realización, el anticuerpo se une a un epítipo de LAG-3 humano que comprende la secuencia de aminoácidos PGHPLAPG (SEQ ID NO: 21). En otra realización, el anticuerpo se une a un epítipo de LAG-3 humano que comprende la secuencia de aminoácidos HPAAPSSW (SEQ ID NO: 22) o PAAPSSWG (SEQ ID NO: 23).

65

En otras realizaciones, el anticuerpo tiñe el tejido de la pituitaria mediante inmunohistoquímica, o no tiñe el tejido de

la pituitaria mediante inmunohistoquímica.

Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, de un isotipo IgG1, IgG2 o IgG4, opcionalmente con una mutación serina a prolina en la región bisagra de la región constante de la cadena pesada (en la posición correspondiente a la posición 241 como se describe en Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30:105-108), de tal manera que la heterogeneidad del puente disulfuro entre las cadenas pesadas se reduce o elimina. En un aspecto, el isotipo de la región constante es IgG4 con una mutación en los restos de aminoácido 228, por ejemplo, S228P. Como alternativa, los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab, Fab' o Fab'2, o anticuerpos monocatenarios.

En otro aspecto de la invención, el anticuerpo (o la porción de unión a antígeno del mismo) es parte de un inmunoconjugado que incluye un agente terapéutico, *por ejemplo*, una citotoxina o un isótopo radiactivo, unido al anticuerpo. En otro aspecto, el anticuerpo es parte de una molécula biespecífica que incluye un segundo resto funcional (por ejemplo, un segundo anticuerpo) que tiene una especificidad de unión diferente a dicho anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo.

Se proporcionan también composiciones que comprenden anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención, formulados opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se proporcionan también moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno (por ejemplo, regiones variables y/o CDR) de los mismos, de la invención, así como vectores de expresión que comprenden dichos ácidos nucleicos y células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión. Se proporcionan también métodos para preparar anticuerpos dirigidos contra LAG-3 que utilizan las células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión, y pueden incluir las etapas de (i) expresar el anticuerpo en la célula hospedadora y (ii) aislar el anticuerpo de la célula hospedadora.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos dirigidos contra LAG-3 de la invención para su uso en los métodos de estimulación de respuestas inmunitarias. En una realización, el método implica estimular una respuesta de linfocitos T específicos de antígenos poniendo en contacto los linfocitos T con un anticuerpo de la invención, de tal manera que se estimula una respuesta de los linfocitos T específicos de antígenos. En una realización preferida, se estimula la producción de interleucina-2 mediante los linfocitos T específicos de antígenos. En otra realización, el sujeto es un sujeto que tiene un tumor y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor. En otra realización, el sujeto es un sujeto que tiene un virus y se estimula una respuesta inmunitaria contra el virus.

En otra realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en un método para inhibir el crecimiento de las células tumorales en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de tal manera que se inhiba el crecimiento del tumor en el sujeto. En otra realización adicional más, la invención proporciona un anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en un método para tratar la infección vírica en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de tal manera que se trata la infección vírica en el sujeto. En otra realización, estos métodos comprenden administrar una composición, molécula biespecífica, o inmunoconjugado de la invención.

En otra realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, y al menos un anticuerpo inmunoestimulante adicional, tal como un anticuerpo dirigido contra PD-1, un anticuerpo dirigido contra PD-L1 y/o un anticuerpo dirigido contra CTLA-4, de tal manera que se estimula una respuesta inmunitaria en el sujeto, por ejemplo, para inhibir el crecimiento tumoral o para estimular una respuesta antivírica. En una realización, el anticuerpo inmunoestimulante adicional es un anticuerpo dirigido contra PD-1. En otra realización, el agente inmunoestimulante adicional es un anticuerpo dirigido contra PD-L1. En otra realización adicional, el agente inmunoestimulante adicional es un anticuerpo dirigido contra CTLA-4. En otra realización adicional, un anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la invención se administra con una citoquina (por ejemplo, IL-2 y/o IL-21), o un anticuerpo coestimulador (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra CD 137 y/o un anticuerpo dirigido contra GITR). Los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados.

La invención proporciona anticuerpos dirigidos contra LAG-3 y composiciones de la invención para su uso en los métodos anteriores, o para la fabricación de un medicamento para su uso en los métodos anteriores (por ejemplo, para tratamiento).

Otras características y ventajas de la presente descripción serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y los ejemplos, que no deben considerarse como limitantes.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 25F7. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 6) y CDR3 (SEQ ID NO: 7) y se indican las derivaciones V, D y J de la línea germinal. Se delinean las regiones CDR utilizando el sistema Kabat (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación NIH nº 91-3242).

La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal humano 25F7. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 8), CDR2 (SEQ ID NO: 9) y CDR3 (SEQ ID NO: 10) y se indican las derivaciones V y J de la línea germinal. Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 25F7 se muestran en las SEQ ID NO: 32 y 34, respectivamente.

La Figura 2A muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal LAG3.5. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 15), CDR2 (SEQ ID NO: 16) y CDR3 (SEQ ID NO: 17). Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo LAG3.5 se muestran en las SEQ ID NO: 35 y 37, respectivamente.

La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 13) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 14) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal LAG3.5. Se delinean las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 18), CDR2 (SEQ ID NO: 19) y CDR3 (SEQ ID NO: 20).

La Figura 3 muestra las secuencias de aminoácidos de las secuencias de la región variable de la cadena pesada CDR2 de las variantes de LAG-3 denominadas LAG3.5 (SEQ ID NO: 16), LAG3.6 (SEQ ID NO: 24), LAG3.7 (SEQ ID NO: 25), y LAG3.8 (SEQ ID NO: 26), en comparación con la secuencia de aminoácidos de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de CDR2 del anticuerpo 25F7 (LAG3.1) (SEQ ID NO: 6) y la correspondiente secuencia de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 27). La región variable de la cadena pesada de CDR2 de LAG3.5 difiere de la región variable de la cadena pesada de CDR2 de 25F7 por la arginina (R) en la posición 54 (frente a la asparagina (N)) y la serina (S) en la posición 56 (frente a las asparaginas (N)). Las CDR restantes de LAG3.5 y 25F7 son idénticas.

Las Figuras 4A y 4B son gráficas que muestran la actividad de unión (CE_{50} y la afinidad, respectivamente) de los anticuerpos LAG3.1 (25F7), LAG3.2, LAG3.5, LAG3.6, LAG3.7, y LAG3.8 para los linfocitos T CD4+ humanos.

Las Figuras 5A, B, C, D, y E son gráficas que muestran las curvas de fusión térmica (es decir, estabilidad térmica) de los anticuerpos LAG3.1 (25F7), LAG3.5, LAG3.6, LAG3.7, y LAG3.8, respectivamente.

Las Figuras 6A, B, C, D, y E son gráficas que muestran las curvas de reversibilidad térmica (es decir, estabilidad térmica) de los anticuerpos LAG3.1 (25F7), LAG3.5, LAG3.6, LAG3.7, y LAG3.8, respectivamente.

La Figura 7 es una gráfica, que muestra la actividad de unión de los anticuerpos LAG3.1 (25F7) y LAG3.5 a los linfocitos T CD4+ humanos activados y la unión al antígeno (Biacore).

La Figura 8 muestra los resultados de la cartografía de péptidos utilizando espectrometría de masas (modificaciones químicas/estabilidad molecular) para los anticuerpos LAG3.1 (25F7) y LAG3.5 que reflejan la desamidación y la isomerización después de incubación durante 5 días en condiciones de estrés acelerado como se describe en el presente documento.

La Figura 9 es una gráfica que compara los perfiles de hidrofiliidad de los anticuerpos LAG3.1 (25F7) y LAG3.5.

Las Figuras 10A, B, C, y D son gráficas que comparan la afinidad y la estabilidad física (es decir, la estabilidad térmica y química) de los anticuerpos LAG3.1 y LAG3.5 a 4 °C y 40 °C, es decir, estudios tanto en condiciones de estrés acelerado y como de estabilidad en "tiempo real", como se describe en el presente documento.

Las Figuras 11A y B son gráficas que comparan el porcentaje de modificación de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos LAG3.1 y LAG3.5 a 4 °C y 40 °C.

Descripción detallada de la invención

A fin de que la presente descripción pueda entenderse más fácilmente, determinados términos se definen en primer lugar. Se muestran definiciones adicionales a través de la descripción detallada.

Los términos "25F7," "anticuerpo 25F7," "anticuerpo LAG3.1," y "LAG3.1" se refieren al anticuerpo dirigido contra LAG-3 humano descrito en el documento US2011/0150892 A1. La secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) que codifica la región variable de la cadena pesada de 25F7 (LAG3.1) y la correspondiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) se muestra en la Figura 1A (con las secuencias de la CDR designadas como SEQ ID NO: 4, 5, y 7, respectivamente). La secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 3) que codifica la región variable de la cadena ligera de 25F7 (LAG3.1) y la correspondiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) se muestra en la Figura 1B (con las secuencias de la CDR designadas como SEQ ID NO: 8, 9, y 10, respectivamente).

El término "LAG-3" se refiere al gen 3 de activación de linfocitos. El término "LAG-3" incluye las variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos. Por ejemplo, los anticuerpos específicos de la proteína LAG-3 humana pueden, en determinados casos, reaccionar en cruzado con una proteína LAG-3 procedente de una especie diferente a la humana. En otras realizaciones, los anticuerpos específicos de una proteína LAG-3 humana pueden ser completamente específicos de la proteína LAG-3 humana y pueden no presentar especies u otros tipos diferentes de reactividad cruzada, o pueden reaccionar en cruzado con LAG-3 de determinadas especies diferentes pero no de

todas las especies diferentes (por ejemplo, reaccionar en cruzado con LAG-3 de mono pero no con LAG-3 de ratón). El término "LAG-3 humano" se refiere a la secuencia de LAG-3 humano, tal como la secuencia de aminoácidos completa de LAG-3 humano que tiene el n.º de registro del Genbank NP_002277 (SEQ ID NO: 29). El término "LAG-3 de ratón" se refiere a una secuencia de LAG-3 de ratón, tal como la secuencia de aminoácidos completa de LAG-3 de ratón que tiene el n.º de registro del Genbank NP_032505. LAG-3 se conoce también en la técnica como, por ejemplo, CD223. La secuencia de LAG-3 humano puede diferir del LAG-3 humano del n.º de registro del Genbank NP_002277 por tener, *por ejemplo*, mutaciones en regiones conservadas o mutaciones en regiones no conservadas y el LAG-3 tiene sustancialmente la misma función biológica que el LAG-3 humano del n.º de registro del Genbank NP_002277. Por ejemplo, una función biológica de LAG-3 humano es la tiene un epítipo en el dominio extracelular de LAG-3 que está unido específicamente a un anticuerpo de la presente descripción o una función biológica de LAG-3 humano es la unión a las moléculas MHC de Clase II.

Se pretende que el término "LAG-3 de mono" abarque las proteínas LAG-3 expresadas por los monos del viejo mundo y el nuevo mundo, incluyendo, aunque no de forma limitativa, LAG-3 de macaco cangrejero y LAG-3 de macaco rhesus. Una secuencia de aminoácidos representativa de LAG-3 de mono es la secuencia de aminoácidos de LAG-3 del macaco rhesus que se depositó con el n.º de registro del Genbank n.º XM_001108923. Otra secuencia de aminoácidos representativa de LAG-3 de mono es la secuencia de macaco rhesus alternativa del clon pa23-5 que se describe en el documento US 2011/0150892 A1. Esta secuencia de rhesus alternativa presenta una diferencia en un único aminoácido, en la posición 419, en comparación con la secuencia depositada en el Genbank.

Una secuencia de LAG-3 humano concreta será por lo general un 90 % idéntica, en su secuencia de aminoácidos, a la de LAG-3 humano con el n.º de registro del Genbank NP_002277 y contiene los restos de aminoácidos que identifican la secuencia de aminoácidos como humana cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de LAG-3 de otras especies (por ejemplo, murino). En determinados casos, un LAG-3 humano puede ser al menos un 95 %, o incluso al menos un 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica, en su secuencia de aminoácidos, a LAG-3 del n.º de registro del Genbank NP_002277. En determinadas realizaciones, una secuencia de LAG-3 humano no presentará más de 10 diferencias de aminoácidos respecto de la secuencia de LAG-3 del n.º de acceso al Genbank NP_002277. En determinadas realizaciones, el LAG-3 humano puede presentar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 aminoácido de diferencia respecto de la secuencia de LAG-3 del n.º de acceso al Genbank NP_002277. El porcentaje de identidad puede determinarse como se describe en el presente documento.

El término "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígenos, fagocitos, granulocitos, y macromoléculas solubles producidas por las anteriores células o el hígado (incluyendo anticuerpos, citoquinas, y complemento) que da como resultado un daño selectivo en, la destrucción de, o la 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 humanos normales.

Una "respuesta de linfocitos T específicos de antígenos" se refiere a respuestas de un linfocito T que resulta de la estimulación de los linfocitos T por el antígeno para el cual el linfocito T es específico. Los ejemplos no limitantes de respuestas por un linfocito T tras la estimulación específica de antígeno incluyen la proliferación y la producción de citoquinas (por ejemplo, producción de IL-2).

El término "anticuerpo" como se denomina en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o fragmento monocatenario del mismo. Los anticuerpos completos son glicoproteínas que comprenden al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), entremezcladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi 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 interactúa con el antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores hospedadores, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

La expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, una proteína LAG-3). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede llevarse a cabo por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados en el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en 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 unidos mediante un puente disulfuro a la región

bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1}; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_H y C_{H1}; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un brazo único de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio V_H; (vii) una región determinante la complementariedad aislada (CDR); y (viii) un nanocuerpo, una región variable de la cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite fabricarlos como una proteína monocatenaria en el que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios estén abarcados en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos se seleccionan por su utilidad de la misma manera que se hace con los anticuerpos intactos.

Se pretende que un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, se refiera a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a una proteína LAG-3 está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de las proteínas LAG-3). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a una proteína LAG-3 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como proteínas LAG-3 de otras especies. Por otra parte, un anticuerpo aislado puede estar prácticamente exento de otros materiales celulares y/o sustancias químicas.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad y afinidad de unión por un epítipo concreto.

Se pretende que término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones del marco como las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de líneas germinales humanas. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante se deriva también de secuencias de inmunoglobulina de líneas germinales humanas. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de líneas germinales humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos en los que las secuencias de la CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas.

La expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que expresan una única especificidad de unión, que tiene regiones variables en las que tanto las regiones del marco como la CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de líneas germinales humanas. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen mediante un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera fusionados con una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se han preparado, expresado, creado o aislado por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de la inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del anterior (descrito adicionalmente a continuación), (b) anticuerpos aislados a partir de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una biblioteca recombinante combinatoria de anticuerpos humanos, y (d) anticuerpos que han preparado, expresado, creado o aislado por cualquier otro medio que implica el corte y empalme de secuencias del gen de la inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos recombinantes humanos tienen regiones variables en las que las regiones del marco y de la CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de líneas germinales humanas. En determinadas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos recombinantes humanos se pueden someter a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y de esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones de V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan y están relacionadas con las secuencias de V_H y V_L de líneas germinales humanas, pueden no existir de manera natural *in vivo* en el repertorio de la línea germinal del anticuerpo humano.

El término "isotipo" se refiere a una clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificado por los genes de la región constante de la cadena pesada.

Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico de un antígeno" se utilizan de manera indistinta en el presente documento con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

La expresión "derivados de anticuerpos humanos" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, *por ejemplo*, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

5 Se pretende que el término "anticuerpo humanizado" se refiera a anticuerpos en los que las secuencias de la CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas. Se pueden realizar modificaciones adicionales de la región marco en las secuencias marco humanas.

10 Se pretende que el término "anticuerpo quimérico" se refiera a anticuerpos en los que las secuencias de la región variable se deriven de una especie y las secuencias de la región constante se deriven de otra especie, tal como un anticuerpo en el que 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.

15 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que un anticuerpo se "une específicamente a una proteína LAG-3 humana" se refiera a un anticuerpo que se une a una proteína LAG-3 humana (y posiblemente una proteína LAG-3 de una o más especies no humanas) pero que no se une sustancialmente a proteínas no LAG-3. Preferentemente, el anticuerpo se une a una proteína LAG-3 humana con "elevada afinidad", concretamente con una K_D de 1×10^{-7} M o menos, más preferentemente 1×10^{-8} M o menos, más preferentemente 5×10^{-9} M o menos, más preferentemente 1×10^{-9} M o menos.

20 El término "no se une sustancialmente" a una proteína o células, como se usa en el presente documento, significa que no se une o no se une con una elevada afinidad a la proteína o las células, es decir, se une a la proteína o a las células con una K_D de 1×10^{-6} M o más, más preferentemente 1×10^{-5} M o más, más preferentemente 1×10^{-4} M o más, más preferentemente 1×10^{-3} M o más, incluso más preferentemente 1×10^{-2} M o más.

25 Se pretende que el término " K_{asoc} " o " K_a ", como se usa en el presente documento, se refiera a la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta, mientras se pretende que el término " K_{dis} " o " K_d ", como se usa en el presente documento, se refiera a la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta. Se pretende que el término " K_D ", como se usa en el presente documento, se refiera a la constante de disociación, que se obtiene a partir del cociente de K_d y K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como concentración molar (M). Se pueden determinar los valores de K_D para los anticuerpos utilizando los métodos bien establecidos en la materia. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es utilizar la resonancia de plasmón superficial, utilizando preferentemente un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

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

45 El término "desamidación" se refiere a un proceso químico degradativo que se produce espontáneamente en las proteínas (por ejemplo, anticuerpos). La desamidación elimina un grupo funcional amida de un resto aminoácido, tal como asparagina y glutamina, dañando de este modo sus cadenas secundarias que contienen amida. Específicamente, la cadena secundaria de una asparagina ataca el grupo peptídico adyacente, formando un intermedio de succinimida simétrico. La simetría del intermedio da como resultado dos productos de hidrólisis, tanto aspartato como isoaspartato. Se puede producir también una reacción similar en cadenas secundarias de aspartato, dando como resultado una conversión parcial en isoaspartato. En el caso de glutamina, la velocidad de desamidación es generalmente diez veces menor que la de la asparagina, sin embargo, el mecanismo es esencialmente el mismo, requiriendo solo moléculas de agua para continuar.

50 El término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, *por ejemplo*, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios, y reptiles, aunque se prefieren mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas y caballos.

Se describen diversos aspectos de la invención con detalles adicionales en las siguientes subsecciones.

Anticuerpos dirigidos contra LAG-3 que tienen estabilidad aumentada y ventajosas propiedades funcionales

60 Los anticuerpos de la invención se unen específicamente a LAG-3 humano y tienen estabilidad optimizada en comparación con los anticuerpos dirigidos contra LAG-3 anteriormente descritos, particularmente en comparación con el anticuerpo 25F7 (LAG3.1). Esta optimización incluye una desamidación reducida (por ejemplo, estabilidad química aumentada) y un mayor desplegado térmico (por ejemplo, estabilidad física aumentada), aunque reteniendo a la vez una elevada afinidad de unión al LAG-3 humano.

Se conocen en la materia los métodos para identificar los sitios de desamidación (véanse, por ejemplo, intercambio iónico, fase inversa, y cromatografía de interacción hidrófoba, y cartografiado peptídico de digestiones proteolíticas (CL-EM)). Los ensayos adecuados para medir la estabilidad física incluyen, por ejemplo, el análisis de los puntos de fusión y/o el desplegamiento de la estructura del anticuerpo tras la desnaturalización (por ejemplo, porcentaje de reversibilidad como se ha descrito, por ejemplo, en el Ejemplo 3, sección 3).

La unión a LAG-3 humano puede evaluarse utilizando una o más técnicas también bien establecidas en la materia. Por ejemplo, puede probarse un anticuerpo mediante un ensayo de citometría de flujo en el que el anticuerpo se hace reaccionar con una línea de células que expresa LAG-3 humano, tal como células CHO que se han transfectado para expresar LAG-3 (por ejemplo, LAG-3 humano, o LAG-3 de mono (por ejemplo, macaco rhesus o macaco cangrejero) o LAG-3 de ratón) sobre su superficie celular. Otras células adecuadas para su uso en los ensayos de citometría de flujo incluyen los linfocitos T activados con CD4⁺ estimulados contra CD3, que expresan LAG-3 natural. De manera adicional o alternativa, la unión del anticuerpo, incluyendo la cinética de unión (por ejemplo, el valor de la K_D), puede probarse en ensayos BIAcore. Otros ensayos de unión adicionales adecuados incluyen ensayos ELISA, por ejemplo, utilizando una proteína LAG-3 recombinante.

