

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 576**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2009 E 15156647 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 2905030**

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

30 Prioridad:

11.08.2008 US 188548 P

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

23.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 768 576 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

5 **Antecedentes de la invención**

10 El gen de activación de linfocitos 3 o LAG-3 (también conocido como CD223), es un miembro de la familia de supergenes de inmunoglobulina y está relacionado estructural y genéticamente con CD4. LAG-3 no se expresa en linfocitos de sangre periférica en reposo, pero se expresa en linfocitos T activados y en células NK. LAG-3 es una proteína de membrana codificada por un gen ubicado en la parte distal del brazo corto del cromosoma 12, cerca del gen CD4, lo que sugiere que el gen LAG-3 puede haber evolucionado a través de la duplicación de genes (Triebel et al. (1990) J. Exp. Med. 171:1393-1405).

15 De manera similar a CD4, se ha demostrado que LAG-3 interactúa con las moléculas del MHC de Clase II pero, a diferencia de CD4, LAG-3 no interactúa con la proteína gp120 del virus de inmunodeficiencia humana (Baixeras et al. (1992) J. Exp. Med. 176:327-337). Los estudios que utilizan una proteína de fusión de inmunoglobulina LAG-3 soluble (sLAG-3lg) demostraron la unión directa y específica de LAG-3 al MHC de clase II en la superficie celular (Huard et al. (1996) Eur. J. Immunol. 26:1180-1186).

20 Se describen los anticuerpos monoclonales, o fragmentos y derivados de los mismos, que reaccionan con regiones definidas de la proteína LAG-3 (documento WO 91/010682 A1). Los anticuerpos monoclonales para LAG-3 se usan en métodos de detección y aislamiento de linfocitos Th1, así como en métodos de diagnóstico de enfermedades mediadas por Th1 (documentos US 6.197.524 B1; WO 97/003695 A1).

25 En estudios *in vitro* de respuestas de linfocitos T específicos de antígeno, la adición de anticuerpos anti-LAG-3 llevó a una mayor proliferación de linfocitos T, una mayor expresión de antígenos de activación como CD25 y a mayores concentraciones de citocinas tales como interferón gamma e interleucina-4, lo que apoya un papel para la interacción LAG-/MHC de clase II en la regulación negativa de la estimulación de linfocitos T CD4⁺ dependiente de antígeno (Huard et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:3216-3221; WO 95/030750 A2). Se ha demostrado que la región intracitoplasmática de LAG-3 interactúa con una proteína denominada LAP, que se cree que es una molécula de transducción de señales implicada en la regulación negativa de la vía de activación de CD3/TCR (Iouzalén et al. (2001) Eur. J. Immunol. 31:2885-2891). Asimismo, la señalización LAG-3 inhibe los eventos tempranos en la activación primaria de los linfocitos T CD4 y CD8 humanos y desempeña un papel en la regulación de la expansión de los linfocitos T efectores o de memoria activados, ya sea directa o indirectamente a través de la actividad supresora de los T_{reg} (Marcon-Lemaitre et al. (2005) Immunology 115(2):170-178). Se ha demostrado que los linfocitos T CD4⁺CD25⁺ reguladores (T_{reg}) que expresan LAG-3 tras la activación y los anticuerpos para LAG-3 inhiben la supresión por linfocitos T_{reg} inducidos, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que sugiere que LAG-3 contribuye a la actividad supresora de los linfocitos T_{reg} (Huang, C. et al. (2004) Immunity 21:503-513). Más aún, se ha demostrado que LAG-3 regula negativamente la homeostasis de los linfocitos T mediante los linfocitos T reguladores tanto en mecanismos independientes como dependientes de linfocitos T (Workman, CJ y Vignali, D.A. (2005) J. Immunol. 174:688-695). El bloqueo de los receptores inhibidores de los linfocitos T PD-1 y LAG-3 simultáneamente y sinérgicamente mejoró las respuestas de los linfocitos T y disminuyó la carga vírica *in vivo* (Blackburn et al. (2008) Nature Immunology 10:29-37).

45 En determinadas circunstancias, LAG-3 también ha demostrado tener efectos inmunoestimuladores. Por ejemplo, las células tumorales transfectadas con LAG-3 trasplantadas en ratones singénicos mostraron una reducción marcada del crecimiento o una regresión completa en comparación con las células tumorales no transfectadas, lo que sugiere que la expresión de LAG-3 en las células tumorales estimuló una respuesta antitumoral al desencadenar células presentadoras de antígeno a través de moléculas del MHC de clase II (Prigent et al. (1999) Eur. J. Immunol. 29:3867-3876). Adicionalmente, se ha demostrado que la proteína de fusión soluble Ig-LAG-3 estimula las respuestas inmunes tanto humorales como celulares cuando se administra a ratones junto con un antígeno, lo que indica que la Ig-LAG-3 soluble puede funcionar como un adyuvante de vacuna (El Mir y Triebel (2000) J. Immunol. 164:5583-5589). Asimismo, se ha demostrado que la Ig-LAG-3 humana soluble amplifica la generación *in vitro* de inmunidad específica de tumor de tipo I (Casati et al. (2006) Cancer Res. 66:4450-4460). La actividad funcional de LAG-3 se revisa adicionalmente en Triebel (2003) Trends Immunol. 24:619-622. En vista de lo anterior, los agentes adicionales para modular la actividad de LAG-3 son de interés.

Sumario

60 La presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales humanos, que se unen específicamente a LAG-3 y que tienen propiedades funcionales deseables. Estas propiedades incluyen unión de alta afinidad a LAG-3 humano, la unión a LAG-3 humano y de mono (por ejemplo, LAG-3 de mono cinomolgo y/o de mono rhesus) pero no al LAG-3 de ratón, la capacidad de inhibir la unión de LAG-3 a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC) y/o la capacidad de estimular respuestas de linfocitos T específicos de antígeno. Los anticuerpos de la invención se pueden usar, por ejemplo, para detectar la proteína LAG-3 o para estimular respuestas de linfocitos T específicos de antígeno, tal como en un

sujeto portador de tumor o un sujeto portador de virus.

Por consiguiente, de acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos aislados, o a porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a LAG-3 humano y a un epítipo de LAG-3 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77.

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos aislados, o a porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a LAG-3 humano y se unen al mismo epítipo en LAG-3 humano como anticuerpo de referencia, comprendiendo dicho anticuerpo de referencia una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43.

En un aspecto, el anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo, presenta al menos una de las siguientes propiedades:

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

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). Aún más preferentemente, el anticuerpo presenta las cuatro propiedades (a), (b), (c) y (d).

En una realización preferida, el anticuerpo estimula una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno, tales como la producción de interleucina-2 (IL-2) en una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno. En otras realizaciones, el anticuerpo estimula una respuesta inmune tal como una respuesta antitumoral (por ejemplo, inhibe el crecimiento tumoral en un modelo *in vivo* de injerto tumoral) o una respuesta autoinmune (por ejemplo, promueve el desarrollo de diabetes en ratones NOD). En otras realizaciones más, los anticuerpos de la invención se unen al LAG-3 humano con una K_D de 1×10^{-7} M o menos, o se une al LAG-3 humano con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, o se une al LAG-3 humano con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, o se une al LAG-3 humano con una K_D de 1×10^{-9} M o menos. En una realización, el anticuerpo tiñe el tejido hipofisario por inmunohistoquímica, mientras que en otra realización, el anticuerpo no tiñe el tejido hipofisario por inmunohistoquímica.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humano aislado, o a una porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo compete de forma cruzada por unirse al LAG-3 humano con un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia comprende:

- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43. En otro aspecto, el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la invención comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o proviene de un gen humano de V_H 4-34. En otro aspecto, el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la invención comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de o proviene de un gen humano de V_K L6. En una realización preferida, el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la invención comprende: una región variable de la cadena pesada que es producto de o proviene de un gen humano de V_H 4-34 y una región variable de la cadena ligera que es el producto de o proviene de un gen humano de V_K L6. Los anticuerpos de la invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, por ejemplo de un isotipo IgG1, IgG2 o IgG4. En una realización preferida, el anticuerpo es un isotipo IgG4. En otra realización preferida, el anticuerpo es un isotipo IgG4 que tiene una mutación de serina a prolina en la región de bisagra de la región constante de la cadena pesada (en una posición correspondiente a la posición 241 tal como se describe en Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30:105-108), de modo que la heterogeneidad del puente disulfuro de entre cadenas pesadas se reduce o se elimina. Como alternativa, los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab, Fab' o Fab'2, o anticuerpos de cadena simple.

Esta divulgación también proporciona un inmunoc conjugado que comprende un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo, unida a un agente terapéutico, por ejemplo, una citotoxina o un isótopo radiactivo. La presente divulgación también proporciona una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención, unida a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente de dicho anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo.

También se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, o un inmunoc conjugado de la invención o una molécula biespecífica desvelada en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, o las porciones de unión a antígeno de los mismos,

de la invención también están abarcadas por la presente divulgación. También se desvelan en el presente documento los vectores de expresión que comprenden tales ácidos nucleicos y células hospedadoras que comprenden tales vectores de expresión. Los métodos para preparar anticuerpos anti-LAG-3 usando las células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión también se desvelan en el presente documento 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 pertenece a anticuerpos anti-LAG-3 de la invención, o a porciones de unión a antígeno de los mismos, para su uso en los métodos de estimulación de las respuestas inmunes. Por ejemplo, en el presente documento se describe un método para estimular una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno que comprende poner en contacto dicho linfocito T con un anticuerpo de la invención de modo que se estimule una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno. Preferentemente, se estimula la producción de interleucina-2 por el linfocito T específico de antígeno. Además, en el presente documento se describe un método para estimular una respuesta inmune (por ejemplo, una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno) en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo desvelado en el presente documento, de manera que se estimule en el sujeto una respuesta inmunológica (una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno). En un método preferido, el sujeto es un sujeto portador de tumor y se estimula una respuesta inmunológica contra el tumor. En otro método preferido, el sujeto es un sujeto portador de virus y se estimula una respuesta inmunológica contra el virus.

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

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

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 49) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 37) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 25F7. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 7) y CDR3 (SEQ ID NO: 13) están delineadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 55) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 43) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal humano 25F7. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 19), CDR2 (SEQ ID NO: 25) y CDR3 (SEQ ID NO: 31) están delineadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 50) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 38) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 26H10. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 2), CDR2 (SEQ ID NO: 8) y CDR3 (SEQ ID NO: 14) están delineadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 56) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 44) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal humano 26H10. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 20), CDR2 (SEQ ID NO: 26) y CDR3 (SEQ ID NO: 32) están delineadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 51) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 39) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 25E3. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 3), CDR2 (SEQ ID NO: 9) y CDR3 están delineadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 57) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 45) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal humano 25E3. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 21), CDR2 (SEQ ID NO: 27) y CDR3 (SEQ ID NO: 33) están delineadas y se indican las

derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 52) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 40) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 8B7. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 4), CDR2 (SEQ ID NO: 10) y CDR3 (SEQ ID NO: 16) están delineadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 58) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 46) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal humano 8B7. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 22), CDR2 (SEQ ID NO: 28) y CDR3 (SEQ ID NO: 34) están delineadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 5A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 53) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 41) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 11F2. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 11) y CDR3 (SEQ ID NO: 17) están delineadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 5B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 59) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 47) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal humano 11F2. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 23), CDR2 (SEQ ID NO: 29) y CDR3 (SEQ ID NO: 35) están delineadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 6A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 54) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 42) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 17E5. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 6), CDR2 (SEQ ID NO: 12) y CDR3 (SEQ ID NO: 18) están delineadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 6B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 60) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 48) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal humano 17E5. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 24), CDR2 (SEQ ID NO: 30) y CDR3 (SEQ ID NO: 36) están delineadas y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 7 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 25F7 (SEQ ID NO: 37) con la línea germinal humana V_H 4-34 y secuencias de aminoácidos JH5b (SEQ ID NO: 61 y 62, respectivamente).

La Figura 8 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 25F7 (SEQ ID NO: 43) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_k L6 y JK2 (SEQ ID NO: 63 y 64, respectivamente).

La Figura 9 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 26H10 (SEQ ID NO: 38) con la línea germinal humana V_H 3-33 y secuencias de aminoácidos JH6B (SEQ ID NO: 65 y 66, respectivamente).

La Figura 10 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 26H10 (SEQ ID NO: 44) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_k A27 y JK3 (SEQ ID NO: 67 y 68, respectivamente).

La Figura 11 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 25E3 (SEQ ID NO: 39) con la línea germinal humana V_H 3-20 y secuencias de aminoácidos JH4b (SEQ ID NO: 69 y 70, respectivamente).

La Figura 12 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 25E3 (SEQ ID NO: 45) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_k L18 y JK2 (SEQ ID NO: 71 y 64, respectivamente).

La Figura 13 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 8B7 (SEQ ID NO: 40) con la línea germinal humana V_H 4-34 y secuencias de aminoácidos JH5b (SEQ ID NO: 61 y 62, respectivamente).

La Figura 14 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 8B7 (SEQ ID NO: 46) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_k L6 y JK4 (SEQ ID NO: 63 y 72, respectivamente).

La Figura 15 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 11F2 (SEQ ID NO: 41) con la línea germinal humana V_H 1-24 y secuencias de aminoácidos JH4b (SEQ ID NO: 73 y 70, respectivamente).

La Figura 16 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 11F2 (SEQ ID NO: 47) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_k L6 y JK1 (SEQ ID NO: 63 y 74, respectivamente).

La Figura 17 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de 17E5 (SEQ ID NO: 42) con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana V_H 3-33 y 2-2 (SEQ ID NO: 65 y 70, respectivamente).

La Figura 18 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 17E5 (SEQ ID NO: 48) con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal humana V_k L6 (SEQ ID NO: 63 y 75, respectivamente).

La Figura 19 muestra la alineación de la secuencia de proteína codificada por el clon de ADNc de LAG-3 de mono pa23-5 (SEQ ID NO: 93) con la secuencia de proteína LAG-3 de mono rhesus depositada en Genbank (SEQ ID NO: 94) (N.º de registro de Genbank XM_001108923). La región de bucle extra del péptido de y el dominio transmembrana están subrayados. La diferencia de un aminoácido entre las dos secuencias (posición de aminoácido 419) se resalta en negrita.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos aislados tal como se define en las reivindicaciones 1 y 2 que se unen a LAG-3 humano y que tienen propiedades funcionales deseables. La presente divulgación proporciona anticuerpos aislados, métodos de hacer tales anticuerpos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que comprenden tales anticuerpos y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, inmunoconjugados de la invención o moléculas biespecíficas. Además, los métodos de uso de los anticuerpos, tales como para detectar la proteína LAG-3, así como a los métodos para usar los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención para estimular las respuestas inmunológicas, solo o en combinación con otros anticuerpos inmunoestimuladores, se describen en el presente documento. Por consiguiente, la presente divulgación también proporciona los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención para su uso en, por ejemplo, la inhibición del crecimiento tumoral o el tratamiento de la infección vírica.

15 Con el fin de que se pueda entender más fácilmente la presente divulgación, se definen previamente determinados términos. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

20 El término "LAG-3" se refiere al gen de activación de los linfocitos 3. El término "LAG-3" incluye variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para una proteína LAG-3 humana pueden, en determinados casos, reaccionar de manera cruzada con una proteína LAG-3 de una especie que no sea humana. En otras realizaciones, los anticuerpos específicos para una proteína LAG-3 humana pueden ser completamente específicos para la proteína LAG-3 humana y pueden no mostrar especies u otros tipos de reactividad cruzada, o pueden reaccionar de forma cruzada con LAG-3 de ciertas otras especies pero no todas otras especies (por ejemplo, reaccionan de forma cruzada 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 número de registro de Genbank NP_002277. El término "LAG-3 de ratón" se refiere a la secuencia de LAG-3 de ratón, tal como la secuencia de aminoácidos completa de LAG-3 de ratón que tiene el número de registro de Genbank NP_032505. LAG-3 también se conoce en la técnica como, por ejemplo, CD223. La secuencia de LAG-3 humano puede diferir del LAG-3 humano del número de registro de Genbank NP_002277 al tener, por ejemplo, mutaciones conservadas o mutaciones en regiones no conservadas y el LAG-3 tiene sustancialmente la misma función biológica que el LAG-3 humano del número de registro de Genbank NP_002277. Por ejemplo, una función biológica del LAG-3 humano es tener un epítipo en el dominio extracelular del LAG-3 que está unido específicamente por un anticuerpo de la presente divulgación o una función biológica del LAG-3 humano es la unión a las moléculas del MHC de clase II.

35 El término "LAG-3 de mono" pretende abarcar las proteínas LAG-3 expresadas por los monos del Viejo Mundo y del Nuevo Mundo, incluidos, entre otros, el LAG-3 de mono cinomolgos y el LAG-3 de mono rhesus. Una secuencia de aminoácidos representativa para el LAG-3 de mono es la secuencia de aminoácidos del LAG-3 de mono rhesus que se muestra en la Figura 19 y la SEQ ID NO: 85, que también se deposita como el N.º de registro de Genbank XM_001108923. Otra secuencia de aminoácidos representativa para el LAG-3 de mono es la secuencia alternativa del clon pa23-5 de mono rhesus que se muestra en la Figura 19 y la SEQ ID NO: 84, aislada tal como se describe en el Ejemplo 3A, subsección 3. Esta secuencia alternativa de rhesus exhibe una única diferencia de aminoácidos, en la posición 419, en comparación con la secuencia depositada por Genbank.

45 Una secuencia particular de LAG-3 humano será generalmente al menos el 90 % idéntica en la secuencia de aminoácidos a LAG-3 humano de N.º de Registro de Genbank NP_002277 y contiene restos de aminoácidos que identifican la secuencia de aminoácidos como humana en comparación con las secuencias de aminoácidos de LAG-3 de otras especies (por ejemplo, de murino). En determinados casos, un LAG-3 humano puede ser al menos el 95 %, o incluso al menos el 96 %, 97 %, 98%, o 99% idéntica en secuencia de aminoácidos al LAG-3 de N.º de Registro de Genbank NP_002277. En determinadas realizaciones, una secuencia de LAG-3 de humano no mostrará más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de LAG-3 de N.º de Registro de Genbank NP_002277. En determinadas realizaciones, el LAG-3 humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de LAG-3 de N.º de Registro de Genbank NP_002277. El porcentaje de identidad se puede determinar tal como se describe en el presente documento.

55 La expresión "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y complemento) que da como resultado un daño selectivo sobre, la destrucción de o la eliminación en el cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados por patógenos, células cancerosas o, en los casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

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

El término "anticuerpo" al que se hace referencia en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, la "porción de unión a antígeno") o cadenas simples de los mismos. Los anticuerpos enteros son glucoproteínas que comprenden al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por puentes disulfuro. Cada cadena pesada está comprendida de 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 está compuesta por tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviado en el presente documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, de sus siglas en inglés). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del clásico sistema del complemento.

La expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente la "parte del anticuerpo"), tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse de manera específica a un antígeno (por ejemplo, una proteína de LAG-3). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de los fragmentos de unión abarcados en la expresión "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 en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fab' , que es esencialmente un Fab con parte de la región de bisagra (véase, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3.sup.rd ed. 1993); (iv) un fragmento Fd 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 solo brazo 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 de la complementariedad (CDR) aislada; y (viii) un nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes. Asimismo, 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 les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:5879-5883). También se pretende que los anticuerpos de cadena única estén abarcados dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por aquellos expertos en la materia y se seleccionan en función de su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado", tal como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a LAG-3 está sustancialmente libre 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 humana puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como las proteínas LAG-3 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad de unión sencilla por un epítipo concreto.

La expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como las regiones CDR provienen de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Asimismo, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también proviene de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria y de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias flanqueantes humanas.

El término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una especificidad de unión única, que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como las regiones CDR provienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se

producen por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido a partir de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

5 La expresión "anticuerpo humano recombinante", tal como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, se expresó, se creó o se aisló por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo (descrito más adelante), (b) anticuerpos
10 aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante combinatoria de anticuerpos humanos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones marco y CDR provienen de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal. En determinadas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de, y están relacionadas con, las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

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

25 Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

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

30 El término "anticuerpo humanizado" pretende referirse a anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias flanqueantes humanas. Se pueden realizar modificaciones adicionales de la región marco dentro de las secuencias marco humanas.

35 La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos en los que las secuencias de región variable provienen de una especie y las secuencias de región constante provienen de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las secuencias de región variable provienen de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante provienen de un anticuerpo humano.

40 Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "se une específicamente a LAG-3 humano" pretende referirse a un anticuerpo que se une a la proteína LAG-3 humana (y posiblemente a una proteína LAG-3 de una o más especies no humanas) pero que no se une sustancialmente a proteínas que no son LAG-3. Preferentemente, el anticuerpo se une a una proteína LAG-3 humana con "alta afinidad", es decir, con una K_D de 1 x 10⁻⁷ M o menos, más preferentemente de 5 x 10⁻⁸ M o menos, más preferentemente de 3 x 10⁻⁸ M o menos, más preferentemente de 1 x 10⁻⁸ M o menos, más preferentemente de 5 x 10⁻⁹ M o menos y más preferentemente de 1 x 10⁻⁹ M o menos.

45 La expresión "no se une sustancialmente" a una proteína o células, tal como se usa en el presente documento, significa que no se une o no se une con una alta afinidad a la proteína o las células, es decir, se une a la proteína o células con una K_D de 1 x 10⁻⁶ M o más, más preferentemente de 1 x 10⁻⁵ M o más, más preferentemente de 1 x 10⁻⁴ M o más, más preferentemente de 1 x 10⁻³ M o más, incluso más preferentemente de 1 x 10⁻² M o más.

50 El término "K_D" o "K_a", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la tasa de asociación de una interacción particular antígeno-anticuerpo, mientras que el término "K_{dis}" o "K_d", tal como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a la constante de asociación en equilibrio de una interacción particular de anticuerpo-antígeno. El término "K_D", tal como se usa en el presente documento, está pensado para referirse a la constante de disociación, que se obtiene de la proporción de K_d frente a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para anticuerpos pueden determinarse usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es mediante el uso de resonancia de plasmón superficial, preferentemente usando un sistema de biosensor tal como un sistema Biacore®.

60 La expresión "alta afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 1 x 10⁻⁷ M o menos, más preferentemente de 5 x 10⁻⁸ M o menos, incluso más preferentemente de 1x10⁻⁸ M o menos, incluso más preferentemente de 5 x 10⁻⁹ M o menos e incluso más preferentemente de 1 x 10⁻⁹ M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la unión de "alta afinidad" para un isotipo de IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10⁻⁶ M o menos, más preferentemente de 10⁻⁷ M o menos, incluso más preferentemente de 10⁻⁸ M o menos.

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 los mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas y caballos.

Diversos aspectos de la invención se describen en más detalle en las siguientes subsecciones.

Anticuerpos anti-LAG-3 que tienen propiedades funcionales particulares

Los anticuerpos de la invención se caracterizan por características funcionales particulares o propiedades de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente al LAG-3 humano y pueden unirse al LAG-3 de ciertas otras especies, por ejemplo, LAG-3 de mono (por ejemplo, monos cinomolgos y monos rhesus), pero no se une sustancialmente al LAG-3 de ciertas otras especies, por ejemplo, LAG-3 de ratón. Preferentemente, un anticuerpo de la invención se une al LAG-3 humano con alta afinidad.

La capacidad del anticuerpo para estimular una respuesta inmunológica, tal como una respuesta de linfocitos T específica de antígeno, puede estar indicado por, por ejemplo, la capacidad del anticuerpo para estimular la producción de interleucina-2 (IL-2) en una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la invención se une al LAG-3 humano y presenta la capacidad de estimular una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno. En otras realizaciones, un anticuerpo de la invención se une al LAG-3 humano pero no presenta la capacidad de estimular una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno. Otros medios para evaluar la capacidad del anticuerpo para estimular una respuesta inmunológica incluyen la capacidad del anticuerpo para inhibir el crecimiento tumoral, como en un modelo *in vivo* de injerto tumoral (véase, por ejemplo, el Ejemplo 6) o la capacidad del anticuerpo para estimular una respuesta autoinmune, tal como la capacidad de promover el desarrollo de una enfermedad autoinmune en un modelo autoinmune, tal como la capacidad de promover el desarrollo de diabetes en el modelo de ratón NOD (véase, por ejemplo, el Ejemplo 7).

La unión de un anticuerpo de la invención a LAG-3 se puede evaluar usando una o más técnicas bien establecidas en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, se puede analizar un anticuerpo mediante un ensayo de citometría de flujo en el que el anticuerpo reacciona con una línea celular que expresa LAG-3 humano, tal como las células CHO que se han transfectado para expresar LAG-3 (por ejemplo, LAG-3 humano, o LAG-3 de mono (por ejemplo, mono rhesus o mono cinomolgo) o LAG-3 de ratón) en su superficie celular (véase, por ejemplo, Ejemplo 3A para un ensayo adecuado). Otras células adecuadas para su uso en ensayos de citometría de flujo incluyen los linfocitos T CD4⁺ activados estimulado con anti-CD3, que expresan LAG-3 natural. Adicionalmente, o como alternativa, la unión del anticuerpo, incluyendo la cinética de unión (por ejemplo, el valor de K_D) se puede probar en ensayos de unión BIAcore (véase, por ejemplo, Ejemplo 3B para ensayos adecuados). Todavía otros ensayos de unión adecuados incluyen ensayos ELISA, por ejemplo usando una proteína LAG-3 recombinante (ver, por ejemplo, Ejemplo 1 para un ensayo adecuado).

Preferentemente, un anticuerpo de la invención se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 5 x 10⁻⁸ M o menos, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 2 x 10⁻⁸ M o menos, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 5 x 10⁻⁹ M o menos, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 4 x 10⁻⁹ M o menos, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 3 x 10⁻⁹ M o menos, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 2 x 10⁻⁹ M o menos, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 1 x 10⁻⁹ M o menos, se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 5 x 10⁻¹⁰ M o menos, o se une a una proteína LAG-3 con una K_D de 1 x 10⁻¹⁰ M o menos.

Normalmente, un anticuerpo de la invención se une a LAG-3 en tejidos linfoides, tales como la amígdala, el bazo o el timo, que pueden ser detectados por inmunohistoquímica. Adicionalmente, tal como se describe adicionalmente en el Ejemplo 8, ciertos anticuerpos anti-LAG-3 de la invención tiñen el tejido hipofisario (por ejemplo, se retienen en la hipófisis) según se mide por inmunohistoquímica, mientras que otros anticuerpos anti-LAG-3 de la invención no tiñen el tejido hipofisario (por ejemplo, no se retienen en la hipófisis) tal como se mide por inmunohistoquímica. Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo humano anti-LAG-3 que tiñe el tejido hipofisario por inmunohistoquímica, mientras que en otra realización, la invención proporciona un anticuerpo humano anti-LAG-3 que no tiñe el tejido hipofisario por inmunohistoquímica.

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

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

Un anticuerpo de referencia preferido según la invención es el anticuerpo monoclonal humano 25F7. El 25F7 y otros anticuerpos anti-LAG-3 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se aislaron y se caracterizaron estructuralmente tal como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Las secuencias de aminoácidos de V_H de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en las SEQ ID NO: 37-42, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de V_K de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en las SEQ ID NO: 43-48, respectivamente.

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse al LAG-3 humano, las secuencias de V_H y V_L se pueden "mezclar y combinar" para crear otras moléculas de unión anti-LAG-3. Preferentemente, cuando las cadenas V_H y V_L se mezclan y se combinan, una secuencia de V_H de un emparejamiento particular V_H/V_L se reemplaza por una secuencia de V_H estructuralmente similar. De manera análoga, preferentemente, una secuencia de V_L de un emparejamiento particular V_H/V_L se reemplaza por una secuencia de V_L estructuralmente similar.

Las combinaciones preferidas de cadena pesada y ligera incluyen una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43.

Además se describen en el presente documento anticuerpos que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 o 17E5, o combinaciones de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_H de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en las SEQ ID NO: 37-42, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_H de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en las SEQ ID NO: 43-48, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_H de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en las SEQ ID NO: 13-14, GGY y 16-18, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_K de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en la SEQ ID NO: 19-24, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_K de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en las SEQ ID NO: 25-30. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de la V_K de 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 se muestran en las SEQ ID NO: 31-36, respectivamente. Las regiones CDR se delinearán utilizando el sistema Kabat (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., Publicación de NIH N.º 91-3242).

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse al LAG-3 humano y que la CDR1 proporciona principalmente la especificidad de unión al antígeno, las regiones CDR2 y CDR3, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de V_L se pueden "mezclar y combinar" (es decir, las CDR de diferentes anticuerpos se pueden mezclar y combinar, aunque cada anticuerpo debe contener una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de V_H , y una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de V_L) para crear otras moléculas de unión anti-LAG-3. La unión de LAG-3 de tales anticuerpos "mixtos y combinados" se puede probar usando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los Ejemplos (por ejemplo, ELISA, análisis Biacore®). Preferentemente, cuando las secuencias de CDR de V_H se mezclan y se combinan, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de V_H particular se reemplaza por una secuencia o secuencias de CDR estructuralmente similares. De manera análoga, cuando las secuencias de CDR de V_L se mezclan y se combinan, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de V_L particular preferentemente se reemplaza por una secuencia o secuencias de CDR estructuralmente similares. Será evidente para el experto en la materia que las nuevas secuencias de V_H y V_L se pueden crear sustituyendo una o más secuencias de la región de CDR de V_H y/o V_L con secuencias estructuralmente similares de las secuencias de CDR desveladas en el presente documento para los anticuerpos monoclonales 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5. En una realización preferida, el anticuerpo comprende:

- (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 1;
- (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 7;
- (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 13;
- (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 19;
- (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 25; y
- (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 31.

Es bien sabido en la técnica que el dominio CDR3, independientemente de los dominios CDR1 y/o CDR2, solo puede determinar la especificidad de unión de un anticuerpo para un antígeno afín y que se pueden generar múltiples anticuerpos de manera predecible que tengan la misma especificidad de unión basada en una secuencia de CDR3 común. Véase, por ejemplo, Klimka et al., *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000); Beiboer et al., *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000); Rader et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95:8910-8915 (1998); Barbas et al., *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994); Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 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., *J. Biochem (Tokyo)* 117:452-7 (1995); Bourgeois et al., *J. Virol* 72:807-10 (1998); Levi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:4374-8 (1993); Polymenis y Stoller, *J. Immunol.* 152:5218-5329 (1994) y Xu y Davis, *Immunity* 13:37-45 (2000). Véase también, las patentes de Estados Unidos N.º 6.951.646; 6.914.128; 6.090.382; 6.818.216; 6.156.313; 6.827.925; 5.833.943; 5.762.905 y 5.760.185.

Anticuerpos que tienen secuencias particulares de la línea germinal

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

Por ejemplo, en una realización preferida, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o

una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que es producto de o deriva de un gen humano de V_H 4-34, en donde el anticuerpo se une específicamente a LAG-3 humano. En otra realización preferida, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de o deriva de un gen humano de V_K L6, en donde el anticuerpo se une específicamente a LAG-3 humano. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal aislado, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la presente invención comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o derivado de un gen humano de V_H 4-34 y comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de o derivado de un gen humano de V_K L6, en donde el anticuerpo se une específicamente a LAG-3 humano.

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

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

Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen la inmunización de un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o la selección de una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana presentada in situ con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana más cercana en secuencia (es decir, mayor % de identidad) con la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal, debido, por ejemplo, a mutaciones somáticas de origen natural o a la introducción intencionada de mutaciones de sitio dirigido. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado normalmente es al menos el 90 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene restos de aminoácidos que identifican al anticuerpo humano como humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de la línea germinal de murino). En determinados casos, un anticuerpo humano puede ser al menos el 95 %, o incluso al menos el 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Normalmente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia particular de la línea germinal humana no mostrará más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinados casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

Anticuerpos homólogos

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

- (a) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 % homóloga a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;
- (b) la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 % homóloga a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43; y
- (c) el anticuerpo se une específicamente al LAG-3 humano.

El anticuerpo puede poseer una o más de las siguientes propiedades funcionales tratadas anteriormente, tales como la unión de alta afinidad al LAG-3 humano, la unión al LAG-3 de mono, la falta de unión al LAG-3 de ratón, la capacidad de inhibir la unión de LAG-3 a las moléculas del MHC de clase II y/o la capacidad de estimular respuestas de linfocitos T específicos de antígeno.

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

5 En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de V_H y/o V_L pueden ser del 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % homólogas a las secuencias expuestas anteriormente. Un anticuerpo que tiene las regiones de V_H y V_L que tienen alta homología (es decir, el 80 % o más) con las regiones de V_H y V_L de las secuencias expuestas anteriormente, puede obtenerse por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis de sitio dirigido o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican la SEQ ID NO: 49 o 55, seguido de la prueba del anticuerpo alterado codificado para la función conservada (es decir, las funciones establecidas anteriormente) usando los ensayos
10 funcionales descritos en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias. (es decir, % de homología = $n.^{\circ}$ de posiciones idénticas / $n.^{\circ}$ total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes a continuación.

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

Adicionalmente, o como alternativa, las secuencias de proteína de la presente invención se pueden usar además como una "secuencia problema" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden realizar utilizando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de proteínas en BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a moléculas de anticuerpos de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402.
30 Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, son útiles los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticuerpos con modificaciones conservativas

40 En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos especificadas basadas en 25F7, o modificaciones conservadoras de las mismas, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención. Se entiende en la técnica que se pueden realizar ciertas
45 modificaciones de secuencia conservativas que no eliminan la unión al antígeno. Véase, 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. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una 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 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde:

- (a) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, y modificaciones conservativas de la misma;
- 55 (b) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31, y sus modificaciones conservativas; y
- (c) el anticuerpo se une específicamente a LAG-3 humano.

Adicionalmente, o como alternativa, el anticuerpo puede poseer una o más de las siguientes propiedades funcionales descritas anteriormente, tales como la unión de alta afinidad al LAG-3 humano, la unión al LAG-3 de mono, la falta de unión al LAG-3 de ratón, la capacidad de inhibir la unión de LAG-3 a las moléculas del MHC de clase II y/o la capacidad de estimular respuestas de linfocitos T específicos de antígeno.

65 En una realización preferida, la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y sus modificaciones conservativas; y la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, y sus modificaciones

conservativas. En otra realización preferida, la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y sus modificaciones conservativas; y la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, y sus modificaciones conservativas.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "modificaciones conservativas de secuencia" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del 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 convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas en las que el resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas. (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por consiguiente, uno o más restos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención pueden reemplazarse con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el anticuerpo alterado puede analizarse para determinar la función conservada (es decir, las funciones establecidas anteriormente) usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

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

25 La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humano aislado, o a una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a LAG-3 y se une al mismo epítipo en LAG-3 humano como anticuerpo de referencia, comprendiendo dicho anticuerpo de referencia una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43.

30 En una realización, los anticuerpos de la invención se unen al mismo epítipo en LAG-3 que el anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 25F7 (es decir, tienen la capacidad de competir cruzadamente para unirse al LAG-3 humano con el anticuerpo monoclonal 25F7). En realizaciones preferidas, el anticuerpo de referencia para estudios de competición cruzada puede ser el anticuerpo monoclonal 25F7.

35 Dichos anticuerpos de competencia cruzada pueden identificarse en función de su capacidad de competir de forma cruzada con 25F7 en ensayos convencionales de unión a LAG-3. Por ejemplo, pueden usarse ensayos ELISA convencionales en los que se inmoviliza una proteína LAG-3 humana recombinante en la placa, uno de los anticuerpos está marcado con fluorescencia y se evalúa la capacidad de los anticuerpos no marcados para competir por la unión del anticuerpo marcado. Adicionalmente, o como alternativa, el análisis BIAcore se puede utilizar para evaluar la capacidad de los anticuerpos para competir de forma cruzada. La capacidad de un anticuerpo de ensayo para inhibir la unión de, por ejemplo, 25F7 a LAG-3 humano demuestra que el anticuerpo de ensayo puede competir con 25F7 por la unión a LAG-3 humano y, por lo tanto, se une al mismo epítipo en LAG-3 humano que 25F7. En una realización preferida, el anticuerpo que se une al mismo epítipo en LAG-3 humano que 25F7 es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse y aislarse tal como se describe en los Ejemplos.

40 Tal como se trata en detalle en el Ejemplo 3C, la unión de 25E3, 25F7 y 8B7 al LAG-3 humano se ha mapeado a una región de "bucle extra" dentro del primer dominio extracelular del LAG-3 humano. La secuencia de la región de bucle adicional se establece en la SEQ ID NO: 79. Usando un experimento de exploración de péptidos, la unión de 25E3 a la región de bucle adicional se ha mapeado a la siguiente secuencia de aminoácidos: PGHPLAPG (SEQ ID NO: 76), mientras que la unión de 25F7 a la región de bucle adicional se ha mapeado a la siguiente secuencia de aminoácidos: HPAAPSSW (SEQ ID NO: 77) y la unión de 8B7 a la región de bucle adicional se ha asignado a la siguiente secuencia de aminoácidos: PAAPSSWG (SEQ ID NO: 78). La invención se refiere a un anticuerpo humano anti-LAG-3, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a un epítipo de LAG-3 humano que comprende la secuencia de aminoácidos HPAAPSSW (SEQ ID NO: 77).

Anticuerpos diseñados y modificados genéticamente

60 Un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias de V_H y/o V_L desveladas en el presente documento puede usarse como material de partida para diseñar genéticamente un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas del anticuerpo de partida. Un anticuerpo se puede diseñar genéticamente 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 marco. Adicionalmente, o como alternativa, se puede diseñar genéticamente un anticuerpo modificando los restos en la(s) región(es) constante(s), por ejemplo, para alterar la(s)

función(es) efectora(s) del anticuerpo.

Por ejemplo, el injerto de CDR puede usarse para diseñar regiones variables de anticuerpos. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana de manera predominante a través de los restos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos en las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Dado que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos de origen natural construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo específico de origen natural insertadas en las secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, 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. Sci. EE.UU.* 86:10029-10033; Patentes de los EE.UU. N.º 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370).

Por consiguiente, un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 7 y 13, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 19, 25 y 31, respectivamente. Por consiguiente, tales anticuerpos contienen las secuencias de CDR de V_H y V_L del anticuerpo monoclonal 25F7 y pueden contener diferentes secuencias marco de este anticuerpo.

Dichas secuencias marco se pueden obtener a partir de bases de datos públicas de ADN o de referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humana se pueden encontrar en la base de datos de secuencias 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 otro ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humana se pueden encontrar en la base de datos Genbank. Por ejemplo, las siguientes secuencias de la línea germinal de la cadena pesada que se encuentran en el HuMAb de ratón HCo7 están disponibles en los números de registro de Genbank adjuntos: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 3-33 (NG_0010109 y NT_024637) y 3-7 (NG_0010109 y NT_024637). Como otro ejemplo, las siguientes secuencias de la línea germinal de la cadena pesada que se encuentran en el HuMAb de ratón HCo12 están disponibles en los números de registro de 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).

Las secuencias de proteínas de anticuerpos se comparan con una base de datos de secuencias de proteínas compiladas usando uno de los métodos de búsqueda de similitud de secuencia llamado Gapped BLAST (Altschul et al. (1997) citado anteriormente), que es bien conocido por los expertos en la materia.

Las secuencias marco preferidas para su uso en los anticuerpos de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias marco usadas por anticuerpos seleccionados de la invención, es decir similar a las secuencias marco de V_H 4-34 (SEQ ID NO: 61) y/o a las secuencias marco de V_K L6 (SEQ ID NO: 63) usadas por el anticuerpo monoclonal preferido de la invención. Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H , y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de V_K , pueden insertarse en regiones marco que tienen la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de inmunoglobulina de línea germinal del que proviene la secuencia marco, o las secuencias de CDR pueden insertarse en regiones marco que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de línea germinal. Por ejemplo, se ha descubierto que en determinados casos es beneficioso mutar restos en las regiones marco para conservar o potenciar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo (véase, por ejemplo, la patentes de Estados Unidos N.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370).

Otro tipo de modificación de región variable es mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones de CDR1, la CDR2 y/o la CDR3 de V_H y/o V_L , para mejorar de este modo una o más propiedades de unión (por ejemplo, la afinidad) del anticuerpo de interés. La mutagénesis de sitio dirigido o la mutagénesis mediada por PCR se pueden realizar para introducir la(s) mutación(es), y el efecto sobre la unión de los anticuerpos y otra propiedad de interés, se puede evaluar en ensayos *in vitro* o *in vivo* tal como se describe en el presente documento y se proporciona en los Ejemplos. Preferentemente, se introducen modificaciones conservativas (tal como se trató anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos, pero preferentemente son sustituciones. Además, normalmente no más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR están alterados.

Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales anti-LAG-3 aislados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, descritos en el presente documento pueden comprender una región variable de cadena pesada que

comprende: (a) una región CDR1 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, 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: 1; (b) una región CDR2 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, 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: 7; (c) una región CDR3 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, 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: 13; (d) una región CDR1 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de 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; (e) una región CDR2 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, 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: 25; y (f) una región CDR3 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31, 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: 31.

Los anticuerpos diseñados por ingeniería genética de la invención incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones en los restos de la región marco en V_H y/o V_L, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, tales modificaciones en la región marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia es "retromutar" uno o más restos de la región marco a la correspondiente secuencia de la línea germinal. De manera más específica, un anticuerpo que se ha sometido a una mutación somática puede contener restos de la región marco que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que deriva el anticuerpo. Tales restos se pueden identificar mediante la comparación de las secuencias marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de la que proviene el anticuerpo.