Los anticuerpos de la invención se unen preferentemente a la proteína LAG-3 humana con una K_D de 1 x 10⁻⁷ M o menos, y más preferentemente 1 x 10⁻⁸ M o menos, 5 x 10⁻⁹ M o menos, o 1 x 10⁻⁹ M o menos.

Normalmente, el anticuerpo se une a LAG-3 en los tejidos linfoides, tales como amígdala, bazo o timo, que se pueden detectar mediante inmunohistoquímica. En una realización, el anticuerpo tiñe el tejido de la pituitaria (por ejemplo, se retiene en la pituitaria) tal como se mide mediante inmunohistoquímica. En otra realización, el anticuerpo no tiñe el tejido de la pituitaria (es decir, no se retiene en la pituitaria) tal como se mide mediante inmunohistoquímica.

Las propiedades funcionales adicionales incluyen la reactividad cruzada con LAG-3 de otras especies. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a LAG-3 de mono (por ejemplo, macaco cangrejero, macaco rhesus), pero no se une prácticamente con el LAG-3 de ratón. Preferentemente, un anticuerpo de la invención se une a la LAG-3 humano con elevada afinidad.

Otras propiedades funcionales incluyen la capacidad del anticuerpo para estimular una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta de linfocitos T específicos de antígenos. Esto se puede probar, por ejemplo, evaluando la capacidad del anticuerpo para estimular la producción de interleucina-2 (IL-2) en una respuesta de linfocitos T específicos de antígenos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une a LAG-3 humano y estimula una respuesta de linfocitos T específicos de antígenos. En otras realizaciones, el anticuerpo se une a LAG-3 humano pero no estimula una respuesta de linfocitos T específicos de antígenos. Otros medios para evaluar la capacidad del anticuerpo para estimular una respuesta inmunitaria incluyen someter a ensayo su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral, tal como en un modelo de injerto tumoral *in vivo* (véase, *por ejemplo*, Ejemplo 6) o la capacidad para estimular una respuesta autoinmunitaria, tal como la capacidad de promover el desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria en un modelo autoinmunitario, por ejemplo, la capacidad de promover el desarrollo de diabetes en el modelo NOD de ratón.

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

Anticuerpo monoclonal LAG3.5

Un anticuerpo preferido de la invención es el anticuerpo monoclonal humano, LAG3.5, caracterizado estructural y químicamente como se describe a continuación y en los siguientes Ejemplos. La secuencia de aminoácidos para V_H de LAG3.5 se muestra en la SEQ ID NO: 12 (Figura 2A). La secuencia de aminoácidos para V_L de LAG3.5 se muestra en la SEQ ID NO: 14 (Figura 2B).

Las secuencias de V_H y V_L (o las secuencias de la CDR) u otros anticuerpos dirigidos contra LAG-3 que se unen a LAG-3 humano se pueden "mezclar y emparejar" con las secuencias de V_H y V_L (o las secuencias de la CDR) del anticuerpo LAG3.5. Preferentemente, cuando las cadenas V_H y V_L (o las CDR de dichas cadenas) se mezclan y emparejan, una secuencia de V_H de un emparejamiento V_H/V_L concreto se sustituye por una secuencia V_H estructuralmente similar. Igualmente, preferentemente, una secuencia de V_L de un emparejamiento V_H/V_L concreto se sustituye con una secuencia V_L estructuralmente similar.

En consecuencia, en una realización, los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión a antígeno de los mismos, comprenden:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12 (es decir, la V_H de LAG3.5); y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 (es decir, la V_L de LAG3.5) o la V_L de otro anticuerpo dirigido contra LAG3 (es decir, que difiere de LAG3.5);

en el que el anticuerpo se une específicamente a LAG-3 humano.

Los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión a antígeno de los mismos, comprenden:

- 5 (a) las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de LAG3.5, SEQ ID NO: 15, 16, y 17, respectivamente; y
 (b) la cadena ligera de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 que comprende las secuencias de aminoácidos de LAG3.5, SEQ ID NO:18, 19, y 20, respectivamente;

10 en el que el anticuerpo se une específicamente a LAG-3 humano.

Adicionalmente, se describe en el presente documento un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que incluye la región CDR2 variable de la cadena pesada de LAG3.5 combinada con las CDR de otros anticuerpos que se unen a la LAG-3 humano, por ejemplo, una CDR1 y/o una CDR3 de la región variable de la cadena pesada, y/o
 15 una CDR1, CDR2, y/o CDR3 de la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo dirigido contra LAG-3 diferente.

Además, es bien sabido en la materia que el dominio CDR3, independientemente de los dominio(s) CDR1 y/o CDR2, en solitario, puede determinar la especificidad de unión de un anticuerpo por un antígeno homólogo y que se pueden generar de forma predecible múltiples anticuerpos que tienen la misma especificidad de unión basándose en la secuencia de la CDR3 común. Véanse, por ejemplo, Klimka et al., *British J. of Cancer* B3(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., *BIAjournal* 8:Scientific Review 8 (2001); Igarashi et al.,
 20 *J. Biochem (Tokio)* 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 y Stoller, *J. Immunol.* 152:5218-5329 (1994) y Xu y Davis, *Immunity* 13:37-45 (2000). Véanse también, las patentes de los Estados Unidos con números 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.

30 Adicionalmente, se describen en el presente documento los anticuerpos que incluyen la CDR2 de la región variable de la cadena pesada de LAG3.5 y al menos la CDR3 de la región variable de la cadena pesada y/o ligera de LAG3.5 (SEQ ID NO: 17 y/o 20), o la CDR3 de la región variable de la cadena pesada y/o ligera de otro anticuerpo LAG-3, en el que el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a LAG-3 humano. Estos anticuerpos preferentemente (a) compiten por la unión; (b) retienen las características funcionales; (c) se unen al mismo epítipo; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar a LAG3.5. Los anticuerpos pueden incluir además la CDR2 de la región variable de la
 35 cadena ligera de LAG3.5 (SEQ ID NO: 17 y/o 20), o la CDR2 de la región variable de la cadena ligera de otro anticuerpo LAG-3, en el que el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a LAG-3 humano. Los anticuerpos pueden incluir además la CDR1 de la región variable de la cadena pesada y/o ligera de LAG3.5 (SEQ ID NO: 17 y/o 20), o la CDR1 de la región variable de la cadena pesada y/o ligera de otro anticuerpo LAG-3, en el que el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a LAG-3 humano.

Modificaciones conservativas

Adicionalmente, se describen en el presente documento anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y/o ligera o las secuencias de CDR1 CDR2 y CDR3 que difieren de las de LAG3.5 en una o más modificaciones conservativas. Preferentemente, sin embargo, los restos 54 y 56 de la CDR2 de V_H siguen siendo arginina y serina, respectivamente (es decir, no están mutados). Se entiende en la técnica que pueden realizarse determinadas modificaciones conservativas de la secuencia que no eliminan la unión al antígeno. Véanse,
 45 por ejemplo, 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 y 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. En consecuencia, se describe en el presente documento un anticuerpo que comprende la región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1 CDR2, y CDR3 y/o la región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3, en el que:

- 55 (a) la secuencia de CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 15, y/o modificaciones conservativas de la misma, excepto en las posiciones 54 y 56; y/o
 (b) la secuencia de CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 17, y modificaciones conservativas de la misma; y/o
 60 (c) las secuencias de la CDR1 y/o CDR2, y/o CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden la SEQ ID NO: 18, y/o, SEQ ID NO: 19, y/o SEQ ID NO: 20, y/o modificaciones conservativas de la misma; y
 (d) el anticuerpo se une específicamente a la LAG-3 humano.

De manera adicional o alternativa, el anticuerpo puede poseer una o más de las siguientes propiedades funcionales
 65 descritas anteriormente, tales como una elevada afinidad de unión a LAG-3 humano, unión a LAG-3 de mono, ausencia de unión a LAG-3 de ratón, la capacidad de inhibir la unión de LAG-3 con las moléculas MHC de clase II y

la capacidad de estimular las respuestas de los linfocitos T específicos de antígeno.

El anticuerpo descrito en el presente documento puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, humanizado o quimérico

5 Tal como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "modificaciones conservativas de la secuencia" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión al anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservativas incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo de la invención mediante técnicas normalizadas conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas en las que el resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que tiene una cadena secundaria similar. Las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas secundarias similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas secundarias básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas secundarias ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas secundarias polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas secundarias no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas secundarias beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas secundarias aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De este modo, uno o más restos de aminoácidos en las regiones CDR de un anticuerpo de la invención se puede sustituir por otros restos de aminoácidos de la misma familia de cadena secundaria y se puede probar el anticuerpo alterado para la función retenida (es decir, las funciones anteriormente definidas) utilizando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

Anticuerpos genomanipulados y modificados

25 Se pueden preparar anticuerpos utilizando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias V_H y/o V_L de LAG3.5 como material de partida para genomanipular un anticuerpo modificado. Un anticuerpo puede genomanipularse modificando uno o más restos en una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo en una o más regiones CDR y/o en una o más regiones del marco. De manera adicional o alternativa, un anticuerpo puede genomanipularse modificando restos en la(s) región(es) constante(s), por ejemplo, para alterar la(s) función(es) efectora(s) del anticuerpo.

35 En determinadas realizaciones, el injerto de la CDR se puede usar para genomanipular regiones variables de anticuerpos. Los anticuerpos interactúan con los antígenos diana predominantemente a través de restos de aminoácidos que se localizan en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y la cadena ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos en las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Como las secuencias de la CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de los anticuerpos específicos que se producen naturalmente construyendo vectores de expresión que incluyan secuencias de la CDR del anticuerpo específico que se produce naturalmente injertado sobre las secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véanse, *por ejemplo*, Riechmann et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Véanse, U.S.A. 86:10029-10033; las patentes de Estados Unidos números 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370).

45 La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 que comprenden las SEQ ID NO: 15, 16, 17, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 que comprenden las SEQ ID NO: 18, 19, 20, respectivamente (es decir, las CDR de LAG3.5). Aunque estos anticuerpos contienen las secuencias CDR de V_H and V_L del anticuerpo monoclonal LAG3.5, pueden contener diferentes secuencias marco.

55 Dichas secuencias marco pueden obtenerse a partir de bases de datos públicas del ADN o referencias publicadas que incluyen las secuencias génicas de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal de los genes de la región variable de la región pesada y ligera humana se pueden encontrar en la base de datos de la secuencia de la línea germinal humana "VBase" (disponible en internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat et al. (1991), citado anteriormente; Tomlinson et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; y Cox et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836. Como ejemplo adicional, se pueden encontrar en la base de datos Genbank las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera. Por ejemplo, las siguientes secuencias de la cadena pesada de la línea germinal que se encuentran en el ratón HCo7 HuMAb están disponibles con los números de registro del Genbank adjuntos: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 3-33 (NG_0010109 y NT_024637) y 3-7 (NG_0010109 & NT_024637).
65 Como ejemplo adicional, las siguientes secuencias de la cadena pesada de la línea germinal que se encuentran en el ratón HCo 12 H uMAb están disponibles con los números de acceso del Genbank adjuntos: 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).

5 Las secuencias de proteínas del anticuerpo se compararon con una base de datos de secuencias de proteínas compiladas utilizando uno de los métodos de investigación de la similitud de secuencias denominado BLAST con huecos (Altschul *et al.* (1997), *citado anteriormente*), que es bien conocido por los expertos en la materia.

10 Las secuencias marco preferidas para su uso en los anticuerpos de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias marco utilizadas por los anticuerpos seleccionados de la invención, *por ejemplo*, similares a las secuencias marco 4-34 de V_H y/o las secuencias marco L6 de V_K utilizadas por los anticuerpos monoclonales preferidos de la invención. Las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H , y las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H , se pueden injertar sobre regiones marco que tienen una secuencia idéntica a la que se encuentra en el gel de la inmunoglobulina de la línea germinal de la que deriva la secuencia marco, o las secuencias de CDR se pueden injertar sobre regiones marco que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha descubierto que, en determinados casos, es beneficioso mutar restos en el interior de las regiones marco para mantener o potenciar la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370).

20 Otro tipo de modificación de la región variable es mutar restos de aminoácidos en el interior 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 unión (por ejemplo, la afinidad) del anticuerpo de interés. La mutagénesis dirigida a sitio o la mutagénesis mediada por PCR pueden llevarse a cabo para introducir la(s) mutación(ones) y el efecto sobre la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, se puede evaluar en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe en el presente documento y se proporcionan en los Ejemplos. Se introducen modificaciones preferentemente conservativas (como se describe anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos, pero son preferentemente sustituciones. Por otra parte, normalmente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco restos en una región CDR.

30 En consecuencia, se describen en el presente documento anticuerpos monoclonales aislados dirigidos contra LAG-3, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende: (a) una región CDR1 de V_H que comprende la SEQ ID NO: 15, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 15; (b) una región CDR2 de V_H que comprende la SEQ ID NO: 16, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 16 (preferentemente en la que las posiciones 54 y 56 son las mismas que en la SEQ ID NO:16); (c) una región CDR3 de V_H que comprende la SEQ ID NO: 17, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 17; (d) una región CDR1 de V_L que comprende la SEQ ID NO: 18, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 18; (e) una región CDR2 de V_L que comprende la SEQ ID NO: 19, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 19; y (f) una región CDR3 de V_L que comprende la SEQ ID NO: 20, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 20.

45 Los anticuerpos genomanipulados de la invención incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones en los restos marco dentro de V_H y/o V_L , por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, dichas modificaciones en el marco se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una solución es "retromutar" uno o más restos marco en la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado una mutación somática puede contener restos marco que difieren de la secuencia de la línea germinal a partir de la cual se deriva el anticuerpo. Dichos restos pueden identificarse comparando las secuencias marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal a partir de la cual se deriva el anticuerpo.

55 Otro tipo de modificación del marco implica mutar uno o más restos en la región del marco para eliminar los epítopos de los linfocitos T para reducir de esta forma la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Esta solución se denomina también "desinmunización" y se describe con mayor detalle en la publicación de patente de EE.UU. n.º 20030153043.

60 De forma adicional o alternativa a las modificaciones realizadas en las regiones marco, se pueden genomanipular los anticuerpos de la invención para incluir modificaciones en la región Fc, de forma típica para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor Fc, y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede estar modificado químicamente (por ejemplo, se pueden unir uno o más restos químicos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe en detalle a continuación. La numeración de los restos en la región Fc es la del índice de la

UE de Kabat.

5 En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo isotipo IgG4 que comprende una mutación de serina a prolina en una posición correspondiente a la posición 228 (S228P; índice de la UE) en la región bisagra de la región constante de la cadena pesada. Se ha notificado que esta mutación elimina la heterogeneidad de los puentes disulfuro entre las cadenas pesada de la región bisagra (Angal *et al.* citado anteriormente; la posición 241 se basa en el sistema de numeración de Kabat).

10 En una realización, la región bisagra de CH1 está modificada de tal manera que el número de restos de cisteína en la región bisagra está alterado, *por ejemplo*, aumentado o disminuido. Esta solución se describe adicionalmente en la patente de Estados Unidos n.º 5.677.425. El número de restos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, *por ejemplo*, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

15 En otra realización, la región bisagra Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfase del dominio CH2-CH3 del fragmento bisagra Fc de tal manera que el anticuerpo tiene alterada la unión a la proteína A de estafilococo (SpA) con respecto a la unión de Spa al dominio de la bisagra de Fc natural. Esta solución se describe en detalle adicionalmente en la patente de Estados Unidos n.º 6.165.745.

20 En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su vida media biológica. Son posibles diversas soluciones. *Por ejemplo*, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, tal como se ha descrito en la patente de Estados Unidos n.º 6.277.375. Como alternativa, para aumentar la vida media biológica, el anticuerpo se puede alterar en la región CH1 o CL para que contenga un epítipo de unión al receptor de rescate a partir de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de Estados Unidos números 5.869.046 y 6.121.022.

30 En otras realizaciones más adicionales, la región Fc se altera sustituyendo al menos un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente para alterar una o varias funciones efectoras del anticuerpo. *Por ejemplo*, uno o más aminoácidos seleccionados entre los restos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322, se pueden sustituir por un resto de aminoácido diferente de tal manera que el anticuerpo tiene una afinidad alterada por el ligando de un efector pero retiene la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo progenitor. El ligando efector cuya afinidad se altera puede ser, *por ejemplo*, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Esta solución se describe en detalle además en las patentes de Estados Unidos números 5.624.821 y 5.648.260.

35 En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados entre los restos de aminoácidos 329, 331 y 322 se pueden sustituir por resto de aminoácido diferente de tal manera que el anticuerpo tiene alterada la unión a C1q y/o reducida o eliminada la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Esta solución se describe en detalle adicionalmente en la patente de Estados Unidos n.º 6.194.551.

40 En otro ejemplo, uno o más restos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 231 y 239 se alteran para modificar de esta forma la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Esta solución se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 94/29351.

45 En otro ejemplo más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando 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, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Esta solución se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072. *Por otra parte*, los sitios de unión en la IgG1 para FcγR1, FcγR2, FcγR3 y FcRn se han cartografiado y se han descrito las variantes con unión mejorada (véase Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Se ha mostrado que las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la unión a FcγR3. Asimismo, se mostró que las siguientes combinaciones de mutantes mejoran la unión a FcγR3: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

55 En otra realización adicional más, la glicosilación de un anticuerpo se modifica. *Por ejemplo*, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse para, *por ejemplo*, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones de los hidratos de carbono se pueden llevar a cabo, *por ejemplo*, alterando uno o más sitios de glicosilación en la secuencia del anticuerpo. *Por ejemplo*, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región variable del marco para eliminar de esta forma la glicosilación en ese sitio. Dicha glicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Véanse, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos números 5.714.350 y 6.350.861.

65 De manera adicional o alternativa, puede prepararse un anticuerpo que tenga un tipo de glicosilación alterado, tal

como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de restos fucosilo o un anticuerpo que tenga estructuras GlcNac bisectrices aumentadas. Dichos modelos de glicosilación alterados han demostrado aumentar la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de los hidratos de carbono se pueden llevar a cabo, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con una maquinaria de glicosilación alterada. Se han descrito en la técnica células con maquinaria de glicosilación alterada y se pueden usar como células hospedadoras en las cuales expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de esta forma un anticuerpo con la glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas de células Ms704, Ms705, y Ms709 carecen del gen de la fucosiltransferasa, FUT8 (α (1,6)-fucosiltransferasa), de forma que los anticuerpos expresados en las líneas de células Ms704, Ms705, y Ms709 carecen de fucosa en sus hidratos de carbono. Las líneas de células Ms704, Ms705, y Ms709 FUT8^{-/-} se crearon mediante la perturbación dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 utilizando dos vectores de sustitución (véase la publicación de patente de los Estados Unidos n.º 20040110704 y Yamane-Ohnuki et al., (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Como ejemplo adicional, el documento EP 1.176.195 describe una línea de células con un gen FUT8 perturbado funcionalmente, que codifica una fucosil transferasa, de tal manera que los anticuerpos expresados en dicha línea de células presentan hipofucosilación debido a la reducción o eliminación de la enzima relacionada con el enlace α -1,6. El documento EP 1.176.195 describe también líneas de células que tienen una baja actividad enzimática para añadir fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo, o que no tienen actividad enzimática, por ejemplo, la línea de células YB2/0 de mieloma de rata (ATCC CRL 1662). La publicación PCT WO 03/035835 describe una variante de la línea de células CHO, células Lec13, con capacidad reducida para atacar la fucosa en hidratos de carbono unidos a Asn(297), dando como resultado también la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esta célula hospedadora (véase también Shields et al., (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Pueden producirse también anticuerpos con un perfil de glicosilación modificado en huevos de pollo, tal como se describe en la publicación PCT WO 06/089231. Como alternativa, pueden producirse anticuerpos con un perfil de glicosilación modificado en células vegetales, tales como *Lemna*. Los métodos para la producción de anticuerpos en un sistema de planta se desvelan en la solicitud de patente de los Estados Unidos que corresponde a Alston & Bird LLP con el n.º de referencia del apoderado 040989/314911, presentada el 11 de agosto de 2006. La publicación PCT WO 99/54342 describe líneas de células genomanipuladas para expresar las glicosil transferasas modificadoras de glicoproteínas (por ejemplo, β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas de células genomanipuladas presentan estructuras GlcNac bisectrices aumentadas que dan como resultado una actividad ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana et al., (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Como alternativa, los restos de fucosa del anticuerpo pueden escindirise utilizando una enzima fucosidasa; *por ejemplo*, la fucosidasa α -L-fucosidasa elimina restos fucosilo de los anticuerpos (Tarentino et al. (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Otra modificación de los anticuerpos en el presente documento que se contempla en esta divulgación es la pegilación. Un anticuerpo puede pegilarse para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o uno de sus fragmentos, normalmente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un derivado de éster reactivo o aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos de PEG quedan unidos al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero reactivo análogo soluble en agua). Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "polietilenglicol" abarque cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivatizar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinadas realizaciones, el anticuerpo que se va a pegar es un anticuerpo aglicosilado. Se conocen en la técnica los métodos para pegar proteínas y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véanse, *por ejemplo*, los documentos EP 0 154 316 y EP 0 401 384.