Por ejemplo, La Tabla A muestra las regiones donde una posición de aminoácidos de la región marco (usando el sistema de numeración Kabat) difiere de la línea germinal y cómo esta posición puede ser retromutada a la línea germinal por las sustituciones indicadas:

Tabla A - Retromutaciones a modo de ejemplo		
Región	Posición de aminoácidos en marco (numeración de Kabat)	Retromutación
25E3 V _H	72	G72R
25E3 V _H	95	Y95H
25E3 V _H	97	T97A
25E3 V _H	98	T98R
25F7 V _H	69	L69I
25F7 V _H	71	L71V
25F7 V _H	83	R83S
25F7 V _H	97	F97R
8B7 V _H	76	K76N
8B7 V _H	79	A79S
8B7 V _H	83	N83S
8B7 V _H	112	P112Q
11F2 V _H	3	D3A
17E5 V _H	3	H3Q
8B7 V _H	59	C59Y
8B7 V _H	59	C59S

Otro tipo de modificación en la región marco implica mutar uno o más restos en la región marco o incluso en una o más regiones CDR, para eliminar los epítomos de linfocitos T para reducir de este modo la posible inmunogenicidad del anticuerpo. Esta estrategia también se denomina "desinmunización" y se describe con más detalle en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20030153043.

Además o como alternativa a las modificaciones hechas en la región marco o en las regiones CDR, los anticuerpos de la invención se pueden diseñar genéticamente para que incluyan modificaciones en la región Fc, normalmente, para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Asimismo, un anticuerpo de la invención se puede modificar químicamente (por ejemplo, se pueden unir uno o más grupos químicos al anticuerpo) se puede modificar para alterar su glucosilación, para alterar de nuevo una o más propiedades del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación. La numeración de los restos en la región Fc es la del índice de EU de Kabat.

En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG4 que comprende una mutación de serina a prolina en una posición correspondiente a la posición 228 (S228P; Índice EU) en la región de bisagra de la región constante de la cadena pesada. Se ha documentado que esta mutación abolió la heterogeneidad de los puentes disulfuro de entre cadenas pesadas en la región de bisagra (Angal *et al.* citado anteriormente; la posición 241 se basa en el sistema de numeración Kabat). Por ejemplo, en diversas realizaciones, un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención puede comprender la región variable de la cadena pesada de 25F7 (SEQ ID NO: 37) unida a una región constante de IgG4 humana en la que la Serina en una posición correspondiente a la posición 241 como se describe en Angal *et al.*, citado anteriormente, se ha mutado a prolina. Por consiguiente, para la región variable de cadena pesada de 25F7 unida a una región constante de IgG4 humana, esta mutación se corresponde con una mutación S228P según el índice EU.

En una realización, la región de bisagra de CH1 se modifica de manera que se altera el número de restos de cisteína en la región de bisagra, por ejemplo, se aumenta o se disminuye. Este enfoque 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 ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. De manera más específica, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento bisagra-Fc de manera que el anticuerpo tiene una unión a la proteína A estafilocócica (SpA) deteriorada en relación con la unión a SpA de Fc-bisagra natural. Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos N.º 6.165.745.

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

En otras realizaciones más, se altera la región Fc sustituyendo al menos un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los restos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden reemplazarse con un resto de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero conserve la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector para el que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc del componente C1 del complemento. Esta estrategia se describe en detalle en las Patentes de EE.UU. N.º 5.624.821 y 5.648.260.

En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los restos de aminoácidos 329, 331 y 322 se pueden sustituir por un resto de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una unión a C1q alterada y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o abolida. Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos N.º 6.194.551.

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

En otro ejemplo más, se modifica la región Fc para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) y/o para 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. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación de PCT WO 00/42072. Además, los sitios de unión sobre la TgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han mapeado y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Se demostró que las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la unión a FcγRIII. Adicionalmente, se demostró que los siguientes mutantes combinados mejoran la unión de FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

En otra realización más, se modifica la glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede hacer un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glucosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación marco de la región variable para eliminar de ese modo la glucosilación en ese sitio. Tal aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos

N.º 5.714.350 y 6.350.861.

Adicionalmente, o como alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glucosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de restos de fucosilo o un anticuerpo que tiene que tiene estructuras GlcNAc bisectadas aumentadas. Se ha demostrado que tales patrones de glucosilación alterada aumentan la capacidad de CCDA de los anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glucosilación alterada. Las células con la maquinaria de glucosilación alterada se han descrito en la materia y se pueden usar como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (α (1,6) -fucosiltransferasa), de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos. Las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 FUT8^{-/-} fueron creadas por la alteración dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de reemplazo (véase la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20040110704 y Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Como otro ejemplo, el documento EP 1.176.195 describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosiltransferasa, de tal manera que los anticuerpos expresados en dicha línea celular presentan hipofucosilación reduciendo o eliminando la enzima relacionada con el enlace α -16. El documento EP 1.176.195 también describe líneas celulares que tienen una baja actividad enzimática para agregar fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo, la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La Publicación de PCT WO 03/035835 describe una variante de la línea celular CHO, células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a los hidratos de carbono enlazados a Asn(297), dando también como resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Los anticuerpos con un perfil de glucosilación modificado también se pueden producir en huevos de gallina, tal como se describe en la publicación PCT WO 06/089231. Como alternativa, los anticuerpos con un perfil de glucosilación modificado pueden producirse en células vegetales, tales como *Lemna*. Los métodos para la producción de anticuerpos en un sistema vegetal se describen en la solicitud de patente de EE. UU. correspondiente al expediente del abogado de Alston & Bird LLP N.º 040989/314911, presentado el 11 de agosto de 2006. La publicación de PCT WO 99/54342 describe líneas celulares diseñadas por ingeniería genética para expresar glucosiltransferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo la β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de manera que tales anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas genéticamente presentan estructuras GlcNAc bisectadas aumentadas que dan como resultado una actividad de CCDA aumentada de los anticuerpos (véase también Umama et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Como alternativa, los restos de fucosa del anticuerpo pueden escindirise usando una enzima fucosidasa; por ejemplo, la fucosidasa α -L-fucosidasa elimina los restos de 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 la presente divulgación es la pegilación. Se puede pegilar un anticuerpo para, por ejemplo, aumentar la vida media biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o el fragmento del mismo, normalmente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen 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, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxipoli- polietilenglicol o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinadas realizaciones, el anticuerpo a pegilar es un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para pegilar proteínas son conocidos en la materia y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, los documentos EP 0 154 316 y EP 0 401 384.

Propiedades físicas de los anticuerpos

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden caracterizar por sus diversas propiedades físicas, para detectar y/o diferenciar diferentes clases de los mismos.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden contener uno o más sitios de glucosilación en la región variable de la cadena ligera o pesada. Dichos sitios de glucosilación pueden dar como resultado un aumento de la inmunogenicidad del anticuerpo o una alteración de la pK del anticuerpo debido a la unión al 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) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh et al (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura et al. (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Se sabe que la glucosilación se produce en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-LAG-3 que no contenga glucosilación de región variable. Esto se puede lograr seleccionando anticuerpos que no contienen el motivo de glucosilación en la región variable o mutando restos dentro de la región de glucosilación.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente divulgación no contienen sitios de isomerismo de

asparagina. La desamidación de la asparagina puede tener lugar 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 del polipéptido y disminuye su estabilidad (efecto del ácido isoaspártico).

5 Cada anticuerpo tendrá un punto isoeléctrico único (pI), que generalmente cae en el intervalo de pH de entre 6 y 9,5. El pI para un anticuerpo de IgG1 generalmente se encuentra dentro del intervalo de pH de 7-9,5 y el pI para un anticuerpo IgG4 normalmente se encuentra dentro del intervalo de pH de 6-8. Se especula que los anticuerpos con un pI fuera del intervalo normal pueden tener cierto desarrollo e inestabilidad bajo condiciones *in vivo*. Por consiguiente, se prefiere tener un anticuerpo anti-LAG-3 que contenga un valor de pI que se encuentre en el intervalo normal. Esto se puede lograr seleccionando anticuerpos con un pI en el intervalo normal o mutando restos de superficie cargados.

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

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

25 En otra realización preferida, se seleccionan anticuerpos que tienen efectos de agregación mínimos, que pueden llevar a la activación de una respuesta inmunológica no deseada y/o a propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. En general, los anticuerpos son aceptables con una agregación del 25 % o menos, preferentemente del 20 % o menos, incluso más preferentemente del 15 % o menos, incluso más preferentemente del 10 % o menos e incluso más preferentemente del 5 % o menos. La agregación se puede medir mediante varias técnicas, incluida la columna de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y dispersión de luz.

30 Métodos de diseño genético de anticuerpos

Tal como se trató anteriormente, los anticuerpos anti-LAG-3 que tienen las secuencias de V_H y V_L desveladas en el presente documento pueden usarse para crear nuevos anticuerpos anti-LAG-3 modificando las secuencias de V_H y/o V_L , o las regiones constantes unidas a las mismas. Por consiguiente, las características estructurales de un anticuerpo anti-LAG-3, por ejemplo, 25F7, se usan para crear anticuerpos anti-LAG-3 estructuralmente relacionados que conservan al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como la unión al LAG-3 humano. Por ejemplo, una o más regiones CDR de 25F7, o mutaciones de las mismas, se pueden combinar de forma recombinante con regiones marco conocidas y/u otras CDR para crear más anticuerpos anti-LAG-3 de la invención diseñados genéticamente por recombinación, tal como se ha tratado anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de diseño genético es una o más de las secuencias de V_H y/o de V_L proporcionadas en el presente documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo diseñado genéticamente, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias de V_H y/o V_L proporcionadas en el presente documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Más bien, la información contenida en la(s) secuencia(s) se usa como material de partida para crear una(s) secuencia(s) de "segunda generación" que proviene de la(s) secuencia(s) original(es) y luego la(s) secuencia(s) de "segunda generación" se prepara y expresa como una proteína.

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

- (a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia CDR1 de la SEQ ID NO: 1, la secuencia CDR2 de la SEQ ID NO: 7, y/o la secuencia CDR3 de la SEQ ID NO: 13; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia CDR1 de la SEQ ID NO: 19, la secuencia CDR2 de la SEQ ID NO: 25, y/o la secuencia CDR3 de la SEQ ID NO: 31;
- (b) alterar al menos un resto de aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena ligera para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y
- (c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

65 Se pueden usar técnicas convencionales de biología molecular para preparar y expresar la secuencia de anticuerpos alterada.

Preferentemente, el anticuerpo codificado por la secuencia o secuencias de anticuerpos alteradas es uno que

conserva una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-LAG-3 descritos en el presente documento, cuyas propiedades funcionales incluyen, pero sin limitación:

- (i) unión de alta afinidad a LAG-3 humano;
- (ii) unión al LAG-3 de mono;
- (iii) falta de unión al LAG-3 de ratón
- (iv) una capacidad para inhibir la unión de LAG-3 a moléculas de MHC de clase II; y/o
- (v) la capacidad de estimular una respuesta inmunológica (por ejemplo, una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno).

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden evaluarse utilizando ensayos convencionales disponibles en la materia y/o descritos en el presente documento, tales como los establecidos en los Ejemplos.

En ciertas realizaciones de los métodos de diseño genético de anticuerpos de la invención, las mutaciones pueden introducirse de forma aleatoria o selectiva junto con toda o parte de una secuencia codificante de anticuerpos anti-LAG-3 y los anticuerpos anti-LAG-3 modificados resultantes pueden seleccionarse para la actividad de unión y/o otras propiedades funcionales tal como se describe en el presente documento. Los métodos de mutación se han descrito en la técnica (véase, por ejemplo, las Publicaciones de PCT WO 02/092780 y WO 03/074679).

Moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención

Otro aspecto de la invención se refiere a las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, 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 lejos de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas convencionales, que incluyen el tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la materia. Véase, 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 pueden 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 convencionales de biología molecular. Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que llevan genes de inmunoglobulina humana como se describe más adelante), Los ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo producido por el hibridoma se pueden obtener mediante técnicas convencionales de amplificación por PCR o de clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos de una biblioteca de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, utilizando técnicas de presentación de fagos), un ácido nucleico que codifica tales anticuerpos puede recuperarse de la biblioteca de genes.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la invención son las que codifican las secuencias de V_H y V_L del anticuerpo monoclonal 25F7. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de V_H de 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 y 17E5 se muestran en las SEQ ID NO: 49-54, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de V_L de 25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2 y 17E5 se muestran en las SEQ ID NO: 55-60, respectivamente.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos de V_H y V_L , estos fragmentos de ADN pueden manipularse aún más mediante técnicas convencionales de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpos de longitud completa, a genes de fragmentos Fab o a un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H está operativamente unido a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. La expresión "unido operativamente", tal como se usa en este contexto, pretende significar 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 el marco.

El ADN aislado que codifica la región V_H se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica V_H a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de la región constante de la cadena pesada humana son conocidas en la técnica (véase por ejemplo, Kabat *et al.* (1991), anteriormente citado) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero lo más preferentemente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede unirse operativamente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región V_L se puede convertir en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como en un gen de cadena ligera Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica V_L a otra molécula de ADN que

codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de la región constante de la cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, citado anteriormente) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación por PCR convencional. En las 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 operativamente unidos 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 de V_H y V_L pueden expresarse como una proteína de cadena única contigua, con las regiones de 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. EE.UU.* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

Producción de anticuerpos monoclonales de la invención

Los anticuerpos monoclonales (mAb) de la presente divulgación pueden producirse usando 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 técnicas de presentación en fagos. Los anticuerpos quiméricos o humanizados también son bien conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, la patentes de Estados Unidos N.º 4.816.567; 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370.

Los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra el LAG-3 humano pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmunológico humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones mencionados en el presente documento como HuMAb Mouse® y KM Mouse®, respectivamente, y se denominan colectivamente en el presente documento "ratones de Ig humana".

El HuMAb Mouse® (Medarex®, Inc.) contiene miniloci del gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias humanas de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y ligera k no reorganizadas, 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). Por consiguiente, los ratones presentan una expresión reducida de IgM o k de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humana introducidos se someten a cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgGk humanos de alta afinidad (Lonberg *et al.* (1994), anteriormente citado; 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. NY Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y el uso del HuMAb Mouse®, y las modificaciones genómicas llevadas por tales ratones, se describe adicionalmente en Taylor *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaille *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaille *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. Véase, además, la patentes de Estados Unidos N.º 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; 5.770.429; y 5.545.807; las publicaciones de PCT N.º WO 92/03918; WO 93/12227; WO 94/25585; WO 97/13852; WO 98/24884; WO 99/45962 y WO 01/14424.

En otra realización, los anticuerpos humanos de la invención pueden generarse usando un ratón que lleva secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Este ratón se denomina en el presente documento "KM mouse®" y se describe en detalle en la publicación de PCT WO 02/43478. Una forma modificada de este ratón, que comprende además una alteración homocigótica del gen del receptor endógeno FcγRIIB, también se describe en la publicación de PCT WO 02/43478 y se hace referencia en el presente documento como un "ratón KM/FCGR2D®". Además, pueden usarse ratones con los transgenes de cadena pesada HCo7 o HCo12 o ambos.

Las realizaciones animales transgénicas adicionales incluyen el Xenomouse (Abgenix, Inc., la patentes de Estados Unidos N.º 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963). Otras realizaciones incluyen "ratones TC" (Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 97:722-727) y vacas que llevan transcromosomas humanos de cadena pesada y ligera (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894; publicación de PCT WO 02/092812).

En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos anti-LAG-3 de la invención pueden prepararse usando métodos de presentación en fagos para la selección sistemática en bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. N.º 5.223.409; 5.403.484; 5.571.698; 5.427.908; 5.580.717; 5.969.108; 6.172.197; 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915; y 6.593.081.

Los anticuerpos monoclonales humanos anti-LAG-3 de la invención también se pueden preparar usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunológicas humanas de modo que se pueda generar una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.476.996 y 5.698.767.

En otra realización, los anticuerpos anti-LAG-3 humanos pueden prepararse usando la presentación en fagos donde los fagos comprenden ácidos nucleicos que codifican anticuerpos generados en animales transgénicos previamente inmunizados con LAG-3. Preferentemente, el animal transgénico es un ratón HuMab, KM, o Kirin. Véase, en la patente de EE.UU. N.º 6.794.132.

Inmunización de ratones de Ig humana

Los ratones de Ig humana se pueden inmunizar con una preparación purificada o enriquecida de un antígeno LAG-3, proteína LAG-3 recombinante, o células que expresan una proteína LAG-3. Véase, por ejemplo, Lonberg *et al.* (1994), anteriormente citado; Fishwild *et al.* (1996), anteriormente citado; las Publicaciones de PCT WO 98/24884 o WO 01/14424. Preferentemente, los ratones de 6-16 semanas de vida se inmunizan con 5-50 µg de proteína LAG-3. Como alternativa, se usa una porción de LAG-3 fusionada a un polipéptido no de LAG-3.

Los ratones transgénicos pueden inmunizarse por vía intraperitoneal (IP) o intravenosa (IV) con antígeno LAG-3 en adyuvante completo de Freund, seguido de posteriores inmunizaciones IP o IV con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Como alternativa, se usan adyuvantes distintos de Freund o células enteras en ausencia de adyuvante. El plasma puede seleccionarse mediante ELISA y las células de ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-LAG-3 pueden usarse para fusiones.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos anti-LAG-3 de la invención, los esplenocitos y/o las células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados pueden aislarse y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden seleccionarse para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. 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 que producen anticuerpos monoclonales de la invención

Los anticuerpos de la invención también se pueden producir en un transfectoma de células hospedadoras usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica como es bien conocido en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202). En una realización, El ADN que codifica cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa obtenidas mediante técnicas estándar de biología molecular se inserta en uno o más vectores de expresión, de modo que los genes estén unidos operativamente a secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales. En este contexto, la expresión "unido operativamente" pretende referirse a que se liga un gen de anticuerpo en un vector, de tal forma que las secuencias de control transcripcional y traduccional dentro del vector cumplen con su función prevista de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo.

El término "secuencia reguladora" pretende incluir 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 de 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 células hospedadoras de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados del citomegalovirus (CMV), el virus del simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal (AdMLP)) y polio. Como alternativa, se pueden usar secuencias reguladoras no víricas, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de β-globina. Más aún, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes orígenes, tales como el sistema promotor SRα, que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de linfocitos T humanos tipo 1 (Takebe *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472). EL vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión empleada.

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

Además de los genes de cadena de anticuerpo y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véase, por ejemplo, Patentes de los EE.UU. N.º 4.399.216; 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, el gen marcador de selección confiere normalmente resistencia a fármacos, tal como G418, higromicina o metotrexato, a una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr- con selección/amplificación en metotrexato) y el gen neo (para selección en G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, se transfectan los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" abarquen una gran variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procariotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferentemente células hospedadoras de mamífero, es la más preferida porque tales células eucariotas, y en particular células de mamíferos, son más propensas que las células procariotas a ensamblar y segregar un anticuerpo 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, usadas con un marcador de selección de DHFR, por ejemplo, tal como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NSO, 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 se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped 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 las células hospedadoras. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas convencionales.

Caracterización de la unión de anticuerpos al antígeno

Los anticuerpos de la invención pueden probarse para la unión al LAG-3 humano mediante, por ejemplo, ELISA convencional. Las IgG humanas antiLAG-3 pueden analizarse adicionalmente para determinar la reactividad con un antígeno LAG-3 mediante análisis por transferencia de Western. La especificidad de unión de un anticuerpo de la invención también se puede determinar controlando la unión del anticuerpo a las células que expresan una proteína LAG-3, por ejemplo, citometría de flujo. Estos métodos son conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988), anteriormente citado.

Inmunoconjugados

Los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse con un agente terapéutico para formar un inmunoconjugado tal como un conjugado anticuerpo-fármaco (CAF). Los agentes terapéuticos adecuados incluyen anti metabolitos, agentes alquilantes, ligantes del surco menor del ADN, intercaladores de ADN, reticulantes de ADN, inhibidores de la histona desacetilasa, inhibidores de exportación nuclear, inhibidores del proteosoma, inhibidores de la topoisomerasa I o II, inhibidores de la proteína de choque térmico, inhibidores de tirosina quinasa, antibióticos y agentes antimitóticos. En el CAF, el anticuerpo y el agente terapéutico se conjugan preferentemente a través de un enlazador escindible tal como un peptidilo, disulfuro, o un enlazador de 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 (SEQ ID NO: 15), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser o Glu. Los CAF pueden prepararse tal como se describe en las Patentes de los Estados Unidos N.º 7.087.600; 6.989.452; y 7.129.261; las publicaciones de PCT N.º WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312; y WO 08/103693; las publicaciones de patentes de EE. UU. 20060024317; 20060004081; y 20060247295.

Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente divulgación presenta moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-LAG-3 unido a al menos otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión diferentes o moléculas diana. Por consiguiente, tal 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 para LAG-3 y una segunda especificidad de unión para una molécula desencadenante que recluta células efectoras citotóxicas que pueden eliminar una célula diana que expresa LAG-3.

Los ejemplos de moléculas desencadenantes 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 una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-LAG-3, una tercera especificidad. La tercera especificidad puede ser para un anti-factor de mejora (EF), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína de superficie involucrada en la actividad citotóxica y por lo tanto aumenta la respuesta inmunológica contra la célula diana. Por ejemplo, el anti-factor de mejora puede unir un linfocito T citotóxico (por ejemplo, a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, o ICAM-1) u otra célula inmunológica, dando como resultado una mayor respuesta inmunológica contra la célula diana.