Propiedades físicas de los anticuerpos

Los anticuerpos de la invención pueden caracterizarse por sus diversas propiedades físicas, para detectar y/o diferenciar las diferentes clases de los mismos.

Por ejemplo, los anticuerpos pueden contener uno o más sitios de glicosilación tanto en la región variable de la cadena ligera como en la región variable de la cadena pesada. Dichos sitios de glicosilación pueden dar como resultado una inmunogenicidad aumentada del anticuerpo o una alteración de la pK del anticuerpo debido a la unión a antígeno alterada (Marshall et al. (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala y Morrison (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick et al. (1988) *JExp 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 glicosilación se produce en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo dirigido contra LAG-3 que no contiene la glicosilación de la región variable. Esto se puede conseguir tanto seleccionando anticuerpos que no contienen el motivo de glicosilación en la región variable como mutando restos en la región de glicosilación.

En una realización preferida, los anticuerpos no contienen sitios de isomerismo de la asparagina. Se puede producir la desamidación de la asparagina en secuencias N-G o D-G y dar como resultado la creación de un resto de ácido isoaspártico que introduce un pliegue en la cadena polipeptídica y disminuye su estabilidad (efecto del ácido isoaspártico).

Cada anticuerpo tendrá un único punto isoeléctrico (pI), que generalmente se encuentra en el intervalo de pH entre 6 y 9,5. El pI de un anticuerpo IgG1 se encuentra normalmente en el intervalo de pH de 7-9,5 y el pI de un anticuerpo IgG4 que se encuentra normalmente en el intervalo de pH de 6-8. Se especula que los anticuerpos con un pI fuera del intervalo normal pueden tener algún desdoblamiento e inestabilidad en las condiciones *in vivo*. De este modo, se prefiere tener un anticuerpo dirigido contra LAG-3 que contenga un valor de pI comprendido en el intervalo normal. Esto se puede conseguir ya sea seleccionando anticuerpos con un pI en el intervalo normal o bien mutando los restos de superficies cargadas.

Moléculas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la invención

En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, o las CDR, de 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 se "aisla" o se "vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, *por ejemplo*, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/con SDS, formación de bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la materia. Véanse, Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, *por ejemplo*, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. En una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse usando técnicas de biología molecular convencionales. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que contienen genes de la inmunoglobulina humana como se describe en detalle a continuación), se pueden obtener los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo preparado mediante el hibridoma mediante técnicas de amplificación de la PCR o de clonación del ADNc convencionales. Para los anticuerpos obtenidos de una genoteca de inmunoglobulina (por ejemplo, utilizando técnicas de expresión en fago), se puede recuperar un ácido nucleico que codifica dichos anticuerpos de la genoteca.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la invención incluyen aquellas que codifican las secuencias V_H y V_L del anticuerpo monoclonal LAG3.5 (SEQ ID NO: 12 y 14, respectivamente). Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L , estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena del anticuerpo de longitud completa, en genes del fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H está unido operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. Se pretende que la expresión "unido operablemente", como se usa en este contexto, que signifique que los dos fragmentos de ADN están unidos de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en marco.

El ADN aislado que codifica la región V_H puede convertirse en un gen de la cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica la V_H con otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana se conocen en la materia (véase por ejemplo, Kabat et al. (1991), citado anteriormente) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación de la PCR convencional. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero con máxima preferencia, es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica la V_H puede estar unido operativamente a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región V_L puede convertirse en un gen de la cadena ligera de longitud completa (así como un gen de la cadena ligera de Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica la V_L con otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana se conocen en la materia (véase, por ejemplo, Kabat et al., citado anteriormente) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación de la PCR convencional. 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 están unidos operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, *por ejemplo*, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de tal manera que las secuencias V_H y V_L puedan expresarse como una proteína monocatenaria contigua, con las regiones V_L y V_H unidas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, 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 anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAb) pueden producirse utilizando la técnica de hibridación de células somáticas

(hibridoma) bien conocida de Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495. Otras realizaciones para producir anticuerpos monoclonales incluyen la transformación vírica u oncogénica de linfocitos B y las técnicas de expresión en fagos. Los anticuerpos quiméricos o humanizados también son bien conocidos en la materia. Véanse por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números 4.816.567; 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370.

5 Los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra LAG-3 humano pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que contienen partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen los ratones denominados en el presente documento como HuMAb Mouse[®] y KM Mouse[®], respectivamente, y que se denominan colectivamente en el presente documento como "ratones Ig humanos".

15 El HuMAb Mouse[®] (Medarex[®], Inc.) contiene miniloci del gen de la inmunoglobulina humana que codifican las secuencias de la cadena pesada (μ y γ) y la cadena ligera k no reordenadas de la inmunoglobulina humana, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de las cadenas μ y k (véase, por ejemplo, Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859). En consecuencia, los ratones presentan una expresión reducida de la IgM o k, de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humana introducidos experimentan un cambio de clase y una mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgGk humanos de elevada afinidad (Lonberg *et al.* (1994), *citado anteriormente*); revisado 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 uso del HuMAb Mouse[®], y las modificaciones genómicas realizadas mediante dichos ratones, se describe adicionalmente en Taylor et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon 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; Tuailon 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. Véanse además, las patentes de Estados Unidos con números 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; publicaciones PCT números WO 92/03918; WO 93/12227; WO 94/25585; WO 97/13852; WO 98/24884; WO 99/45962 y WO 01/14424.

30 Adicionalmente, los anticuerpos humanos pueden sensibilizarse utilizando un ratón que contiene secuencias de la inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tales como un ratón que contiene un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Este ratón se denomina en el presente documento "ratón KM[®]" y se describe en detalle en la publicación PCT WO 02/43478. Una forma modificada de este ratón, que comprende además una perturbación homocigótica del gen del receptor Fc γ RIIB endógeno, se describe también en la publicación PCT WO 02/43478 y se denomina en el presente documento como "ratón KM/FCGR2D[®]". Además, se pueden usar cualquiera de los transgenes de la cadena pesada HCo7 o HCo12 o ambos.

40 Los animales transgénicos adicionales que se pueden usar para generar anticuerpos humanos incluyen el Xenomouse (Abgenix, Inc., patentes de Estados Unidos con números 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963), "ratones TC (Tomizuka et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727) y vacas que contienen transcromosomas de la cadena pesada y la cadena ligera humanas (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894; publicación PCT WO 02/092812).

45 Adicionalmente, se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos utilizando métodos de expresión en fagos para seleccionar genotecas de la inmunoglobulina humana. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 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.

50 También se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos utilizando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de tal manera que se puede generar una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.476.996 y 5.698.767.

55 Adicionalmente, se pueden preparar anticuerpos dirigidos contra LAG-3 humanos utilizando la expresión en fagos donde los fagos comprenden ácidos nucleicos que codifican anticuerpos generados en animales transgénicos anteriormente inmunizados con LAG-3. Preferentemente, el animal transgénico es un ratón HuMAb, ratón KM, o ratón Kirin. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.794.132.

Inmunización de ratones Ig humanos

60 Los ratones Ig humanos se pueden inmunizar con una preparación purificada o enriquecida de un antígeno de LAG-3, proteína LAG-3 recombinante, o células que expresan la proteína LAG-3. Véanse, por ejemplo, Lonberg *et al.* (1994), citado anteriormente; Fishwild *et al.* (1996), citado anteriormente; las publicaciones PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferentemente, ratones de 6-16 semanas de edad se inmunizaron con 5-50 μ g de proteína LAG-3. Como alternativa, se usó una porción de LAG-3 fusionada a un polipéptido no LAG-3.

Los ratones transgénicos se pueden inmunizar por vía intraperitoneal (IP) o intravenosa (IV) con un antígeno de LAG-3 en adyuvante completo de Freund, seguido por inmunizaciones posteriores IP o IV con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Se pueden usar adyuvantes diferentes de los de Freund o células completas en ausencia de adyuvante. El plasma se puede cribar mediante ELISA y se pueden usar células de ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina dirigida contra LAG-3 humano para las fusiones.

Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos

Para generar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos, se pueden aislar esplenocitos y/o células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse en una línea de células inmortalizadas adecuadas, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden cribarse según la producción de anticuerpos específicos de antígenos. La generación de hibridomas es bien conocida en la materia. Véase, *por ejemplo*, Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York.

Generación de transfectomas productores de anticuerpos monoclonales de la invención

Se pueden producir anticuerpos de la invención en un transfectoma de una célula hospedadora utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica como se conoce bien en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202). En una realización, el ADN que codifica las cadenas ligera y pesada de longitud parcial o completa obtenidas mediante técnicas de biología molecular convencionales se inserta en uno o más vectores de expresión de tal manera que los genes están unidos operativamente a secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción. En este contexto, se pretende que el término "unido operativamente" signifique que un gen de un anticuerpo está ligado en un vector de tal manera que las secuencias control de la transcripción y la traducción comprendidas en el vector sirvan para su función prevista 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 la traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Dichas 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 en una célula hospedadora de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen elevados niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus 40 de simio (VS40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío mayor de adenovirus (AdMLP) y el poliovirus. Como alternativa, se pueden usar secuencias reguladoras no víricas, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de la globina β . Además, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SR α , que contiene secuencias del promotor temprano del SV40 y de la repetición terminal larga del virus de la leucemia de linfocitos T de tipo 1 (Takebe et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472). El vector de expresión y las secuencias control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la expresión de la célula hospedadora utilizada.

Se pueden insertar el gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo en el mismo vector o en vectores de expresión separados. En realizaciones preferidas, se utilizan las regiones variables para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican las regiones constantes de la cadena pesada y las regiones constantes de la cadena ligera del isotipo deseado de tal manera que el segmento V_H está unido operativamente al(a los) segmento(s) C_H dentro del vector, y el segmento V_L está unido operativamente al segmento C_L dentro del vector. De manera adicional o alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo desde la célula hospedadora. El gen de la cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de tal manera que el péptido señal se una en marco al extremo amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de la inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no de inmunoglobulina).

Además de los genes de la cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden contener secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos números 4.399.216; 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, de forma típica, el gen marcador seleccionable transmite resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, o una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en las células hospedadoras dhfr con selección/amplificación por metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el(los) vector(es) de expresión que codifica(n) las cadenas pesada y ligera se transfecta(n) en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" abarquen una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, *por ejemplo*, electroporación,

precipitación con fosfato de calcio, transfección mediante DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención tanto en células hospedadoras procariotas como eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y lo más preferente en células hospedadoras de mamífero, es la más preferida debido a que dichas células eucariotas, y en particular células de mamífero, son más propensas que las células procariotas a ensamblarse y secretar un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo.

Las células hospedadoras de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, *por ejemplo*, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621), células NSO de mieloma, células COS y células SP2. En particular, para su uso en células NSO de mieloma, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS desvelado en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036, y EP 338.841. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpo se introducen en células hospedadoras de mamífero, se producen los anticuerpos cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se hacen crecer células hospedadoras. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas convencionales.

Inmunconjugados

Los anticuerpos de la invención pueden conjugarse con un agente terapéutico para formar un inmunconjugado tal como un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC). Los agentes terapéuticos adecuados incluyen antimetabolitos, agentes alquilantes, aglutinantes de la ranura menor del ADN, intercalantes de ADN, reticuladores del ADN, inhibidores de la histona desacetilasa, inhibidores de la exportación nuclear, inhibidores de los proteosomas, inhibidores de la topoisomerasa I o II, inhibidores de la proteína de choque térmico, inhibidores de la tirosina quinasa, antibióticos, y agentes antimitóticos. En el ADC, el anticuerpo y el agente terapéutico se conjugan preferentemente mediante un enlazador escindible tal como un enlazador de peptidilo, disulfuro, o hidrazona. Más preferentemente, el enlazador es un enlazador de peptidilo tal como Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val, 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 Estados Unidos números 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; publicaciones de patente de Estados Unidos 20060024317; 20060004081; y 20060247295.

Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente descripción presenta moléculas biespecíficas que comprenden uno o más anticuerpos de la invención unidos a al menos un anticuerpo o porción de unión a antígeno diferente de los mismos para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión o moléculas diana diferentes. De este modo, como se usa en el presente documento, "molécula biespecífica" incluye moléculas que tienen tres o más especificidades. En una realización preferida, la molécula biespecífica comprende una primera especificidad de unión por LAG-3 y una segunda especificidad de unión por una molécula estimuladora que recluta células efectoras citotóxicas que pueden destruir una célula diana que expresa LAG-3. Los ejemplos de moléculas estimulantes adecuadas son CD64, CD89, CD16, y CD3. Véase, *por ejemplo*, Kufer et al., TRENDS in Biotechnology, 22 (5), 238-244 (2004).

En una realización, una molécula biespecífica tiene, además de la especificidad de unión dirigida contra Fc y una especificidad de unión dirigida contra LAG-3, una tercera especificidad. La tercera especificidad puede ser para un factor antipotenciación (EF), *por ejemplo*, una molécula que se une a una proteína superficial implicada en la actividad citotóxica y que aumenta de esta forma la respuesta inmunitaria contra la célula diana. Por ejemplo, el factor antipotenciación se puede unir a un linfocito T citotóxico (por ejemplo, mediante CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, o ICAM-1) u otra célula inmunitaria, dando como resultado una respuesta inmunitaria aumentada contra la célula diana.

Las moléculas biespecíficas pueden estar en muchos formatos y tamaños diferentes. En un extremo del espectro de tamaños, una molécula biespecífica retiene el formato de anticuerpo tradicional, excepto que, en vez de tener dos brazos de unión de especificidad idéntica, tiene dos brazos de unión teniendo cada uno una especificidad diferente. En el otro extremo están las moléculas biespecíficas que consisten en dos fragmentos de anticuerpos monocatenarios (scFv) unidos mediante una cadena peptídica, lo que se denomina una construcción Bs(scFv)₂. Las moléculas biespecíficas de tamaño intermedio incluyen dos fragmentos F(ab) diferentes unidos por un enlazador de peptidilo. Las moléculas biespecíficas de estos y otros formatos pueden prepararse mediante ingeniería genética, hibridación somática, o métodos químicos. Véase, *por ejemplo*, Kufer et al., citado anteriormente; Cao y Suresh, Bioconjugate Chemistry, 9 (6), 635-644 (1998); y van Spriell et al., Immunology Today, 21 (8), 391-397 (2000), y las referencias citadas en el anterior.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos de la presente invención formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede contener opcionalmente uno o más principios farmacéuticamente activos adicionales, tales como otro anticuerpo o un fármaco. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden también administrarse en un tratamiento combinado con, por ejemplo, otro agente inmunoestimulante, agente anticanceroso, un agente antivírico, o una vacuna, de tal manera que el anticuerpo dirigido contra LAG-3 potencia la respuesta inmunitaria contra la vacuna.

La composición farmacéutica puede comprender cualquier número de excipientes. Los excipientes que se pueden usar incluyen vehículos, agentes tensioactivos, agentes espesantes o emulsionantes, aglutinantes sólidos, adyuvantes de la dispersión o suspensión, solubilizantes, colorantes, agentes aromatizantes, recubrimientos, agentes disgregantes, lubricantes, edulcorantes, conservantes, agentes isotónicos, y combinaciones de los mismos. La selección y uso de excipientes adecuados se contempla en Gennaro, ed., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Ed. (Lippincott Williams y Wilkins 2003).

Preferentemente, la composición farmacéutica es adecuada para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el principio activo puede revestirse con un material para protegerle de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pudieran inactivarlo. La frase "administración parenteral" como se usa en el presente documento significa modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, usualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Como alternativa, un anticuerpo de la invención puede administrarse mediante una ruta no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidérmica o mucosal, *por ejemplo*, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no trasmite ningún efecto toxicológico indeseado. Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos monocarboxílicos y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos y aromáticos sulfónicos y similares. Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de soluciones o dispersiones acuosas estériles. Se pueden formular también en una microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una concentración de fármaco elevada.

La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma farmacéutica unitaria variará dependiendo del sujeto que se está tratando y del modo de administración concreto y será generalmente la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, más allá del cien por ciento, esta cantidad variará desde aproximadamente 0,01 % a aproximadamente noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente desde aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 70 %, lo más preferente desde aproximadamente 1 % a aproximadamente 30 % de principio activo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

Para la administración del anticuerpo, los intervalos de dosificación serán desde aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más usualmente 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosificaciones 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 comprendidas en el intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ilustrativo

conlleva 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 cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo dirigido contra LAG-3 de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, administrándose el anticuerpo usando uno de los siguientes calendarios de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, a continuación cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg /ml y en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg /ml.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo dirigido contra LAG-3 de la invención da como resultado preferentemente una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y la duración de los periodos exentos de síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o la discapacidad debidos a la afección de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de los sujetos que tienen tumores, una "dosificación terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente el crecimiento del tumor en al menos aproximadamente un 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente un 40 %, aún de forma más preferente en al menos aproximadamente un 60 %, y todavía de forma más preferente en al menos aproximadamente un 80 % con respecto a los sujetos no tratados. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar de otra forma los síntomas en un sujeto, que es normalmente un ser humano o puede ser de otro mamífero.

La composición farmacéutica puede ser una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno acetato de vinilo, 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 de inyección hipodérmica sin aguja (por ejemplo, documentos 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 de microinfusión (documento US 4.487.603); (3) dispositivos transdérmicos (documento US 4.486.194); (4) aparatos de infusión (documentos US 4.447.233 y 4.447.224); y (5) dispositivos osmóticos (documentos US 4.439.196 y 4.475.196).

En determinadas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden formularse para asegurar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la barrera hematoencefálica, se pueden formular en liposomas, que pueden comprender adicionalmente restos directores para potenciar el transporte selectivo en células u órganos específicos. Véase, por ejemplo los documentos 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 y Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; y Killion y Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

Usos de la invención

Los anticuerpos (composiciones, moléculas biespecíficas, e inmunoconjugados) de la presente invención tienen numerosas utilidades *in vitro* e *in vivo* que implican, por ejemplo, la detección de LAG-3 o la potenciación de respuestas inmunitarias mediante el bloqueo de LAG-3. En una realización preferida, los anticuerpos son anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, *por ejemplo, in vivo*, para potenciar la inmunidad en varias situaciones. En consecuencia, el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la invención puede utilizarse en un método para modificar una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de tal manera que se modifica la respuesta inmunitaria en el sujeto. Preferentemente, la respuesta se potencia, estimula o regula en exceso.

Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que necesitan potenciar una respuesta inmunitaria. Los métodos son particularmente adecuados para tratar pacientes humanos que tienen un trastorno que se puede tratar aumentando una respuesta inmunitaria (por ejemplo, la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T). Adicionalmente, los métodos son particularmente adecuados para el tratamiento del cáncer *in vivo*. Para conseguir la potenciación de la inmunidad específica de antígeno, los anticuerpos dirigidos contra LAG-3 se pueden administrar junto con un antígeno de interés o el antígeno puede estar ya presente en el sujeto que se va a tratar (por ejemplo, un sujeto que tiene un tumor o que tiene un virus). Cuando los anticuerpos contra LAG-3 se administran junto con otro agente, los dos se pueden administrar en cualquier orden o simultáneamente.