Las moléculas biespecíficas pueden venir en muchos formatos y tamaños diferentes. En un extremo del espectro de tamaños, una molécula biespecífica conserva el formato de anticuerpo tradicional, salvo que, en lugar de tener dos brazos de unión de idéntica especificidad, tiene dos brazos de unión, cada uno con una especificidad diferente. En el otro extremo están las moléculas biespecíficas que consisten en dos fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) unidos por una cadena peptídica, una construcción llamada Bs(scFv)₂. Las moléculas biespecíficas intermedias incluyen dos fragmentos F(ab) diferentes unidos por un enlace de peptidilo. Las moléculas biespecíficas de estos y otros formatos pueden prepararse mediante diseño genético, 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 Spriël et al., *Immunology Today*, 21 (8), 391 - 397 (2000), y las referencias citadas en esos documentos.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente divulgación formulado junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente puede contener uno o más principios farmacéuticamente activos adicionales, tales como otro anticuerpo o un fármaco. Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en una terapia de combinación con, por ejemplo, otro agente inmunoestimulador, agente anticanceroso, un agente antivírico o una vacuna, de tal manera que el anticuerpo anti-LAG-3 mejora la respuesta inmunológica 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 dispersión o suspensión, solubilizantes, colorantes, agentes aromatizantes, recubrimientos, agentes disgregantes, lubricantes, edulcorantes, conservantes, agentes isotónicos y combinaciones de los mismos. La selección y el uso de excipientes adecuados se enseña en Gennaro, ed., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20^a Ed. (Lippincott Williams y Wilkins 2003).

Preferentemente, una composición farmacéutica es adecuada para vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo puede estar revestido con un material para protegerlo de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivarlo. La frase "administración por vía parenteral" tal como se usa en el presente documento significa modos de administración diferentes de la administración oral y tópica, habitualmente mediante inyección e incluyen, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal e infusión. Como alternativa, un anticuerpo de la invención se puede administrar por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden estar en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y que no produce ningún efecto toxicológico indeseado. Ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen las 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 mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similares. Las sales de adición de bases 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, procaína y similares.

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

La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una sola forma de dosificación variará dependiendo del sujeto a tratar y el modo particular de administración y generalmente será esa cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. En general, del cien por ciento, esta cantidad variará desde aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo,

preferentemente de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 70 %, lo más preferentemente de aproximadamente 1 % a aproximadamente el 30 % de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 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 en el tiempo varias dosis divididas, o la dosis se puede reducir proporcionalmente o aumentarse tal como indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico necesario. Como alternativa, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente.

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

30 Una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención preferentemente da como resultado una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debido al padecimiento de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de sujetos con tumor, una "dosis terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente el crecimiento tumoral en al menos aproximadamente el 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente el 40 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente el 60 %, y aún más preferentemente en al menos aproximadamente el 80 % en relación con sujetos no tratados. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor o mejorar los síntomas en un sujeto, que es normalmente un humano o puede ser otro mamífero.

40 La composición farmacéutica puede ser una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, 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.

45 Las composiciones terapéuticas se pueden administrar a través de dispositivos médicos tales como (1) dispositivos de inyección hipodérmica sin aguja (por ejemplo, los 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 (el documento US 4.487.603); (3) dispositivos transdérmicos (el documento US 4.486.194); (4) aparatos de infusión (los documentos US 4.447.233 y 4.447.224); y (5) dispositivos osmóticos (los documentos US 4.439.196 y 4.475.196).

50 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 atraviesan la barrera hematoencefálica, pueden formularse en liposomas, que además puede comprender restos de direccionamiento para mejorar el transporte selectivo a 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.

60 Usos y métodos de la invención

Los anticuerpos, las composiciones de anticuerpos y los métodos de la presente invención tienen numerosas utilidades *in vitro* e *in vivo* que implican, por ejemplo, la detección de LAG-3 o la mejora de la respuesta inmunológica por bloqueo de LAG-3. En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos humanos. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a

5 sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para mejorar la inmunidad en varias situaciones. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en un método para modificar una respuesta inmunológica en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención de tal manera que se modifica la respuesta inmunológica en el sujeto. Preferentemente, se mejora la respuesta, se estimula o se regula positivamente.

10 Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que necesitan potenciar una respuesta inmunológica. Los métodos son particularmente adecuados para el tratamiento de pacientes humanos que tienen un trastorno que puede tratarse aumentando la respuesta inmunológica (por ejemplo, la respuesta inmunológica mediada por linfocitos T). En una realización particular, los métodos son particularmente adecuados para el tratamiento *in vivo* del cáncer. Para lograr una mejora de la inmunidad específica de antígeno, los anticuerpos anti-LAG-3 pueden administrarse junto con un antígeno de interés o el antígeno ya puede estar presente en el sujeto a tratar (por ejemplo, un sujeto portador de un tumor o un sujeto portador de un virus). Cuando los anticuerpos para LAG-3 se administran junto con otro agente, los dos se pueden administrar en cualquier orden o de manera simultánea.

15 La invención proporciona además métodos para detectar la presencia de antígeno LAG-3 humano en una muestra, o medir la cantidad de antígeno LAG-3 humano, que comprende 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 une específicamente al LAG-3 humano, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o parte del mismo y el LAG-3 humano. Entonces se detecta la formación de un complejo, en donde una formación de complejo de diferencia entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia de antígeno LAG-3 humano en la muestra. Además, los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención pueden usarse para purificar LAG-3 humano mediante purificación por inmutafinidad.

20 Dada la capacidad de los anticuerpos anti-LAG-3 de la invención para inhibir la unión de LAG-3 a las moléculas de MHC de clase II y estimular las respuestas de linfocitos T específicos de antígeno, los anticuerpos de la invención también pueden usar métodos *in vitro* e *in vivo* para estimular, mejorar o regular positivamente las respuestas de linfocitos T específicos de antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención puede usarse en un método para estimular una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno que comprende poner en contacto dichos linfocitos T con el anticuerpo de la invención de modo que se estimule una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno. Cualquier indicador adecuado de una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno puede usarse para medir la respuesta de linfocitos T específicos de antígeno. Los ejemplos no limitantes de tales indicadores adecuados incluyen una mayor proliferación de linfocitos T en presencia del anticuerpo y/o aumentar la producción de citocinas en presencia del anticuerpo. En una realización preferida, se estimula la producción de interleucina-2 por el linfocito T específico de antígeno.

25 La invención también proporciona un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en un método para estimular una respuesta inmunológica (por ejemplo, una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno) en un sujeto que comprende administrar el anticuerpo de la invención al sujeto de tal manera que se estimule una respuesta inmunológica (por ejemplo, una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno) en el sujeto. En una realización preferida, el sujeto es un sujeto portador de tumor y se estimula una respuesta inmunológica contra el tumor. En otra realización preferida, el sujeto es un sujeto portador de virus y se estimula una respuesta inmunológica contra el virus.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento 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 el anticuerpo de la invención de modo que el crecimiento del tumor se inhiba en el sujeto. En otro aspecto más, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en un método de tratamiento de infección vírica en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo de la invención de modo que la infección vírica se trate en el sujeto.

35 Estos y otros usos de la invención se analizan con más detalle a continuación.

35 Cáncer

El bloqueo de LAG-3 por anticuerpos puede mejorar la respuesta inmunológica a las células cancerosas en el paciente. En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en el tratamiento *in vivo* de un sujeto, de tal manera que se inhibe el crecimiento de tumores cancerosos. Un anticuerpo anti-LAG-3 puede usarse solo para inhibir el crecimiento de tumores cancerosos. Como alternativa, un anticuerpo anti-LAG-3 puede usarse junto con otros agentes inmunogénicos, tratamientos estándar contra el cáncer u otros anticuerpos, tal como se describe a continuación.

65 Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo, para su uso en un método de inhibición del crecimiento de células tumorales en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-LAG-3, o una porción de unión a antígeno del mismo. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano anti-LAG-3 (como cualquiera

de los anticuerpos humanos anti-LAG-3 humanos descritos en el presente documento). Adicionalmente, o como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-LAG-3 quimérico o humanizado.

Los cánceres preferidos cuyo crecimiento puede inhibirse usando los anticuerpos de la invención incluyen cánceres que normalmente responden a la inmunoterapia. Los ejemplos no limitantes de cánceres preferidos para tratamiento incluyen melanoma (por ejemplo, metastásico melanoma maligno), 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). Adicionalmente, la invención incluye neoplasias refractarias o recurrentes cuyo crecimiento se puede inhibir usando los anticuerpos de la invención.

Los ejemplos de otros cánceres que pueden tratarse usando anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, incluyendo el cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículos, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias crónicas o agudas, incluyendo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o del uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos ambientalmente incluyendo aquellos inducidos por amianto, y combinaciones de dichos cánceres. La presente invención también es 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 inmunogénico, tales como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos), células y células transfectadas con genes que codifican citocinas inmunoestimulantes (He et al (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Los ejemplos no limitativos de vacunas tumorales que se pueden usar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citocina GM-CSF (tratado en detalle a continuación).

En humanos, algunos tumores han demostrado ser inmunogénicos, como los melanomas. Al aumentar el umbral de activación de los linfocitos T por el bloqueo de LAG-3, las respuestas tumorales en el hospedador se pueden activar.

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, pág. 3023-3043 en DeVita et al. (eds.), 1997, *Cáncer: Principles and Practice of Oncology*, Quinta Edición). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna usando células tumorales autólogas o alogénicas. Se ha demostrado que estas vacunas celulares son más eficaces cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. Se ha demostrado que el GM-CSF es un potente activador de la presentación de antígenos para la vacunación de tumores (Dranoff et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 3539-43).

El estudio de la expresión génica y los patrones de expresión génica a gran escala en diversos tumores ha conducido a la definición de los denominados antígenos específicos de tumores (Rosenberg, SA (1999) *Immunity* 10: 281-7). En muchos casos, estos antígenos específicos de tumor son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula de la que se originó el tumor, por ejemplo, antígenos de melanocitos gp100, antígenos MAGE y Trp-2. Más importante aún, se puede demostrar que muchos de estos antígenos son las dianas de linfocitos T específicos de tumor encontrados en el hospedador. El bloqueo de LAG-3 puede usarse junto con una colección de proteínas recombinantes y/o péptidos expresados en un tumor con el fin de generar una respuesta inmune a estas proteínas. Estas proteínas son normalmente vistas por el sistema inmunitario como antígenos propios y por lo tanto, son tolerantes a ellos. El antígeno tumoral puede incluir la proteína telomerasa, que se requiere para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85 % de los cánceres humanos y en solo 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). El antígeno tumoral también puede ser "neo-antígenos" expresados en células cancerosas debido a mutaciones somáticas que alteran la secuencia proteica o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (es decir, bcr-abl en el cromosoma Filadelfia), o idiotipo de tumores de linfocitos B.

Otras vacunas de tumores pueden incluir las proteínas de virus implicados en cánceres humanos tales como virus del papiloma humano (HPV), virus de la hepatitis (VHB y VHC) y virus del herpes sarcoma de Kaposi (KHSV). Otra

forma de antígeno específico del tumor que puede usarse 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 altamente eficientes en la administración a las células que presentan antígeno para provocar la inmunidad tumoral (Suot y Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) *Science* 278:117-120).

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

El bloqueo de LAG-3 también se puede combinar con tratamientos convencionales contra el cáncer. El bloqueo de LAG-3 puede combinarse efectivamente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, puede ser posible reducir la dosis de reactivo quimioterapéutico administrado (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Un ejemplo de tal combinación es un anticuerpo anti-LAG-3 en combinación con descabazina para el tratamiento del melanoma. Otro ejemplo de tal combinación es un anticuerpo anti-LAG-3 en combinación con interleucina-2 (IL-2) para el tratamiento del melanoma. La razón científica detrás del 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 los compuestos quimioterapéuticos, debería dar lugar a niveles aumentados de antígeno tumoral en la ruta de presentación del antígeno. Otras terapias combinadas que pueden dar como resultado la sinergia con el bloqueo de LAG-3 a través de la muerte celular son radiación, cirugía y privación de hormonas. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el hospedador. Los inhibidores de la angiogénesis también se pueden combinar con el bloqueo de LAG-3. La inhibición de la angiogénesis conduce a la muerte de células tumorales que pueden alimentar el antígeno tumoral en las rutas de presentación del antígeno hospedador.

Los anticuerpos de bloqueo de LAG-3 también se pueden usar en combinación con anticuerpos biespecíficos que dirigen las células efectoras que expresan el receptor Fc α o Fc γ a las células tumorales (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 5.922.845 y 5.837.243). Se pueden usar anticuerpos biespecíficos para dirigir dos antígenos separados. Por ejemplo, se han usado compuestos biespecíficos de anti-receptor Fc/anti-antígeno tumoral (por ejemplo, Her-2/neu) para dirigir macrófagos a sitios de tumor. Este direccionamiento puede activar más eficazmente las respuestas tumorales específicas. El grupo de linfocitos T de estas respuestas aumentará mediante el uso del bloqueo de LAG-3. Como alternativa, el antígeno puede administrarse directamente a las DC mediante el uso de anticuerpos biespecíficos que se unen al antígeno tumoral y un marcador de superficie celular específico de células dendríticas.

Los tumores evaden la vigilancia inmune del hospedador por una gran diversidad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden ser superados por la inactivación de proteínas que son expresadas por los tumores y que son inmunosupresoras. Estas incluyen entre otras TGF- β (Kehrl, J. 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 para cada una de estas entidades pueden usarse en combinación con anti-LAG-3 para contrarrestar los efectos del agente inmunosupresor y favorecer las respuestas inmunes tumorales por parte del hospedador.

Se pueden usar otros anticuerpos que activan la respuesta inmune del hospedador en combinación con anti-LAG-3. Estos incluyen moléculas en la superficie de las células dendríticas que activan la función DC y la presentación del antígeno. Los anticuerpos anti-CD40 son capaces de sustituir eficazmente la actividad de los linfocitos T colaboradores (Ridge et al. (1998) *Nature* 393: 474-478) y se puede utilizar junto con los anticuerpos de LAG-3 (Ito et al. (2000) *Immunobiology* 201 (5) 527-40). La activación de anticuerpos contra moléculas coestimuladoras de linfocitos T como CTLA-4 (por ejemplo, la 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) también pueden proporcionar niveles incrementados de la activación de linfocitos T.

El trasplante de médula ósea se utiliza actualmente para tratar diversos tumores de origen hematopoyético. Mientras que la enfermedad del injerto contra huésped es una consecuencia de este tratamiento, el beneficio terapéutico puede obtenerse a partir de respuestas de injerto frente a tumor. El bloqueo de LAG-3 puede usarse para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos de tumor injertados donantes.

También hay varios protocolos de tratamiento experimental que involucran la activación *ex vivo* y la expansión de linfocitos T específicos de antígeno y la transferencia adoptiva de estas células a receptores para estimular los linfocitos T específicos de antígeno contra el tumor (Greenberg y Riddell (1999) *Science* 285: 546-51). Estos métodos también se pueden usar para activar las respuestas de los linfocitos T a agentes infecciosos tales como el CMV. La activación *ex vivo* en presencia de anticuerpos anti-LAG-3 puede aumentar la frecuencia y la actividad de los linfocitos T transferidos adoptivamente.

Enfermedades infecciosas

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

15 Similar a su aplicación a los tumores como se ha analizado anteriormente, el bloqueo de LAG-3 mediado por
 anticuerpos se puede usar solo o como adyuvante, en combinación con vacunas, para estimular la respuesta inmune
 a patógenos, toxinas y autoantígenos. Los ejemplos de patógenos para los que este enfoque terapéutico puede ser
 20 particularmente útil, incluyen patógenos para los que actualmente no existe una vacuna eficaz, o patógenos para los
 cuales las vacunas convencionales son menos que completamente eficaces. Estos incluyen, pero sin limitación, VIH,
 Hepatitis (A, B, y C), gripe, Herpes, Giardia, Malaria, Leishmania, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa.
 El bloqueo de LAG-3 es particularmente útil contra infecciones establecidas por agentes tales como el VIH que
 25 presentan antígenos alterados durante el transcurso de las infecciones. Estos nuevos epítopos se reconocen como
 extraños en el momento de la administración de anti-LAG-3 humano, provocando así una fuerte respuesta de
 linfocitos T que no se amortigua por las señales negativas a través de LAG-3.

30 Algunos ejemplos de virus patógenos que causan infecciones tratables mediante métodos descritos en el presente
 documento incluyen VIH, hepatitis (A, B o C), herpes virus (por ejemplo, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, y CMV, virus
 25 Epstein Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus coxsackie, 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 molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC y virus de la
 encefalitis arboviral.

35 Algunos ejemplos de bacterias patógenas que causan infecciones tratables mediante procedimientos de la
 divulgación incluyen clamidia, bacterias rickettsiales, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumonococos,
 meningococos y gonococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difteria, salmonella, bacilos,
 cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospirosis y bacterias de la enfermedad de Lyme.

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

45 Algunos ejemplos de parásitos patógenos que causan infecciones tratables mediante los métodos descritos en el
 presente documento incluyen Entamoeba histolytica, Balantidium coli, Naegleriafowleri, Acanthamoeba sp., Giardia
 40 lambia, Cryptosporidium sp., Pneumocystis carinii, Plasmodium vivax, Babesia microti, Trypanosoma brucei,
 Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani, Toxoplasma gondii, Nippostrongylus brasiliensis.

45 En todos los métodos anteriores, el bloqueo de LAG-3 puede combinarse con otras formas de inmunoterapia tales
 como tratamiento con citocinas (por ejemplo, interferones, GM-CSF, G-CSF, IL-2) o terapia de anticuerpos
 50 biospecíficos, que proporciona una presentación de antígenos tumorales mejorada (véase, por ejemplo, Holliger
 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:6444-6448; Poljak (1994) Structure 2:1121-1123).

50 Reacciones autoinmunes

Los anticuerpos anti-LAG-3 pueden provocar y amplificar respuestas autoinmunes. De hecho, la inducción de
 respuestas antitumorales usando células tumorales y vacunas peptídicas revela que muchas respuestas
 55 antitumorales implican antirreactividades (van Elsas et al. (2001) J. Exp. Med. 194:481-489; Overwijk, et al. (1999)
 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 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 el uso del bloqueo anti-LAG-
 3 junto con diversas autoproteínas para diseñar protocolos de vacunación para generar eficazmente respuestas
 inmunes contra estas autoproteínas para el tratamiento de la enfermedad. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer
 60 implica la acumulación inapropiada de péptido A β en depósitos amiloides en el cerebro; las respuestas de
 anticuerpos contra el amiloide son capaces de eliminar estos depósitos amiloides (Schenk et al., (1999) Nature 400:
 173-177).

Otras autoproteínas también pueden usarse como dianas tales como IgE para el tratamiento de alergia y asma, y
 65 TNF α para la artritis reumatoide. Finalmente, las respuestas de anticuerpos a varias hormonas pueden ser inducidas
 por el uso de anticuerpos anti-LAG-3. Para la anticoncepción se pueden utilizar respuestas de anticuerpos
 neutralizantes a hormonas reproductivas. La respuesta de anticuerpos neutralizantes a hormonas y otros factores

solubles que se requieren para el crecimiento de tumores particulares también pueden considerarse como posibles dianas de vacunación.

5 Pueden usarse métodos análogos como se ha descrito anteriormente para el uso del anticuerpo anti-LAG-3 para la inducción de respuestas terapéuticas autoinmunes para tratar pacientes que tienen una acumulación inapropiada de otros auto-antígenos, tales como depósitos amiloides, incluyendo A β en la enfermedad de Alzheimer, citocinas tales como TNF α e IgE.

10 Vacunas

10 Los anticuerpos anti-LAG-3 pueden usarse para estimular respuestas inmunológicas específicas de antígeno mediante la administración conjunta de un anticuerpo anti-LAG-3 con un antígeno de interés (por ejemplo, una vacuna). Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo, para su uso en un método para mejorar la respuesta inmunológica para un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto: (i) el antígeno; y (ii) el anticuerpo anti-LAG-3, o su porción de unión a antígeno, de forma que se mejora una respuesta inmunitaria al antígeno en el sujeto. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-LAG-3 humano (tal como cualquiera de los anticuerpos anti-LAG-3 humanos descritos en el presente documento). Adicionalmente, o como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral, un antígeno vírico, un antígeno bacteriano o un antígeno de un patógeno. Los ejemplos no limitativos de tales antígenos incluyen los analizados en las secciones anteriores, tales como los antígenos tumorales (o vacunas tumorales) analizados anteriormente, o antígenos de los virus, bacterias u otros patógenos descritos anteriormente.

25 Las vías de administración adecuadas de las composiciones de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, moléculas e inmunoconjugados multiespecíficos y biespecíficos) de la invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidos en la técnica y pueden ser seleccionados por los expertos en la materia. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos pueden administrarse mediante inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosis adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpos.

30 Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos anti-LAG-3 humanos de la invención pueden administrarse conjuntamente con uno u otros agentes terapéuticos más, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede estar unido al agente (como un inmunocomplejo) o puede administrarse por separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo se puede administrar antes, después o simultáneamente con el agente o pueden coadministrarse con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anticancerosa, por ejemplo, radiación. Dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorrubicina (adriamicina), cisplatino, bleomicina sulfato, carmustina, clorambucilo, dacarbazina y ciclofosfamida hidroxurea que, por sí solos, son solamente eficaces a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino se administra por vía intravenosa como una dosis de 100 mg/ml de dosis una vez cada cuatro semanas y la adriamicina se administra por vía intravenosa en forma de una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La administración conjunta de los anticuerpos anti-LAG-3 humanos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerígenos que operan a través de diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico para las células tumorales humanas. Dicha coadministración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o a un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que las hará no reactivas con el anticuerpo.

50 También se desvelan en el presente documento kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o inmunoconjugados) e instrucciones para su uso. El kit puede contener además al menos 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 en el antígeno LAG-3 distinto del primer anticuerpo humano). Los kits incluyen normalmente una etiqueta que indica el uso pretendido del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con el kit, o que de otro modo acompaña al kit.

55 Terapia de combinación

60 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en métodos de terapia combinada en los que el anticuerpo anti-LAG-3 se coadministra con uno o más anticuerpos adicionales que son eficaces para estimular las respuestas inmunológicas para así potenciar aún más, estimular o regular positivamente las respuestas inmunológicas en un sujeto. Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en un método para estimular una respuesta inmunológica en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo anti-LAG-3 y uno o más anticuerpos inmunoestimuladores adicionales, tal como un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 y/o un anticuerpo anti-CTLA-4, de tal manera que se estimula una respuesta inmunológica en el sujeto, por ejemplo, para inhibir el crecimiento tumoral o para estimular una respuesta

antivírica. En una realización, al sujeto se le administra un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-PD-1. En otra realización, al sujeto se le administra un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-PD-L1. En otra realización más, al sujeto se le administra un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-CTLA-4. En una realización, el anticuerpo anti-LAG-3 es un anticuerpo humano, tal como un anticuerpo de la divulgación. Como alternativa, el anticuerpo anti-LAG-3 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado (por ejemplo, preparado a partir de un mAb anti-LAG-3 de ratón). En otra realización, el al menos un anticuerpo inmunoestimulador adicional (por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 y/o anti-CTLA-4) es un anticuerpo humano. Como alternativa, el al menos un anticuerpo inmunoestimulador adicional puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado (por ejemplo, preparado a partir de un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 y/o anti-CTLA-4 de ratón).

En una realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer), que comprende administrar el anticuerpo de LAG-3 y un anticuerpo de CTLA-4 a un sujeto. En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-LAG-3 se administra a una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-CTLA-4 se administra a una dosis subterapéutica, o ambos se administran a una dosis subterapéutica. En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en un método para alterar un evento adverso asociado al tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar el anticuerpo anti-LAG-3 y una dosis subterapéutica de anticuerpo anti-CTLA-4 a un sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 es el anticuerpo monoclonal de secuencia humana 10D1 (descrito en la publicación de PCT WO 01/14424) y el anticuerpo anti-LAG-3 es el anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como 25F7 descrito en el presente documento. Otros anticuerpos anti-CTLA-4 abarcados por los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, los divulgados en: WO 98/42752; WO 00/37504; la patente de EE.UU. N.º 6.207.156; Hurwitz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95(17): 10067-10071; Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology 22(145): Resumen N.º 2505 (anticuerpo CP-675206); y Mokyr et al. (1998) Cancer Res. 58:5301-5304. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 se une al CTLA-4 humano con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, se une al CTLA-4 humano con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, se une al CTLA-4 humano con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, o se une al CTLA-4 humano con una K_D de entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M o menos.

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

En una realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer), que comprende administrar el anticuerpo de LAG-3 y un anticuerpo de PD-L1 a un sujeto. En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-LAG-3 se administra a una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-PD-L1 se administra a una dosis subterapéutica, o ambos se administran a una dosis subterapéutica. En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-LAG-3, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en un método para alterar un evento adverso asociado al tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar el anticuerpo anti-LAG-3 y una dosis subterapéutica de anticuerpo anti-PD-L1 a un sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana y el anticuerpo anti-LAG-3 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como 25F7 descrito en el presente documento. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 de secuencia humana incluyen 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 y 13G4, que se describen en la publicación de PCT WO 07/005874. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 se une al PD-L1 humano con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, se une al PD-L1 humano con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, se une al PD-L1 humano con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, o se une al 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 antígenos diana secundarios tales como CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 por anticuerpos puede mejorar la respuesta inmune a las células cancerosas en el paciente. Los cánceres cuyo

crecimiento puede inhibirse usando los anticuerpos de la divulgación instantánea incluyen cánceres que normalmente responden a la inmunoterapia. Los ejemplos representativos de cánceres para el tratamiento con la terapia de combinación de la divulgación instantánea incluyen aquellos cánceres específicamente enumerados anteriormente en la discusión de la monoterapia con anticuerpos anti-LAG-3.

5 En determinadas realizaciones, la combinación de anticuerpos terapéuticos discutidos 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, 10 un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-LAG-3 pueden administrarse secuencialmente, tales como el anticuerpo anti-CTLA-4 que se administra primero y el anticuerpo anti-LAG-3 segundo, o el anticuerpo anti-LAG-3 que se administra primero y el anticuerpo anti-CTLA-4 segundo. Adicionalmente, o como alternativa, un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo anti-LAG-3 pueden administrarse secuencialmente, tales como el anticuerpo anti-PD-1 que se administra primero y el anticuerpo anti-LAG-3 segundo, o el anticuerpo anti-LAG-3 que se administra primero y el anticuerpo anti-PD-1 segundo. Adicionalmente, o como alternativa, un anticuerpo anti-PD-L1 y un anticuerpo anti-LAG-3 pueden administrarse secuencialmente, tales como el anticuerpo anti-PD-L1 que se administra primero y el anticuerpo anti-LAG-3 segundo, o el anticuerpo anti-LAG-3 que se administra primero y el anticuerpo anti-PD-L1 segundo.

20 Asimismo, si se administra secuencialmente más de una dosis de la terapia combinada, el orden de la administración secuencial puede invertirse o mantenerse en el mismo orden en cada punto temporal de administración, las administraciones secuenciales se pueden combinar con administraciones simultáneas o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, la primera administración de una combinación de anticuerpo anti-CTLA-4 y anticuerpo anti-LAG-3 puede ser simultánea, la segunda administración puede ser secuencial con anti-CTLA-4 primero y anti-LAG-3 segundo, y la tercera administración puede ser secuencial con anti-LAG-3 primero y anti-CTLA-4 segundo, etc. Adicionalmente, o como alternativa, la primera administración de una combinación de anticuerpo anti-PD-1 y anticuerpo anti-LAG-3 puede ser simultánea, la segunda administración puede ser secuencial con anti-PD-1 primero y anti-LAG-3 segundo, y la tercera administración puede ser secuencial con anti-LAG-3 primero y anti-PD-1 segundo, etc. Adicionalmente, o como alternativa, la primera administración de una combinación de anticuerpo anti-PD-L1 y anticuerpo anti-LAG-3 puede ser simultánea, la segunda administración puede ser secuencial con anti-PD-L1 primero y anti-LAG-3 segundo, y la tercera administración puede ser secuencial con anti-LAG-3 primero y anti-PD-L1 segundo, etc. Otro esquema de dosificación representativo puede implicar una primera administración que es secuencial con anti-LAG-3 primero y anti-CTLA-4 (y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1) en segundo lugar, y las administraciones posteriores pueden ser simultáneas.

35 Opcionalmente, La combinación de anti-LAG-3 y uno o más anticuerpos adicionales (por ejemplo, los anticuerpos anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1) pueden combinarse adicionalmente con un agente inmunogénico, tales como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos), células y células transfectadas con genes que codifican citocinas inmunoestimulantes (He et al (2004) J. Immunol. 173:4919-28). Los ejemplos no limitativos de vacunas tumorales que se pueden usar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citocina GM-CSF (tratado en detalle 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 discutidos en detalle anteriormente con respecto a la monoterapia con anticuerpos anti-LAG-3.

Un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 también se puede combinar con tratamientos estándar contra el cáncer. 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 otro reactivo quimioterapéutico administrado con la combinación de la divulgación instantánea (Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304). Un ejemplo de tal combinación es una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1 en combinación con decarbazina para el tratamiento del melanoma. Otro ejemplo es una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1 en combinación con interleucina-2 (IL-2) para el tratamiento del melanoma. El fundamento científico detrás del uso combinado del bloqueo de LAG-3 y de CTLA-4 y/o de PD-1 y/o de PD-L1 con quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería dar lugar a niveles aumentados de antígeno tumoral en la ruta de presentación del antígeno. Otras terapias combinadas que pueden producir sinergia con un bloqueo combinado de LAG-3 y de CTLA-4 y/o de PD-1 y/o de PD-L1 a través de la muerte celular incluyen radiación, cirugía o privación hormonal. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el hospedador. Los inhibidores de la angiogénesis también se pueden combinar con un bloqueo combinado de LAG-3 y de CTLA-4 y/o de PD-1 y/o de PD-L1. La inhibición de la angiogénesis conduce a la muerte de las células tumorales, que puede ser una fuente de antígeno tumoral alimentado en las vías de presentación del antígeno del hospedador.

65 También se puede usar una combinación de anticuerpos de bloqueo de LAG-3 y de CTLA-4 y/o de PD-1 y/o de PD-L1 en combinación con anticuerpos biespecíficos que dirigen las células efectoras que expresan el receptor Fcα

Fcy a las células tumorales (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 5.922.845 y 5.837.243). Se pueden usar anticuerpos biespecíficos para dirigir dos antígenos separados. El brazo de linfocitos T de estas respuestas se aumentaría mediante el uso de un bloqueo combinado de LAG-3 y de CTLA-4 y/o de PD-1 y/o de PD-L1.

5 En otro ejemplo, una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1 se puede usar junto con anticuerpos antineoplásicos, tales como Rituxan® (rituximab), Herceptin® (trastuzumab), Bexxar® (tositumomab), Zevalin® (ibritumomab), Campath® (alemtuzumab), Lymphocide® (epruzumab), Avastin® (bevacizumab) y Tarceva® (erlotinib) y similares. A modo de ejemplo y sin querer estar ligados a la teoría, el
10 tratamiento con un anticuerpo anticancerígeno o un anticuerpo anticancerígeno conjugado con una toxina puede llevar a la muerte de células cancerosas (por ejemplo, células tumorales) que potenciarían una respuesta inmunológica 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 en
15 combinación con anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1, de manera simultánea o secuencial o cualquier combinación de los mismos, que puede potenciar una respuesta inmunológica antitumoral por parte del hospedador.

Los tumores evaden la vigilancia inmune del hospedador por una gran diversidad de mecanismos. Muchos de estos
20 mecanismos pueden ser superados por la inactivación de proteínas, que se expresan por los tumores y que son inmunosupresores. Estos 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 para cada una de estas entidades pueden combinarse adicionalmente con una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 para contrarrestar los
25 efectos de los agentes inmunosupresores y favorecer respuestas inmunológicas antitumorales por parte del hospedador.

Otros anticuerpos que pueden usarse para activar la respuesta inmunológica del hospedador se pueden usar además en combinación con una combinación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1. Estos incluyen moléculas en la superficie de las células dendríticas que activan la función DC y la presentación
30 del antígeno. Los anticuerpos anti-CD40 (Ridge et al., citado anteriormente) puede usarse junto con una combinación de anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o de anti-PD-1 y/o de anti-PD-L1 (Ito et al. citado anteriormente). Otros anticuerpos activadores de las moléculas coestimuladoras de linfocitos T Weinberg et al., citado anteriormente, Melero et al., citado anteriormente, Huttoff et al., citado anteriormente) también pueden proporcionar mayores niveles de activación de linfocitos T.

35 Tal como se trató anteriormente, el trasplante de médula ósea se utiliza actualmente para tratar diversos tumores de origen hematopoyético. se puede usar un bloqueo combinado de LAG-3 y CTLA-4 y/o de PD-1 y/o de PD-L1 para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos de tumor injertados por donante.

40 Varios protocolos de tratamiento experimental implican la activación y expansión *ex vivo* de linfocitos T específicos de antígeno y la transferencia adoptiva de estas células a receptores para linfocitos T específicos de antígeno contra tumor (Greenberg y Riddell, citado anteriormente). Estos métodos también se pueden usar para activar las respuestas de los linfocitos T a agentes infecciosos tales como el CMV. Se puede esperar que la activación *ex vivo* en presencia de los anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 aumente la frecuencia y
45 actividad de los linfocitos T transferidos adoptivamente.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-LAG-3 o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en un método para alterar un evento adverso asociado al
50 tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer) con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar el anticuerpo anti-LAG-3 y una dosis subterapéutica de anticuerpo anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 a un sujeto. Por ejemplo, la incidencia de colitis o diarrea inducida por anticuerpos terapéuticos inmunoestimuladores puede reducirse mediante la administración de un esteroide no absorbible al paciente. Debido a que cualquier paciente que recibirá un anticuerpo terapéutico inmunoestimulador está en riesgo de desarrollar colitis o diarrea inducida por dicho anticuerpo, toda esta población de pacientes es adecuada para la terapia de
55 acuerdo con los métodos de la presente invención. Aunque los esteroides se han administrado para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y prevenir exacerbaciones de la EII, no se han utilizado para prevenir (disminuir la incidencia de) EII en pacientes que no han sido diagnosticados con EII. Los efectos secundarios significativos asociados a los esteroides, incluso esteroides no absorbibles, han desalentado el uso profiláctico.

60 En realizaciones adicionales, una combinación del bloqueo de LAG-3 y CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 (es decir, los anticuerpos terapéuticos inmunoestimulantes anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o los anticuerpos anti-PD-1 y/o anti-PD-L1) pueden combinarse 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 metabolismo extenso de primer paso tal que, tras el metabolismo en el hígado, la biodisponibilidad del esteroide es baja, es decir, menos de
65 aproximadamente el 20 %. En una realización de la invención, el esteroide no absorbible es budesonida. La budesonida es un glucocorticosteroide de acción local, que se metaboliza ampliamente, principalmente por el

hígado, después de la administración oral. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) es una formulación oral de budesonida que depende del pH y del tiempo, desarrollada para optimizar la administración del fármaco al íleon y a todo el colon. ENTOCORT EC® está aprobado en los EE.UU. para el tratamiento de la enfermedad de Crohn leve a moderada que afecta al íleon y/o al colon ascendente. La dosis oral habitual de ENTOCORT EC® para el tratamiento de la enfermedad de Crohn es de 6 a 9 mg/día. ENTOCORT EC® se libera en los intestinos antes de ser absorbido y retenido en la mucosa intestinal. Una vez que pasa a través del tejido diana de la mucosa intestinal, ENTOCORT EC® se metaboliza ampliamente por el sistema del citocromo P450 en el hígado a metabolitos con actividad glucocorticoide insignificante. Por lo tanto, la biodisponibilidad es baja (alrededor del 10 %). La baja biodisponibilidad de budesonida da como resultado una relación terapéutica mejorada en comparación con otros glucocorticoides con un metabolismo de primer paso menos extenso. La budesonida produce menos efectos adversos, incluyendo menos supresión hipotálamica-hipofisaria, que los corticosteroides de acción sistémica. Sin embargo, la administración crónica de ENTOCORT EC® puede producir efectos sistémicos de glucocorticoides, tales como hipercorticismismo y supresión suprarrenal. Véase PDR 58th ed. 2004; 608-610.

En otras realizaciones adicionales, una combinación de bloqueo de LAG-3 y CTLA-4 y/o de PD-1 y/o de PD-L1 (es decir, los anticuerpos terapéuticos inmunoestimulantes anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o los anticuerpos anti-PD-1 y/o anti-PD-L1) junto con un esteroide no absorbible pueden combinarse adicionalmente con un salicilato. Los salicilatos incluyen agentes 5-ASA tales como, por ejemplo: sulfasalazina (AZULFIDINE®, Pharmacia y UpJohn); olsalazina (DIPENTUM®, Pharmacia y 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 usos médicos de la presente invención, un salicilato administrado en combinación con los anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y un esteroide no absorbible puede incluir cualquier administración superpuesta o secuencial del salicilato y el esteroide no absorbible con el fin de disminuir la incidencia de colitis inducida por los anticuerpos inmunoestimuladores. Por consiguiente, por ejemplo, los métodos para reducir la incidencia de colitis inducida por los anticuerpos inmunoestimuladores de acuerdo con la presente invención incluyen la administración de un salicilato y un no absorbible simultáneamente o secuencialmente. (por ejemplo, se administra un salicilato 6 horas después de un esteroide no absorbible), o cualquier combinación de los mismos. Además, de acuerdo con la presente invención, un salicilato y un esteroide no absorbible pueden administrarse por la misma vía (por ejemplo, ambos se administran por vía oral) o por diferentes vías (por ejemplo, un salicilato se administra por vía oral y un esteroide no absorbible se administra por vía rectal), que pueden diferir de la(s) vía(s) utilizada(s) para administrar los anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como una limitación adicional.

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

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

Antígenos

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

Cepas transgénicas transcromosómicas KM Mouse™ y KM/FCGR2D Mouse™

Se prepararon anticuerpos monoclonales completamente humanos contra LAG-3 humano usando ratones de las cepas transcromosómicas transgénicas KM Mouse™ y KM/FCGR2D Mouse™, que expresan genes de anticuerpos humanos.

En la cepa KM Mouse™, el gen endógeno de la cadena ligera kappa de ratón se ha alterado homocigóticamente tal como se describe en Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820 y el gen endógeno de cadena pesada de ratón se ha alterado homocigóticamente tal como se describe en el Ejemplo 1 de la Publicación de PCT WO 01/09187. Asimismo, esta cepa de ratón lleva un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, tal como se describe en Paulsen *et al.*, citado anteriormente. La cepa también contiene el transcromosoma SC20, que lleva el locus de la cadena pesada de Ig humana, tal como se describe en la publicación PCT WO 02/43478. La cepa KM/FCGR2D Mouse™ es la misma que la cepa KM Mouse™, excepto que su genoma también comprende una alteración

homocigótica del gen endógeno FcγRIIB. Las cepas KM Mouse™ y KM/FCGR2D Mouse™ también se describen en detalle en la Publicación de Solicitud de los Estados Unidos N.º 20020199213.

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

5 Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra LAG-3, los ratones de las cepas KM Mouse™ y KM/FCGR2D Mouse™ se inmunizaron con una de las tres proteínas de fusión recombinantes LAG-3 diferentes descritas anteriormente (D1-D4 hFc, D1-D4 mFc, D1-D2, mFc). Los esquemas generales de inmunización se describen en Lonberg. *et al.* (1994) citado anteriormente; Fishwild *et al.*, citado anteriormente y la publicación de PCT WO 98/24884. Los ratones tenían 6-16 semanas de vida tras la primera infusión de antígeno. Los ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal (IP) y/o subcutánea (SC). Los ratones fueron inmunizados quincenalmente cuatro veces con 10 µg de la proteína de fusión recombinante LAG-3, seguido de la inmunización dos veces con 20 µg del mismo inmunógeno en Ribi como adyuvante. La respuesta inmunológica se controló mediante hemorragias retroorbitales. El plasma se analizó mediante ELISA (como se describe a continuación), y los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-LAG-3 se usaron para las fusiones. Antes del sacrificio y la extracción de los bazo, los ratones recibieron un refuerzo por vía intravenosa e intraperitoneal de 20 µg de antígeno seguido de un posterior refuerzo intravenoso con 20 µg de antígeno.

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

20 Para seleccionar ratones que producen anticuerpos que se unen a la proteína LAG-3, los sueros de ratones inmunizados con la proteína de fusión D1-D4 hFc se analizaron mediante un ELISA modificado como se describió originalmente por Fishwild *et al.* (1996). Brevemente, las placas de microtitulación se revistieron con proteína de fusión LAG-3 recombinante purificada a 1 µg/ml en PBS, 50 µl/pocillos incubados a 4 °C durante la noche, luego se bloqueó con 200 µl/pocillo de BSA en PBS al 5 %. Se agregaron diluciones de plasma de ratones inmunizados con LAG-3 a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y luego se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-cadena ligera kappa de humano en cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se desarrollaron con sustrato ABTS y se analizaron por espectrofotómetro a una DO de 405.

30 Para los ratones inmunizados con las proteínas de fusión D1-D4 mFc o D1-D2 mFc, los sueros de estos ratones se analizaron mediante ELISA indirecto utilizando anti-IgG de ratón en cabra para recubrir las placas durante una hora antes del recubrimiento con el antígeno para eliminar la unión inespecífica a la parte Fc del ratón. Luego se llevaron a cabo las mismas etapas de ELISA descritas anteriormente.

35 Los ratones que desarrollaron los títulos más altos de anticuerpos anti-LAG-3 se usaron para fusiones. Las fusiones se realizaron tal como se describe a continuación y los sobrenadantes de hibridoma se analizaron para determinar la actividad anti-LAG-3 mediante ELISA.