Se describen además en el presente documento métodos para detectar la presencia del antígeno LAG-3 humano en una muestra, o medir la cantidad del antígeno LAG-3 humano, que comprenden poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal humano, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se

5 une específicamente a LAG-3 humano, en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o una porción del mismo y LAG-3 humano. A continuación se detecta la formación de un complejo, en el que una diferencia en la formación del complejo entre la muestra en comparación con la muestra del control es indicativa de la presencia de antígeno LAG-3 humano en la muestra. Por otra parte, los anticuerpos dirigidos contra LAG-3 de la invención pueden utilizarse para purificar LAG-3 humano mediante purificación por inmunoafinidad.

10 Dada la capacidad de los anticuerpos dirigidos contra LAG-3 de la invención para inhibir la unión de LAG-3 a las moléculas MHC de clase II y de estimular las respuestas de los linfocitos T a antígenos, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse también en métodos *in vitro e in vivo* para estimular, potenciar o regular en exceso las respuestas de los linfocitos T específicos de antígenos. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse en un método para estimular una respuesta de linfocitos T específicos de antígenos que comprende poner en contacto dichos linfocitos T con el anticuerpo, de tal manera que se estimula una respuesta de los linfocitos T específicos de antígenos. Cualquier indicador adecuado de una respuesta de linfocitos T específicos de antígenos se puede usar para medir la respuesta de los linfocitos T específicos de antígenos. Los ejemplos no limitantes de dichos indicadores adecuados incluyen la proliferación aumentada de linfocitos T en presencia del anticuerpo y/o el aumento en la producción de citoquinas en presencia del anticuerpo. En una realización preferida, se estimula la producción de interleucina-2 mediante los linfocitos T específicos de antígenos.

20 La invención proporciona también un anticuerpo de la invención para su uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta de linfocitos T específicos de antígenos) en un sujeto que comprende administrar el anticuerpo al sujeto de tal manera que se estimula una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta de linfocitos T específicos de antígenos). En una realización preferida, el sujeto es un sujeto que tiene un tumor y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor. En otra realización preferida, el sujeto es un sujeto que tiene un virus y se estimula una respuesta inmunitaria contra el virus.

25 En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método para inhibir el crecimiento de las células tumorales en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo de tal manera que se inhibe dicho crecimiento del tumor en el sujeto. En otra realización adicional, 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 tal manera que se trata la infección vírica en el sujeto.

Estos y otros métodos de la invención se describen en detalle a continuación.

35 *Cáncer*

El bloqueo de LAG-3 por anticuerpos puede potenciar la respuesta inmunitaria a células cancerosas en el paciente. En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo dirigido contra LAG-3 de la presente invención para su uso en el tratamiento de un sujeto *in vivo* de tal manera que se inhibe dicho crecimiento de tumores cancerosos. Se puede usar un anticuerpo dirigido contra LAG-3 en solitario para inhibir el crecimiento de tumores cancerosos. Como alternativa, se puede usar un anticuerpo dirigido contra LAG-3 junto con otros agentes inmunógenos, tratamientos convencionales contra el cáncer, u otros anticuerpos, como se describe más adelante.

45 En consecuencia, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo dirigido contra LAG-3, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la invención 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 dirigido contra LAG-3, o una porción de unión a antígeno del mismo. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo dirigido contra LAG-3 humano (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos dirigidos contra LAG-3 humano descritos en el presente documento). De manera adicional o alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo dirigido contra LAG-3 quimérico o humanizado.

50 Los cánceres preferidos cuyo crecimiento puede inhibirse utilizando los anticuerpos de la invención incluyen cánceres normalmente sensibles a la inmunoterapia. Los ejemplos no limitantes de cánceres preferidos para el tratamiento incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata refractario a hormonas), cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico). Asimismo, la invención incluye neoplasias resistentes a tratamiento o recurrentes cuyo crecimiento puede inhibirse utilizando los anticuerpos de la invención.

60 Los ejemplos de otros cánceres que se pueden tratar utilizando los anticuerpos de la invención incluyen cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular maligno, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículo, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cuello de útero, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, leucemias crónicas o agudas que incluyen leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica

crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o de uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma de la pituitaria, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer escamocelular, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos ambientalmente que incluyen aquellos inducidos por asbesto, y las combinaciones de dichos cánceres. La presente invención es también útil para el tratamiento de cánceres metastásicos, especialmente cánceres metastásicos que expresan PD-L1 (Iwai et al. (2005) *Int. Immunol.* 17:133-144).

Opcionalmente, los anticuerpos contra LAG-3 se pueden combinar con un agente inmunógeno, tal como células bacterianas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos, y moléculas de hidratos de carbono), células, y células transfectadas con genes que codifican citoquinas estimulantes inmunitarias (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Los ejemplos no limitantes de vacunas tumorales que se pueden usar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como los péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citoquina GM-CSF (descritas adicionalmente a continuación).

En los seres humanos, algunos tumores han mostrado ser inmunógenos tales como los melanomas. Al aumentar el umbral de activación de los linfocitos T mediante el bloqueo de LAG-3, pueden activarse las respuestas tumorales del hospedador.

Es probable que el bloqueo de LAG-3 sea más eficaz cuando se combina con un protocolo de vacunación. Se han ideado 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. y Sznol, M., *Cancer Vaccines*, cap. 61, pp. 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. Estas vacunas celulares han mostrado ser más eficaces cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. GM-CSF ha mostrado ser un potente activador de la presentación de antígenos para la vacunación tumoral (Dranoff et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43).

El estudio de la expresión génica y de los modelos de expresión génica a gran escala en diversos tumores ha conducido a la definición de los denominados antígenos específicos del tumor (Rosenberg, SA (1999) *Immunity* 10: 281-7). En muchos casos, estos antígenos específicos de tumor son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula de la que surge el tumor, por ejemplo, antígenos gp100 de melanocitos, antígenos MAGE, y Trp-2. De forma más importante, muchos de estos antígenos pueden mostrar ser las dianas de linfocitos T específicos de tumores que se encuentran en el hospedador. Se puede usar el bloqueo de LAG-3 junto con una serie de proteínas y/o péptidos recombinantes en un tumor a fin de generar una respuesta inmunitaria a estas proteínas. El sistema inmunitario suele considerar estas proteínas como autoantígenos y, por tanto, son tolerantes a ellas. El antígeno tumoral puede incluir la proteína telomerasa, que es necesaria para la síntesis de los telómeros de los cromosomas y que se expresa en más del 85 % de cánceres humanos y solamente en un número limitado de tejidos somáticos (Kim et al. (1994) *Science* 266: 2011-2013). (Estos tejidos somáticos pueden protegerse del ataque inmunitario por diversos medios). Los antígenos tumorales pueden ser también "neoantígenos" expresados en células cancerosas debido a mutaciones somáticas que alteran la secuencia de proteínas o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (es decir, bcr-abl en el cromosoma Philadelphia), o el idiotipo de tumores de linfocitos B.

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

Las células dendríticas (CD) son potentes células presentadoras de antígenos que se pueden usar para estimular respuestas específicas a antígenos. Las CD pueden producirse *ex vivo* y cargarse con diversos antígenos de proteínas y péptidos así como extractos de células tumorales (Nestle et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). Las CD pueden transducirse también por medios genéticos para expresar también estos antígenos tumorales. Las CD se han fusionado también directamente a células tumorales con fines de inmunización (Kugler et al. (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). Como método de inmunización, la inmunización con CD puede combinarse eficazmente con el bloqueo de LAG-3 para activar respuestas antitumorales más potentes.

El bloqueo de LAG-3 puede combinarse también con tratamientos contra el cáncer convencionales. El bloqueo de LAG-3 puede combinarse eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, puede ser posible reducir la dosis de reactivo quimioterapéutico administrada (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Un

ejemplo de dicha combinación es un anticuerpo dirigido contra LAG-3 combinado con descarbazina para el tratamiento del melanoma. Otro ejemplo de dicha combinación es un anticuerpo dirigido contra LAG-3 combinado con interleucina-2 (IL-2) para el tratamiento del melanoma. La lógica científica subyacente al uso combinado del bloqueo de LAG-3 y la quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de compuestos quimioterapéuticos, debería dar como resultado mayores niveles de antígeno tumoral en la ruta de presentación del antígeno. Otros tratamientos combinados que pueden dar como resultado la sinergia con el bloqueo de LAG-3 a través de la célula son la radiación, la cirugía, y la privación de hormonas. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el hospedador. Pueden también combinarse los inhibidores de la angiogénesis con el bloqueo de LAG-3. La inhibición de la angiogénesis conduce a la muerte de células tumorales que pueden alimentar al antígeno tumoral en las rutas de presentación del antígeno al hospedador.

Se pueden usar también anticuerpos que bloquean LAG-3 en combinación con anticuerpos biespecíficos que dirigen las células efectoras que expresan el receptor Fc α o Fc γ hacia las células tumorales (véase, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos números 5.922.845 y 5.837.243). Se pueden usar anticuerpos biespecíficos que se dirijan a dos antígenos diferentes. Por ejemplo, se han utilizado anticuerpos biespecíficos dirigidos contra el receptor de FC/antígeno antitumoral (por ejemplo, Her-2/neu) para dirigir macrófagos a los sitios del tumor. Este direccionamiento puede activar más eficazmente respuestas específicas de tumor. El brazo de linfocitos T de estas respuestas aumentaría mediante el uso del bloqueo de LAG-3. Como alternativa, el antígeno puede administrarse directamente a las CD mediante el uso de anticuerpos biespecíficos que se unen al antígeno tumoral y al marcador superficial celular específico de células dendríticas.

Los tumores eluden la vigilancia inmunitaria del hospedador mediante una gran variedad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden superarse mediante la inactivación de las proteínas que expresan los tumores y que son inmunosupresoras. Estas incluyen entre otras TGF- β (Kehrl et al. (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-1050), IL-10 (Howard y O'Garra (1992) Immunology Today 13: 198-200), y ligando Fas (Hahne et al. (1996) Science 274: 1363-1365). Los anticuerpos de cada una de estas entidades se pueden usar junto con un anticuerpo dirigido contra LAG-3 para contrarrestar los efectos del agente inmunosupresor y favorecer las respuestas inmunitarias tumorales del hospedador.

Se pueden usar otros anticuerpos que activan la sensibilidad inmunitaria del hospedador junto con el anticuerpo dirigido contra LAG-3. Estos incluyen moléculas sobre la superficie de células dendríticas que activan la función CD y la presentación del antígeno. Los anticuerpos dirigidos contra CD40 son capaces de sustituir eficazmente la actividad de los linfocitos T auxiliares (Ridge et al. (1998) Nature 393: 474-478) y se pueden usar junto con los anticuerpos dirigidos contra LAG-3 (Ito et al. (2000) Immunobiology 201 (5) 527-40). Anticuerpos activadores de las moléculas coestimulantes de los linfocitos T tales como CTLA-4 (por ejemplo, patente de Estados Unidos 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) pueden proporcionar también niveles aumentados de activación de linfocitos T.

El trasplante de médula ósea se usa actualmente para tratar varios tumores de origen hematopoyético. Aunque la enfermedad de injerto frente a hospedador es una consecuencia de este tratamiento, puede obtenerse un beneficio terapéutico del injerto frente a las respuestas tumorales. Se puede usar el bloqueo de LAG-3 para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos de tumor injertados en el donante.

Existen también varios protocolos de tratamiento experimentales que implican la activación y expansión *ex vivo* de linfocitos T específicos de antígenos y la transferencia adoptiva de estas células en receptores a fin de estimular los linfocitos T específicos de antígenos frente al tumor (Greenberg & Riddell (1999) Science 285: 546-51). Estos métodos se pueden usar también para activar respuestas de los linfocitos T a agentes infecciosos tales como CMV. La activación *ex vivo* en presencia de anticuerpos dirigidos contra LAG-3 puede aumentar la frecuencia y la actividad de los linfocitos T transferidos adoptivamente.

Enfermedades infecciosas

Adicionalmente, Se describen en el presente documento métodos que se utilizan para tratar pacientes que se han expuesto a toxinas o patógenos concretos. En consecuencia, se describe en el presente documento un método para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo dirigido contra LAG-3, o la porción de unión a antígeno del mismo, de tal manera que el sujeto se trata para la enfermedad infecciosa. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano dirigido contra LAG-3 humano (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos dirigidos contra LAG-3 humano descritos en el presente documento). De manera adicional o alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado.

Similar a su aplicación a los tumores que se ha descrito anteriormente, el bloqueo de LAG-3 mediado por anticuerpo se puede usar solo, o como un adyuvante, en combinación con vacunas, para estimular la respuesta inmunitaria a patógenos, toxinas, y autoantígenos. Los ejemplos de patógenos para los cuales esta solución terapéutica puede ser particularmente útil incluyen patógenos para los cuales no existe actualmente vacuna eficaz, o patógenos para los cuales las vacunas convencionales son menos que completamente eficaces. Estas incluyen,

aunque no de forma limitativa VIH, Hepatitis (A, B, y C), gripe, herpes, giardia, malaria, Leishmania, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa. El bloqueo de LAG-3 es particularmente útil frente a las infecciones establecidas por agentes tales como VIH que presentan antígenos alterados durante el curso de las infecciones. Estos novedosos epítomos son reconocidos como extraños en el momento de la administración del anticuerpo dirigido contra LAG-3 humano, provocando de esta manera una fuerte respuesta de linfocitos T que no está amortiguada por señales negativas a través de LAG-3.

Algunos ejemplos de virus patógenos que producen infecciones tratables por anticuerpos dirigidos contra LAG-3, o porciones de unión a antígeno del mismo, de la invención incluyen VIH, hepatitis (A, B, o C), virus del herpes (por ejemplo, VZV, VHS-1, VHA-6, VHS-II, y CMV, virus de Epstein-Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus de coxackie, coronavirus, virus sincitial respiratorio, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubeola, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus del dengue, virus del papiloma, virus de moluscos, poliovirus, virus de la rabia, virus JC y virus de la encefalitis arbovívica.

Algunos ejemplos de bacterias patógenas que producen infecciones tratables por los métodos descritos en el presente documento incluyen clamidias, bacterias rickettsiales, micobacterias, estafilococos, estreptococos, pneumococos, meningococos y gonococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionela, difteria, salmonela, bacilos, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospirosis, y bacterias de la enfermedad de Lyme.

Algunos ejemplos de hongos patógenos que producen infecciones tratables por los métodos descritos en el presente documento incluyen Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis, etc.), Cryptococcus neoformans, Aspergillus (fumigatus, niger, etc.), Géneros de Mucorales (mucor, absidia, rhizopus), Sporothrix schenckii, Blastomyces dermatitidis, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis e Histoplasma capsulatum.

Algunos ejemplos de parásitos patógenos que producen infecciones tratables por los métodos descritos en el presente documento 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 gondii, Nippostrongylus brasiliensis.

En todos los métodos anteriores, el bloqueo de LAG-3 puede combinarse con otras formas de inmunoterapia tales como tratamiento con citoquinas (por ejemplo, interferones, GM-CSF, G-CSF, IL-2), o tratamiento con anticuerpos biespecíficos, que proporcionan una presentación potenciada de antígenos tumorales (véanse, *por ejemplo*, Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak (1994) Structure 2:1121-1123).

Reacciones autoinmunitarias

Los anticuerpos dirigidos contra LAG-3 pueden provocar y amplificar respuestas autoinmunitarias. De hecho, la inducción de respuestas antitumorales utilizando células tumorales y vacunas peptídicas describe que muchas respuestas antitumorales implican antiautorreactividades (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) anteriormente citado; Rosenberg y White (1996) J. Immunother Emphasis Tumor Immunol 19 (1): 81-4). Por lo tanto, es posible considerar la utilización del bloqueo dirigido contra LAG-3 junto con diversas autoproteínas a fin de concebir protocolos de vacunación para generar eficazmente respuestas inmunitarias contra estas autoproteínas para el tratamiento de la enfermedad. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer implica la acumulación inadecuada del péptido A β en depósitos amiloides en el cerebro; las respuestas de los anticuerpos contra el amiloide son capaces de aclarar estos depósitos amiloides (Schenk et al., (1999) Nature 400: 173-177).

Se pueden usar también otras autoproteínas como dianas tales como IgE para el tratamiento de la alergia y el asma, y TNF α para la artritis reumatoide. Finalmente, se pueden inducir respuestas de anticuerpos a diversas hormonas mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra LAG-3. Se pueden usar las respuestas de los anticuerpos neutralizantes a las hormonas reproductoras para la contracepción. Se puede considerar también la respuesta de los anticuerpos a las hormonas y otros factores solubles que se requieren para el crecimiento de tumores concretos como posibles dianas de vacunación.

Se pueden considerar métodos análogos a los que se han descrito anteriormente para el uso de un anticuerpo dirigido contra LAG-3 en la inducción de respuestas autoinmunitarias terapéuticas para tratar pacientes que tienen una acumulación inadecuada de otros autoantígenos, tales como depósitos de amiloide, incluyendo A β en la enfermedad de Alzheimer, citoquinas tales como TNF α , e IgE.

Vacunación

Se pueden usar anticuerpos dirigidos contra LAG-3 para estimular respuestas inmunitarias específicas de antígenos mediante la coadministración de un anticuerpo dirigido contra LAG-3 con un antígeno de interés (por ejemplo, una vacuna). En consecuencia, se describe en el presente documento un método para potenciar una respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto que comprende administrar al sujeto: (i) el antígeno; y (ii) un anticuerpo dirigido contra LAG-3, o la porción de unión a antígeno del mismo, de tal manera que se potencia una

respuesta inmunitaria en el sujeto. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano dirigido contra LAG-3 humano (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos dirigidos contra LAG-3 humano descritos en el presente documento). De manera adicional o 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
 5 procedente de un patógeno. Los ejemplos no limitantes de dichos antígenos incluyen los descritos en las secciones anteriores, tales como los antígenos tumorales (o vacunas tumorales) analizados anteriormente, o antígenos procedentes de virus, bacterias u otros patógenos descritos anteriormente.