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

40 Los esplenocitos de ratón, aislados de los ratones KM o KM/FCGR2D, se fusionaron mediante electrofusión basada en un campo eléctrico utilizando un electroporador de fusión selectiva de cámara grande Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD) a una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes fueron seleccionados para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Las suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados se fusionaron a un cuarto del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580). Las células se colocaron en placas a aproximadamente 1 x 10⁵/pocillo en placa de microtitulación de fondo plano, seguido de aproximadamente dos semanas de incubación en medio selectivo que contiene suero de ternera fetal al 10 %, suplementado con origen (IGEN) en RPMI, L-glutamina, piruvato de sodio, HEPES, penicilina, estreptomina, gentamicina, 1x HAT y β-mercaptoetanol. Después de 1-2 semanas, Las células se cultivaron en un medio en el que el HAT se reemplazó por HT. Luego, los pocillos individuales se seleccionaron mediante ELISA (descrito anteriormente) para detectar anticuerpos monoclonales IgG anti-LAG-3 humanos. Una vez que se produjo un crecimiento extenso de hibridoma, el medio se controló generalmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos fueron reemplazados, seleccionados de nuevo y, si aún eran positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales anti-LAG-3 se subclonaron al menos dos veces mediante dilución limitante. Los subclones estables se cultivaron *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpos en medio de cultivo tisular para una caracterización adicional.

60 Se seleccionaron los clones de hibridoma 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 para su posterior análisis y secuenciación.

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

65 Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera de los mAb expresados por los clones 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5, tal como se describe en el Ejemplo 1, se secuenciaron usando

el siguiente protocolo. El ARN total se preparó a partir de 5×10^6 células de hibridoma usando el Mini kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). El ADNc se preparó mediante el protocolo 5'-RACE con el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) y la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las regiones V de cada anticuerpo se amplificaron usando un cebador 3' de región constante específico para humanos, junto con la mezcla de cebador 5' RACE. Los productos de PCR que contienen la región V se clonaron en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transformaron en la cepa TOP10 de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se prepararon muestras de ADN Miniprep o Templiphi (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, EE.UU.) y se sometieron a secuenciación de ADN (Sequetech, Mountain View, CA). Las secuencias de ADN resultantes se analizaron para reordenamientos dentro del marco y otras características de los anticuerpos. Las proteínas expresadas se caracterizaron mediante análisis químico convencional de proteínas. Se descubrió que los clones 25E3, 25F7 y 26H10 expresan un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera kappa de IgG1, mientras que se descubrió que los clones 8B7 y 17E5 expresaban un anticuerpo que comprendía una cadena pesada y una cadena ligera kappa de IgG4 y que el clon 11F2 expresaba un anticuerpo que comprendía una cadena pesada y una cadena ligera kappa de IgG2.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 25F7 se muestran en la Figura 1A y en la SEQ ID NO: 49 y 37, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa de 25F7 se muestran en la Figura 1B y en la SEQ ID NO: 55 y 43, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 25F7 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas (Figura 7) mostró que la cadena pesada de 25F7 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 4-34 (SEQ ID NO: 61), y un segmento JH de la línea germinal humana JH5b (SEQ ID NO: 62). El análisis adicional de la secuencia de V_H de 25F7 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR llevó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 1A y en las SEQ ID NO: 1, 7 y 13, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 25F7 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas (Figura 8) mostró que la cadena ligera kappa de 25F7 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K L6 (SEQ ID NO: 63) y un segmento J_K de la línea germinal humana JK 2 (SEQ ID NO: 64). El análisis adicional de la secuencia de V_K de 25F7 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR llevó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 1B y en las SEQ ID NO: 19, 25 y 31, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 26H10 se muestran en la Figura 2A y en la SEQ ID NO: 50 y 38, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 26H10 se muestran en la Figura 2B y en la SEQ ID NO: 56 y 44, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 26H10 con la secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocida (Figura 9) mostró que la cadena pesada de 26H10 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-33 (SEQ ID NO: 65), y un segmento JH de la línea germinal humana JH 6B (SEQ ID NO: 66). El análisis adicional de la secuencia de V_H de 26H10 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR llevó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 2A y en las SEQ ID NO: 2, 8 y 14, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 26H10 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas (Figura 10) mostró que la cadena ligera kappa 26H10 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K A27 (SEQ ID NO: 67) y un segmento J_K de la línea germinal humana JK 3 (SEQ ID NO: 68). El análisis adicional de la secuencia de V_K de 26H10 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR llevó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 2B y en las SEQ ID NO: 20, 26 y 32, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 25E3 se muestran en la Figura 3A y en la SEQ ID NO: 51 y 39, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 25E3 se muestran en la Figura 3B y en la SEQ ID NO: 57 y 45, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 25E3 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas (Figura 11) mostró que la cadena pesada de 25E3 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-20 (SEQ ID NO: 69), y un segmento JH de la línea germinal humana JH 4b (SEQ ID NO: 70). El análisis adicional de la secuencia de V_H de 25e3 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR llevó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 3A y en las SEQ ID NO: 3, 9 y GGY, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 25E3 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas (Figura 12) mostró que la cadena ligera kappa 25E3 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K L18 (SEQ ID NO: 71) y un segmento J_K de la línea germinal humana JK 2 (SEQ ID NO: 64). El análisis adicional de la secuencia de V_K de 25E3 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR llevó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 3B y en las SEQ ID NO: 21, 27 y 33, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 8B7 se muestran en la Figura 4A y en la SEQ ID NO: 52 y 40, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 8B7 se muestran en la Figura 4B y en la SEQ ID NO: 58 y 46, respectivamente. La

comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 8B7 con la secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocida (Figura 13) mostró que la cadena pesada de 8B7 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 4-34 (SEQ ID NO: 61), y un segmento JH de la línea germinal humana JH 5B (SEQ ID NO: 62). El análisis adicional de la secuencia de V_H de 8B7 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR llevó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 4A y en las SEQ ID NO: 4, 10 y 16, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de 8B7 (Figura 14) con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas mostró que la cadena ligera de kappa 8B7 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K L6 (SEQ ID NO: 63) y un segmento J_K de la línea germinal humana JK 4 (SEQ ID NO: 72). El análisis adicional de la secuencia de V_K de 26H10 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR llevó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 4B y en las SEQ ID NO: 22, 28 y 34, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 11F2 se muestran en la Figura 5A y en la SEQ ID NO: 53 y 41, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 11F2 se muestran en la Figura 5B y en la SEQ ID NO: 59 y 47, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 11F2 con la secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocida (Figura 15) mostró que la cadena pesada de 11F2 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 1-24 (SEQ ID NO: 73), un segmento D de la línea germinal humana 2-15, y un segmento JH de la línea germinal humana JH 4B (SEQ ID NO: 70). El análisis adicional de la secuencia de V_H de 11F2 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR llevó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 13A y en las SEQ ID NO: 5, 11 y 17, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 11F2 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas (Figura 16) mostró que la cadena ligera kappa 11F2 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K L6 (SEQ ID NO: 63) y un segmento J_K de la línea germinal humana JK 1 (SEQ ID NO: 74). El análisis adicional de la secuencia de V_K de 11F2 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR llevó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 5B y en las SEQ ID NO: 23, 29 y 35, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 17E5 se muestran en la Figura 6A y en la SEQ ID NO: 54 y 42, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 17E5 se muestran en la Figura 6B y en la SEQ ID NO: 60 y 48, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 17E5 con la secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocida (Figura 17) mostró que la cadena pesada de 17E5 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-33 (SEQ ID NO: 65), un segmento D de la línea germinal humana 2-2, y un segmento JH de la línea germinal humana JH 4B (SEQ ID NO: 70). El análisis adicional de la secuencia de V_H de 17E5 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR llevó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 6A y en las SEQ ID NO: 6, 12 y 18, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera 17E5 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas (Figura 18) mostró que la cadena ligera kappa 17E5 utiliza un segmento V_K de la línea germinal humana V_K L6 (SEQ ID NO: 63) y un segmento J_K de la línea germinal humana JK 5 (SEQ ID NO: 75). El análisis adicional de la secuencia de V_K de 17E5 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR llevó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 6B y en las SEQ ID NO: 24, 30 y 36, respectivamente.

Las regiones variables 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 y 17E5 pueden convertirse en anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo deseado utilizando técnicas convencionales de ADN recombinante. Por ejemplo, el ADN que codifica las regiones V_H y V_L se puede clonar en un vector de expresión que lleva las regiones constantes de la cadena pesada y ligera de modo que las regiones variables estén unidas operativamente a las regiones constantes. Como alternativa, se pueden usar vectores separados para la expresión de la cadena pesada de longitud completa y la cadena ligera de longitud completa. Los ejemplos no limitantes de vectores de expresión adecuados para su uso en la creación de anticuerpos de longitud completa incluyen los vectores pIE descritos en la publicación de patente de EE.UU. N.º 20050153394.

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

En este ejemplo, la citometría de flujo examinó la unión de los anticuerpos humanos anti-LAG-3 a LAG-3 de superficie celular (LAG-3 de humano, de mono y de ratón). Asimismo, la cinética de unión a LAG-3 se analizó mediante análisis BIACORE. Aún más, se realizó un mapeo adicional de epítomos usando un experimento de exploración de péptidos.

A. Estudios de citometría de flujo

1. Unión a LAG-3 humano en células CHO

65

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

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

Tabla 1: Unión de anticuerpos anti-LAG-3 a células CHO que expresan LAG-3 humano

<u>Anticuerpo</u>	<u>CE_{50} (nM)</u>
25F7	0,45 - 2,52
8B7	1,93 - 4,44
26H10	1,81 - 3,64
11F2	15,12
25E3	14,9 - 25,39
17E5	12,3

2. Unión de linfocitos T CD4⁺ humanos activados

Para probar la capacidad de los anticuerpos para unirse al LAG-3 humano natural en la superficie de los linfocitos T humanos activados, los linfocitos T CD4⁺ restantes se aislaron de células mononucleares de sangre periférica purificada y se sometieron a tres días de estimulación con una combinación de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 fijados a perlas de poliestireno. Los anticuerpos monoclonales 25F7, 8B7 y 26H10 se diluyeron en serie con tampón PFAE frío a 1x (PBS a 1x + FBS al 2 %, azida de sodio al 0,02 %, Na EDTA 2 mM). Durante la reacción de unión, se mezclaron 50 µl de solución de anticuerpo diluida con 50 µl de anti-CD4 humano marcado con PE (BD Bioscience, n.º de cat. 555347). Los linfocitos T activados se procesaron mediante el mismo protocolo descrito anteriormente. El análisis de la unión del anticuerpo se realizó como se describió anteriormente.

Los resultados del análisis de citometría de flujo se resumen a continuación en la Tabla 2, que muestra la CE_{50} para la unión a los linfocitos T CD4⁺ humanos activados, lo que demuestra que los tres anticuerpos se unen de manera similar al LAG-3 humano de la superficie celular.

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

<u>Anticuerpo</u>	<u>CE_{50} (nM)</u>
25F7	0,27 - 0,45
26H10	0,41 - 0,84
8B7	0,69 - 1,80

3. Unión al antígeno LAG-3 de mono

Para determinar si los anticuerpos anti-LAG-3 reaccionan de forma cruzada con el LAG-3 de mono, se clonó una secuencia de ADNc mediante RT-PCR a partir de una preparación de ADNc agrupado preparado mediante transcripción inversa de ARN a partir de una colección de muestras de tejido de mono rhesus y cinomolgo. La secuencia se amplificó primero del grupo de ADNc usando cebadores (cebador directo 5': 5Mcy1408; 5'-atgtgggaggctcagtctctg-3' (SEQ ID NO: 91) y cebador inverso 3': 3Mcy1408a; 5'-gtcagagctgctccggctc-3' (SEQ ID NO: 92)) usando un sistema de amplificación por PCR rico en GC (Roche) y se clonó en un vector de clonación TOPO receptor (Invitrogen) para el análisis de secuencia. Los clones que coinciden con la secuencia de LAG-3 de mono rhesus de Genbank de referencia (Nº de registro de Genbank XM_001108923) se reamplificaron posteriormente a partir del ADN del vector de clonación TOPO utilizando un segundo conjunto de cebadores que incorporaron sitios de enzimas de restricción para la clonación direccional en un vector de expresión de células de mamífero.

El clon pa23-5 de LAG-3 de mono se aisló y se secuenció. La secuencia de mono aislada exhibió un 99,6% de identidad con la secuencia LAG-3 de mono rhesus de Genbank de referencia. En la Figura 19 se muestra una comparación de la secuencia de aminoácidos del clon de ADNc pa23-3 (SEQ ID NO: 93) con el LAG-3 de mono

rhesus (SEQ ID NO: 94) de Genbank (número de registro XM_001108923). Las dos secuencias son idénticas, excepto por una diferencia de un aminoácido en la posición 419 (arginina en el clon pa23-5 frente a treonina en la secuencia de rhesus de Genbank) y basándose en esto se concluye que el clon de ADNc pa23-5 representa la secuencia del gen LAG-3 de rhesus.

5 El ADNc del clon pa23-5 se insertó en una construcción de expresión, que se transfectó en células en suspensión CHO-S por nucleofección (Amaxa). La expresión de LAG-3 de rhesus por clones resistentes a fármacos seleccionados y clasificados se verificó mediante análisis por FACS. Esta línea celular CHO clonal que sobreexpresa el LAG-3 de rhesus se usó en ensayos FACS similares a los descritos anteriormente para medir la reactividad
10 cruzada de los anticuerpos a la proteína de mono. Brevemente, los anticuerpos monoclonales 25F7, 8B7 y 26H10 se diluyeron en serie con tampón PFAE frío a 1x (PBS a 1x + FBS al 2 %, azida de sodio al 0,02 %, Na EDTA 2 mM). Durante la reacción de unión, se añadieron 50 µl de solución de anticuerpo diluida a una suspensión celular de 50 µl que contenía 2×10^5 células y la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. Las células fueron procesadas por el mismo protocolo descrito anteriormente. El análisis de la unión del anticuerpo se realizó como se describió
15 anteriormente.

En un experimento independiente, se probó la unión de los anticuerpos al LAG-3 de mono cinomolgo usando linfocitos T activados de mono cinomolgo. La activación *in vitro* de estos linfocitos T de mono se logró mediante el
20 tratamiento con anti-CD3/anti-CD28 de los linfocitos T mediante esencialmente el mismo protocolo descrito anteriormente para la activación *in vitro* de linfocitos T humanos, seguido por un análisis de citometría de flujo realizado como se describió anteriormente para la tinción de linfocitos T CD4⁺ humanos activados *in vitro*.

Los resultados de los análisis de citometría de flujo utilizando LAG-3 de rhesus en CHO y los linfocitos T activados de cinomolgo se resumen a continuación en la Tabla 3, que muestra CE₅₀ para la unión a los dos tipos diferentes de
25 células que expresan el LAG-3 de mono. Estos resultados mostraron que todos los anticuerpos se unen eficazmente tanto a LAG-3 en los linfocitos T activados de cinomolgo al LAG-3 de rhesus (SEQ ID NO: 93) transfectado en células CHO. Hay una jerarquía, sin embargo, de afinidades de unión, presentando el clon 26H10 la mayor afinidad, que es aproximadamente 2,5 y 6 veces mejor que la de los clones 8B7 y 25F7, respectivamente. La diferencia en la jerarquía de unión entre los dos tipos de células puede reflejar diferencias en la secuencia de aminoácidos entre las
30 proteínas LAG-3 de rhesus y de cinomolgo.

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

Anticuerpo	CE ₅₀ de linfocitos T CD4 ⁺ activados de cinomolgo (nM)	CE ₅₀ de LAG3 de rhesus en CHO (nM)
26H10	5,19	4,684
25F7	14,18	22,72
8B7	30,45	10,01

4. Unión al antígeno LAG-3 de ratón

35 Para determinar si los anticuerpos reaccionaron de forma cruzada con el LAG-3 de ratón, se realizaron estudios de citometría de flujo similares a los descritos anteriormente utilizando como línea diana una línea celular de hibridoma de linfocitos T de ratón (3A9) que se había transfectado para expresar LAG-3 de ratón en su superficie celular, seguido de análisis por FACS para detectar la unión de anticuerpos. Los resultados indicaron que, en contraste con
40 un anticuerpo de control anti-LAG3 de ratón que mostró una fuerte tinción, ninguno de los anticuerpos humanos 25E3, 25F7, 8B7 o 26H10 presentó unión por encima de los niveles de fondo al LAG-3 de ratón en superficie celular, demostrando que ninguno de estos anticuerpos reacciona de forma cruzada con el LAG-3 de ratón.

B. Análisis BIACORE

45 BIAcore™ examinó la unión de los anticuerpos 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 y 17E5 a la proteína LAG-3 recombinante utilizando un método de captura. Los anticuerpos 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 y 17E5 fueron capturados cada uno usando anti-CH1, un anticuerpo reactivo que es específico para la región constante de cadena pesada 1 del anticuerpo humano (Zymed, Clon HP6045, conc. de solución madre de 1,0 mg/ml). El anti-CH1 fue recubierto en una
50 microplaca CM5 (BR-1000-14, Research Grade) a alta densidad (9700-11500UR). El recubrimiento se realizó basándose en el procedimiento de inmovilización convencional recomendado por el fabricante. El anticuerpo purificado 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 o 17E5, con concentraciones que varían de 0,5-3 µg/ml, se capturó después en la superficie recubierta con anti-CHa a un caudal de 10 µl/min durante 1 minuto. Se inyectó una concentración única de proteína de fusión LAG-3 humana recombinante (20 nM) sobre el anticuerpo capturado durante 3 minutos a una
55 velocidad de flujo de 25 µg/ml. Se permitió que el antígeno se disociara durante 7,5 minutos. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo con 25 µl de NaOH 25 mM seguido de 30 µl de lavado con HBS-EP. Los controles de isotipo se ejecutaron en la microplaca y los datos se usaron para restar la unión inespecífica. Todos los experimentos se llevaron a cabo en un instrumento de resonancia de plasmón superficial Biacore 3000, utilizando el programa informático BIAcore Control v 3.2. El análisis de los datos se realizó con el programa informático
60 BiaEvaluation v3.2. Los resultados se muestran en la Tabla 4 siguiente. Los resultados de BIAcore para 25E3, 25F7, 8B7, 26H10 y 17E5 confirman los resultados de la citometría de flujo de que los cinco anticuerpos son capaces de

unirse con alta afinidad al LAG-3 humano.

Tabla 4: Cinética de unión del anticuerpo anti-LAG-3 al LAG-3 humano recombinante

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

5 C. Mapeo de epítomos

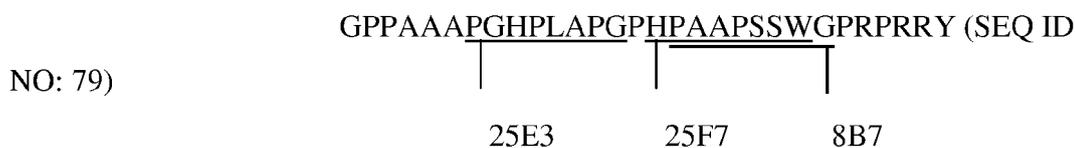
En la proteína LAG-3, el primer dominio similar a inmunoglobulina de la región extracelular contiene un "bucle extra" expuesto que tiene la secuencia de aminoácidos: GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY (SEQ ID NO: 79). Para examinar la unión de 25E3, 25F7, 8B7 y 26H10 a esta región de LAG-3, y mapear el epítipo unido por cada anticuerpo, se realizó un experimento de exploración de péptidos en esta región. Se preparó y se conjugó con biotina una serie de 10 péptidos superpuestos que se escanearon en toda la longitud de la secuencia de bucle adicional. Para el análisis ELISA, se utilizaron placas de microtitulación pre-recubiertas con estreptavidina (Sigma-Aldrich, N.º de Cat. M5432) para capturar los conjugados de péptidos de bucle biotinilados aplicados en un volumen de 100 µl a una concentración de 2 µg/ml y se incubaron 18 horas a 4 °C, después de lo cual las placas se lavaron 3 veces y se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 hora con tampón de bloqueo (PBS a 1x + FBS al 10 %). A continuación, se aplicaron anticuerpos humanos anti-LAG-3 diluidos en serie 3 veces en tampón de bloqueo a partir de 10 µg/ml y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se lavaron tres veces. Para detectar el anticuerpo humano unido, se diluyó un anticuerpo anti-cadena ligera kappa humana en cabra conjugado con HRP (Bethyl Laboratories, n.º de cat. A80-115P) a 1 µg/ml en tampón de bloqueo y se aplicó a los pocillos de ensayo durante 1 hora seguido de tres lavados y aplicación de sustrato TMB (eBioscience, n.º de cat. 00-4201-56). Las lecturas de densidad óptica a una longitud de onda de 650 nm se realizaron en un espectrofotómetro Spectramax 340PC (Molecular Dynamics, Inc.). Los resultados del experimento de exploración de péptidos se resumen a continuación en la Tabla 5.