Las rutas adecuadas para administrar las composiciones de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y se pueden seleccionar por las personas normalmente expertas en la materia. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos se pueden administrar mediante inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosificaciones adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y de la concentración y/o la formulación de la composición de anticuerpo.
 10

Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos dirigidos contra LAG-3 humano de la invención pueden coadministrarse con uno o más agentes terapéuticos, *por ejemplo*, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede unirse al agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar por separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o puede coadministrarse con otros tratamientos conocidos, *por ejemplo*, una terapia dirigida contra el cáncer, *por ejemplo*, radiación. Dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), sulfato de cisplatino bleomicina, carmustina, clorambucilo, dacarbazina y ciclofosfamida hidroxurea que, por sí mismos, son solo eficaces a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. Cisplatino se administra por vía intravenosa como una dosis de 100 mg/ml una vez cada cuatro semanas y se administra adriamicina por vía intravenosa como una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La coadministración de los anticuerpos dirigidos contra LAG-3 humano, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerosos que funcionan mediante diferentes mecanismos que dan como resultado un efecto citotóxico en células tumorales humanas. Dicha coadministración puede resolver problemas debido al desarrollo de resistencia a los fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que les volvería no reactivos con el anticuerpo.
 15
 20
 25
 30

También se incluyen en el alcance de la presente invención kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o inmunoconjugados) e instrucciones para el uso. El kit puede contener además un reactivo adicional, o uno o más anticuerpos humanos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo de un antígeno LAG-3 distinto del primer anticuerpo humano). Los kits incluyen normalmente una marca indicativa del uso previsto del contenido del kit. El término marca incluye cualquier material escrito, o grabado suministrado sobre o con el kit, o que acompaña de otra forma al kit.
 35

40 Terapia de combinación

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo dirigido contra LAG-3 (o una porción de unión a antígeno del mismo) de la invención para su uso en un método de tratamiento combinado en el que el anticuerpo dirigido contra LAG-3 (o la porción de unión a antígeno del mismo) se coadministra con uno o más anticuerpos adicionales que son eficaces para estimular respuestas inmunitarias para potenciar, estimular o regular en exceso todavía más las respuestas inmunitarias de un sujeto. En una realización, la invención proporciona un anticuerpo dirigido contra LAG-3 de la invención para su uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y uno o más anticuerpos inmunoestimulantes adicionales, tales como un anticuerpo dirigido contra PD-1, un anticuerpo dirigido contra PD-L1 y/o un anticuerpo dirigido contra CTLA-4, de tal manera que se estimula una respuesta inmunitaria en el sujeto, por ejemplo, para inhibir el crecimiento tumoral o para estimular una respuesta antivírica. En otra realización, se administra al sujeto un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y un anticuerpo dirigido contra PD-1. En otra realización adicional más, se administra al sujeto un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y un anticuerpo dirigido contra PD-L1. En otra realización adicional, se administra al sujeto un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y un anticuerpo dirigido contra CTLA-4. En una realización, el anticuerpo dirigido contra LAG-3 es un anticuerpo humano, tal como un anticuerpo de la divulgación. Como alternativa, el anticuerpo dirigido contra LAG-3 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado (por ejemplo, preparado a partir de un mAb de ratón dirigido contra LAG-3). En otra realización, el al menos un anticuerpo inmunoestimulante adicional (por ejemplo, el anticuerpo dirigido contra PD-1, dirigido contra PD-L1 y/o dirigido contra CTLA-4) es un anticuerpo humano. Como alternativa, el al menos un anticuerpo inmunoestimulante adicional puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado (por ejemplo, preparado a partir de un anticuerpo de ratón dirigido contra PD-1, PD-L1 y CTLA-4).
 45
 50
 55
 60

Adicionalmente, se describe en el presente documento un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer), que comprende administrar un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y un anticuerpo dirigido contra CTLA-4 a un sujeto. El anticuerpo dirigido contra LAG-3 puede administrarse a una dosis subterapéutica, el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 se administra a una dosis subterapéutica, o ambos se administran a una dosis
 65

subterapéutica. Adicionalmente, se describe en el presente documento un método para alterar un acontecimiento adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulante, que comprende administrar un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y una dosis subterapéutica de anticuerpo dirigido contra CTLA-4 a un sujeto. El sujeto puede ser un ser humano. El anticuerpo dirigido contra CTLA-4 puede ser un anticuerpo monoclonal 10D1 de secuencia humana (descrito en la publicación PCT WO 01/14424) y el anticuerpo dirigido contra LAG-3 puede ser un anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como LAG3.5 descrito en el presente documento. Otros anticuerpos dirigidos contra CTLA-4 abarcados por los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, los desvelados en: los documentos 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(14S): resumen n.º 2505 (anticuerpo CP-675206); y Mokyry et al. (1998) Cancer Res. 58:5301-5304. En determinadas realizaciones, el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 se une a CTLA-4 humano con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, se une a CTLA-4 humano con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, se une a CTLA-4 humano con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, o se une a CTLA-4 humano con una K_D de entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M o menos.

Adicionalmente, se describe en el presente documento un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer), que comprende administrar un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y un anticuerpo dirigido contra PD-1 a un sujeto. El anticuerpo dirigido contra LAG-3 puede administrarse a una dosis subterapéutica, el anticuerpo dirigido contra PD-1 se administra a una dosis subterapéutica, o ambos se administran a una dosis subterapéutica. Adicionalmente, se describe en el presente documento un método para alterar un acontecimiento adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulante, que comprende administrar un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y una dosis subterapéutica de anticuerpo dirigido contra PD-1 a un sujeto. El sujeto puede ser un ser humano. El anticuerpo dirigido contra PD-1 puede ser un anticuerpo monoclonal de secuencia humana y el anticuerpo dirigido contra LAG-3 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como LAG3.5 descrito en el presente documento. Los ejemplos de anticuerpos dirigidos contra PD-1 de secuencia humana incluyen 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 y 4A11, que se describen en la publicación PCT WO 06/121168. Otros anticuerpos dirigidos contra PD-1 incluyen, por ejemplo, lambrolizumab (documento WO2008/156712), y AMP514 (documentos WO2010/027423, WO2010/027827, WO2010/027828, WO2010/098788). El anticuerpo dirigido contra PD-1 se puede unir a PD-1 humano con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, se une a PD-1 con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, se une a PD-1 con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, o se une a PD-1 humano con una K_D de entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M o menos.

Adicionalmente, se describe en el presente documento un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer) que comprende administrar un anticuerpo contra LAG-3 y un anticuerpo contra PD-L1 a un sujeto. El anticuerpo dirigido contra LAG-3 puede administrarse a una dosis subterapéutica, el anticuerpo dirigido contra PD-L1 puede administrarse a una dosis subterapéutica, o ambos se pueden administrar a una dosis subterapéutica. Adicionalmente, se describe en el presente documento un método para alterar un acontecimiento adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulante que comprende administrar un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y una dosis subterapéutica de un anticuerpo dirigido contra PD-L1 a un sujeto. El sujeto puede ser un ser humano. El anticuerpo dirigido contra PD-L1 puede ser un anticuerpo monoclonal de secuencia humana y el anticuerpo dirigido contra LAG-3 puede ser un anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como LAG3.5 descrito en el presente documento. Los ejemplos de anticuerpos dirigidos contra 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. Otros anticuerpos dirigidos contra PD-L1 incluyen, por ejemplo, MPDL3280A (RG7446) (documento WO2010/077634), MEDI4736 (documento WO2011/066389), y MDX1105 (documento WO20071005874). El anticuerpo dirigido contra PD-L1 puede unirse a PD-L1 humano con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, se une a PD-L1 humano con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, se une a PD-L1 humano con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, o se une a PD-L1 humano con una K_D de entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M o menos.

El bloqueo de LAG-3 y uno o más segundos antígenos diana tales como CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 por anticuerpos puede potenciar la respuesta inmunitaria a células cancerosas en el paciente. Los cánceres cuyo crecimiento puede inhibirse utilizando los anticuerpos de la presente descripción incluyen cánceres normalmente sensibles a la inmunoterapia. Los ejemplos representativos de cánceres a tratar con la terapia de combinación de la presente descripción incluyen aquellos cánceres específicamente relacionados anteriormente en la descripción de la monoterapia con los anticuerpos dirigidos contra LAG-3.

En determinadas realizaciones, la combinación de los anticuerpos terapéuticos descritos en el presente documento puede administrarse simultáneamente como una composición única en un vehículo farmacéuticamente aceptable, o simultáneamente como composiciones separadas con cada anticuerpo en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la combinación de anticuerpos terapéuticos puede administrarse secuencialmente. Por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y/o un anticuerpo dirigido contra LAG-3 se pueden administrar secuencialmente, de tal manera que se administra en primer lugar un anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y se administra en segundo lugar un anticuerpo dirigido contra LAG-3, o se administra en primer lugar un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y en segundo lugar anticuerpo dirigido contra CTLA-4. De manera adicional o alternativa, un anticuerpo dirigido contra PD-1 y/o un anticuerpo dirigido contra LAG-3 se pueden administrar secuencialmente, de tal manera que se administra en primer lugar un anticuerpo dirigido contra PD-1 y se administra en segundo lugar un anticuerpo dirigido contra LAG-3, o se administra en primer lugar un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y en segundo

lugar anticuerpo dirigido contra PD-1. De manera adicional o alternativa, un anticuerpo dirigido contra PD-L1 y un anticuerpo dirigido contra LAG-3 se pueden administrar secuencialmente, de tal manera que se administra en primer lugar un anticuerpo dirigido contra PD-L1 y se administra en segundo lugar un anticuerpo dirigido contra LAG-3, o se administra en primer lugar un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y se administra en segundo lugar un anticuerpo dirigido contra PD-L1.

Además, si se administra secuencialmente más de una dosis de la terapia de combinación, puede invertirse el orden de la administración secuencial o mantenerse en el mismo orden en cada punto temporal de administración, las administraciones secuenciales pueden combinarse con administraciones simultáneas, o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, la primera administración de una combinación de un anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y un anticuerpo dirigido contra LAG-3 puede ser concurrente, la segunda administración puede ser secuencial con el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 primero y el anticuerpo dirigido contra LAG-3 segundo, y la tercera administración puede ser secuencial, primero con un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y segundo con un anticuerpo dirigido contra CTLA-4, etc. De manera adicional o alternativa, la primera administración de una combinación de un anticuerpo dirigido contra PD-1 y un anticuerpo dirigido contra LAG-3 puede ser concurrente, la segunda administración puede ser secuencial, primero con un anticuerpo dirigido contra PD-1 y segundo con anticuerpo dirigido contra LAG-3, y la tercera administración puede ser secuencial, primero con un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y segundo con un anticuerpo dirigido contra PD-1, etc. De manera adicional o alternativa, la primera administración de una combinación de un anticuerpo dirigido contra PD-L1 y un anticuerpo dirigido contra LAG-3 puede ser concurrente, la segunda administración puede ser secuencial primero con el anticuerpo dirigido contra PD-L1 y segundo con el anticuerpo dirigido contra LAG-3, y la tercera administración puede ser secuencial, primero con anticuerpo dirigido contra LAG-3 y segundo con el anticuerpo dirigido contra PD-L1, etc. Otro esquema de dosificación representativo puede implicar una primera administración que sea secuencial primero con el anticuerpo dirigido contra LAG-3 y segundo con el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 (y/o un anticuerpo dirigido contra PD-1 y/o un anticuerpo dirigido contra PD-L1), y las administraciones posteriores pueden ser concurrentes.

Opcionalmente, la combinación de un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y uno o más anticuerpos adicionales (por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra CTLA-4 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-1 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-L1) puede combinarse adicionalmente con un agente inmunógeno, tal como células bacterianas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos, y moléculas de hidratos de carbono), células, y células transfectadas con genes que codifican citoquinas inmunoestimulantes (He et al., (2004) J. Immunol. 173:4919-28). Los ejemplos no limitantes de vacunas tumorales que se pueden usar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como los péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citoquina GM-CSF (descritas adicionalmente a continuación). Un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 puede combinarse adicionalmente con un protocolo de vacunación, tal como cualquiera de los protocolos de vacunación descritos en detalle anteriormente con respecto a la monoterapia con anticuerpos dirigidos contra LAG-3.

Un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 puede combinarse también adicionalmente con tratamientos contra el cáncer convencionales. Por ejemplo, un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 puede combinarse eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, es posible reducir la dosis de otros reactivos quimioterapéuticos administrados junto con la combinación de la presente descripción (Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304). Un ejemplo de dicha combinación es una combinación de anticuerpos dirigidos contra LAG-3 y contra CTLA-4 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-1 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-L1 combinados adicionalmente con dacarbazina para el tratamiento del melanoma. Otro ejemplo es una combinación de anticuerpos dirigidos contra LAG-3 y contra CTLA-4 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-1 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-L1 combinados adicionalmente con interleucina-2 (IL-2) para el tratamiento del melanoma. La lógica subyacente al uso combinado del bloqueo de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y junto con la quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de compuestos quimioterapéuticos, debería dar como resultado mayores niveles de antígeno tumoral en la ruta de presentación del antígeno. Otras terapias de combinación que pueden dar como resultado una sinergia con un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 mediante la muerte celular incluyen radiación, la cirugía, o privación de hormonas. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el hospedador. Los inhibidores de la angiogénesis pueden también combinarse con un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1. La inhibición de la angiogénesis conduce a la muerte de las células tumorales, que pueden ser una fuente del antígeno tumoral introducido en las rutas de presentación del antígeno del hospedador.

Se puede usar también una combinación de anticuerpos que bloquean LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 junto con anticuerpos biespecíficos que dirigen las células efectoras que expresan el receptor Fc α o Fc γ hacia las células tumorales (véanse, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos números 5.922.845 y 5.837.243). Se pueden usar anticuerpos biespecíficos que se dirijan a dos antígenos diferentes. El grupo del linfocito T de estas respuestas se aumentaría 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 usar una combinación de anticuerpos dirigidos contra LAG-3 y contra CTLA-4 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-1 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-L1 junto con anticuerpos antineoplásicos, tales como Rituxan[®] (rituximab), Herceptin[®] (trastuzumab), Bexxar[®] (tositumomab), Zevalin[®] (ibratumomab), Campath[®]

- (alemtuzumab), Lymphocide® (epruzumab), Avastin® (bevacizumab), y Tarceva® (erlotinib), y similares. A modo de ejemplo y sin desear quedar ligados a teoría alguna, el tratamiento con un anticuerpo anticanceroso o un anticuerpo anticanceroso conjugado a una toxina puede conducir a la muerte de las células cancerosas (por ejemplo, células tumorales) que potenciarían una respuesta inmunitaria mediada por CTLA-4, PD-1, PD-L1 o LAG-3. En una realización ilustrativa, un tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, un tumor canceroso) puede incluir un anticuerpo anticanceroso junto con anticuerpos dirigidos contra LAG-3 y contra CTLA-4 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-1 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-L1, de forma concurrente o secuencial o cualquier combinación de las mismas, que puedan potenciar respuestas inmunitarias antitumorales del hospedador.
- Los tumores eluden la vigilancia inmunitaria del hospedador mediante una gran variedad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden superarse por la inactivación de las proteínas, que se expresan por los tumores y que son inmunosupresoras. Estas incluyen, entre otros, TGF- β (Kehrl et al. (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-1050), IL-10 (Howard y O'Garra (1992) Immunology Today 13: 198-200), y ligando Fas (Hahne et al. (1996) Science 274: 1363-1365). En otro ejemplo, los anticuerpos de cada una de estas entidades pueden combinarse adicionalmente con una combinación de un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y contra CTLA-4 y/o un anticuerpo dirigido contra PD-1 y/o un anticuerpo dirigido contra PD-L1 para contrarrestar los efectos de los agentes inmunosupresores y favorecer las respuestas inmunitarias antitumorales del hospedador.
- Otros anticuerpos que se pueden usar para activar la sensibilidad inmunitaria del hospedador pueden utilizarse adicionalmente junto con una combinación de anticuerpos dirigidos contra LAG-3 y contra CTLA-4 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-1 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-L1. Estos incluyen moléculas sobre la superficie de células dendríticas que activan la función CD y la presentación del antígeno. Los anticuerpos dirigidos contra CD40 (Ridge *et al.*, anteriormente citado) se pueden usar junto con una combinación de anticuerpos dirigidos contra LAG-3 y contra CTLA-4 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-1 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-L1 (Ito *et al.*, anteriormente citado). Otros anticuerpos activadores de moléculas coestimulantes de linfocitos T, Weinberg *et al.*, anteriormente citado, Melero *et al.* anteriormente citado, Hutloff *et al.*, anteriormente citado) pueden proporcionar también niveles aumentados de activación de linfocitos T.
- Tal como se ha analizado anteriormente, el trasplante de médula ósea se usa actualmente para tratar varios tumores de origen hematopoyético. Se puede usar 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 de tumor injertados en el donante.
- Algunos protocolos de tratamiento experimental implican la activación y expansión *ex vivo* de linfocitos T específicos de antígenos y la transferencia adoptiva de estas células a receptores para estimular los linfocitos T específicos de antígenos frente al tumor (Greenberg y Riddell, *anteriormente citado*). Estos métodos se pueden usar también para activar respuestas de los linfocitos T a agentes infecciosos tales como CMV. La activación *ex vivo* en presencia de anticuerpos dirigidos contra LAG-3 y contra CTLA-4 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-1 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-L1 puede aumentar la frecuencia y la actividad de los linfocitos T transferidos adoptivamente.
- Adicionalmente, se describe en el presente documento un método para alterar un acontecimiento adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer) con un agente inmunoestimulante, que comprende administrar un anticuerpo dirigido contra LAG-3 y una dosis subterapéutica de un anticuerpo dirigido contra CTLA-4 y/o contra PD-1 y/o contra PD-L1 a un sujeto. Por ejemplo, dichos métodos incluyen un método para reducir la incidencia de la colitis o diarrea inducida por anticuerpos terapéuticos inmunoestimulantes administrando un esteroide no absorbible al paciente. Puesto que cualquier paciente que reciba un anticuerpo terapéutico inmunoestimulante está en riesgo de desarrollar colitis o diarrea inducida por dicho anticuerpo, esta población completa de pacientes es adecuada para el tratamiento de acuerdo con los métodos de la presente invención. Aunque se han administrado esteroides para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y evitar agravamientos de la EII, no se han utilizado para prevenir (disminuir la incidencia) de la EII en pacientes a los que no se les ha diagnosticado EII. Los efectos secundarios significativos asociados con los esteroides, incluso con los esteroides no absorbibles, han desaconsejado el uso profiláctico.
- En realizaciones adicionales, un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 (es decir, anticuerpos terapéuticos inmunoestimulantes dirigidos contra LAG-3 y contra CTLA-4 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-1 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-L1) se pueden combinar adicionalmente con el uso de cualquier esteroide no absorbible. Tal como se usa en el presente documento, un "esteroide no absorbible" es un glucocorticoide que presenta un amplio metabolismo de primer paso, de tal manera que, tras el metabolismo en el hígado, la biodisponibilidad del esteroide es baja, *es decir*, menos de aproximadamente un 20 %. En una realización de la invención, el esteroide no absorbible es budesonida. La budesonida es un glucocorticosteroide que actúa localmente, que se metaboliza extensamente, principalmente por el hígado, tras la administración oral. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) es una formulación oral de budesonida dependiente del pH y del tiempo desarrollada para optimizar la administración del fármaco en el íleo y a lo largo del colon. ENTOCORT EC® está autorizado en Estados Unidos para el tratamiento de la enfermedad de Crohn leve a moderada que implica el íleo y/o el colon ascendente. La dosificación oral usual 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 absorberse y retenerse en la mucosa del intestino. Una vez que pasa a través del tejido diana de la mucosa del intestino, ENTOCORT EC® se metaboliza extensamente por el

sistema del citocromo P450 en el hígado a metabolitos con actividad glucocorticoide despreciable. Por lo tanto, la biodisponibilidad es baja (aproximadamente un 10 %). La baja disponibilidad de budesonida da como resultado una relación terapéutica mejorada en comparación con otros glucocorticoides con metabolismo de primer paso menos extenso. La budesonida da como resultado pocos efectos secundarios, incluyendo menos supresión hipotálamica-pituitaria, que los corticosteroides que actúan sistémicamente. Sin embargo, la administración crónica de ENTOCORT EC[®] puede dar como resultado efectos glucocorticoides sistémicos tales como hipercorticismismo y supresión adrenal. Véase el PDR 58^o ed. 2004; 608-610.

En realizaciones preferidas adicionales, un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 (es decir, anticuerpos terapéuticos inmunoestimulantes dirigidos contra LAG-3 y contra CTL-4 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-1 y/o contra PD-L1) junto con un esteroide no absorbible se pueden combinar adicionalmente 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 US; CANASA[®], Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA[®], Solvay).

De acuerdo con los métodos de la presente invención, un salicilato administrado junto con anticuerpos dirigidos contra LAG-3 y contra CTL-4 y/o anticuerpos dirigidos contra PD-1 y/o contra PD-L1 y un esteroide no absorbible puede incluir cualquier administración solapante o secuencial del salicilato y del esteroide no absorbible para disminuir la incidencia de la colitis inducida por los anticuerpos inmunoestimulantes. De este modo, por ejemplo, los métodos para reducir la incidencia de la colitis inducida por los anticuerpos inmunoestimulantes de acuerdo con la presente invención abarca administrar un salicilato y un esteroide no absorbible de forma concurrente o secuencial (por ejemplo, se administra un salicilato 6 horas después de un esteroide no absorbible), o cualquier combinación de las mismas. Adicionalmente, de acuerdo con la presente invención, se pueden administrar un salicilato y un esteroide no absorbible por la misma ruta (por ejemplo, ambos se administran por vía oral) o por diferentes rutas (por ejemplo, se administra un salicilato por vía oral y se administra un esteroide no absorbible por vía rectal), que puede diferir de la(s) ruta(s) utilizadas para administrar los anticuerpos dirigidos contra LAG-3 y contra CTLA-4 y/o los anticuerpos dirigidos contra PD-1 y/o contra PD-L1.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no deben considerarse como una limitación adicional. Se hace una referencia concreta a las publicaciones PCT WO 09/045957, WO 09/073533, WO 09/073546, y WO 09/054863.

Ejemplos

Ejemplo 1: Diseño de variantes de LAG3.1 (Anticuerpo 25F7)

Se crearon variantes de anticuerpos del anticuerpo dirigido contra LAG-3 anteriormente descrito, 25F7, denominado en el presente documento como LAG3.1, analizando en primer lugar la secuencia de aminoácidos del anticuerpo para los sitios potenciales de degradación. Se llevó a cabo la expresión de la mutagénesis dirigida a sitio de la región V_H de LAG3.1 utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange II XL[®] (Agilent Technologies). A continuación se subclonaron las regiones V_H alteradas en vectores UCOE[®] (EMD Millipore) que contienen la región constante de IgG4-S228P humana. Cada uno de los diferentes vectores de la cadena pesada se cotransfectaron con un vector que expresaba la cadena kappa de LAG3.1 en células CHO-S, y se seleccionaron combinaciones estables para la expresión.

Se identificaron cinco motivos de desamidación potenciales en la CDR2 de la región variable de la cadena pesada. Estos sitios se localizaron en las posiciones 52, 54, 56, 58, y 60 de la región variable de la cadena pesada de LAG3.1 (SEQ ID NO: 2) (véase la Figura 1A). En particular, la desamidación de la secuencia "NG" de la CDR2 de la VH (SEQ ID NO: 6) se observó en todas las condiciones, así como la isomerización adicional de la secuencia. La desamidación del material de partida fue aproximadamente del 10 %. Adicionalmente, se descubrió que esta secuencia "NG" no corresponde a una secuencia de la línea germinal (véase la Figura 3). Sin embargo, la secuencia consenso de la línea germinal era un sitio de glicosilación potencial y, por lo tanto, no se incluyó entre las variantes de anticuerpos.

Se diseñaron cuatro variantes (denominadas en el presente documento LAG3.5, LAG3.6, LAG3.7, y LAG3.8) que resolvieron dos de los motivos de desamidación potenciales (posiciones 54 y 56), como se muestra en la Figura 3. Estas variantes se sometieron a una matriz de condiciones que se resume en la siguiente Tabla 1 y se analizaron las siguientes características: (a) estabildades química y térmica (estabilidad física); (b) cromatografía de exclusión por tamaño (agregación); (c) gel de centrado isoeléctrico (IEF) (heterogeneidad de carga); (d) actividad mediante el análisis Biacore (actividad de unión y funcional); y (e) cartografiado de péptidos mediante espectrometría de masas (modificaciones químicas/estabilidad molecular).

Tabla 1

Tampón	Acetato (NaCl 100 nM, manitol al 3 % p/v, Tween-20 al 0,03 %)	Citrato (NaCl 100 nM, manitol al 3 % p/v, Tween-20 al 0,03 %)
pH	5,5, 6,0, 6,5, 7,0	5,5, 6,0, 6,5, 7,0
Temperatura	4°C y 37°C	4°C y 37°C
Tiempo	0, 4, 8, 12 semanas	0, 4, 8, 12 semanas

Ejemplo 2: Caracterización de variantes de LAG-35 **1. Unión de linfocitos T CD4⁺ humanos activados**

Para ensayar la capacidad de las variantes de anticuerpos para unirse a LAG-3 humano natural sobre la superficie de los linfocitos T activados humanos, se estimularon células mononucleares de sangre periférica de un donante sano normal en placas de cultivo de tejidos de 15 cm a una densidad de 2x10⁶ células/ml, con una combinación de anticuerpo dirigido contra CD3 (eBioscience, n.º de catálogo 16-0037-85) y anticuerpo dirigido contra-CD28 (BD Bioscience, n.º de catálogo 555725) presentes en solución a 5 µg/ml y 3 µg/ml, respectivamente. Después de tres días de estimulación, las células se recogieron, se lavaron 1X con tampón 1x PFAE (1x PBS + FBS al 2 %, azida de sodio al 0,02 %, Na EDTA 2 mM), y se resuspendieron en tampón 1x PFAE para la tinción.

15 Para la reacción de unión, las variantes de LAG3.1 se diluyeron en serie con tampón 1x PFAE frío, a continuación se mezclaron 50 µl de solución de anticuerpo diluida con 50 µl de anticuerpo marcado con Fitc dirigido contra CD4 humano (BD Bioscience, n.º de catálogo 555346) diluido 1:16 en tampón 1x PFAE. Para la reacción de unión, 100 µl de esta mezcla de anticuerpos diluida se añadieron a 2 x 10⁵ células y la mezcla se incubó a 4 °C durante 30 minutos. A continuación las células se lavaron dos veces con tampón 1x PFAE. Una dilución 1:200 de anticuerpo de cabra marcado con PE dirigido contra anticuerpo específico de Fcγ humano (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109-116-170) se añadió a lo anterior y la mezcla se incubó durante 30 minutos a 4 °C, seguido por lavado dos veces con tampón 1x PFAE frío. Tras el lavado final, se añadieron 150 µl de 1x PFAE frío a cada solución y se llevó a cabo el análisis de la unión del anticuerpo mediante citometría de flujo usando el citómetro de flujo FACSCanto (BD Bioscience).

25 Los resultados del análisis de citometría de flujo se resumen en la Figura 4A, que es un gráfico que muestra la CE₅₀ para la unión del anticuerpo a linfocitos T CD4⁺ activados humanos. La Figura 4B es un gráfico que muestra la unión del anticuerpo a un antígeno LAG-3/Fc humano soluble mediante BIACORE. Tal como se muestra, las afinidades de unión de LAG3.5 y LAG3.8 son ligeramente menores, en comparación con LAG3.1, mientras que sus constantes de disociación son ligeramente mayores en comparación con LAG3.1.

30 **2. Estabilidad física**

Se ensayaron la estabilidad térmica y la desnaturalización térmica de las variantes utilizando Microcal VP-DSC. Específicamente, se diluyó cada variante en PBS (Mediatech n.º de catálogo 21-040-CV lote n.º 21040139). La concentración final de la muestra fue de 250 µg/ml tras la dilución en PBS. Se realizó un barrido de la muestra a 74 °C, se enfrió a 25 °C, y se recalentó a 74 °C. Se usó un tampón PBS como blanco control. Los datos se ajustaron a un modelo no de dos estados y se llevó a cabo el ajuste de la curva mediante el programa informático Origin.

40 Como se resume en la Tabla 2 y se muestra en la Figura 5, LAG3.5 tuvo una temperatura de fusión TM2 mayor que LAG3.1, indicando una mayor estabilidad global.

Tabla 2

MAb	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
	Corresponde a los dominios CH2 y/o Fab	Corresponde a los dominios CH3 y/o Fab
LAG3.1	70,7	75,7
LAG3.5	70,5	76,3
LAG3.6	67,8	70,8
LAG3.7	69,4	73,5
LAG3.8	70,3	75,4

45 El repliegado del anticuerpo tras la desnaturalización es una medida inversa del potencial de agregación a largo plazo. En consecuencia, se ensayaron también las variantes de LAG-3y se compararon en términos de reversibilidad

térmica. Específicamente, los anticuerpos se calentaron a 74 °C y se enfriaron a temperatura ambiente antes de calentarse de nuevo a 74 °C. La relación del área bajo la curva entre el segundo y el primer histograma proporciona la estimación de la reversibilidad térmica, que es una medida directa de la reversibilidad conformacional.

- 5 Como se resume en la Tabla 3 y se muestra en la Figura 6, LAG3.5 tuvo una reversibilidad térmica sustancialmente mayor que el resto de variantes. De forma notable, el porcentaje de reversibilidad de LAG3.5 (47 %) fue más del doble del de LAG3.1 (20 %). La reversibilidad térmica está fuertemente correlacionada con el potencial de agregación a largo plazo. Una reversibilidad menor corresponde a una agregación potencial mayor. Basándose en esta observación, LAG3.1 presentaría potencialmente una agregación sustancialmente mayor en el tiempo, en comparación con LAG3.5. De forma similar, el resto de variantes podrían presentar potencialmente una agregación sustancialmente mayor en el tiempo en comparación con LAG3.5.

Tabla 3

MAB	Reversibilidad térmica (%)
LAG3.1	20
LAG3.5	47
LAG3.6	0
LAG3.7	11
LAG3.8	26

3. Agregación

- 15 Se ensayaron también las variantes para determinar la estabilidad como medida de la agregación de proteínas utilizando HPLC de exclusión por tamaños convencional (SEC-HPLC) de acuerdo con el siguiente protocolo: se diluyeron muestras de ensayo del anticuerpo a 1,0 mg/ml con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se aplicaron 10 µl a un HPLC (Waters, modelo 2795). Se llevó a cabo la separación en una columna de filtración en gel (TOSOH Bioscience, TSKgel G3000 SWxl, 7,8 mm x 300 mm, n.º de producto 08541) utilizando una fase móvil de fosfato de sodio 0,1 M, cloruro de sodio 0,15 M, sulfato de sodio 0,1 M, pH 7,2. El analito se detectó por seguimiento de la absorbancia del UV a 280 nm, y la composición porcentual del área de pico del anticuerpo se determinó mediante el programa informático Empower. Como se muestra en la Tabla 4, LAG3.5 presentó una agregación sustancialmente reducida en comparación con LAG3.1.

Tabla 4

Muestra	Monómero IgG (% área de pico)	Agregado IgG (% área de pico)
LAG3.1	90	10
LAG3.5	96	4
LAG3.6	96	4
LAG3.7	95	5
LAG3.8	95	5

Ejemplo 3: Selección de variantes

- 30 Basándose en los estudios descritos anteriormente, se seleccionó la variante del anticuerpo LAG3.5 para análisis adicional, a la vista de su estabilidad física y química significativamente mejorada en comparación con su forma sin modificar (LAG3.1), particularmente su elevada capacidad de replegado conformacional (reversibilidad térmica). Este análisis incluía una solución en dos etapas de (a) estrés acelerado, (b) seguida por una evaluación de la estabilidad en tiempo real durante 12 semanas. Específicamente, se incubó LAG3.5 a 1,0 mg/ml a pH 8,0, en bicarbonato de amonio 50 mM, durante 5 días a 40 °C. Se analizó el grado de modificaciones después de 5 días, así como los efectos sobre la actividad y la estabilidad. A continuación, se sometió la variante de LAG3.5 a estabilidad en tiempo real en PBS durante un plazo de 12 semanas y se analizó posteriormente. A continuación se describen los resultados de estos estudios.

40 1. Unión al antígeno

- Como se muestra en la Figura 7 (y en la Tabla 5), no se observaron cambios en la unión al antígeno después de 5 días. Como también se muestra en las Figuras 10A y B, LAG3.5 no presentó cambios en la unión al antígeno ni en la estabilidad física después de 12 semanas. En particular, LAG3.5 mantiene una mayor afinidad que LAG3.8 durante el periodo completo de 12 semanas a 4 °C y 40 °C.

Tabla 5

ID clon	Antígeno	$K_D \times 10^{-9}$ (M)	$k_{on} \times 10^4$ (1/Ms)	$K_{off} \times 10^{-4}$ (1/s)
Lag3.1	PBS	0,21	166	3,44
	pH 8	0,20	184	3,61
Lag3.5	PBS	0,25	130	3,22
	pH 8	0,20	148	2,98
Lag3.8	PBS	0,25	147	3,68
	pH 8	0,25	162	4,02

2. Modificaciones químicas/Estabilidad molecular

- 5 Se utilizó el cartografiado de péptidos mediante espectrometría de masas para analizar la estabilidad química/molecular de LAG3.5 en comparación con LAG3.1. Específicamente, el anticuerpo purificado se redujo, se alquiló, se dializó, y se digirió con tripsina (catálogo de Promega, V5111) y GluC (Roche Cat. 11047817001). El resultado de las digestiones se analizó mediante espectrometría de masas nano-CL EMEM (Thermo Fisher LTQ Orbitrap).
- 10 Tal como se muestra en la Figura 8, LAG3.1 mostró una mayor heterogeneidad para V_H en comparación con LAG3.5 cuando se sometió a estabilidad acelerada a un pH mayor, que desamida los restos de asparagina (etapa 1). El cambio en la masa debido a la isomerización no se pudo detectar en las condiciones experimentales actuales. El cambio del porcentaje se expresa como un cociente de todos los cambios combinados respecto al pico precursor.
- 15 Además, como se muestra en la Figura 11, LAG3.1 mostró una mayor heterogeneidad para V_H en comparación con LAG3.5 cuando se sometió a estabilidad en tiempo real prolongada de 12 semanas, tanto a 4 °C como a 40 °C (etapa 2).

3. Estabilidad física

- 20 La reversibilidad térmica se midió en PBS a un pH 8,0. En ambas condiciones, LAG3.5 presentó de nuevo aproximadamente el doble de nivel de replegado en comparación con LAG3.1. Específicamente, como se muestra en las Tablas 6-8, LAG3.5 presentó un 43 % de replegado en comparación con un 18 % para LAG3.1 en PBS. LAG3.5 presentó también un 48 % de replegado en comparación con un 29 % de replegado para LAG3.1 a pH 8,0.
- 25

Tabla 6 - DSC:fusión

MAB	Condición	Tm1	Tm2
Lag3.1	PBS	70,7	75,7
Lag3.1	pH 8	70,4	75,6
Lag3.5	PBS	70,8	76,4
Lag3.5	pH 8	70,5	76,3

Tabla 7 - Fluorolog-2:desplegado

Mab/mutantes	Punto medio (M)	Agregación (M)
Lag3.1 PBS	1,99	-
Lag3.1 pH 8	2,08	-
Lag3.5 PBS	1,86	-
Lag3.5 pH 8	2,00	-

Tabla 8: DSC:replegado

MAB	% de reversibilidad en PBS	% de reversibilidad pH8
Lag3.1	18	29
Lag3.5	43	48

30 4. Heterogeneidad de carga

Para evaluar la heterogeneidad de carga, se analizaron las variantes utilizando isoelectroenfoque (IEF) con

marcadores convencionales de pl 5,5 y pl 10,0 en comparación con LAG3.1. En resumen, se aplicaron las soluciones de anticuerpo sobre un gel de IEF prefabricado de pl 3-7 de 1 mm de espesor (Invitrogen, n.º de catálogo EC6648BOX) junto con marcadores pl 3-10 (SERVA, n.º de cat. 39212). Se llevó a cabo la electroforesis utilizando un tampón de cátodo IEF 3-7 (Invitrogen, n.º de catálogo LC5370) y un tampón de ánodo IEF (Invitrogen, n.º de catálogo LC5300) y se aplicó la corriente eléctrica de aproximadamente 100 V constantes durante 1 h, 200 V constantes durante 1 h, y 500 V constantes durante 30 min. Los geles IEF se tiñeron con azul de Coomassie para detectar las bandas de proteínas y se destiñeron con una solución de metanol-ácido acético. A continuación, los geles IEF se analizaron mediante el programa informático ImageQuant TL. Basándose en este análisis (no se muestran los datos), LAG3.5 presentó significativamente menos heterogeneidad en comparación con LAG3.1.

5. HIC-HPLC

Para evaluar la solubilidad, se analizaron las variantes utilizando la cromatografía de interacción hidrófoba convencional (HIC-HPLC) de acuerdo con el siguiente protocolo: 50 ul de sulfato de amonio 2 M se añadieron a 50 ul de la muestra de ensayo del anticuerpo a 1mg/ml. A continuación se aplicaron 80 ul de la muestra de ensayo a un HPLC (Waters, modelo 2795) conectado en línea a una columna HIC (TOSOH Bioscience, Éter-5PW TSK-gel, 7,5mm x 75mm, producto n.º 07573). Se eluyó la muestra a un caudal de 1,0 ml/min con un gradiente del 100 % de tampón A (sulfato de amonio 2 M, fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0) a 100 % de tampón B (fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0) durante 50 minutos. El anticuerpo se detectó por seguimiento de la absorbancia UV a 280 nm y se analizaron los datos con el programa informático Empower. Tal como se muestra en la Figura 9, la hidrofiliidad de LAG3.5 presento solubilidad a concentraciones elevadas de sulfato de amonio.

Ejemplo 4: Inversión de la inhibición de la respuesta inmunomediada de los linfocitos T

Se determinó la actividad de LAG3.5 por medio de un ensayo funcional que utilizó un hibridoma de linfocitos T de ratón específico de antígeno (3A9). El hibridoma 3A9 expresa un receptor de linfocitos T específico de un péptido de lisozima de huevo de gallina (HEL48-62) y secreta IL-2 cuando se cultiva simultáneamente con células presentadoras de antígenos pulsadas con péptidos (LK35.2) emparejadas por MHC. Como huLAG-3-Fc es capaz de unirse a líneas de células B positivas para MHC de clase II, la expresión de huLAG-3 en la línea 3A9 podría ejercer un efecto inhibitor a través del encaje con la clase II de la línea presentadora de murino. Una comparación del perfil de respuesta del péptido del precursor 3A9 con el de las células 3A9 transducidas con LAG-3 humano cultivadas simultáneamente con las células presentadoras de antígenos emparejadas con MHC demostró que la expresión de LAG-3 humano inhibió la sensibilidad del péptido en comparación con las células 3A9 del control. Esta inhibición se invirtió mediante el bloqueo de LAG-3 utilizando LAG3.5. Por lo tanto, se demostró el bloqueo de la inhibición mediada por LAG-3 para LAG3.5.

Ejemplo 5: Activación de linfocitos T mediante LAG3.5

La actividad funcional de LAG3.5 sobre linfocitos T primarios se evaluó usando cultivos de PBMC humanas estimuladas con el superantígeno SEB. Las PBMC totales se aislaron de la sangre de dieciocho donantes humanos y se estimularon durante 72 horas en cualquiera de dos formatos de ensayo: (i) una cantidad fija de anticuerpo (20 µg/ml) y diluciones en serie de SEB, o (ii) una cantidad fija de SEB (85 ng/ml) y disoluciones en serie del anticuerpo. La IL-2 secretada, como medida de la actividad de los linfocitos T, se controló mediante ELISA. Se usaron anticuerpo dirigido contra PD-1 e Ipilimumab como controles positivos, y la actividad de LAG3.5 junto con la de los anticuerpos dirigidos contra PD-1 o contra CTLA-4 se evaluó para un subconjunto de donantes.

Se observó una secreción de IL-2 mejorada para una gama de concentraciones de SEB para quince de dieciocho donantes tratados con LAG3.5 solo, en comparación con el tratamiento con el anticuerpo control de isotipo. En la mayoría de los casos, la estimulación fue menor a la observada para el tratamiento con anticuerpo dirigido contra PD-1 o Ipilimumab. Con respecto al LAG3.5, los resultados de los dos formatos de ensayo (descritos anteriormente) concordaron entre sí. Por otra parte, en 5 de los 6 donantes sometidos a ensayo, la combinación de LAG3.5 con anticuerpo dirigido contra PD-1 o Ipilimumab dio como resultado mayores niveles de estimulación de lo observado para el anticuerpo control de isotipo combinado con anticuerpo dirigido contra PD-1 o Ipilimumab. Estos datos revelaron que LAG3.5 puede actuar en ensayos de linfocitos T humanos normales y que puede actividad adicionalmente respuestas mediadas por la inhibición de PD-1 y la función de CTLA-4.