25 Tabla 5: Unión del anticuerpo anti-LAG a la exploración de péptidos del bucle extra de LAG-3

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

Basándose en estos resultados, se determinó que el anticuerpo 25E3 reconoció una región dentro del bucle extracelular que comprende la secuencia de aminoácidos PGHPLAPG (SEQ ID NO: 76), mientras que el anticuerpo 25F7 reconoció una región dentro del bucle extra que comprende la secuencia de aminoácidos HPAAPSSW (SEQ ID NO: 77) y 8B7 parecía reconocer una región dentro del bucle extracelular que comprende la secuencia de aminoácidos PAAPSSWG (SEQ ID NO: 78). En contraste, no se pudo detectar la unión del péptido de bucle extra de longitud completa o cualquiera de los péptidos de exploración más cortos por el anticuerpo 26H10.

Las regiones identificadas en este estudio están subrayadas en la secuencia de bucle adicional de longitud completa:



Por consiguiente, los resultados de la exploración de péptidos indican que los anticuerpos 25E3, 25F7 y 8B7 se unen a epítomos diferentes aunque estrechamente localizados dentro del LAG-3 humano.

Para examinar más a fondo la unión de estos anticuerpos a la región de péptido de bucle extra, se realizaron ensayos ELISA adicionales. En un ensayo ELISA que utiliza el péptido de bucle extra humano de longitud completa (SEQ ID NO: 79), se determinaron los valores CE_{50} para la unión de 25E3, 25F7 y 8B7. Adicionalmente, se realizó un ELISA de péptido similar usando la secuencia de péptido de bucle extra de longitud completa del LAG-3 de mono rhesus, que tiene la secuencia GPPAPAPGHPPAPGHRPAAP YSWGPRPRRY (SEQ ID NO: 90) y se determinaron los valores de CE_{50} para la unión para 25F7 y 8B7. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 6. Los resultados confirman que los anticuerpos 25E3, 25F7 y 8B7 son capaces de reconocer la región peptídica de bucle extra de LAG-3 humano. Además, los anticuerpos 25F7 y 8B7 también se unen a la región peptídica de bucle extra de LAG-3 de rhesus, aunque menos bien en comparación con la secuencia humana, lo que puede deberse a la secuencia de especies divergentes en este polipéptido. Los resultados también confirman que el anticuerpo 26H10 no es capaz de reconocer el péptido de bucle adicional de LAG-3.

Tabla 6: Unión de anticuerpos anti-LAG-3 a péptido de bucle extra de LAG-3 humano y de rhesus

Anticuerpo	CE_{50} de bucle extra de humano (nM)	CE_{50} de bucle extra de rhesus (nM)
25E3	0,55	No analizado
25F7	0,29-0,95	13,09
8B7	0,28-1,35	0,60
26H10	Sin unión	Sin unión

Ejemplo 4: Inhibición de la unión de LAG-3 a MHC de Clase II por mAb anti-LAG-3

Para probar la capacidad de los anticuerpos anti-LAG-3 para inhibir la unión de LAG-3 a las moléculas de MHC Clase II, se realizó un ensayo *in vitro* de unión en el que una proteína de fusión LAG-3, que comprende el dominio extracelular LAG-3 humano fusionado con Fc de ratón (hLAG-3-mIg), reaccionó con células Daudi, que expresan moléculas MHC de clase II humanas.

Para probar la inhibición de anticuerpos de la unión de LAG-3 a MHC Clase II, 25E3, 25F7, 8B7 y 26H10 se diluyeron en serie a partir de 20 $\mu\text{g/ml}$ en tampón PFAE y a estas diluciones en serie se les añadió 1 $\mu\text{g/ml}$ de proteína de fusión hLAG-3-mIg. Esta mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de añadir 2×10^5 células Daudi lavadas con PFAE a 1x. La mezcla se aplicó a células Daudi y se incubó a 4 °C durante 30 minutos. Las células se sedimentaron (tres minutos, a 400 xg), se lavaron una vez con tampón PFAE a 1x y se volvieron a sedimentar, y se detectó la unión de hLAG-3-mIg a las células Daudi usando un reactivo secundario anti-mIgG Fc γ marcado con PE recombinante. El análisis de la unión de LAG-3-mIg se realizó con el citómetro de flujo FACScalibur (BD Bioscience). Los resultados se resumen en la Tabla 7 siguiente, que muestra los valores de CI_{50} en nM.

Tabla 7: Inhibición de la unión de LAG-3 a MHC de Clase II por anticuerpos anti-LAG-3

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

Los resultados demuestran que los cuatro anticuerpos son eficaces para inhibir la unión de LAG-3 a los anticuerpos MHC de Clase II, presentando 25F7, 8B7 y 26H10 valores de CI_{50} aproximadamente de 7 a 13 veces más bajos que los de 25E3.

Ejemplo 5: Estimulación de la respuesta de linfocitos T específicos de antígeno por mAb anti-LAG-3

Para probar la capacidad de los anticuerpos anti-LAG-3 para estimular una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno, se usó un ensayo de estimulación del péptido con linfocitos T 3A9 (véase, por ejemplo, Workman et al. (2003) J. Immunol. 169:5392-5395; Workman et al. (2002) Eur. J. Immunol. 32:2255-2263).

En este ensayo, un hibridoma de linfocitos T de ratón, 3A9, específico para el péptido HEL₄₈₋₆₂, fue utilizado como el linfocito T de respuesta. El linfocito T 3A9 de respuesta se transdujo retrovíricamente para expresar LAG-3 humano o LAG-3 de ratón en su superficie celular. La célula presentadora de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) utilizada para presentar el péptido antigénico HEL₄₈₋₆₂ para los linfocitos 3A9 fue la línea celular LK35.2 positiva para MHC de clase II de ratón. Estudios separados determinaron que una proteína de fusión LAG-3 humana era capaz de unirse a moléculas de MHC de clase II de ratón, validando así el uso de APC de ratón LK35.2 en este ensayo. La estimulación específica de antígeno de linfocitos 3A9 se indicó mediante la producción de interleucina-2 (IL-2), cuya secreción se midió mediante ELISA (kit OptEIA de ratón IL-2, BD Biosciences, n.º de cat 555148 según las recomendaciones del fabricante).

Expresión ectópica de LAG-3 humano o de ratón en los linfocitos T 3A9, en ausencia de cualquier anticuerpo, llevó a un efecto inhibitorio sobre las respuestas específicas de antígeno cuando los linfocitos T transfectados se incubaron con las APC LK35.2 que presentan el péptido antigénico HEL₄₈₋₆₂, según lo indicado por un aumento en la cantidad de péptido antigénico necesario para estimular la producción de IL-2 por los linfocitos 3A9 en comparación con el perfil de respuesta a la dosis del péptido de los linfocitos T 3A9 de control.

Para probar la estimulación de anticuerpos de la respuesta de linfocitos T específicos de antígeno, las APC (2,5x10⁴ células) se preincubaron primero con el péptido antigénico (200 nM) durante 30 minutos a 37 °C y los linfocitos T 3A9 (5,0x10⁴ células que expresan mLAG-3, hLAG-3 o células de control) se preincubaron con un anticuerpo anti-hLAG-3 (25E3, 25F7, 8B7, 26H10, 11F2, 17E5), diluidos en serie en dilución triple de 25 µg/ml durante 15 minutos a 37 °C. Los linfocitos T 3A9 se añadieron luego a las APC pulsadas con antígeno y el cultivo se incubó durante 24 horas a 37 °C. Los sobrenadantes se recolectaron y se midieron para la producción de IL-2 de ratón. Los resultados para los linfocitos T 3A9 que expresan LAG-3 humano se encuentran en la Tabla 8, que muestra los valores de CI₅₀ en nM.

Tabla 8: Estimulación de respuestas de linfocitos T específicos de antígeno por anticuerpos anti-LAG-3

Anticuerpo	CI ₅₀ de ensayo de péptido 3A9-hLAG-3 (nM)
25F7	0,14 - 1,94
26H10	1,45 - 6,49
8B7	3,25 - 13,90
25E3	3,88 - 70,78
11F2	81,50 - 240
17E5	Sin inhibición

Los resultados muestran que los anticuerpos 25F7, 8B7 y 26H10, y en menor medida 25E3, fueron capaces de estimular la producción de IL-2 en un ensayo de respuesta de linfocitos T específicos de antígeno, mientras que el anticuerpo 11F2 presentó una capacidad mínima para inhibir y el anticuerpo 17E5 no fue funcional en este ensayo. Ninguno de los anticuerpos alteró la producción de IL-2 medida por los linfocitos T de control 3A9 o los linfocitos T 3A9 transfectados con proteína LAG-3 de ratón, lo que demuestra la especificidad del efecto estimulante.

Ejemplo 6: Inhibición del crecimiento tumoral por mAb anti-LAG-3, solo o en combinación

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

En un primer experimento, los ratones (cepa A/J) se implantaron cada uno con 2 x 10⁶ células de fibrosarcoma Sa1N el día 0 y las células tumorales se dejaron crecer durante siete días. El día 7, el día 10 y el día 12 después de la implantación, los ratones se trataron con 10 mg/kg de un mAb anti-LAG-3 solo (el mAb anti-LAG-3 de ratón en rata C9B7W; eBioscience, n.º de cat. 14-2231), un anticuerpo anti-PD-L1 solo (un mAb anti-PD-L1 de ratón 14D8), los anticuerpos anti-LAG-3 y anti-PD-L1 en combinación, o un anticuerpo de control de isotipo IgG1. El mAb 14D8 es un anticuerpo anti-PD-L1 de ratón en rata que se ha quimerizado para que contenga las regiones constantes de IgG1 y kappa de ratón.

Se midieron los volúmenes tumorales en los ratones durante más de 50 días después de la implantación y se determinaron los volúmenes tumorales medios y medianos. Se calculó la inhibición media del crecimiento tumoral (basándose en el tratamiento con el anticuerpo de control de isotipo IgG1 siendo el 0 % de inhibición). Los resultados para el día 24 después de la implantación se resumen a continuación en la Tabla 9:

Tabla 9: Inhibición media del crecimiento tumoral en el modelo de tumor Sa1N

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

Por consiguiente, el tratamiento solo con anticuerpo anti-LAG3 o solo con anticuerpo anti-PD-L1, dio como resultado la inhibición del crecimiento tumoral, mientras que la combinación de ambos anticuerpos condujo a una mayor inhibición del crecimiento tumoral. Con respecto a los grupos de tratamiento, al final del experimento, los resultados fueron que 4 de 10 ratones tratados con anti-LAG3 solo quedaron libres de tumores, mientras que solo 1 de cada 10 ratones tratados con el anticuerpo IgG1 de control quedó libre de tumores. De manera similar, 4 de 11 ratones tratados solo con anti-PD-L1 quedaron libres de tumor. El tratamiento de ratones con la combinación de anti-LAG3 y anti-PD-L1 dio como resultado que 9 de 10 ratones quedaran libres de tumor; el ratón restante no libre de tumor tuvo un tumor indolente que permaneció pequeño durante todo el estudio.

Dos estudios adicionales utilizaron ratones implantados con células de la línea celular de cáncer de colon MC38 de murino. En el primer experimento, los ratones C57Bl/6 fueron implantados cada uno con 2×10^6 células MC38 en el día 0, y fueron tratados en el día 7, el día 10 y el día 12 después de la implantación con 200 µg/dosis de anti-LAG-3 solo (mAb C9B7W), anti-PD-1 solo (el mAb 4H2) o anti-LAG-3 y anti-PD-1 en combinación. Un anticuerpo IgG1 isotipo compatible, a 400 µg/dosis, se utilizó como control. El mAb 4H2 es un anticuerpo anti-PD-1 de ratón en rata que se ha quimerizado para que contenga las regiones constantes de IgG1 y kappa de ratón.

El volumen tumoral medio, el volumen tumoral mediano y el % de supervivencia se determinaron a los 80 días después de la implantación. Los resultados mostraron que la monoterapia con LAG-3 en este modelo tumoral (MC38) mostró poca o ninguna actividad para inhibir el crecimiento tumoral y ninguno de los ratones tratados sobrevivió a la duración del experimento. En contraste, la monoterapia anti-PD-1 mostró actividad significativa, con 4 de 10 ratones libres de tumor al final del experimento. Además, similar a los resultados con el modelo Sa1N, la terapia combinada de anti-LAG-3 más anti-PD-1 fue más efectiva que cualquier tratamiento solo, con 7 de 8 ratones libres de tumor al final del experimento.

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

El volumen tumoral medio, el volumen tumoral mediano y el % de supervivencia se determinaron durante más de 100 días después de la implantación. Los resultados fueron similares al primer experimento en que la monoterapia con LAG-3 mostró poca o ninguna actividad en la inhibición del crecimiento del tumor MC38 y ninguno de los ratones tratados sobrevivió a la duración del experimento. La monoterapia con CTLA-4 también mostró poca o ninguna actividad en la inhibición del crecimiento tumoral de MC38 y ninguno de los ratones tratados sobrevivió a la duración del experimento. En contraste, la monoterapia anti-PD-1 nuevamente mostró una actividad significativa, con 4 de 10 ratones libres de tumor al final del experimento. Además, de nuevo la terapia combinada fue más efectiva que la monoterapia. Para los ratones tratados con la combinación de anti-LAG-3 y anti-CTLA-4, 3 de 10 ratones estaban libres de tumor al final del experimento y para los ratones tratados con la combinación de anti-LAG-3 y anti-PD-1, 8 de 10 ratones estaban libres de tumor al final del experimento.

Por consiguiente, los estudios *in vivo* de injerto tumoral descritos anteriormente demostraron que, para al menos ciertos modelos tumorales, el tratamiento con anticuerpos anti-LAG solo resultó en una inhibición significativa del crecimiento tumoral *in vivo*. Asimismo, para múltiples modelos tumorales, la terapia de combinación del anticuerpo anti-LAG-3 junto con el anticuerpo anti-PD-1, el anticuerpo anti-PD-L1 o el anticuerpo anti-CTLA-4 dieron como resultado una actividad antitumoral aún mayor que la monoterapia sola.

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

Para probar la capacidad del anticuerpo anti-LAG-3 para estimular una respuesta inmunológica, tal como lo indica el desarrollo de la autoinmunidad, se utilizó el modelo de diabetes en ratones NOD. Se sabe que los ratones NOD son propensos a desarrollar diabetes autoinmune. Se puede seguir la progresión de la diabetes en ratones NOD hembra midiendo la glucosa en suero. Por consiguiente, se examinó el efecto del tratamiento anti-LAG-3, solo o en combinación con anticuerpos inmunoestimuladores, sobre el desarrollo de diabetes en ratones hembra NOD.

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

Por consiguiente, estos resultados demuestran que el bloqueo de la interacción de LAG-3 con su receptor interfirió con una señal inmunorreguladora negativa que permitió una mayor actividad inmunológica en los ratones NOD, y esta mayor actividad inmunológica en los ratones tratados con LAG-3 podría mejorarse mediante el tratamiento combinado con anticuerpo anti-PD-1 o anti-CTLA-4.

Ejemplo 8: Inmunohistoquímica utilizando mAb anti-LAG-3

En este experimento, se usaron anticuerpos humanos anti-LAG-3 marcados con fluorescencia en experimentos de inmunohistoquímica. Se utilizaron los siguientes anticuerpos humanos anti-LAG-3 marcados con FITC: 25F7-FITC

(F:P = 2,9; versión de IgG1); 25F7-G4-FITC (F:P = 2,7; versión de IgG4); 8B7-FITC (F:P = 2,6) y 26H10-FITC (F:P = 3,4). Se examinó un panel de tejidos linfoides, específicamente amígdalas (dos muestras), bazo (dos muestras) y timo (dos muestras), junto con tejido hipofisario (cuatro muestras). Las células CHO transfectadas con LAG-3 también se usaron como control. Se utilizaron secciones de criostato fijadas con acetona. Las secciones se tiñeron con anticuerpo anti-LAG-3 marcado con FITC (0,2-5 µg/ml), seguido de tinción con un anticuerpo anti-FITC de conejo como anticuerpo puente y luego se visualizaron usando el Kit de sistema EnVision™+ de conejo (Dako USA, Carpintería, CA). Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10: Inmunohistoquímica utilizando mAb Anti-LAG-3

Tejido	25F7-FITC	25F7-G4-FITC	8B7-FITC	26H10-FITC
Células CHO/LAG-3	+ (fuerte)	+ (fuerte)	+ (fuerte)	+ (fuerte)
Amígdalas (n=2)	+ (fuerte; raro en LC dispersos, 2/2)	+ (fuerte; raro en LC dispersos, 2/2)	+ (fuerte; raro en LC dispersos, 2/2)	+ (fuerte; raro en LC dispersos, 2/2)
Bazo (n=2)	+ (muy débil, principalmente en pulpa roja, 2/2)	+ (muy débil, principalmente en pulpa roja, 2/2)	+ (débil, principalmente en pulpa roja, 2/2)	+ (muy débil, principalmente en pulpa roja, 2/2)
Timo (n=2)	+ (fuerte; muy raro en LC disperso, 1/2)	+ (fuerte; muy raro en LC disperso, 1/2)	+ (fuerte; muy raro en LC disperso, 1/2)	+ (fuerte; muy raro en LC disperso, 1/2)
Hipófisis (n=4)	+ (fuerte; ocasionalmente en adeno-hipófisis, 3/4)	+ (fuerte; ocasionalmente en adeno-hipófisis, 3/4)		+ (fuerte; ocasionalmente en adeno-hipófisis, 3/4; débil moderado, raro, 1/4)

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

Como cabía esperar, la expresión de LAG-3 se detectó en el panel de tejido linfoide. Adicionalmente, dos de los tres anticuerpos anti-LAG-3 examinados, 25F7 (versiones IgG1 e IgG4) y 26H10, presentaron retención en el tejido hipofisario, mientras que un anticuerpo examinado, 8B7, no mostró esta retención en el tejido hipofisario. Por consiguiente, el experimento de inmunohistoquímica identificó dos subconjuntos de anticuerpos anti-LAG-3, en donde un subconjunto se retiene en el tejido hipofisario y el otro subconjunto no se retiene en el tejido hipofisario.