SUMARIO DEL LISTADO DE SECUENCIAS

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA</u>
1	V _H n.a. 25F7 (LAG3.1)

>1408_LAG-3_403_25F7.1_VH1_NT

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACC
 CTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGATTACTACTGGAA
 CTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAA
 TCATAATGGAAACACCAACTCCAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCCTA
 TCACTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGACCG
 CCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGTTTGGATATAGTGACTACGAGTA
 CAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

2	V _H a.a. 25F7	
---	--------------------------	--

>1408_LAG-3_403_25F7.1_VH1_AA

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINH
 NGNTNSNPSLKSRTLSDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYSDYEYNW
 FDPWGQGLTVSS

5

3	V _K n.a. 25F7	
---	--------------------------	--

>1408_LAG-3_403_25F7.1_VK1_NT

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA
 GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGCAGCTACTTAGCCTG
 GTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC
 AACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA
 GACTTCACTCTACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATT
 ACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTCACTTTTGGCCAGGGGACCAACCT
 GGAGATCAAA

4	V _K a.a. 25F7	
---	--------------------------	--

10 >1408_LAG-3_403_25F7.1_VK1_AA

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
 GIPARFSGSGSDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIK

5	V _H CDR1 a.a. 25F7	DYYWN
6	V _H CDR2 a.a. 25F7	EINHNGNTNSNPSLKS
7	V _H CDR3 a.a. 25F7	GYSDEYNWFDP
8	V _K CDR1 a.a. 25F7	RASQSISSYLA
9	V _K CDR2 a.a. 25F7	DASNRAT
10	V _K CDR3 a.a. 25F7	QQRSNWPLT
11	V _H n.a. LAG3.5	

V_H n.a. LAG3.5

15

caggtgcagctacagcagtggggscgaggactgtgaagccttcggagaccctgcccacactgcgctgtctatggtgggct
 cttcagtgattactactggaactggatccgccagccccaggggaaggggctggagtgattggggaaatcaatcatcgtggaa
 gcaccaactccaaccctccctcaagagtcgagtcaccctatactagacagctccaagaaccagttctcctgaagctgaggt
 ctgtgaccgcccggacacggctgtgtattactgtgcgtttggatatagtgactacgagtacaactggttcgaccctggggcc
 agggaaacctggtcaccgtctcctca

ES 2 638 545 T3

12	V _H a.a. LAG3.5	
----	----------------------------	--

V_H a.a. LAG3.5

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGE
 INHRGSTNSNP SLKSRVTLSDLT SKNQFSLKLR SVTAADTAVYYCAFGYS
 DYEYNWFD PWGQGLTVTVSS

13	V _K n.a. LAG3.5	
----	----------------------------	--

V_K n.a. LAG3.5

5

gaaattgtgttgacacagtcctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctctgcagggccagtcagagt
 attagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcaccaacagggccact
 ggcatcccagccaggttcagtggtcagtggtctgggacagactcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagatttga
 gtttattactgtcagcagcgtagcaactggcctctcacttttggccaggggaccaacctggagatcaaaa

14	V _K a.a. LAG3.5	
----	----------------------------	--

V_K a.a. LAG3.5

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLA WYQKPGQAPRLLIYD
 ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ
 GTNLEIK

10

15	V _H CDR1 a.a. LAG3.5	DYYWN
16	V _H CDR2 a.a. LAG3.5	EINHRGSTNSNP SLKS
17	V _H CDR3 a.a. LAG3.5	GYSDYEYNWFD P
18	V _K CDR1 a.a. LAG3.5	RASQSISSYLA
19	V _K CDR2 a.a. LAG3.5	DASNRAT
20	V _K CDR3 a.a. LAG3.5	QQRSNWPLT
21	Epítoto LAG-3	PGHPLAPG
22	Epítoto LAG-3	HPAAPSSW
23	Epítoto LAG-3	PAAPSSWG
24	V _H CDR2 a.a. LAG3.6	EIIHSGSTNSNP SLKS
25	V _H CDR2 a.a. LAG3.7	EINHGGGTNSNP SLKS
26	V _H CDR2 a.a. LAG3.8	EINHIGTNSNP SLKS
27	V _H CDR2 a.a. LÍNEA GERMINAL HUMANA	GEINHSGSTNY
28		

29	LAG-3 a.a. humano	
----	-------------------	--

secuencia de LAG-3 a.a. humano

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGEVPPVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDL
 SLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGP
 GGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALS
 CRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPV
 RESPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLPPTPL
 TVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTSTRFLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLE
 DVSQAQAGTYTCHIHLEQQLNATVTLAIIITVTPKSFSGPSLGLKLLCEVTPVSG
 QERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTE
 LSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLLFLTLGVLSLLLVTGAFGFHLWRRQWRPRRF
 SALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL*

30	V _H CDR2 a.a. LAG3.2	VIWYDGSNKYYADSVKG
31	V _H LAG3.1 n.a.	

LAG3.1HC

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACC
 CTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGACTACTGGAA
 CTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAA
 TCATAATGGAAACACCAACTCCAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCCTA
 TCACTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGACCG
 CCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGTTTGGATATAGTGACTACGAGTA
 CAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT
 AGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCT
 CCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC
 GGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC
 CCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
 TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACA
 AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCC
 CATGCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTCT
 GTTCCCCCAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
 ACGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAC
 TGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
 GAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC
 AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCC
 TCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
 AGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACC
 AGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGT
 GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCC
 CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGAC
 AAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
 GCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAT
 GA

5

32	V _H LAG3.1 a.a.	
----	----------------------------	--

TRADUCCIÓN DE LAG3.1HC

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINH
 NGNTNSNPSLKSRVTLSLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYSDYEYNW

FDPWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPHKPSNTKV
 DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
 DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
 EALHNHYTQKSLSLGLGK*

33	V _L LAG3.1 n.a.	
----	----------------------------	--

LAG3.1LC

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA
 GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGCAGCTACTTAGCCTG
 GTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC
 AACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACA
 GACTTCACTCTACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATT
 ACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTCACTTTTGGCCAGGGGACCAACCT
 GGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCCGCCATCT
 GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT
 TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT
 CGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
 ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA
 AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
 GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

34	V _L LAG3.1 a.a.	
----	----------------------------	--

5

TRADUCCIÓN DEL LAG3.1LC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

35	V _H LAG3.5 a.a.	
----	----------------------------	--

10 **Secuencia de la cadena pesada de LAG3.5 - completa**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGE
 INHRGSTNSNPSLKSRVTLSLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYS
 DYEYNWFDPWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTK
 YTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
 DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK*

36	V _H LAG3.5 n.a.	
----	----------------------------	--

Secuencia de la cadena pesada de LAG3.5 - completa

cagggtgcagctacagcagtgggggcgcaggactgttgaaagccttcggagaccctgtccctcacctgcgctgtctatgggtgggtc
 cttcagtgattactactggaactggatccgccagccccaggggaaggggctggagtggattggggaaatcaatcatcgtggaa
 gcaccaactccaaccgtccctcaagagtcgagtcaccctatcactagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgaggt
 ctgtgaccgccgacggcgtgtgtattactgtgcgtttggatatagtgactacgagtagaactggttcgaccctggggcc
 agggaaaccctggtcaccgtctcctcagctagcaccgaagggccatccttccccctggcgcctgtccaggagcacctcc

gagagcacagccgcctgggctgcctgggtcaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgctgtggaactcaggcgcctg
 accagcggcgtgcacacctcccggctgtctacagtcctcaggacttactccctcagcagcgtgggtgaccgtgcctccag
 cagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaaaccaagggtggacaagagagttgagtcaa
 atatggtccccatgccaccatgccagcacctgagttcctggggggaccatcagttctctgtcccccaaaacccaagga
 cactctcatgatctccggaccctgaggtcagctgctgtggtggagcgtgagccaggaagaccccaggtccagttcaact
 ggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgaggagcagttcaacagcagctaccgtgtggta
 gcgtcctaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggctccaacaaaggcctcccgtcctc
 catcgagaaaacctctcaaagccaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggaggaga
 tgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaaggcttctaccccagcagatcgccgtggagtgggagagcaatgg
 gcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgtggactccgacggctccttctctctacagcaggtaccgtgg
 acaagagcaggtggcaggagggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagag
 cctctcctgtctctgggtaaatga

37	V _L LAG3.5 a.a.	
----	----------------------------	--

Secuencia de la cadena kappa de LAG3.5 - completa

5

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
 ASN RATGIPARFSGSGSDFTLTISSLEPEDFAVYQCQRSNWPLTFGQ
 GTNLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
 DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
 LSSPVTKSFNRGEC*

38	V _L LAG3.5 n.a.	
----	----------------------------	--

Secuencia de la cadena pesada de LAG3.5 - completa

gaaattgtgtgacacagctctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagt
 attagcagctacttagcctggtaccaacagaacactggccaggtcccaggtcctcatctatgatgcatccaacagggccact
 ggcattcccagccaggtcagtgagcagtggtgtggtggacagacttactctaccatcagcagcctagagcctgaagatttga
 gttattactgtcagcagcgtagcaactggcctctcactttggccaggggaccaacctggagatcaaacgtacgggtgctgca
 ccatctgtctcattcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaactgctctgttgtgctgctgaataactctatcca
 gagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctacagagcaggacagc
 aaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaacgagactacgagaacacaaaagtctacgctgcgaa
 gtcaccatcagggcctgagctcggcgtcacaagagcttcaacaggggagagtgtag

10

--	--	--

LISTADO DE SECUENCIAS

15

- <110>
- <120> OPTIMIZACIÓN DE ANTICUERPOS QUE SE UNEN AL GEN 3 DE ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS (LAG-3), Y SUS USOS

20

- <130> 11911-WO-PCT
- <140>
- <141> 30-05-2013

ES 2 638 545 T3

<150> 61/667.058
 <151> 02-07-2012

5 <160> 52

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(360)

<400> 1

cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag	48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu	
1 5 10 15	
acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt gat tac	96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr	
20 25 30	
tac tgg aac tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att	144
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
ggg gaa atc aat cat aat gga aac acc aac tcc aac ccg tcc ctc aag	192
Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys	
50 55 60	
agt cga gtc acc cta tca cta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg	240
Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu	
65 70 75 80	
aag ctg agg tct gtg acc gcc gcg gac acg gct gtg tat tac tgt gcg	288
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	
85 90 95	
ttt gga tat agt gac tac gag tac aac tgg ttc gac ccc tgg ggc cag	336
Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln	
100 105 110	
gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca	360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

25 <210> 2
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

35 <400> 2

ES 2 638 545 T3

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

- <210> 3
- <211> 321
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <221> fuente
- 10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
- <220>
- <221> CDS
- 15 <222> (1)..(321)
- <400> 3

ES 2 638 545 T3

```

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg      48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt att agc agc tac      96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
           20           25           30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
           35           40           45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc      192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
           50           55           60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65           70           75           80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ctc      288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
           85           90           95

act ttt ggc cag ggg acc aac ctg gag atc aaa      321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
           100           105

```

<210> 4

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 4

```

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

```

15

<210> 5

ES 2 638 545 T3

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

10

Asp Tyr Tyr Trp Asn
1 5

<210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

20

<400> 6

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

25

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

35

<400> 7

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

40

<210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 8

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

50

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>

ES 2 638 545 T3

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 9

5

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

15

<400> 10

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

20

<210> 11
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

30

<400> 11

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctggtgaagc ctcggagac cctgtccctc	60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc	120
ccaggaagg ggctggagt gattggggaa atcaatcatc gtggaagcac caactccaac	180
ccgtccctca agagtcgagt caccctatca ctagacacgt ccaagaacca gttctccctg	240
aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgtt tggatatagt	300
gactacgagt acaactgggt cgaccctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca	360

35

<210> 12
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 12

ES 2 638 545 T3

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 Arg Gly Ser 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

5 <210> 13
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)
 <400> 13

ES 2 638 545 T3

<p>gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly 1 5 10 15</p>	<p>48</p>
<p>gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt att agc agc tac Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr 20 25 30</p>	<p>96</p>
<p>tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile</p>	<p>144</p>
<p style="text-align: center;">35 40 45</p> <p>tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly 50 55 60</p>	<p>192</p>
<p>agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro 65 70 75 80</p>	<p>240</p>
<p>gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ctc Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu 85 90 95</p>	<p>288</p>
<p>act ttt ggc cag ggg acc aac ctg gag atc aaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys 100 105</p>	<p>321</p>

<210> 14
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 14

ES 2 638 545 T3

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> 15

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 15

Asp Tyr Tyr Trp Asn

1 5

15

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

25 <400> 16

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

30 <210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

ES 2 638 545 T3

<400> 17

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

5

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

15

<400> 18

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

20

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 19

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

30

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

40

<400> 20

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

45

<210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50

<400> 21

Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly
1 5

55

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 638 545 T3

<400> 22

His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
1 5

5 <210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 23

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly
1 5

15 <210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 24

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

30 <210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 25

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

40 <210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

50 <400> 26

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

55 <210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

ES 2 638 545 T3

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr
1 5 10

5 <210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 28

15 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

20 <210> 29
<211> 525
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

ES 2 638 545 T3

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

Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
130 135 140

Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
145 150 155 160

Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
165 170 175

Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
180 185 190

Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
195 200 205

Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
210 215 220

Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
225 230 235 240

Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn

ES 2 638 545 T3

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

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
515 520 525

5 <210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
<400> 30

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

15 Gly
<210> 31
<211> 1344
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
25 <400> 31

ES 2 638 545 T3

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc 120
 ccaggaaggg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata atggaaacac caactccaac 180
 cogtccctca agagtcgagt cacccatca ctagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcggt tggatatagt 300
 gactacgagt acaactggtt cgaccctggg gccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360
 gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 420
 agcacagccg ccctgggctg cctgggcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 480
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca 540
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 600
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 660
 aaatatggtc ccccatgccc accatgcccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 720
 ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 780
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 900
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1020
 ggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtca gcctgacctg cctgggcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgcctggag 1140
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccctg gctggactcc 1200
 gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1260
 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1320
 ctctccctgt ctctgggtaa atga 1344

<210> 32
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 32

ES 2 638 545 T3

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 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

ES 2 638 545 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

ES 2 638 545 T3

370		375		380											
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
385					390					395					400
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				405					410					415	
Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
			420					425					430		
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	
		435					440						445		

5 <210> 33
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 33

gaaattgtgt	tgacacagtc	tccagccacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcotgca	gggccagtca	gagtattagc	agctacttag	cctggtacca	acagaaacct	120
ggccaggctc	ccaggctcct	catctatgat	gcatccaaca	gggcactgg	catcccagcc	180
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagac	ttcactctca	ccatcagcag	cctagagcct	240
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcagcag	cgtagcaact	ggcctctcac	ttttggccag	300
gggaccaacc	tggagatcaa	acgtacggtg	gctgcaccat	ctgtcttcat	cttcccgcca	360
tctgatgagc	agttgaaatc	tggaactgcc	tctgtttgtg	gcctgctgaa	taacttctat	420
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagggtg	gataacgccc	tccaatcggg	taactcccag	480
gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	caccctgacg	540
ctgagcaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcagggc	600
ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	gtag		645

15 <210> 34
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 34

ES 2 638 545 T3

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 Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 35
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente

10

ES 2 638 545 T3

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 638 545 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 36
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 36

ES 2 638 545 T3

cagggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc 120
 ccaggggaag ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaagcac caactccaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccctatca ctagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgaggt ctgtgacgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcggt tggatatagt 300
 gactacgagt acaactggtt cgacccctgg ggcagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360
 gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgcctt gctccaggag cacctccgag 420
 agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
 tggaaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtectca 540
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 600
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 660
 aatatggtc ccccatgccc accatgccc aacacctgagt tcctgggggg accatcagtc 720
 ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccgacccc tgaggtcacg 780
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 900
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tocatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1020
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat ccaggagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgcctggag 1140
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200
 gacggctcct tcttctctta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1260
 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1320
 ctctccctgt ctctgggtaa atga 1344

<210> 37
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 37

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

ES 2 638 545 T3

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 Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 38
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 38

ES 2 638 545 T3

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agctacttag cctggtacca acagaaacct      120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct      240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctctcac ttttgccag      300
gggaccaacc tggagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                          645

```

5 <210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 39

Pro Val Gly Val Val
 1 5

15 <210> 40
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 25 <400> 40

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro
 1 5 10

30 <210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 41

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser
 1 5 10

40 <210> 42
 <211> 11
 <212> PRT

ES 2 638 545 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 42

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser
1 5 10

10

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

20

<400> 43

Gly Glu Ile Ile His Ser Gly Ser Thr Asn Ser
1 5 10

25

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 44

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Ser
1 5 10

35

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

45

<400> 45

Gly Glu Ile Asn His Ile Gly Asn Thr Asn Ser

1

5

10

50

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<221> fuente

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a LAG-3 humano, en el que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, 16 y 17, respectivamente, y en el que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 19 y 20, respectivamente.
2. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.
3. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que presenta una o una combinación de las siguientes propiedades:
- (a) unión a LAG-3 de mono;
 - (b) ausencia de unión a LAG-3 de ratón;
 - (c) unión a moléculas de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase II de LAG-3;
 - (d) inhibe la unión de LAG-3 a moléculas de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase II; o
 - (e) estimula una respuesta inmunitaria.
4. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que estimula la producción de interleucina-2 (IL-2) en una respuesta de linfocitos T específicos de antígenos y/o estimula una respuesta inmunitaria antitumoral.
5. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se une a LAG-3 humano con una K_D de $0,27 \times 10^{-9}$ M o menos, tal como se determina mediante resonancia de plasmón superficial.
6. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo humano.
7. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un isotipo de IgG1, IgG2 o IgG4.
8. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un isotipo de IgG4.
9. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario.
10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que es un anticuerpo de longitud completa.
11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o 10, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano de IgG 4 de longitud completa aislado que se une a LAG-3 humano con una K_D de $0,27 \times 10^{-9}$ M o menos, tal como se determina mediante resonancia de plasmón superficial.
12. Una molécula biespecífica que comprende el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un segundo anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo.
13. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, unido a un agente terapéutico.
14. El inmunoconjugado de la reivindicación 13, en el que el agente terapéutico es una toxina o un isótopo radiactivo.
15. Una composición que comprende el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, la molécula biespecífica de la reivindicación 12 o el inmunoconjugado de las reivindicaciones 13 o 14, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
16. La composición de la reivindicación 15, que comprende además un agente anticanceroso.
17. La composición de la reivindicación 16, en la que el agente anticanceroso es un anticuerpo o un agente quimioterapéutico.
18. La composición de la reivindicación 17, en la que el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.
19. La composición de las reivindicaciones 17 o 18, en la que el anticuerpo es un isotipo de IgG4.

20. Un ácido nucleico aislado que codifica la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de las reivindicaciones 1 o 2.
- 5 21. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 20.
22. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 21.
- 10 23. Un método para preparar un anticuerpo dirigido contra LAG-3 que comprende expresar el anticuerpo en la célula hospedadora de la reivindicación 22 y asilar el anticuerpo a partir de la célula hospedadora.
24. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, o la molécula biespecífica de la reivindicación 12 o el inmunoconjugado de las reivindicaciones 13 o 14 para su uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto.
- 15 25. El anticuerpo, la porción de unión a antígeno, la molécula biespecífica o el inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el sujeto es un sujeto que tiene un tumor y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor.
- 20 26. El anticuerpo, la porción de unión a antígeno, la molécula biespecífica o el inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el sujeto es un sujeto que tiene un virus y se estimula una respuesta inmunitaria contra el virus.
- 25 27. El anticuerpo, la porción de unión a antígeno, la molécula biespecífica o el inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 24, en donde la respuesta inmunitaria es una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno, de tal manera que se estimula una respuesta de los linfocitos T específicos de antígenos.
- 30 28. El anticuerpo, la porción de unión a antígeno, la molécula biespecífica o el inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 27, en donde se estimula la producción de interleucina-2 mediante los linfocitos T específicos de antígenos.
- 35 29. El anticuerpo, la porción de unión a antígeno, la molécula biespecífica o el inmunoconjugado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24-26, que comprende además la administración de al menos un anticuerpo inmunoestimulante adicional.
- 40 30. El anticuerpo, la porción de unión a antígeno, la molécula biespecífica o el inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el al menos un anticuerpo inmunoestimulante adicional es un anticuerpo dirigido contra PD-1.
- 45 31. El anticuerpo, la porción de unión a antígeno, la molécula biespecífica o el inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el al menos un anticuerpo inmunoestimulante adicional es un anticuerpo dirigido contra PD-L1.
- 50 32. El anticuerpo, la porción de unión a antígeno, la molécula biespecífica o el inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el al menos un anticuerpo inmunoestimulante adicional es un anticuerpo dirigido contra CTLA-4.
- 55 33. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, la molécula biespecífica de la reivindicación 12 o el inmunoconjugado de las reivindicaciones 13 o 14 para su uso en un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto.
34. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, la molécula biespecífica de la reivindicación 12 o el inmunoconjugado de las reivindicaciones 13 o 14 para su uso en un método para tratar una infección vírica en un sujeto.
35. Uso del anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, la molécula biespecífica de la reivindicación 12 o el inmunoconjugado de las reivindicaciones 13 o 14, en la fabricación de un medicamento para estimular una respuesta inmunitaria, opcionalmente una respuesta de linfocitos T específicos de antígenos, o inhibir el crecimiento de células tumorales, o tratar una infección vírica en un sujeto.

LAG3.1 - 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 K 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 CAC 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 P 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

Fig. 1A

LAG3.1 - Anti-LAG3 25F7 VK

```

Segmento V           L6
Segmento J:         JK2

  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 I S S Y L A W Y
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT ATT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
  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