RESUMEN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:	SECUENCIA	SEQ ID NO:	SECUENCIA
1	a.a. de CDR1 de V _H 25F7	49	n.t. de V _H 25F7
2	a.a. de CDR1 de V _H 26H10	50	n.t. de V _H 26H10
3	a.a. de CDR1 de V _H 25E3	51	n.t. de V _H 25E3
4	a.a. de CDR1 de V _H 8B7	52	n.t. de V _H 8B7
5	a.a. de CDR1 de V _H 11F2	53	n.t. de V _H 11F2
6	a.a. de CDR1 de V _H 17E5	54	n.t. de V _H 17E5
7	a.a. de CDR2 de V _H 25F7	55	n.t. de V _K . 25F7
8	a.a. de CDR2 de V _H 26H10	56	n.t. de V _K . 26H10
9	a.a. de CDR2 de V _H 25E3	57	n.t. de V _K . 25E3
10	a.a. de CDR2 de V _H 8B7	58	n.t. de V _K . 8B7
11	a.a. de CDR2 de V _H 11F2	59	n.t. de V _K . 11F2
12	a.a. de CDR2 de V _H 17E5	60	n.t. de V _K . 17E5
13	a.a. de CDR3 de V _H 25F7	61	a.a. de la línea germinal de V _H 4-34
14	a.a. de CDR3 de V _H 26H10	62	a.a. de la línea germinal de V _H JH5b
15	PVGVV	63	a.a. de la línea germinal de V _K L6
16	a.a. de CDR3 de V _H 8B7	64	a.a. de la línea germinal de V _K JK2
17	a.a. de CDR3 de V _H 11F2	65	a.a. de la línea germinal de V _H 3-33
18	a.a. de CDR3 de V _H 17E5	66	a.a. de la línea germinal de V _H JH6b
		67	a.a. de la línea germinal de V _K A 27
19	a.a. de CDR1 de V _K 25F7	68	a.a. de la línea germinal de V _K JK3
20	a.a. de CDR1 de V _K 26H10	69	a.a. de la línea germinal de V _H 3-20
21	a.a. de CDR1 de V _K 25E3		
22	a.a. de CDR1 de V _K 8B7	70	a.a. de la línea germinal de V _H JH4b
23	a.a. de CDR1 de V _K 11F2	71	a.a. de la línea germinal de V _K L-18
24	a.a. de CDR1 de V _K 17E5	72	a.a. de la línea germinal de V _K JK4

(continuación)

SEQ ID NO:	SECUENCIA	SEQ ID NO:	SECUENCIA
		73	a.a. de la línea germinal de V _H 1-24
25	a.a. de CDR2 de V _K 25F7	74	a.a. de la línea germinal de V _K JK1
26	a.a. de CDR2 de V _K 26H10	75	a.a. de la línea germinal de V _K JK5
27	a.a. de CDR2 de V _K 25E3		
28	a.a. de CDR2 de V _K 8B7	76	PGHPLAPG
29	a.a. de CDR2 de V _K 11F2	77	IIPAAPSSW
30	a.a. de CDR2 de V _K 17E5	78	PAAPSSWG
		79	GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY
31	a.a. de CDR3 de V _K 25F7	80	GPPAAAPGHPLA
32	a.a. de CDR3 de V _K 26H10	81	PAAAPGHPLAPG
33	a.a. de CDR3 de V _K 25E3	82	AAPGHPLAPGPH
34	a.a. de CDR3 de V _K 8B7	83	PGHPLAPGPHPA
35	a.a. de CDR3 de V _K 11F2	84	HPLAPGPHPAAP
36	a.a. de CDR3 de V _K 17E5	85	LAPGPHPAAPSS
		86	PGPHPAAPSSWG
37	a.a. de V _H de 25F7	87	PHPAAPSSWGPR
38	a.a. de V _H 26H10	88	PAAPSSWGPRPR
39	a.a. de V _H 25E3	89	APSSWGPRPRRY
40	a.a. de V _H 8B7	90	GPPAPAPGHPPAPGHRPAA PYSW GPRPRRY
41	a.a. de V _H 11F2		
42	a.a. de V _H 17E5	91	atgtgggaggctcagttcctg
		92	gtcagagctgctccggctc
43	a.a. de V _K 25F7	93	a.a. del clon pa23-5 de LAG-3 de Rhesus
44	a.a. de V _K 26H10	94	a.a. de LAG-3 de Rhesus (XM_001108923)
45	a.a. de V _K 25E3		
46	a.a. de V _K 8B7		
47	a.a. de V _K 11F2		
48	a.a. de V _K 17E5		

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> ER Squibb y Sons, L.L.C
- <120> Anticuerpos humanos que se unen al gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3) y sus usos
- <130> M/52023-EP-DIV
- 10 <150> US 61/188548
<151> 11/08/2008
- <150> EP 09807162.4
<151> 11/08/2009
- 15 <160> 94
- <210> 1
<211> 5
20 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- 25 Asp Tyr Tyr Trp Asn
1 5
- <210> 2
<211> 5
<212> PRT
30 <213> *Homo sapiens*

ES 2 768 576 T3

<400> 2

Ser Tyr Gly Met His
1 5

5 <210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 3

Asp Tyr Gly Met Ser
1 5

15 <210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 4

Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

25 <210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Glu Val Ser Met His
1 5

30 <210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Ser Tyr Gly Met His
1 5

40 <210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 7

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

50 <210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 8

ES 2 768 576 T3

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

Gly

5 <210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

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

Gly

10 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

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

20 <210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

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

Gly

30 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 12

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

Gly

40 <210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 768 576 T3

<400> 13

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

5

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

10

<400> 14

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

15

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

20

<400> 15

Pro Val Gly Val Val
 1 5

25

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

30

<400> 16

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

35

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

<400> 17

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

40

<210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45

<400> 18

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

50

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55

ES 2 768 576 T3

<400> 19

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

5 <210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 20

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

15 <210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 21

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

25 <210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

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

35 <210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 23

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

40 <210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 24

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

50 <210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 768 576 T3

<400> 25

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

5 <210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 26

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

15 <210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 27

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

25 <210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

Asn Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

30 <210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

40 <210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 30

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

50 <210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 31

ES 2 768 576 T3

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

5 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 32

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Thr
1 5

15 <210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 33

20 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

25 <210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

30 <210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 35

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr
1 5

40 <210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 36

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr
1 5

50 <210> 37
<211> 120
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 768 576 T3

<400> 37

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr

20

25

30

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 38

<211> 122

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 38

ES 2 768 576 T3

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

115

120

5 <210> 39
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 39

ES 2 768 576 T3

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

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

5

<400> 40

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

10

ES 2 768 576 T3

<210> 41
 <211> 123
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 42
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 42

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

ES 2 768 576 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

5

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

10

<210> 44
 <211> 108
 <212> PRT

ES 2 768 576 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 44

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 45

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

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

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

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

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

15

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

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

ES 2 768 576 T3

<210> 46
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 46

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

10 <210> 47
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 47

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

ES 2 768 576 T3

50

55

60

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

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

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

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

5

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

10

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

15

<400> 49

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattactact ggaactggat cgcagccc 120
ccaggaagg ggctggagt gattggggaa atcaatcata atggaaacac caactccaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccctatca ctagacacgt ccaagaacca gttctcctg 240

20

ES 2 768 576 T3

	aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcggt tggatatagt	300
	gactacgagt acaactgggt cgaccctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca	360
5	<210> 50 <211> 366 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 50	
	caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat	180
	gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaatgg	300
	gcagtggcct cctgggacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc	360
10	tcctca	366
15	<210> 51 <211> 336 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 51	
	gaggtgcagt tggaggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctggggggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatggca tgagctgggt ccgccaagct	120
	ccagggaagg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atggtggtag cacatattat	180
	gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccggagaca acgccaagaa ctccctgtat	240
	ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtac cactgggggc	300
20	tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc tcctca	336
25	<210> 52 <211> 360 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 52	
	caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctggtgaagc catcggaaac cctgtccctc	60
	acctgcgctg tctatggagg gtccttcagt gggtactact ggagctggat ccgccagccc	120
	ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaaacac caactgcaac	180
	ccgtccctca agagtcgagt caccatatca ggagatacgt ccaagaaaca gttcgccttg	240
	aagctgaact ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtctatt actgtgagag aggatacgat	300
30	atthtgactg gttattatga ggactcctgg ggcccgggaa ccctggtcac cgtctcctca	360
	<210> 53	

ES 2 768 576 T3

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

5 <400> 53
 acccacgacc aggtccagct ggtacagtct ggggctgagg tgaagaagcc tggggcctca 60
 gtgaaggtct cctgcaaggt ttccggatac accctcactg aagtatccat gcaactgggtg 120
 cgacaggctc ctggaaaagg gcttgagtgg atgggagggtt ttgatcctga agatggtgaa 180
 acaatctacg cacagaagtt ccagggcaga gtcacatga ccgaggacac atctacagac 240
 acagcctaca tggagctgag cagcctgaga tctgaggaca cggccgtgta ttactgtgca 300
 acagcctttg tagtggtggt agctgcttct gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360
 gtctcctca 369

10 <210> 54
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 54
 caggtgcacc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggcog attcaccatc tocagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatccc 300
 cattgtagta gtaccaactg ctaccttttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360
 gtctcctca 369

20 <210> 55
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 55
 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 ttttggccag 300
 gggaccaacc tggagatcaa a 321

25 <210> 56
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 56

ES 2 768 576 T3

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

5 <210> 57
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 57
 gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattagg agtgcttag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccgtacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

15 <210> 58
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 58
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctataat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

25 <210> 59
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 59

ES 2 768 576 T3

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgtggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

5 <210> 60
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 60

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctatcac cttcggccaa 300
 gggacacgac tggagattaa a 321

10

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

15

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

20

<400> 61

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

25

ES 2 768 576 T3

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

Arg Gly

5 <210> 62
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(3)
 <223> Los restos 1-3 se presentan solo en un subconjunto de figuras.

<400> 62

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

20 <210> 63
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 63

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

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

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

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

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

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

25 <210> 64
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> El resto 1 se presenta solo en un subconjunto de figuras.

35 <400> 64

ES 2 768 576 T3

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

5
 <210> 65
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 65

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

10 Ala Arg

15
 <210> 66
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 66

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

20
 <210> 67
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 67

ES 2 768 576 T3

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

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

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

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

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

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

5 <210> 68
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 68

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

15 <210> 69
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 69

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

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

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

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

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

20

ES 2 768 576 T3

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

Ala Arg

5 <210> 70
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(2)
 <223> Los restos 1-2 solo se presentan en un subconjunto de figuras.

<400> 70

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

20 <210> 71
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 71

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

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

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

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

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

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

25 <210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 72

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

35 <210> 73

ES 2 768 576 T3

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

5 <400> 73

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

10 <210> 74
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 74

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

20 <210> 75
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 75

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

30 <210> 76
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 76

Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly
 1 5

ES 2 768 576 T3

5 <210> 77
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 77

His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
 1 5

10 <210> 78
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 78

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly
 1 5

20 <210> 79
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 79

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

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

30 <210> 80
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 80

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

40 <210> 81
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 81

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

50 <210> 82
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 82

ES 2 768 576 T3

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

5 <210> 83
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 83

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

10 <210> 84
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 84

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

20 <210> 85
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 85

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

30 <210> 86
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 86

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

40 <210> 87
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 87

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

50 <210> 88
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 88

ES 2 768 576 T3

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

5 <210> 89
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 89

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

10 <210> 90
 <211> 30
 <212> PRT
 15 <213> *Macaca sp.*

<400> 90

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

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

20 <210> 91
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador 5Mcynl408

30 <400> 91
 atgtgggagg ctcagttcct g 21

35 <210> 92
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador 3Mcyn1408a

40 <400> 92
 gtcagagctg ctccggctc 19

45 <210> 93
 <211> 532
 <212> PRT
 <213> *Macaca mulatta*

<400> 93

ES 2 768 576 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 Pro Gln Pro Gly Ala Glu Ile Ser Val Val
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Ser Arg Gly Gln

ES 2 768 576 T3

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

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

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

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

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

Pro Glu Gln Leu
 530

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

5

<400> 94

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 768 576 T3

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

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

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

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

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

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

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

Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
245 250 255

Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Ala Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
260 265 270

Gly Ala Gly Ser Arg Val Glu Leu Pro Cys Arg Leu Pro Pro Ala Val
275 280 285

Gly Thr Gln Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Ala Pro Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Pro Asp Leu Leu Val Ala Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
305 310 315 320

Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Ile Cys His Ile Arg
325 330 335

Leu Gln Gly Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr
340 345 350

Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu
355 360 365

Cys Glu Val Thr Pro Ala Ser Gly Gln Glu His Phe Val Trp Ser Pro
370 375 380

ES 2 768 576 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Pro Glu Gln Leu
 530

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal humano aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une al gen de activación de linfocitos humanos 3 (LAG-3) y se une a un epítipo de LAG-3 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77.
- 10 2. Un anticuerpo monoclonal humano aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une al gen de activación de linfocitos humanos 3 (LAG-3) y se une al mismo epítipo en el LAG-3 humano como anticuerpo de referencia, comprendiendo dicho anticuerpo de referencia una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43.
- 15 3. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprenden una región variable de cadena pesada que es el producto de o deriva de un gen humano de V_H 4-34, y una región variable de la cadena ligera que es el producto de o derivado de un gen humano V_K L6.
- 20 4. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que inhiben la unión de LAG-3 a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II.
- 25 5. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que estimulan una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno.
6. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno de la reivindicación 5, que estimulan la producción de interleucina-2 por el linfocito T específico de antígeno.
7. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se unen a la proteína LAG-3 humana con una K_D de 1×10^{-9} M o menos.
- 30 8. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se unen a la proteína LAG-3 humana con una K_D de 5×10^{-10} M o menos.
- 35 9. Una composición que comprende un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 10. La composición de la reivindicación 9, que comprende además uno o más anticuerpos inmunoestimuladores adicionales seleccionados de anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos anti-CTLA-4.
11. La composición de la reivindicación 10, en donde el anticuerpo inmunoestimulador adicional es un anticuerpo anti-PD-1.
- 45 12. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o la porción de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, unido a un agente terapéutico.
13. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo o la porción de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 50 14. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en terapia.
15. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el anticuerpo o la porción de unión a antígeno son para ser administrados simultáneamente, por separado o secuencialmente con al menos un anticuerpo inmunoestimulador adicional seleccionado de anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos anti-CTLA-4.
- 55 16. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el anticuerpo inmunoestimulador adicional es un anticuerpo anti-PD-1.
17. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en donde el uso en terapia se selecciona del uso en el tratamiento del cáncer y el uso en el tratamiento de la infección vírica.

Anti-LAG3 25F7 VH

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

```

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

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

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

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

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

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

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

FIGURA 1A

Anti-LAG3 25F7 VK

Segmento V: L6
 Segmento J: JK2

```

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

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

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

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

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

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

FIGURA 1B

ES 2 768 576 T3

Anti-LAG3 26H10 VH

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

```

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

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

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

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

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

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

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

FIGURA 2A

Anti- LAG3 26H10 VK

Segmento V: A27
 Segmento J: JK3

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

CDR1

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

**CDR2**

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

CDR2

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

**CDR3**

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

CDR3

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

**FIGURA 2B**

**Anti-LAG3 25E3 VH**

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

```

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

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

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

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

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

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

    T V S S
  325 ACC GTC TCC TCA
  
```

**FIGURA 3A**

**Anti-LAG3 25E3 VK**

Segmento V: L18  
 Segmento J: JK2

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

**CDR 1**

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

CDR 2

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

**CDR 2**

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

CDR 3

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

**CDR 3**

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

FIGURA 3B

Anti-LAG3 8B7 VH

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

```

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

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

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

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

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

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

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

FIGURA 4A

Anti-LAG3 8B7 VK

Segmento V: L6
 Segmento J: JK4

```

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

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

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

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

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

      CDR3
      ~~~~~
      R S N W P L T F G G G T K V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
    
```

FIGURA 4B

ES 2 768 576 T3

Anti- LAG3 11F2 VH

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

```

      T  H  D  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G
1 ACC CAC GAC CAG GTC CAG CTG GTA CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG
                                                                 CDR 1
      A  S  V  K  V  S  C  K  V  S  G  Y  T  L  T  E  V  S
55 GCC TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG GTT TCC GGA TAC ACC CTC ACT GAA GTA TCC
CDR 1
~~~~~
      M  H  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  M  G  G  F
109 ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCT CCT GGA AAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGT TTT
                                                                 CDR 2
      D  P  E  D  G  E  T  I  Y  A  Q  K  F  Q  G  R  V  T
163 GAT CCT GAA GAT GGT GAA ACA ATC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC
      M  T  E  D  T  S  T  D  T  A  Y  M  E  L  S  S  L  R
217 ATG ACC GAG GAC ACA TCT ACA GAC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA
                                                                 CDR 3
      S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  T  A  F  V  V  V  V  A
271 TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA ACA GCC TTT GTA GTG GTG GTA GCT
CDR 3
~~~~~
      A  S  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
325 GCT TCT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

FIGURA 5A

Anti-LAG3 11F2 VK

Segmento V: L6
 Segmento J: JK1

```

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

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

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

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

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

      CDR 3
      ~~~~~
      R S N W P W T F G Q G T K V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
    
```

FIGURA 5B

Anti-LAG3 17E5 VH

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

```

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

                                CDR 1
                                ~~~~~
        R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y   G   M   H   W
    55 AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR 2
                                ~~~~~
        V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I   W   Y   D
    109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT

                                CDR 2
                                ~~~~~
        G   S   N   K   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R
    163 GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

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

                                CDR 3
                                ~~~~~
        T   A   V   Y   Y   C   A   R   D   P   H   C   S   S   T   N   C   Y
    271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CCC CAT TGT AGT AGT ACC AAC TGC TAC

                                CDR 3
                                ~~~~~
        L   F   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
    325 CTT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

FIGURA 6A

Anti-LAG3 17E5 VK

Segmento V: L6
 Segmento J: JK5

```

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

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

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

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

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

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

FIGURA 6B

Anti-LAG3 26H10 VH

3-33 de la línea germinal 26H10 VH Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S ^{CDR1} S Y G M H W - - - - -

3-33 de la línea germinal 26H10 VH V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R - - - - - ^{CDR2}

3-33 de la línea germinal JH6b de la línea germinal 26H10 VH D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R - - - - - ^{CDR3}

JH6b de la línea germinal 26H10 VH M D V W G Q G T T V T V S S - - - - - E W A V A S W D - - - - - Y G

FIGURA 9

Anti-LAG3 26H10 VK

A27 de la línea germinal 26H10 VK
 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
 CDR1

A27 de la línea germinal 26H10 VK
 Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F
 CDR2

A27 de la línea germinal JK3 de la línea germinal 26H10 VK
 T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P F T F G P G T K V D I K
 CDR3

FIGURA 10

Anti-LAG3 25E3 VH

3-20 de la línea germinal EVQLVESGGGVVRRPGGSLRLSCLASGFTFDYGMSSW
 25E3 VH CDR1

3-20 de la línea germinal VRQAPGKGLWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISR
 25E3 VH CDR2

3-20 de la línea germinal DNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCA R CDR 3
 JH4b de la línea germinal YWGGQGTLLV
 25E3 VH

JH4b de la línea germinal TVSS
 25E3 VH (JH4B)

FIGURA 11

Anti-LAG3 8B7 VH

4-34 de la línea germinal 8B7 VH	Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G S F S <u>CDR1</u> G Y Y W S W
4-34 de la línea germinal 8B7 VH	I R Q P P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D R N C CDR2
4-34 de la línea germinal JH5b de la línea germinal 8B7 VH	T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y C A R G <u>CDR3</u> N D E
JH5b de la línea germinal 8B7 VH	P W G Q G T L V T V S S S P

FIGURA 13

Anti-LAG3 8B7 VK

L6 de la línea germinal 8B7 VK	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S	<u>CDR1</u>
L6 de la línea germinal 8B7 VK	<u>Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F</u>	<u>CDR2</u>
L6 de la línea germinal 8B7 VK	S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y C Q Q R S N	<u>CDR3</u>
L6 de la línea germinal JK4 de la línea germinal 8B7 VK	<u>W P</u> L T F G G G T K V E I K	

FIGURA 14

Anti-LAG3 17E5 VK

<p>L6 de la línea germinal 17E5 VK</p>	<p>E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S -</p>
<p>L6 de la línea germinal 17E5 VK</p>	<p>Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F -</p>
<p>L6 de la línea germinal 17E5 VK</p>	<p>S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y C Q Q R S N -</p>
<p>L6 de la línea germinal JK5 de la línea germinal 17E5 VK</p>	<p>W P I T F G Q G T R L E I K -</p>

FIGURA 18

LAG-3 de Rhesus (XM_001108923)	(1)	MWEAQFLGLLFLQPLWVAVKPPQPGAEISVVWAQEGAPAQLPCSPPTIPL	50
clon de ADNc Pa23-5	(1)	MWEAQFLGLLFLQPLWVAVKPPQPGAEISVVWAQEGAPAQLPCSPPTIPL	100
LAG-3 de Rhesus (XM_001108923)	(51)	QDLsLLRRAGVTWQHQDSDSGPPAPAGHPHPAPGHRPAAPYSWGPRPRRYT	51
clon de ADNc Pa23-5	(51)	QDLsLLRRAGVTWQHQDSDSGPPAPAGHPHPAPGHRPAAPYSWGPRPRRYT	100
		bucle extra del péptido	
LAG-3 de Rhesus (XM_001108923)	(101)	VLSVPGGLRSGRLLPQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAT	101
clon de ADNc Pa23-5	(101)	VLSVPGGLRSGRLLPQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAT	200
LAG-3 de Rhesus (XM_001108923)	(151)	VHLRDRALSCRLRLRVGQASMTASPPGSLRTSDWVILNCFSRPRDRPASV	151
clon de ADNc Pa23-5	(151)	VHLRDRALSCRLRLRVGQASMTASPPGSLRTSDWVILNCFSRPRDRPASV	200
LAG-3 de Rhesus (XM_001108923)	(201)	HWFRSRGQGRVPVQGSPPHHHLAESFLFLPHVGPMDSLWGCILTYRDGFN	201
clon de ADNc Pa23-5	(201)	HWFRSRGQGRVPVQGSPPHHHLAESFLFLPHVGPMDSLWGCILTYRDGFN	250
LAG-3 de Rhesus (XM_001108923)	(251)	VSIMYNLTVLGLPATPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVGTQSFILAKWAP	251
clon de ADNc Pa23-5	(251)	VSIMYNLTVLGLPATPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVGTQSFILAKWAP	300
LAG-3 de Rhesus (XM_001108923)	(301)	PGGGPDLVAGDNGDFTLRLEDVVSQAQAGTYICHIRLQGGQLNATVTLAI	301
clon de ADNc Pa23-5	(301)	PGGGPDLVAGDNGDFTLRLEDVVSQAQAGTYICHIRLQGGQLNATVTLAI	350
LAG-3 de Rhesus (XM_001108923)	(351)	ITVTPKSFSGPSLGLKLLCEVTPASGQEHFVWSPLNTPSQRSFSGPWLEA	351
clon de ADNc Pa23-5	(351)	ITVTPKSFSGPSLGLKLLCEVTPASGQEHFVWSPLNTPSQRSFSGPWLEA	400

FIGURA 19

LAG-3 de Rhesus (XM 001108923) clon de ADNc Pa23-5	(401) 01)	QEAQLLSQFWQCQLHQGE T LLGAAVYFTELSSPGAQRSGRPFALRAGHL QEAQLLSQFWQCQLHQGE R LLGAAVYFTELSSPGAQRSGRPFALRAGHL	450 451
LAG-3 de Rhesus (XM 001108923) clon de ADNc Pa23-5	(451) 51)	PLFLILGVLFLLLLVTGAFGFHLWRRQRWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIE PLFLILGVLFLLLLVTGAFGFHLWRRQRWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIE	500
		Dominio transmembrana	
LAG-3 de Rhesus (XM 001108923) clon de ADNc Pa23-5	(501) 01)	ELEQEPELEPEPELERELGPPEPEPEPEPEQL- ELEQEPELEPEPELERELGPPEPEPEPEPEPEQL-	534

FIGURA 19 Cont.