                                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 Q G T N L E I K
271  CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAC CTG GAG ATC AAA
    
```

Fig. 1B

LAG3.5 - Anti-LAG VH

Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L
CDR1
S L T C A V Y G G S F S D Y Y W N W
CDR2
I R Q P P G K G L E W I G E I N H R
CDR2
G S T N S N P S L K S R V T L S L D
T S K N Q F S L K L R S V T A A D T
CDR3
A V Y Y C A F G Y S D Y E Y N W F D
CDR3
P W G Q G T L V T V S S

Fig. 2A

LAG3.5 - Anti- LAG3 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 CAC 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

Fig. 2B

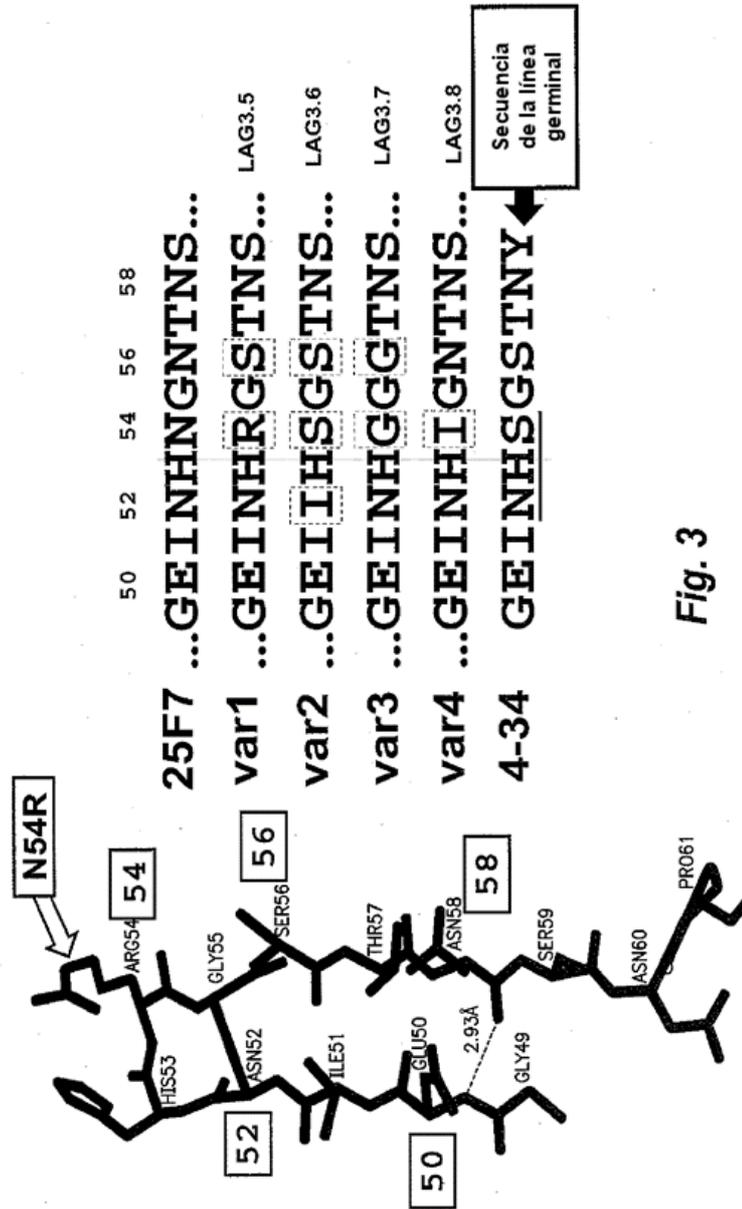


Fig. 3

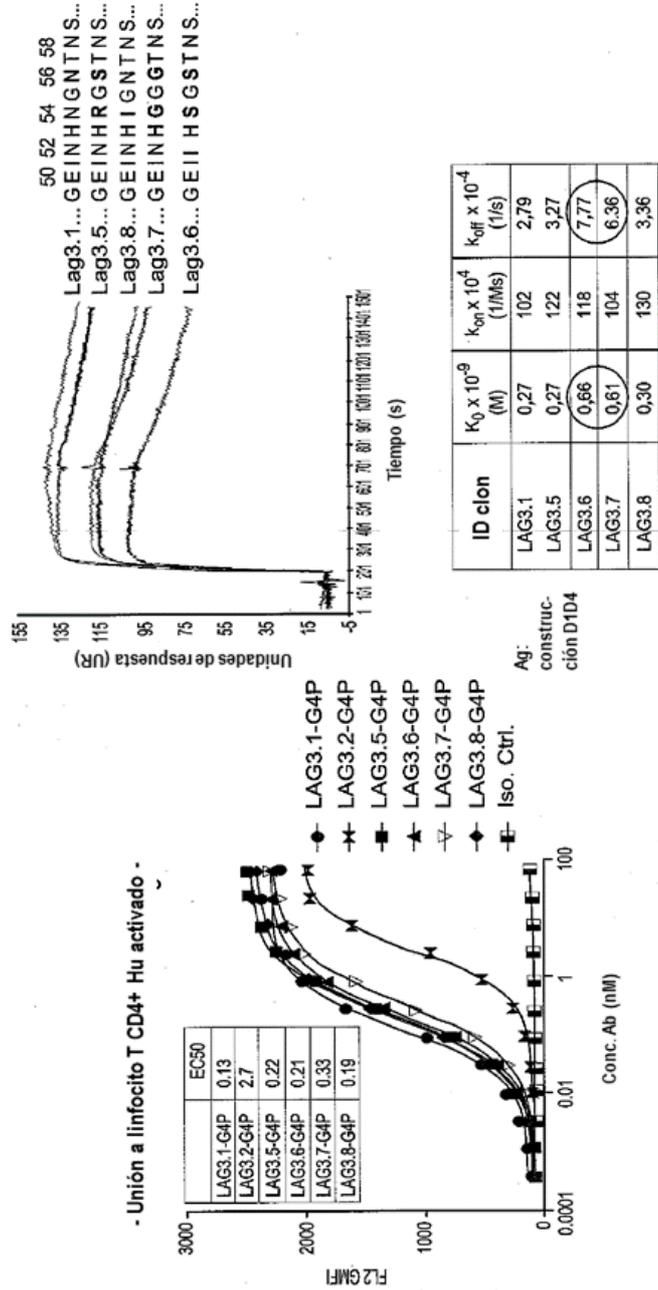


Fig. 4B

Fig. 4A

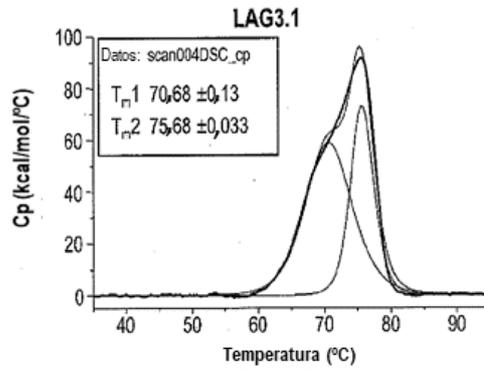


Fig. 5A

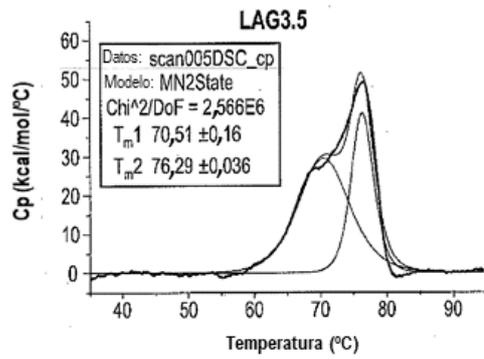


Fig. 5B

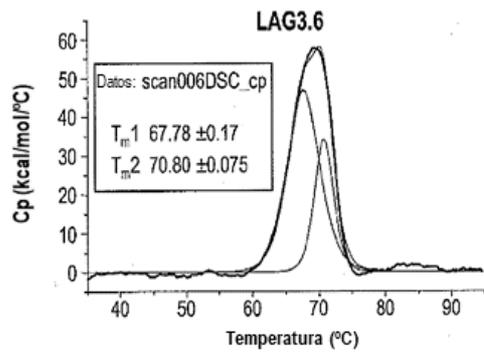


Fig. 5C

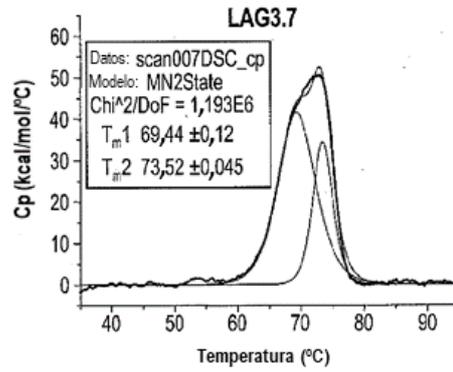


Fig. 5D

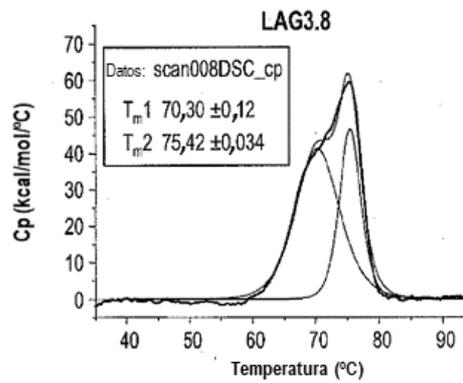


Fig. 5E

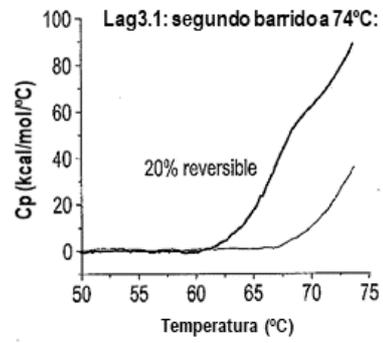


Fig. 6A

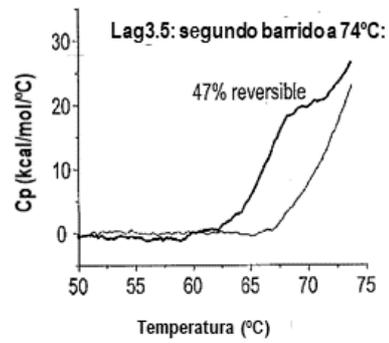


Fig. 6B

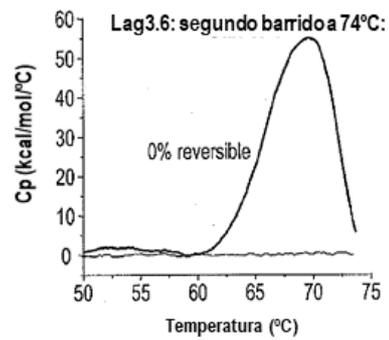


Fig. 6C

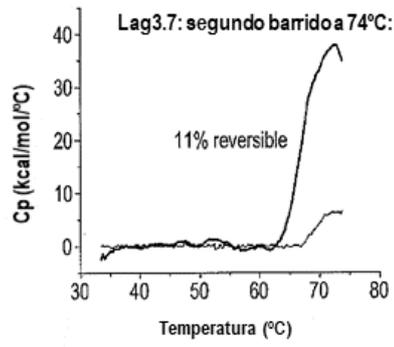


Fig. 6D

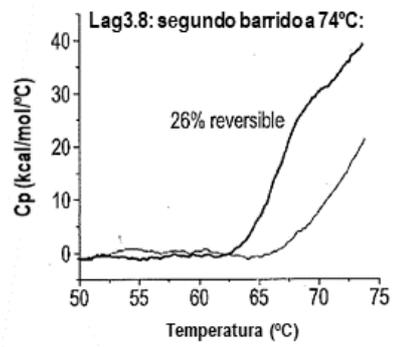


Fig. 6E

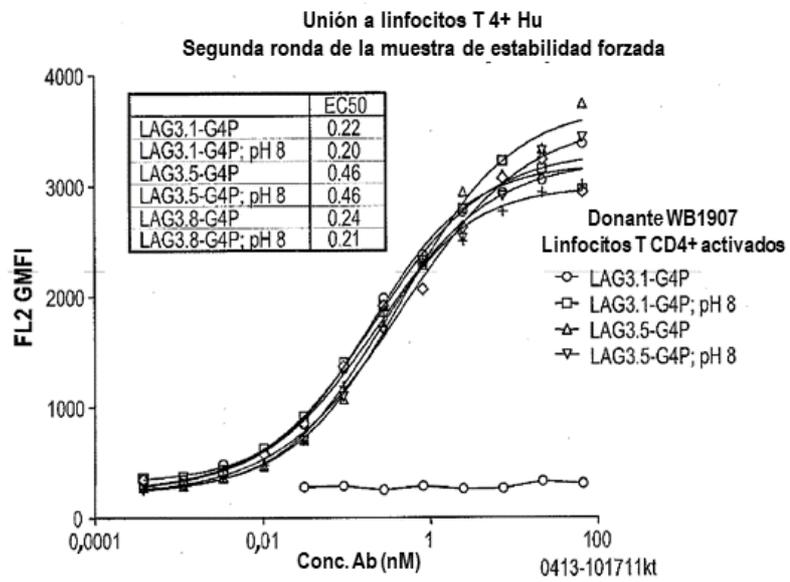
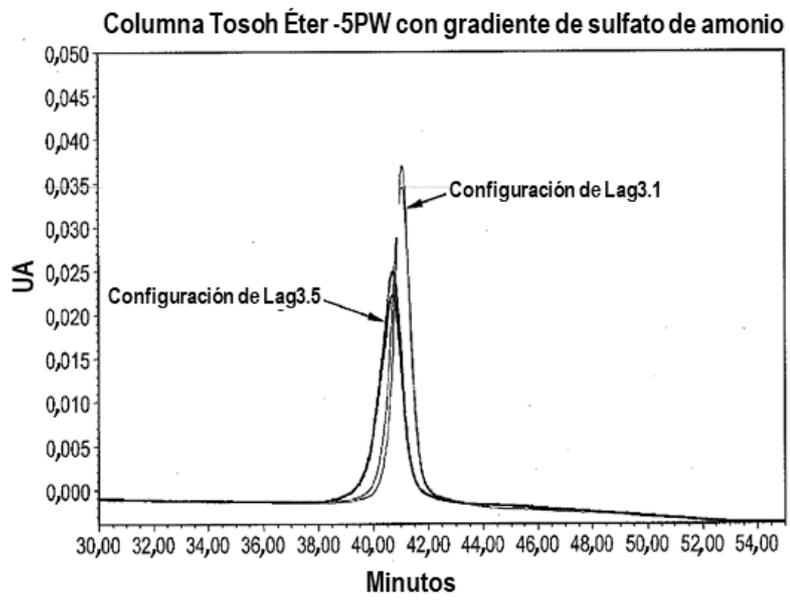


Fig. 7

Incubación 5 días Mab		Se muestra el péptido CDR2 solo		CDR2 deamidation	
	INHDT [*] GNTNSNPSLK	INHNGTNSNPSLK	INHHDGNTNSNPSLK	IDHNGTNSNPSLK	Total
3.1	2,5%	10,0%	5,1%	1,5%	9%
3.1 pH8			15,3%	4,9%	30%
3.5	INHNGTSDSNPSLK	INHNGTNSNPSLK	INHHDGNTNSNPSLK	IDHNGTNSNPSLK	
3.5 pH8	2,3%	3,1%	-	1,5%	4%
			-	1,7%	5%

Fig. 8



alto contenido de sal → bajo contenido de sal

Fig. 9

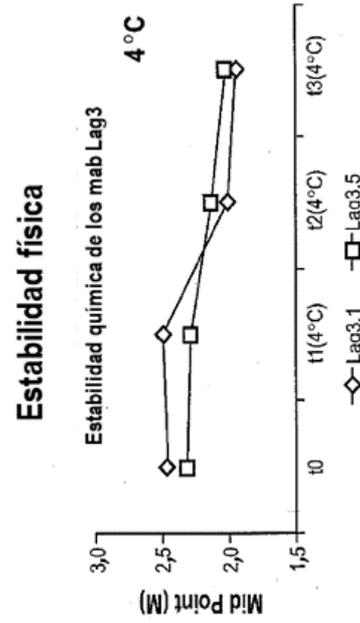


Fig. 10C

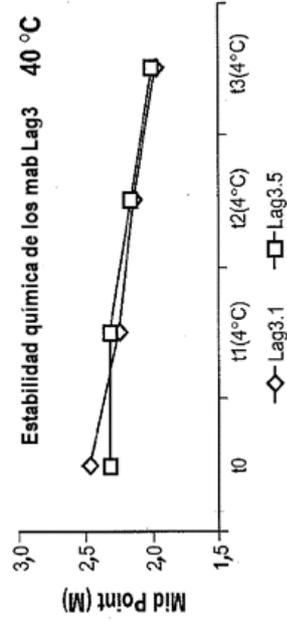


Fig. 10D

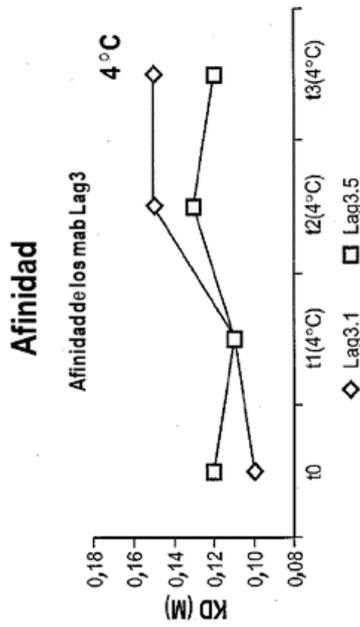


Fig. 10A

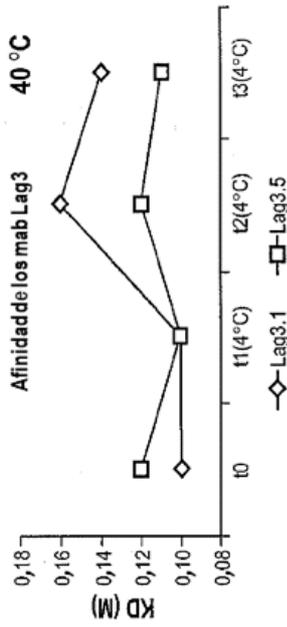


Fig. 10B

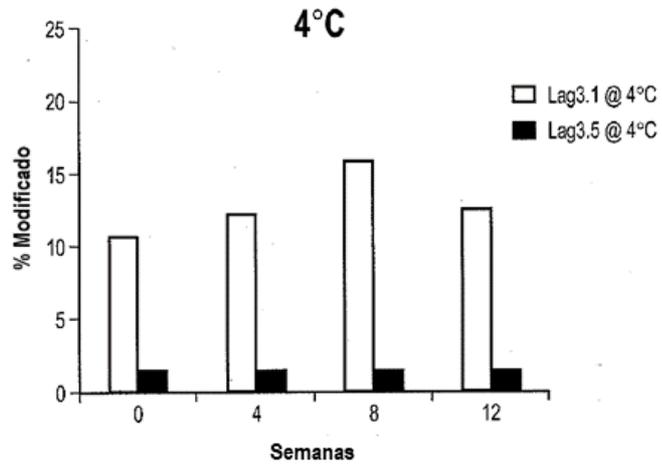


Fig. 11A

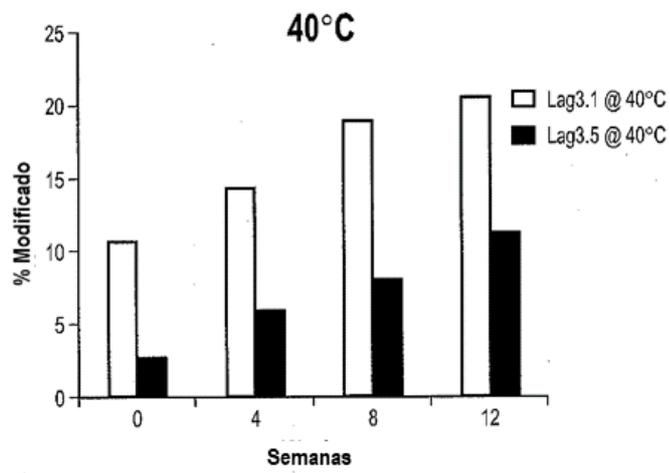


Fig. 11B